

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS

ANALES
DE LA
ESTACION EXPERIMENTAL
DE AULA DEI



INDICE

	págs.
M. ^a DOLORES ANGULO y M. ^a CRUZ REAL. — Efectos de PCMB sobre <i>Digitalis thapsi</i>	85
M. ^a D. ANGULO, A. M. ^a SÁNCHEZ DE RIVERA y F. GONZÁLEZ BERNALDEZ. — Estudios cromosómicos en el género <i>Trifolium</i>	97
F. BAGULHO. — Perspectivas do melhoramento do <i>Triticum durum</i> em Portugal	111
M. T. BARRADAS y M. L. BARROS E SOUSA. — Alguns aspectos agronomicos de um ensaio de misturas de genotipos de <i>T. aestivum</i> ssp. <i>Vulgare</i> Makey	128
M. C. BARRADAS. — Notas sôbre algumas experiências de indução artificial de mutações com vista ao melhoramento de cevada para malte	154
A. FERNANDES & FILOMENA FRANÇA. — Sobre a descendência do cruzamento de triplóides em <i>Narcissus bulbocodium</i> L.	174
ROSETTE FERNANDES & MARIA TERESA LEITAO. — Contribuição para o conhecimento cário-sistemático do género <i>Myosotis</i> L.	210
A. FONTDEVILLA. — Interacción genotipo temperatura en cepas isogénicas de <i>Drosophila melanogaster</i>	223
ALBERTO PALLYART DO CARMO E FREITAS. — Linhas monogénicas de trigo na diferenciação de <i>Puccinia recondita</i> Rob. ex Desm.	235

	págs.
FRANCISCO GARCÍA OLMEDO. — Síntesis de proteínas y relaciones citogenéticas en el grupo <i>Aegilops-triticum</i>	245
R. GONZÁLEZ-DUARTE y A. PREVOSTI. — Polimorfismo de esterasas en <i>Drosophila subobscura</i>	256
RAMONA LORENTE. — Acción de mercuriales en mitosis vegetales	265
M. J. XAVIER MORATO e M. J. RODRIGUES CORREIA. — Ultraestructura e involução do nucléolo. O corpo nucleolóide citoplásmico	277
R. PARÉS-FARRÁS y J. GUINEA. — Transferencia interespecífica del factor episómico que condiciona la segregación de glutamato en <i>Citrobacter intermedium</i> C3	287
A. A. TEIXEIRA-PINTO. — Alterações cromosómicas em doentes injectados com dióxido de torio	297
M. C. FRIAS DÉ SÁ. — Um caso de amenorreia primaria com provavel transloção Y/D	303
M. C. FRIAS DÉ SÁ. — Anomalia cromosómica em doente oligofrénica	308
G. RIBO y A. PREVOSTI. — Viabilidad dependiente de las frecuencias génicas en varios mutantes de <i>Drosophila melanogaster</i>	313
C. RODRÍGUEZ MURCIA y J. J. ARROYO NOMBELA. — Acción citológica del Natulan (RO 4-6467) sobre un tumor ascítico de ratón	322
JULIÁN RUBIO. — Selección estabilizadora del número de quetas abdominales en <i>Drosophila</i>	334
ISIDRO SIERRA. — Resultados del "Cruce Industrial" en ganado ovino de raza Rasa aragonesa	373
LUIS DE O. M. DA COSTA E SOUSA. — Tipos florais da videira - revisão critica; proposta de classificação	381
A. VALLS. — Antropogenética de una población aislada de los Pirineos	396
A. VALLS, A. HAUSMAN-HAGEMELJER y J. FREDERIC. — Un caso de mosaicismo XO/Xx	411

En el presente volumen se recogen algunos de los trabajos originales presentados con ocasión de la celebración de las V JORNADAS DE GENÉTICA LUSO-ESPAÑOLAS que tuvieron lugar del 22 al 24 de octubre de 1968 en la Estación Experimental de Aula Dei (C.S.I.C.), Zaragoza, bajo la presidencia del Prof. Dr. Antonio Prevosti y actuando como Secretario General el Prof. Dr. Juan-Ramón Lacadena, y como Secretario por Portugal el Eng.º Agr.º Tristão Mello-Sampayo.

Las Jornadas de Genética Luso-Españolas tuvieron su nacimiento en el Simposio de Genética que, con motivo de la conmemoración del XXV aniversario del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, se celebró en el Centro de Investigaciones Biológicas (C.S.I.C.), Madrid, del 26 al 28 de octubre de 1964.

Las II Jornadas de Genética se celebraron en la Estação Agronómica Nacional, Oeiras, Portugal, del 19 al 22 de octubre de 1965.

Las III Jornadas de Genética tuvieron lugar en Madrid, en el Instituto Nacional de Investigaciones Agronómicas, del 6 al 9 de octubre de 1966.

Las IV Jornadas de Genética se celebraron del 9 al 11 de octubre de 1967 en el Centro de Biología del Instituto Gulbenkian de Ciência en Oeiras, Portugal.

La Estación Experimental de Aula Dei expresa su agradecimiento a la Caja de Ahorros y Monte de Piedad de Zaragoza, Aragón y Rioja, tanto por las facilidades concedidas para la celebración de las sesiones de trabajo como por la ayuda recibida para la edición de este volumen.

Las V JORNADAS DE GENETICA se desarrollaron de acuerdo con el siguiente

PROGRAMA

22 de octubre de 1968, Martes

- 9,15. Entrega de la documentación a los participantes.
- 10,15. Sesión inaugural:
- Palabras del Secretario General de las Jornadas Prof. Dr. JUAN-RAMON LACADENA CALERO.
- Palabras del Director de la Estación Experimental de Aula Dei, Dr. ANTONIO SILVAN LOPEZ.
- Palabras del Presidente de la Comisión Permanente de las Jornadas Profesor Dr. ANTONIO PREVOSTI PELEGRIN.
- 11,00. Descanso.
- 11,30. VALLS, A.
Estudio antropogenético de una población aislada del Pirineo.
- 11,50. BASABE, J. M.
Impresiones dermopapilares en el Pirineo aragonés y vasco-navarro.
- 12,10. PELLICER, A. y CASADO, A.
Estudio sobre la frecuencia de talasemia y G-6-PD en una población muestra extremeña.
- 12,30. Descanso.
- 12,40. MIRALLES, L. K. y Ortiz, E.
Inducción de mutaciones completas y en mosaico en *Drosophila melanogaster* por el sulfato de dietilo.
- 13,00. VICENTE, Y. y ORTIZ, E.
Inducción de mosaicos para «yellow» por etil-metano-sulfonato en machos de *Drosophila melanogaster* (Col.).

- 13,20. PETITPIERRE, E.
Análisis canónico de varias poblaciones catalanas de *Timarcha* (Col. Cris).
- 13,40. Comida.
- 15,30. GOROSPE, M. J. y TORROJA, E.
Efecto del ambiente en la valoración del lastre genético en poblaciones de *Drosophila*.
- 15,50. FONTDEVILA, A.
Interacción genotipo-temperatura en cepas isogénicas de *Drosophila melanogaster*.
- 16,10. RUBIO, J.
Selección estabilizadora del número de quetas abdominales en *Drosophila*.
- 16,30. GONZALEZ DUARTE, R. y PREVOSTI, A.
Polimorfismo de esterazas en *Drosophila suboscuro*.
- 16,50. Descanso.
- 17,10. GIMENEZ-MARTIN, G. y RISUEÑO, M. C.
La membrana celular generativa en el grano de polen como un sistema de secreción.
- 17,30. RISUEÑO, M. C.; GIMENEZ-MARTIN, G., y RODRIGUEZ-GARCIA, M. I.
Origen y desarrollo de los cuerpos de esporopolenina.
- 17,50. MOURA NUNES, J. F.; BASTOS, A. L.; TERRINHA, A. M.; VIGARIO, J. D.; MARQUES, D. V., y SILVA, J. F.
Perfis membranosos intranucleares no sarcoma 37 —forma ascítica— do murganho.
- 18,10. RODRIGUEZ-GARCIA, M. I.; RISUEÑO, M. C., y GIMENEZ-MARTIN, G.
Conexiones entre los meiocitos en vegetales.
- 18,30. Regreso a Zaragoza.

23 de octubre de 1968, Miércoles

SESION «A»

- 9,30. ABRISQUETA, J. A.
Cromatina sexual y anomalías sexuales.

- 9,50. SA, M. C. FRIAS
Um caso de amenorreia primaria com provável translocação Y/D.
- 10,10. TORRE, C. de la y GIMENEZ-MARTIN, G.
Polimorfismo del cromosoma Y en la población central española.
Polimorfismo y trisomía 21.
- 70,30. PINTO, A. A. TEIXEIRA
Anomalias cromosómicas em doentes injectados com dióxido de torio.
- 10,50. SA, M. C. FRIAS
Anomalia cromosómica em doente oligofrénica. Triplificação dos grandes braços do cromosoma X.
- 11,10. Descanso.
- 11,30. VALLAS, A.; HAUSMAN-HAGEMEIGER, A. y FREDERIC, J.
Un caso de mosaicismo 45 X/46 X, X (p-q).
- 11,50. PARES-FARRAS, R. y GUINEA, J.
Transferencia interespecífica del factor episómico que condicio-
na la segregación de glucamato en *C. intermedium* C-3.
- 12,10. SAEDLER, H.; GULLON, A., y STARLINGER, P.
Control negativo del operón de la galactosa en *E. coli*.
- 12,30. Descanso.
- 12,40. FERNANDEZ-GOMEZ, M. E.; LOPEZ-SAEZ, J. F.; GIMENEZ-
MARTIN, G., y GONZALEZ-FERNANDEZ, A.
Análisis de la interfase celular: Síntesis de proteínas, RNA y DNA.
- 13,00. WARDEN, J.
Inhibición de la actividad metabólica de los ácidos nucleínicos
en relación con la latencia de los pseudo-bulbillos en *Bryophy-
llum crenatum* Bak.
- 13,20. PAIS, M. S. SOARES
Desenvolvimento ultrastrutural dos cromoplastos nas flores de
híbridos de Aloe.
- 13,40. Comida.
- 15,30. RODRIGUEZ-MURCIA, C. y ARROYO, J. J.
Acción citológica del Natulán (R04-6467) sobre un tumor ascítico
de ratón.
- 15,50. VALLS, A. y MORATA, G.
Alteraciones cromosómicas inducidas por virus. I. Acción del
virus PPA sobre células de cerdo cultivadas *in vitro*.

- 16,10. VALLS, A.; MORATA, G., y PAVLICKOVA, M. L.
Alteraciones cromosómicas inducidas por virus. II. Acción del virus de la influenza sobre células tumorales de hamster.
- 16,30. ARROYO, J. J. y RODRIGUEZ-MURCIA, C.
Vimblastina: mecanismos de acción citológica.
- 16,50. Descanso.
- 17,10. MORATO, M. J. XAVIER y CORREIA, M. J. RODRIGUES
Sobre a ultrastrutura e a involução do nucléolo.
- 17,30. STOCKER, J. C. y FERNANDEZ-GOMEZ, M. E.
Un método simple para la impregnación argéntica del nucleolo en células vegetales.
- 17,50. TERRINHA, A. MARQUES
Estudo das inclusoes intranucleares indusidas pelo virus do variola ovina em células de músculo de embrião de ovino.
- 18,10. Regreso a Zaragoza.

23 de octubre de 1968, Miércoles

SESION «B»

- 9,30. FREITAS, A. P. DO CARMO
Linhas monogénicas de trigo na diferenciação de *Puccinia recondita* Rob. ex Desm.
- 9,50. MELLO-SAMPAYO, T.
Efeito do dosagem do cromosona 5B em trigo tetraploide.
- 10,10. LACADENA, J. R.
Meiosis en *Triticum durum* Desf. haploide.
- 10,30. GARCIA-OLMEDO, F.
Regulación genética de dos sistemas para síntesis de ésteres de beta-sitosterol en el trigo y especies afines.
- 10,50. GARCIA-OLMEDO, F.
Síntesis de proteínas y relaciones citogenéticas en el grupo *Triticum-Aegilops*.
- 11,10. Descanso.
- 11,30. ANGULO, M. D. y REAL, M. C.
Efectos de PCMB sobre *Digitalis thapsi* L. II.

- 11,50. BARRADAS, M. DAS TORRES y SAUSA, M. L. BARROS
Algunos aspectos agronómicos de um ensaio de misturas de ge-
notipos de *Triticum aestivum* ssp *vulgare* Mac Key.
- 12,10. BARRADAS, M. C. VICTORIA PIRES
Notas sobre algumas experiências de indução artificial de muta-
ções com vista ao melhoramento da cevada para malte.
- 12,30. Descanso:
- 12,40. BLANCO, M.; LORENZO-ANDREU, A. y BLANCO, J. L.
Modificaciones filotáxicas en maíz. II.
- 13,00. SILVELA, L.
Herencia del contenido total de aceite en el grano de maíz (*Zea
mays* L.). I. Covariancia de efectos génicos.
- 13,20. SILVELA, L.
Herencia del contenido total de aceite en el grano del maíz (*Zea
mays* L.). II. Efectos maternos.
- 13,40. Comida.
- 15,30. BAGULHO, F. J. CORTES
Perspectivas do melhoramento do *Triticum durum* em Portugal.
- 15,50. ALPUIM, M. DOS SANTOS HALL
Algunas notas sobre a enxertia do pinheiro manso (*Pinus pi-
nea* L.) em pinheiro bravo (*Pinus pinaster* L.).
- 16,10. SOUSA, M. L. MEIRELLES
Aspectos da enxertia homoplástica do pinheiro manso (*Pinus
pineae* L.).
- 16,30. GOMES, A. LOPES
Observações preliminares sobre a viabilidade da enxertia no
Eucalyptus globulus L.
- 16,50. Descanso.
- 17,10. ALMEIDA, J. L. FERREIRA
Melhoramento genético da videira (*Vitis vinifera* L.) em Portu-
gal: alguns resultados obtidos nos aspectos qualitativo e quan-
titativo.
- 17,30. SOUSA, L. O. MENDES DA COSTA
Cultivares de videira com flores de estames retroflectidos: Da
sua feminilidade e das limitações da sua cultura e da sua utili-
zação nos trabalhos de melhoramento.
- 17,50. SOUSA, L. O. MENDES DA COSTA
Tipos florais de videira. Revisão crítica; proposta de classificação.
- 18,10. Regreso a Zaragoza.

24 de octubre de 1968, Jueves

- 9,30. JORDANO, D.
Computación electrónica de cruzamientos dialélicos.
- 9,50. RODERO, A.; LEGUEY, N.; RIVAS, C., y JORDANO, D.
Análisis genético de cruces dialélicos en aves.
- 10,10. SIERRA, I.
Resultados del cruce industrial en ganado ovido de raza Rasa Aragonesa.
- 10,30. JOVER, A. y RODERO, A.
Nuestras investigaciones en el laboratorio de grupos sanguíneos y polimorfismo bioquímico.
- 10,50. ESPEJO, M. y DESVIGNES, A.
Determinismo genético de la actividad sexual estacionaria en la oveja.
- 11,10. Descanso.
- 11,30. GOMEZ-COMPO, C. y CASAS-BUILLA, M.
Efecto de las radiaciones ionizantes sobre el sexo de *Ecballium claterium* Rich.
- 11,50. ANGULO, M. D.; SANCHEZ DE RIVERA, A. M., y GONZALEZ-BELNALDEZ, F.
Estudios cromosómicos en el Género *Trifolium*.
- 12,10. FERNANDES, A., y FRANCA, F.
Sobre a descendência do cruzamiento de triplóides em *Narcissus bulbocodium* L.
- 12,30. Descanso.
- 12,40. BLANCO, J. L.; LORENZO-ANDREU, A., y BLANCO, M.
Meiosis y consanguinidad. III.
- 13,00. FERNANDES, R. M. BATARDA y LEITAO, M. T.
Contribuição para o conhecimento cário-sistemático do género *Myosotis* L.
- 13,20. LORENTE, R.
Acción de mercuriales en mitosis vegetales.
- 13,40. Comida.
- 15,30. RIBO, G. y PREVOSTI, A.
Viabilidad dependiente de las frecuencias génicas en varios mutantes de *Drosophila melanogaster*.

- 15,50. SALAS, E. y TORROJA, E.
Función de la heterosis en los fenómenos de adaptación a condiciones ambientales extremas en *Drosophila melanogaster*.
- 16,10. TORROJA, E. y SALAS, E.
Endogamia en poblaciones de *Drosophila melanogaster* sometidas a condiciones ambientales extremas.
- 16,30. Descanso.
- 16,50. Sesión para tratar diversos asuntos según el orden del día que será establecido previamente.
Nombramiento de Presidente de la Comisión Permanente de las Jornadas. Elección de nuevo Secretario para Portugal.
- 17,50. Sesión de clausura.
- 18,30. Traslado a Cogullada.
Recepción ofrecida a los participantes por la Caja de Ahorros y Monte de Piedad de Zaragoza, Aragón y Rioja, en los salones de la Casa de Economía Rural y Capacitación Agrícola de Nuestra Señora de Cogullada.

Dadas las características especiales de este Volumen, la COMISION DE PUBLICACIONES DE LA ESTACION EXPERIMENTAL DE AULA DEI ha considerado oportuno respetar la presentación de los originales tal como han sido enviados por los autores respectivos.

Efectos de PCMB sobre *Digitalis thapsi*

por M.^a DOLORES ANGULO y M.^a CRUZ REAL

Instituto de Genética y Antropología, Sección de Citogenética Vegetal, C. S. I. C.

Hemos estudiado anteriormente (Angulo, et al. 1967 b-en prensa) la acción del P-cloromercuribenzoato (PCMB) sobre *Digitalis thapsi* para comprobar su actividad como agente mutagénico en comparación con los efectos inducidos por colchicina. Como continuación de estas experiencias presentamos los resultados obtenidos en el estudio de la segunda floración de plantas de *D. thapsi* tratadas inicialmente con PCMB en el año 1966, así como las primeras observaciones de la F₁, cuyo estudio iniciamos en la primavera de 1968.

Asimismo damos un avance de los nuevos estudios comparativos que estamos realizando sobre la acción mutagénica de ambos agentes, utilizando concentraciones molares más bajas que las empleadas anteriormente. Estos ensayos tienen por objeto comprobar la actividad biológica del PCMB dada la especificidad de este agente para actuar en *Allium cepa* a concentraciones débiles y con acción citológica persistente (Angulo et al. 1965 b).

MATERIAL Y METODOS

Con objeto de estudiar los efectos de PCMB y colchicina a concentraciones similares se realizaron ensayos durante 1966 sobre

D. thapsi con diluciones de 0,2; 0,1 y 0,05 % y tratamientos de una y dos horas.

En 1967-68 se realizó una nueva serie de experimentos con concentraciones molares de PCMB de 1×10^{-2} M, 1×10^{-3} M y 1×10^{-4} M, utilizando esta última por su gran efectividad para inducir aberraciones citológicas persistentes en *A. cepa*, ensayando también concentraciones análogas de colchicina para estudiar comparativamente sus efectos.

La duración de los tratamientos fue de 2 y 4 horas. Se aplicaron, principalmente, sobre primordios foliares de plántulas de 8 a 12 días de edad, ya que los tratamientos en semillas germinadas y en primordios radiculares fueron letales en gran proporción.

OBSERVACIONES

El estudio de la segunda floración de plantas tratadas en 1966, correspondiente al año 1968, ha mostrado las mismas variaciones fenotípicas ya aparecidas en la primavera anterior.

Las plantas de *Digitalis thapsi* pierden sus tallos y hojas después de la floración y maduración de los frutos y los nuevos tallos empiezan a brotar inmediatamente después para florecer en primavera.

Las principales características anormales observadas son las siguientes:

a) *Modificación en el porte general de la planta.*

Esta población presentó, en general, un porte más vigoroso que el material testigo, aunque en este segundo año su desarrollo vegetativo fue menor que el año anterior, hecho frecuente en este género de plantas silvestres cuando se cultivan en invernadero durante un período de tiempo largo y que se observó también en los testigos.

b) *Modificaciones en el sistema foliar.*

Se siguen manifestando de modo persistente, las variaciones de las hojas que muestran bordes ondulados y limbos más anchos y redondeados que las normales, apareciendo, en otros casos, hojas de limbos engrosados y de color verde oscuro.

c) *Modificaciones en los tallos*, presentando principalmente variaciones de coloración, intenso color morado en algunas plantas.

d) *Modificaciones de la coloración normal de las flores* que van del blanco y malva pálido hasta el púrpura intenso característico de las flores de *D. purpurea*.

e) *Modificaciones en las manchas*. También aparecen corolas con manchas típicas de las flores de *D. purpurea*.

f) *Modificaciones en la forma de las flores*.

En la segunda floración se observaron corolas con aspecto similar a las flores de *D. lutea* (aparecidas en sectores quimerales), así como el carácter pétalo supernumerario exhibido por una de las plantas, en su primera floración. Observamos en una de las flores de esta misma planta el carácter anormal corola con tres lóbulos.

Un resumen de los resultados correspondientes a la primera y segunda floración de plantas tratadas con PCMB se recoge en el cuadro 1.

CUADRO 1. — *Variaciones fenotípicas inducidas en Digitalis Thapsi por PCMB (plantas tratadas en 1966).*

		<i>Organos afectados</i>			
		<i>Hojas</i>	<i>Tallos</i>	<i>Flores</i>	
				<i>Color</i>	<i>Forma</i>
1.ª floración abril 1967	a) rizadas	Coloración morada	a) malva muy pálido b) púrpura intenso c) moteado morado	a) tipo «lutea» b) pétalo independ. c) 5 lóbulos	
	b) sentadas				
	c) verde intenso				
	d) limbo prolongado				
2.ª floración abril 1968	a) ídem	ídem	a) ídem b) » c) »	a) ídem b) » c) 3 lóbulos	
	b) »				
	c) »				
	d) limbo redondeado				



LÁMINA I. Variaciones fenotípicas inducidas en *D.thapsi* mediante tratamientos con p-cloro-mercuribenzoato; FIG. 1) Rama quimeral con flores tipo «lutea» (1.^a floración); FIG. 2) Comparación de tallos quimerales y normales (2.^a floración), aparecidos en el primer ciclo floral de la misma planta y aislados posteriormente; FIG. 3) Detalle de ramas quimerales y normales, dónde se aprecian las diferencias morfológicas de las corolas.

Producción de quimeras

En algunas plantas de la población, inicialmente tratadas con PCMB, se observó la aparición de quimeras con flores anormales tipo "lutea" (fig. 1). En la segunda floración han seguido observándose, en algunas plantas, sectores quimerales "lutea", que se manifestaron del modo siguiente:

a) En plantas que ya exhibieron este carácter en la primavera anterior. Los sectores quimerales y normales fueron separados y plantados en tiestos diferentes. El sector "lutea" produjo un único tallo tipo "lutea" que fue estéril en esta segunda floración (figuras 2 y 3).

b) En plantas con dos tallos donde ha aparecido por primera vez un tallo quimeral tipo "lutea", mientras que en el otro se manifestaron las modificaciones de los caracteres típicos de las hojas y color de las flores aparecidas en la floración anterior. Algunas de las flores "lutea" han producido semillas aparentemente fértiles al ser cruzadas por flores con morfología normal aparecidas en otras ramas de la misma planta.

c) En plantas que tuvieron todos sus tallos normales en la primera floración y que produjeron en la segunda un tallo único quimeral tipo "lutea".

El resultado comparativo sobre producción de quimeras en la 1.^a y 2.^a floración de plantas tratadas con PCMB, se recogen en el cuadro número 2.

CUADRO 2.— *Variaciones fenotípicas inducidas en Digitalis Thapsi por PCMB (plantas tratadas en 1966).*

<i>Quimeras</i>	
<i>Primera floración</i>	<i>Segunda floración</i>
a) En plantas con ramas principales de flores normales y ramas quimerales tipo «lutea».	a) En plantas con ramas principales de flores normales y ramas quimerales tipo «lutea».
b) En plantas con pequeños brotes quimerales tipo «lutea».	b) En plantas con un tallo quimeral tipo «lutea» aparecido por primera vez en la segunda floración, y otro tallo normal.
c) En plantas con pequeños brotes quimerales mixtos de flores normales y tipo «lutea».	c) En plantas con un único tallo tipo «lutea» que mostró caracteres normales en su primera floración.

Observaciones correspondientes a la población F₁

En relación con los caracteres observados en la F₁, los datos obtenidos hasta la fecha no permiten sacar conclusiones definitivas, ya que la totalidad de la población no había alcanzado su pleno desarrollo excepto en algún caso esporádico de florecimiento precoz. No obstante podemos indicar que, en general, el aspecto fenotípico de esta población acusa la transmisión de los siguientes caracteres mutantes aparecidos en la generación anterior:

Modificaciones en el sistema foliar; presentando las hojas limbos ensanchados, de color verde oscuro y bordes ondulados y acentuadamente aserrados, en contraste con la forma lanceolada y el color verde amarillento de las hojas normales de *D. thapsi*.

Modificaciones en los tallos con variaciones de coloración, transmitiéndose el carácter morado de los tallos.

Modificaciones en el color de las flores; variaciones en la coloración de las flores que presentan la misma coloración anormal exhibida por las plantas genitoras.

Observaciones sobre la actividad mutagénica del PCMB y colchicina a concentraciones bajas

En las poblaciones tratadas con PCMB y colchicina con el fin de verificar la efectividad de estos agentes a diluciones débiles, solamente algunos individuos alcanzaron su pleno desarrollo en la primavera de 1968. Sin embargo, podemos indicar que, en general, las concentraciones utilizadas han sido efectivas para inducir variaciones fenotípicas que afectan, de modo especial, a la morfología de la hoja. Se observan asimismo modificaciones de la coloración y estructura de la corola en los escasos individuos que llegaron a la fase de floración.

Concentración 0,01 M

En la primera fase de desarrollo de las plantas tratadas las hojas aparecieron frecuentemente deformes y con bordes irregularmente dentados y rizados. El tratamiento también afectó al desarrollo de algunos individuos. El grado de crecimiento de la población no permitió la observación de plantas en flor.

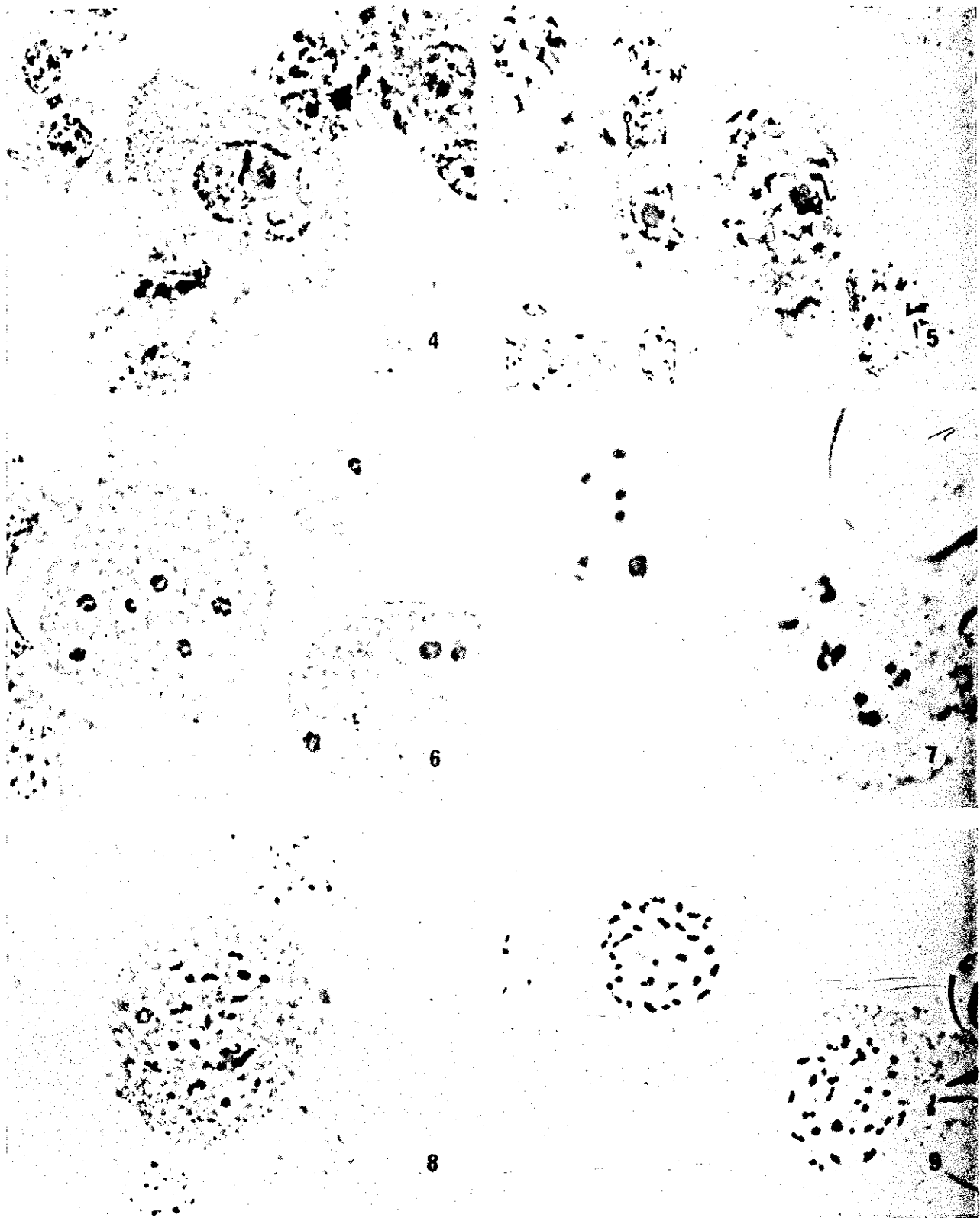


LÁMINA II. Anormalidades observadas en células meióticas de plantas de *D.thapsi* tratadas con PCMB; FIG. 4) Paquítena alterada con condensaciones de heterocromatina; FIG. 5) Diacinesis con distribución irregular de cromosomas y dos nucleolos; FIG. 6) Tétrada anormal (6 núcleos); FIG. 7) Tétrada anormal (5 núcleos) y célula con condensaciones irregulares de cromatina; FIG. 8) Diacinesis con asociaciones de bivalentes; FIG. 9) Diacinesis normal con apareamiento regular de bivalentes.

Concentración 0,001 M

Se observaron anomalías en las hojas, consistentes en bordes dentados y rizados que persisten a través del desarrollo de la planta, igualmente afectado en algunos casos, apareciendo individuos con mayor vigor y crecimiento que las plantas testigo, y otros con desarrollo muy precario. También se han observado sensibles variaciones en el porte general de las plantas.

Concentración 0,0004 M

Las concentraciones más débiles también se mostraron efectivas para inducir anormalidades foliares bastante acusadas, tales como limbos redondeados, con peciolo acortado y bordes rizados.

Estos tratamientos también se muestran capaces de inducir notables alteraciones de los caracteres florales. Se observan flores con labio inferior prolongado y corolas hendidas, en relación con las características normales de las plantas de *D. thapsi*.

Observaciones citológicas

Hemos iniciado el estudio de la meiosis en aquellas plantas que presentaban mayor interés por sus características morfológicas y cuyas flores se dedicaron, principalmente, a realizar autofecundaciones y cruzamientos con el fin de obtener semillas fértiles. Por

CUADRO 3.— *Anormalidades observadas en CMP de plantas de D. Thapsi tratadas con PCMB.*

<i>Concentraciones y h. tratamiento</i>	<i>Efectos</i>	<i>Características de las plantas</i>
0,2 % (1 h.)	Paquitenas alteradas con condensaciones de heterocromatina (fig. 4) Diacinesis con distribución irregular de cromosomas y dos nucleolos (figura 5).	Planta en segunda floración que presentaba significativas anomalías en la estructura de las flores (corolas tipo «lutea») en tallos quimerales. (Ensayo comparativo de PCMB y Colchicina).
0,001 M (2 h.)	Tetradas con 3 y 6 núcleos (fig. 6). Idem con 5 núcleos y célula con condensaciones irregulares de cromatina (fig. 7).	Planta con florecimiento precoz, en primera floración, que presentaba discretas alteraciones del fenotipo normal en tallos, hojas y flores.
0,0004 M (2 h.)	Ligeras irregularidades del proceso meiótico en diacinesis (fig. 8).	Planta con sensibles anomalías en tallos, hojas y flores.

este motivo hemos podido disponer de un escaso número de capullos para el estudio citológico.

Los caracteres fenotípicos de los capullos fijados no pudieron comprobarse por ser preciso hacer la fijación en una fase muy atrasada de su desarrollo.

Los primeros resultados del estudio de CMP se recogen en el cuadro núm. 3 (pág. 92).

De la observación del cuadro se deduce que las principales anomalías meióticas corresponden a las tétradas con número irregular de núcleos (figs. 6 y 7). También se observaron irregularidades en paquitenas (fig. 4) y en diacinesis (figs. 5 y 8). La figura 9 corresponde a una diacinesis de tipo normal.

DISCUSION

Se ha considerado con amplitud la importancia de los grupos —SH en el mecanismo de la mitosis. (Rapkine 1931-1938; Jensen, 1949; Barron, 1951; Gompel, 1952; Hyde y Paliwal, 1958; Zimmerman, 1960; Kane, 1962; Lallier, 1962.) Principalmente los trabajos de Mazia (1959, 1960, 1961) pusieron de manifiesto la acción de inhibidores químicos de sulfhidrilos sobre el aparato mitótico entre los que el PCMB se ha mostrado muy efectivo.

Nosotros tuvimos interés en estudiar la actividad citológica y capacidad mutagénica de este compuesto de mercurio en *D. thapsi*, comparando sus efectos con los inducidos por colchicina en esta especie, (Angulo y Real, 1958-67) aplicando ambos agentes a dosis relativamente elevadas, y pudimos comprobar la gran efectividad del PCMB como agente inductor de variaciones fenotípicas (Angulo loc. cit. 1967 b).

En el presente trabajo, el estudio de la segunda floración de las plantas tratadas con PCMB en el año 1966, ha ofrecido una confirmación de la persistencia de acción de este agente químico, cuyos efectos se mantienen a través de sucesivos ciclos de división celular, ya que se han registrado en las plantas tratadas las mismas anomalías observadas en la primera floración, destacando por su interés la producción de quimeras idénticas a las obtenidas en el primer año.

Asimismo las características fenotípicas de los individuos de la F₁, cuyo desarrollo precoz permitió el estudio de todos sus caracteres, parecen mostrar la eficacia de este compuesto de mercurio para inducir variaciones transmisibles a la descendencia.

Por otra parte, concentraciones molares de PCMB y colchicina, más débiles que las empleadas anteriormente, se muestran efectivas para inducir alteraciones notables de los caracteres normales de las hojas y flores en *D. thapsi*, poniendo de manifiesto la capacidad mutagénica de ambos agentes, aún actuando a concentraciones bajas.

En el estado actual del trabajo y a la vista de la información obtenida, resulta prematuro pronunciarse sobre la naturaleza de las variaciones fenotípicas inducidas en *D. thapsi*, por PCMB. Conociendo las propiedades biológicas de este agente se puede atribuir su actividad mutagénica a los efectos inducidos sobre el aparato mitótico, debidos a su acción metabólica específica como bloqueante de sulfhidrilos.

RESUMEN

Como continuación de nuestras experiencias sobre acción mutagénica del PCMB en *Digitalis thapsi* presentamos los resultados obtenidos en la segunda floración de plantas tratadas inicialmente en 1966, así como los datos correspondientes a las primeras observaciones de la F₁, iniciadas en la primavera de 1968 y que muestran la eficaz y persistente acción de este agente para inducir variaciones fenotípicas transmisibles.

También exponemos un avance de los nuevos estudios comparativos sobre acción mutagénica de PCMB y colchicina empleando concentraciones más bajas que las ensayadas anteriormente.

En todos estos ensayos se pone de manifiesto la actividad mutagénica de ambos agentes para inducir notables variaciones fenotípicas aun aplicados a concentraciones débiles.

Las observaciones iniciales hechas en CMP mostraron la existencia de algunas irregularidades meióticas, destacando la producción de tétradas con 3, y 6 núcleos.

SUMMARY

We have continued our experiments about the mutagenic action of PCMB on *Digitalis thapsi*, and we report the results obtained in the second blossoming of plants originally treated in 1966. We present as well the data relative to our initial observations—started in the Spring of 1968—on F_1 , which show an efficient and permanent ability of PCMB to induce transmissible phenotypical variations.

We also present an advance of our new comparative studies on the mutagenic action of PCMB and colchicine, both of which turned out to be active in the induction of remarkable phenotypical variations, even when used at lower concentrations than at those previously studied.

Our first observations on PMC showed some meiotic irregularities, the most striking of which were tetrads with 3, 5 and 6 nuclei.

REFERENCIAS

- ANGULO CARPIO, M.^a D.
1958 Variaciones florales en *Digitalis thapsi* obtenidas por medio de colchicina. *Genét. Ibér.*, 10 (1-2): 57-66.
- ANGULO CARPIO, M.^a D.
1959 Idem. II (estudio F_1) *Genét. Ibér.*, 11 (3-4): 175-216.
- ANGULO CARPIO, M.^a D.
1961 Idem. III (estudio F_2) *Genét. Ibér.*, 13 (3-4): 87-103.
- ANGULO CARPIO, M.^a D. y REAL, M.^a C.
1965a Idem. IV (estudio F_3) *Genét. Ibér.*, 17 (1-2): 81-94.
- ANGULO CARPIO, M.^a D., SILIO, F. y FIGUERAS, C.
1965b Acción de sustancias bloqueantes de sulfhidrilos sobre la división celular. *Genét. Ibér.*, 17 (3-4): 269-302.
- ANGULO CARPIO, M.^a D. y REAL, M.^a C.
1967 Variaciones florales inducidas en *Digitalis thapsi* V. (Estudio F_4 y F_5). *Rev. Biol. (Lisboa)* 6, n.º 3-4: 327-336.
- ANGULO CARPIO, M.^a D., FIGUERAS, C. y REAL, M.^a C.
1967b Posibilidades del PCMB como agente mutágeno. *Melhoramento* (en prensa).
- BARRON, E. S. G.
1951 Thiol groups of biological importance. *Advan. Enzimol.*, XI, 201-66.

- GOMPLE, C.
1952 Sur l'inactivation du fuscau chez la souris par les substances thiolooprives. *Rev. Belge Pathol. Med. Exptl.*, **22**: 85-92.
- HYDE, B. B. and PALIWAL, R. L.
1958 Sulphydryls in plant chromosomes. *Proc. Intern. Cong. Genet. 10th Montréal*, **2**: 130.
- JENSEN, E. V.
1949 Sulphydryl. Disulfide interchange. *Science*, **130**: 1319-23.
- KANE, R. E.
1962 The mitotic apparatus. Fine structure of the isolated unit. *J. Cell. Biol.*, **15**: 279-87.
- LALLIER, R.
1962 Les effets du thiosorbitol et du thiglyceron sur la structure de l'appareil mitotique de l'oeuf de l'oursin *Paracentrotus lividus*. *J. Cell. Biol.*, **15**: 382-84.
- MAZIA, D.
1959 The role of thiol groups in the structure and function of the mitotic apparatus. Sulfur Proteins. *Proc. Symp. Falmouth, Mass, 1958*: 367-89.
- MAZIA, D.
1961a Mitosis and the physiology of cell division. *Cell Biochem. Physiol. Morphol.*, **III**: 77-412.
- MAZIA, D.
1961b The central problems of the biochemistry of cell division. *Bibl. Struct. Function Proc. IUB/IUBS. Intern. Symp. Ist. Stockholm, 1960*, **II**: 475-96.
- MAZIA, D., HARRIS, J. P. y BIBRING, T.
1960 The multiplicity of the mitotic centers and the time course of their duplication and separation. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **7**: 1-20.
- RAPKINE, L.
1931 Sur les processus chimiques au cours de la division cellulaire. *Ann. Physiol. Physicochem. Biol.*, **7**: 382-418.
- RAPKINE, L.
1937 Sur les processus chimiques au cours de la division cellulaire. III. Inhibition et rétablissement de la division cellulaire. *J. Chim. Phys.*, **34**: 416.
- RAPKINE, L.
1938a Rôle des groupements sulphydrilés dans l'activité de l'oxydoreductase du triosephosphate. *Compt. Rend.*, 207-301.
- RAPKINE, L.
1938b Sulphydryl groups and enzymic oxido-reduction. *Biochem. J.*, **32**: 1729-39.

Estudios cromosómicos en el género *Trifolium*

por ANGULO, M. D., SÁNCHEZ DE RIVERA, A. M. y GONZÁLEZ BERNALDEZ, F.

Instituto de Genética y Antropología.
Sección de Citogenética Vegetal e Instituto de Edafología y Biología Vegetal, C. S. I. C.
Madrid

INTRODUCCION

Iniciamos nuestros trabajos cariológicos sobre el género *Trifolium* estudiando tres subespecies de *T. subterraneum*, KATZNELSON and MORLEY (1965), *T. subterraneum* ssp. *subterraneum* var. *subterraneum*; *T. subterraneum* L. ssp., *Yanninicum*, KATZN. et MORLEY; *T. subterraneum* L. ssp. *Brachycalycinum*, KATZN. et MORLEY var *flagelliforme* Guss. ANGULO et al (1968). En este trabajo pudimos estudiar los cromosomas mitóticos de cinco líneas de *T. subterraneum*, Tallarook, Dwalganup, Mt. Barker, Yarloop y Clare, comprobando que su complemento diploide es $2n = 16$. Asimismo establecimos los tipos morfológicos de cromosomas correspondientes al cariotipo de la cultivar Clare, que aparentemente parece el mismo para todas las variedades estudiadas. También pudimos realizar estudios sobre meiosis que confirmaron los resultados del análisis mitótico dando un número haploide $n = 8$.

Continuando estas investigaciones, presentamos en esta comunicación los nuevos estudios realizados sobre especies españolas de la subsección *Probatostoma* de la sección *Eulagopus* perteneciente al subgénero *Lagopus*, sobre las que se carecía de información ci-

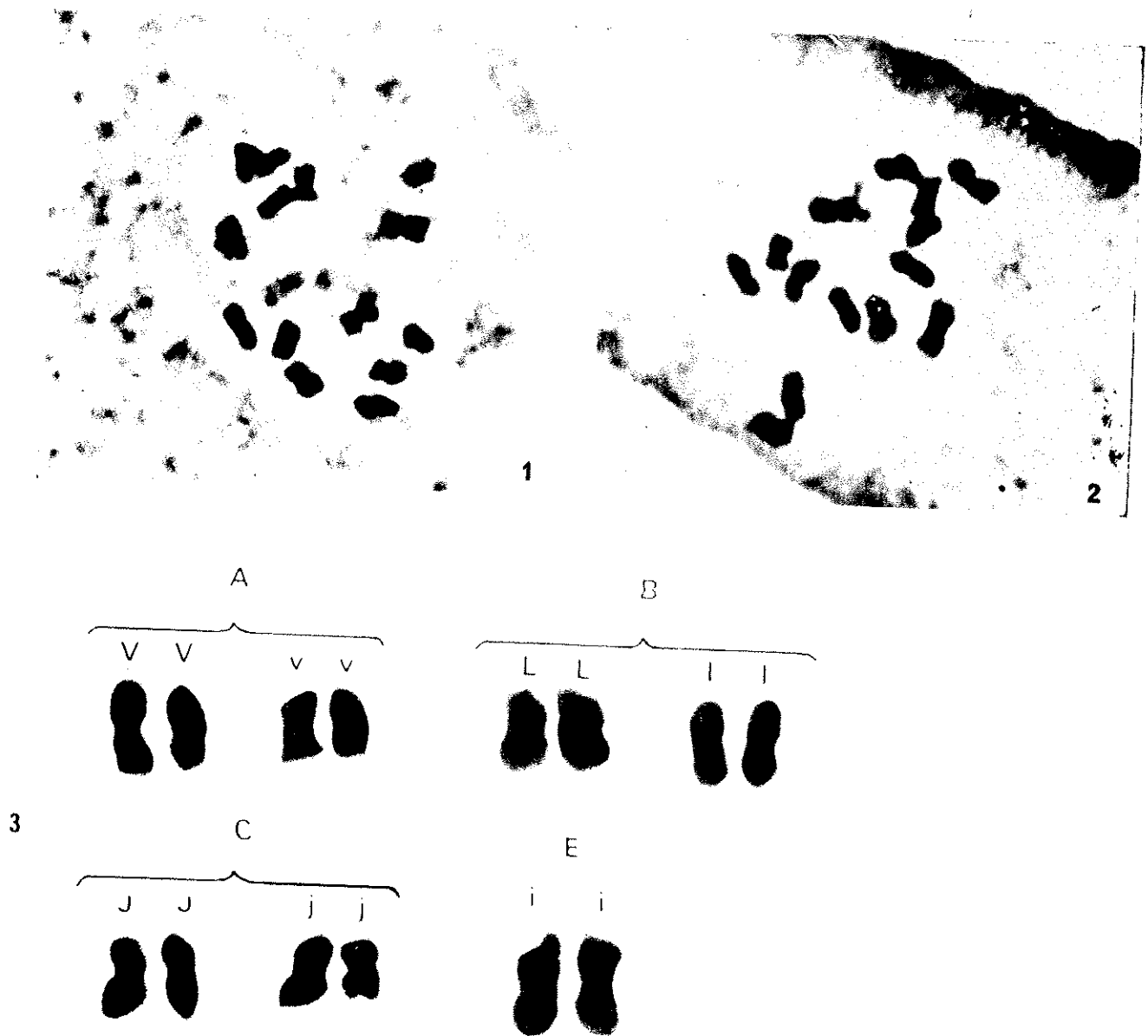


LÁMINA I. Cromosomas mitóticos de *T. phleoides* Pourr: FIG. 1) Metafase que muestra el número somático de esta especie, $2n = 14$; FIG. 2). Otra metafase $\times 6.553$ que muestra las características morfológicas del cariotipo que ha servido para confeccionar el idiograma; FIG. 3) Idiograma. Metafase $\times 11.570$.

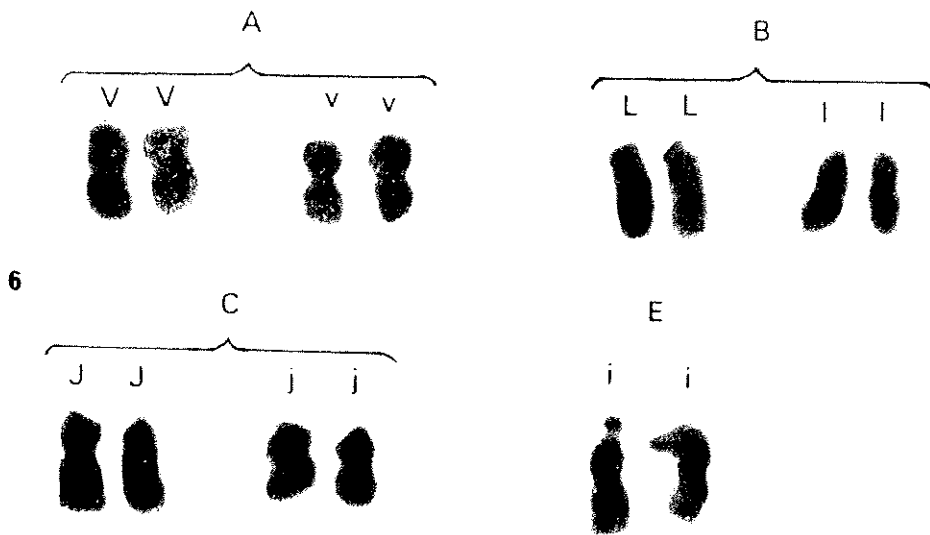
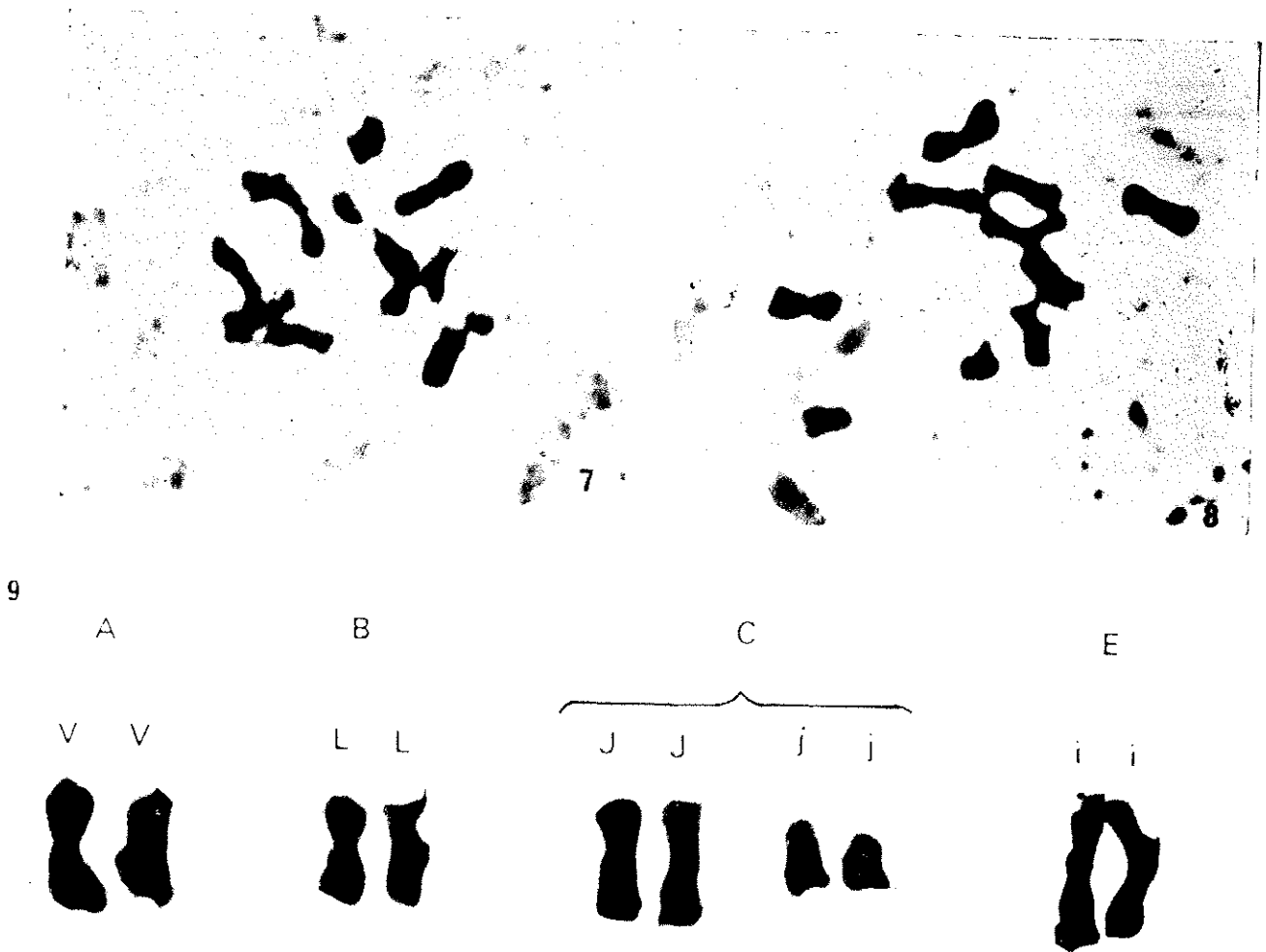


LÁMINA II: Cromosomas mitóticos de *T. gemellum* Pourr: FIG. 4) Metafase que muestra el número somático de esta especie, $2n=14$; FIG. 5) Otra metafase $\times 4.480$ que muestra las características morfológicas del cariotipo que ha servido para confeccionar el idiograma; FIG. 6) Idiograma. Metafase $\times 7.800$.



LAMINA III. Cromosomas mitóticos de *T. Cherleri* L.; FIG. 7) Metafase que muestra el número somático de esta especie, $2n = 10$; FIG. 8) Otra metafase $\times 4.480$ que muestra las características morfológicas del cariotipo que ha servido para confeccionar el idiograma; FIG. 9) Idiograma. Metafase $\times 7.040$.

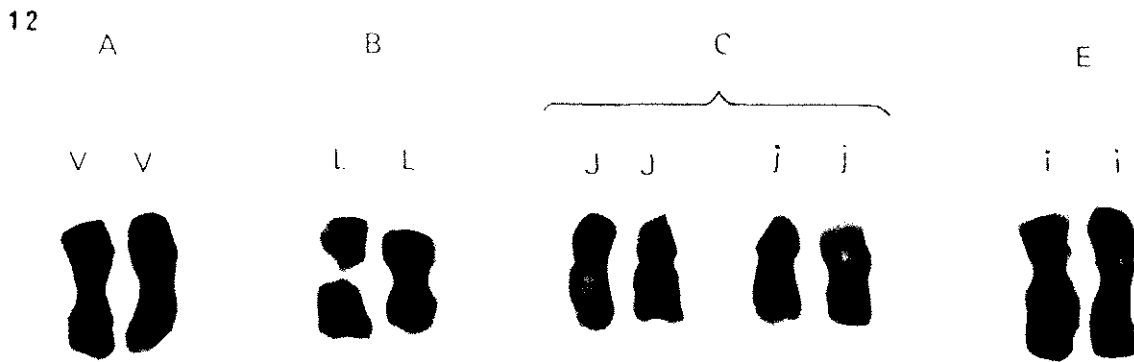
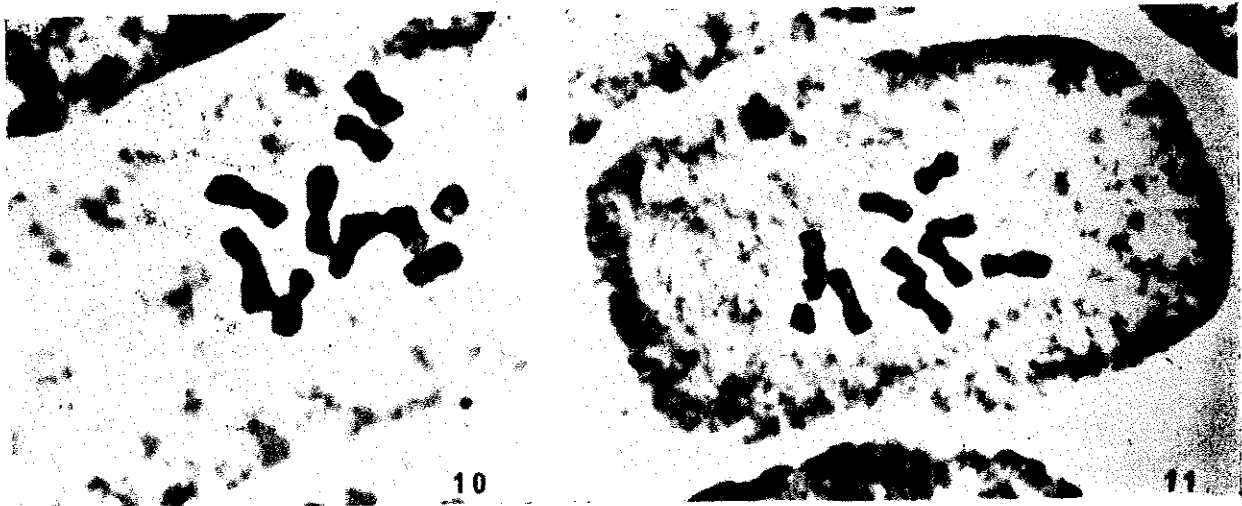


LÁMINA IV. Cromosomas mitóticos de *T.hirtum* Pourr: FIG. 10) Metafase que muestra el número somático de esta especie, $2n=10$; FIG. 11) Otra metafase $\times 3.200$ que muestra las características morfológicas del cariotipo que ha servido para confeccionar el idiograma; FIG. 12) Idiograma, Metafase $\times 6.780$.

tológica. Este trabajo forma parte de un programa en el que pretendemos estudiar las tendencias evolutivas de las especies anuales españolas del género, que desempeñan un papel importante como fijadoras de nitrógeno en los pastizales de la zona subárida española. Muchas especies del subgénero *Lagopus* merecen un estudio detallado con miras a su utilización en la mejora de pastos extensivos y control de la erosión en la región mediterránea. En esta aportación nos hemos centrado en las especies que ofrecían las lagunas de información más notables.

MATERIAL Y METODOS

Las especies estudiadas en este trabajo son: *Trifolium phleoides* Pourr. (población de semillas recogidas en Urda, Toledo, *T. gemellum* Pourr. (semillas recolectadas en Navarredonda, Madrid), *T. Cherleri* L. y *T. hirtum* All. (semillas recolectadas en los terrenos de la "Urbanización la Chopera", junto a Madrid.

Para el estudio citológico de la mitosis utilizamos meristemos radiculares y el método citológico de TJIO y LEVAN (1950). Las semillas fueron sometidas a pre-tratamiento con oxiquinoleína en solución 0,002M durante 1 y 2 horas.

Habíamos comprobado en nuestro anterior trabajo —después de numerosas pruebas con otras sustancias— que el pretratamiento con oxiquinoleína era el mejor medio para permitir la observación microscópica de un material tan poco favorable al estudio citológico. Los ápices radiculares fueron fijados en Carnoy 3 : 1 y teñidos con orceína acética al 2 por ciento.

La nomenclatura de las formas específicas y de las Secciones y otras divisiones del género *Trifolium* comentadas aquí, es la de VICIOSO (1952).

OBSERVACIONES

T. phleoides Pourr.

No hemos encontrado ninguna referencia citológica a esta especie en la bibliografía. Posee complemento diploide $2n = 14$, bastante menos frecuente que el núm. $2n = 16$ en el género.

El examen de los tipos cromosómicos nos ha llevado a establecer su cariotipo, que siguiendo la clasificación de LEVAN *et al.* (1964) e ISING (1967) —lo mismo que para el resto de las especies— responde a las siguientes características:

- Grupo A) *Cromosomas con centrómero en posición mediana.*
2 pares de homólogos: uno de dimensiones grandes y otro algo más pequeño (V) (v).
- " B) *Cromosomas con centrómero en posición submediana.*
2 pares de homólogos con pequeñas diferencias de tamaño (L) (l).
- " C) *Cromosomas con centrómero en posición subterminal.*
2 pares de homólogos con pequeñas diferencias de tamaño (J) (j).
- " E) *Cromosomas de grandes dimensiones tipo SAT* (el más largo del complemento diploide) (i).

T. gemellum Pourr.

Esta especie es relativamente vecina de la anterior, pero merece claramente una categoría específica distinta, como señala VICIOSO (1952), y como hemos podido comprobar nosotros mismos en los varios centenares de ejemplares que hemos recogido. Su área geográfica es más reducida que la de la anterior, limitándose a la Península Ibérica y Marruecos. El habitat es también claramente distinto del de la especie anterior, tolerando suelos más secos y compitiendo menos con la vegetación favorecida por la humedad.

No existen indicaciones citológicas en la bibliografía sobre esta interesante especie. Hemos encontrado también que su complemento diploide es $2n = 14$. Su cariotipo, muy semejante al de *T. phleoides*, está de acuerdo con el parentesco taxonómico y se representa mediante el siguiente idiograma:

- Grupo A) *Cromosomas con centrómetro en posición mediana.*
2 pares de homólogos: uno de dimensiones grandes y otro más pequeño (V) (v).
- " B) *Cromosomas con centrómetro en posición submediana.*
2 pares de homólogos con pequeñas diferencias de tamaño (L) (l).

- " C) *Cromosomas con centrómetro en posición subterminal.*
2 pares de homólogos con pequeñas diferencias de tamaño (J) (j).
- " E) *Cromosomas de grandes dimensiones tipo SAT* (el más largo del complemento diploide (i).

T. Cherleri L.

La morfología de *T. Cherleri* L. le hace aparecer vecino de otra especie anual mediterránea *T. hirtum* All. al que con exagerado criterio le habían subordinado GIBELLI y BELLI (1893). *T. Cherleri* presenta, sin embargo, diferencias muy notables e interesantes adaptaciones, como el comportamiento de los capítulos semiglobosos muy pronto caedizos y que permanecen durante mucho tiempo adheridos a la superficie del suelo. En estos capítulos van germinando alternativamente cada año en número reducido las semillas que contiene, debido a una desaparición progresiva de la dormancia. La permanencia del capítulo y su utilización alternativa por distintas plántulas debe probablemente tener un papel competitivo, manteniendo la humedad del suelo en los primeros milímetros de la superficie de éste y ocupando una pequeña pero decisiva zona de terreno. Es notable la ausencia de investigaciones sobre esta especie, una de las menos exigentes en nutrición y humedad del género.

Hemos encontrado que *T. Cherleri* L. posee complemento diploide $2n = 10$, número que hasta ahora solamente se había encontrado en dos especies, *T. scabrum* (LARSEN, 1960 y KLIPHUIS, 1962) y *T. hirtum* (BRITTEN, 1963 b), constituyendo una notable excepción dentro de las 75 especies de las que poseemos datos (BRITTEN, 1963 a).

Igualmente la morfología de los cromosomas de *T. Cherleri*, es muy semejante a la de *T. hirtum*, lo que también está de acuerdo con la semejanza anatómica de ambas especies.

Las características generales del cariotipo corresponden a los siguientes tipos morfológicos que se representan mediante este idiograma:

- Grupo A) *Cromosomas con centrómero en posición mediana.*
1 par de homólogos de grandes dimensiones (V).

- " B) *Cromosomas con centrómero en posición submediana.*
1 par de homólogos (L).
- " C) *Cromosomas con centrómero en posición subterminal.*
2 pares de homólogos. Uno de grandes dimensiones (J) y otro pequeño (j) (el menor de todo el complemento diploide).
- " E) *Cromosomas de grandes dimensiones tipo SAT* (el más largo del complemento diploide).
1 par de homólogos (i).

T. hirtum All.

El número cromosómico de esta especie $2n = 10$ fue determinado por BRITTEN (1963 a, 1963 b) que llamó la atención sobre el carácter excepcional del número básico 5 en el género *Trifolium*. Este autor, sin embargo, no establece las características del cariotipo, que hemos examinado, sobre todo, por el interés de la comparación con el de *T. Cherleri* L., con el que presenta estrechas analogías. Comprende los siguientes tipos morfológicos:

- Grupo A) *Cromosomas con centrómero en posición mediana.*
1 par de homólogos de grandes dimensiones (V).
- " B) *Cromosomas con centrómero en posición submediana.*
1 par de homólogos (L).
- " C) *Cromosomas con centrómero en posición subterminal.*
2 pares de homólogos con pequeñas diferencias de tamaño (J).
- " E) *Cromosomas de grandes dimensiones tipo SAT.*
1 par de homólogos (i).

DISCUSION

Números cromosómicos de la subsección Probatostoma

Uniendo nuestras determinaciones a las ya conocidas (1), esta Sección del género *Trifolium* parece corresponder toda ella a formas

(1) *T. striatum* L., *T. lappaceum* L., *T. pratense* L., *T. scabrum* L., *T. incarnatum* L., *T. stellatum* L., *T. arvense* L., *T. hirtum* All. (BRITTEN, 1963a).

con número $2n = 14$ (que no es el más frecuente en el género) y $2n = 10$ (las tres únicas especies hasta ahora conocidas de ese número. Una excepción sería *T. lappaceum* L. al que dos determinaciones antiguas (BLEIER, 1925; KARPECHENKO, 1925) atribuyen el número $2n = 16$.

Esta situación es bastante interesante, si se compara con la constancia del número básico 8 en las Secciones *Galearia* y *Amoria* y la subsección *Stenostoma*; y del número básico 7 en la Sección *Chromosomemium*.

Por otro lado, la confrontación de los idiogramas de los dos pares de especies relativamente vecinas en su morfología, *T. Cherleri* y *T. hirtum* de una parte y *T. phleoides* y *T. gemellum* por otra, indica diferencias citológicas importantes, en cuanto al número cromosómico, que apoyan la heterogeneidad de la subsección.

Comparación de los tipos cromosómicos de las especies del subgénero Lagopus

Es interesante la comparación de los cariotipos de las formas del subgénero *Lagopus* que hemos obtenido hasta ahora. Estos cariógramas pueden reducirse a tres tipos, representados por las siguientes especies:

- Tipo 1*, correspondiente a *T. subterraneum* y sus formas subespecíficas. Número cromosómico $2n = 16$.
- Tipo 2*, correspondiente a *T. phleoides* y *T. gemellum*. Número cromosómico $2n = 14$.
- Tipo 3*, correspondiente a *T. hirtum* y *T. Cherleri*. Número cromosómico $2n = 10$.

El tipo 1 pertenece a la Sección *Calycomorphum*, mientras que los tipos 2 y 3 pertenecen a especies colocadas en la subsección *Probatostoma* de la Sección *Eulagopus* (ver Cuadro 1).

En los tréboles de 16 cromosomas, por ejemplo, *T. subterraneum*, estudiado recientemente por nosotros, establecimos que los grupos cromosómicos eran A, B, C, D y E, grupos que a excepción del D (cromosomas con dos constricciones) se repetían en las especies de 14 cromosomas objeto de este estudio, guardando estrecha analogía entre sí. Por tanto, las características morfológicas del cariotipo de la cultivar Clare (*T. subterraneum* L. ssp. *Brachycaly-*

CUADRO 1.—Tipos cromosómicos de las especies del subgénero *Lagopus*.

Grupos	Especies					
	2n = 16		2n = 14		2n = 10	
	<i>T. subterraneum</i>	<i>T. phleoides</i>	<i>T. gemellum</i>	<i>T. Cherleri</i>	<i>T. hirtum</i>	
A (centrómero pos. med.)	2 pares	2 pares	2 pares	1 par	1 par	
B (centrómero pos. subm.)	» »	» »	» »	» »	» »	
C (centrómero pos. subb.)	» »	» »	» »	2 pares (tamaño muy dif.)	2 pares	
D (cromos. 2 constricciones)	1 par	—	—	—	—	
E (cromos. SAT)	» »	1 par	1 par	1 par	1 par	

cinum Katzn. et Morley var. *flagelliforme* Guss.) son similares a las encontradas en especies de menor número cromosómico $2n = 14$, ya que los grupos A, B y C presentan tipos de constricción idénticos y están formados, cada uno de ellos, por dos pares de homólogos con pequeñas diferencias de tamaño. También presentan el grupo correspondiente a los cromosomas SAT.

En las especies de 14 cromosomas, *T. phleoides* y *T. gemellum*, vemos estrechas analogías cariotípicas que no sólo corresponden al número, sino también a las características morfológicas de los cromosomas.

Los grupos A, B, C y E se repiten exactamente con muy pocas diferencias relativas a las dimensiones cromosómicas.

En las especies *T. Cherleri* y *T. hirtum* con 10 cromosomas, observamos que éstos son de mayores dimensiones y que están representados también los cuatro grupos, presentando idénticas características morfológicas, aunque incluyen un solo par de cromosomas; únicamente el grupo C está compuesto por dos pares de homólogos, apreciándose diferencias de tamaño entre ellos, ya que en *T. Cherleri* se observa un par de pequeños cromosomas con centrómero subterminal, diferencias que no son tan acusadas entre los dos pares de homólogos de este grupo correspondientes a *T. hirtum*.

Consideramos de gran interés la comparación de los tipos cromosómicos de las especies de esta subsección, que poseen igual número cromosómico, es decir, las especies de 10 y de 14 cromosomas. Esta comparación puede ser una aclaración importante de las relaciones entre las especies que forman la Sección y otras Secciones del género. En todo caso, la información proporcionada será más útil que la derivada simplemente del número cromosómico. Tanto *T. hirtum* como *T. Cherleri* presentan características anatómicas que no pueden considerarse como "primitivas" en el género, por lo que se hace lógico pensar que las formas de 10 cromosomas son derivadas de las de 14; BRITTEN (1963 a) piensa también que las formas de 14 derivan de formas de 16. Es posible, por tanto, que en la subsección *Probatostoma* formada por especies de 14 y 10 pueda haber existido una reducción progresiva del número cromosómico.

La comparación con géneros afines (*Trigonella*, *Medicago*, y *Melilotus*, fundamentalmente) hace pensar que las especies polispérmicas de la Sección *Amoria* y fundamentalmente la subsección *Falcátula*, sean las más "primitivas" del género. Todas estas especies poseen

16 cromosomas, por lo que parece bastante plausible que asistamos, en el género *Trifolium*, a una reducción de los números cromosómicos, dando los números básicos de 8, 7, 6 y 5. Al lado de este proceso general que, naturalmente, tendrá grados y expresiones muy distintos en los diferentes subgéneros, se observan excepcionalmente especies de tipo poliploide: *T. medium*, *T. repens*, *T. lupinaster* y probablemente *T. dubium*.

RESUMEN

Continuando nuestros trabajos cariológicos sobre *Trifolium*, se hace el estudio citológico de algunas especies anuales españolas, cuyo conocimiento es urgente para comprender las tendencias evolutivas y las relaciones taxonómicas de las especies del género. Se observa una buena concordancia entre la posición taxonómica clásica y los datos citológicos. Tanto por el número cromosómico como por las características del cariotipo, se confirma el parentesco de *T. hirtum* y *T. Cherleri* ($2n = 10$) por una parte, y de *T. gemellum* y *T. phleoides* ($2n = 14$) por otra. Se comparan los tipos cromosómicos del subgénero *Lagopus* y se hacen algunas consideraciones filogenéticas.

SUMMARY

The cytological study of some Spanish annual species of *Trifolium* was made. This study became urgent in order that the evolutionary tendencies and the taxonomic relations of the species belonging to this genus could be understood. A fair agreement between the classic taxonomic position and the cytological data was observed. Both the chromosome number and the karyotype characteristics confirm the relationship between *T. hirtum* and *T. Cherleri* ($2n = 10$) on one hand, and *T. gemellum* and *T. phleoides* ($2n = 14$), on the other. The chromosome types of the subgenus *Lagopus* were compared and some philogenetical aspects were considered.

REFERENCIAS

- ANGULO, M.^a D., SÁNCHEZ DE RIVERA, A. M.^a y GONZÁLEZ-BERNÁLDEZ, F.
 1968 The chromosomes of *Trifolium subterraneum* L. *Israel J. Bot.* 17, n.º 3: 155-162.
- BLEIER, H.
 1925 Chromosomenstudien bei der Gattung *Trifolium*. *Jahrb. Wiss. Bot. Pringsheim.* 64: 604-636.
- BRITTEN, E. J.
 1963a Chromosome numbers in the genus *Trifolium*. *Cytologia* 28 (4): 428-449.
- BRITTEN, E. J.
 1963b Chromosome number of rose clover *Trifolium hirtum*. *Science* 142 (3590): 401-402.
- GIBELLI, G. and BELLI, S.
 1893 Rivista critica e descrittiva delle specie di *Trifolium italiane*. *Mem. R. Acad. Sci. Torino Ser. II*, 43, 169-221.
- ISING, G.
 1967 Chromosome breakage and aneuploidy in *Cyrtanthus*. *Hereditas* 57, n.º 3: 312-318.
- KARPECHENKO, G. D.
 1925 Karyologische Studien über die Gattung *Trifolium*. *Bull. appl. Bot. of Gent. and P. Breed.* 14: 271-279.
- KATZNELSON, J. and MORLEY, F. H. W.
 1965a Sp. ciation processes in *Trifolium subterraneum* L. *Israel J. Bot.*, 14: 15-35.
- KATZNELSON, J. and MORLEY, F. H. W.
 1965b A taxonomic revision of sect. *Calycomorphum* of the genus *Trifolium*. I. The geocarpic species. *Israel J. Bot.*, 14: 112-134.
- KLIIPHUIS, E.
 1962 Chromosome numbers of some annual *Trifolium* species occurring in the Netherlands. *Acta. Bot. Neerlandica*, 11: 90-92.
- LARSEN, K.
 1960 Cytological and experimental studies on the flowering plants of the Canary Islands. *Biol. Skr. Dan. Vid. Selsk.*, 11: 1-60.
- LEVAN, A., FREDGA, K. and SANDBERG, A. A.
 1964 Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas*, 52, n.º 2: 201-220.
- TJIO, J. H. and LEVAN, A.
 1950 The use of oxyquinoline in chromosome analysis. With an appendix by Stafelt, M. G. The effect of oxyquinoline on protoplasmic viscosity. *An. Est. Exp. Aula Dei*, 2, n.º 1: 21-64.
- VICIOSO, C.
 1952 Tréboles españoles. Revisión del género *Trifolium*. *An. Inst. Bot. A. J. Cavanilles*, XI: 289-383.

«Estando ya este trabajo en la imprenta tenemos noticia de un artículo de A. J. Pritchard (*Caryología* 20 (4): 323-331, 1967) donde se establece para *T. cherleri* el número cromosómico $2n = 10$ ».

Perspectivas do melhoramento do *Triticum durum* em Portugal

por F. BAGULHO

Estação de Melhoramento de Plantas-Elvas-Portugal

A B S T R A C T

Perspectives about the breeding of the *T. durum* in Portugal.

After pointing out the economical interest of the *T. durum* in Portugal, the principal purposes to be obtained with the breeding are limited.

Some sources of genes to be used in the schemes of artificial hybridizations are also described, in order to obtain combinations of the highest agricultural and industrial value.

1. INTRODUÇÃO

O *T. durum* apresenta-se como um dos cereais de maior interesse económico. A sua importância reside no facto de constituir matéria prima essencial ao fabrico de massas alimentícias de qualidade.

A divulgação deste alimento, cujo consumo progressivo é devido a diversos factores de ordem económico-social, desempenha papel de transcendente relevo na valorização do trigo “rijo”. Em pleno desenvolvimento, esta indústria necessita grandes quantidades de *T. durum*, produto em que o mercado internacional é com frequência deficitário. Daqui resulta o recurso a grãos de trigos “semi-duros” e até mesmo “moles”, para lotar com o trigo “rijo”, o que leva à obtenção de um produto de inferior qualidade.

A escassez da espécie tetraploide é, fundamentalmente, uma

consequência de factores de natureza agrícola, a que se liga a acção do factor qualidade.

A existência de características agronómicas pouco atractivas, nas actuais variedades de *T. durum*, com destaque para a baixa produtividade, têm conduzido à sua gradual substituição por cultivares *T. aestivum*, mais convenientes à moderna triticultura. Este problema é de ordem genética, competindo ao melhoramento de plantas a criação de indivíduos com as condições requeridas.

Por outro lado, a área de difusão da espécie é bastante restrita, sendo unicamente em condições de clima continental que é possível a máxima expressão do carácter qualidade.

A conjugação destes dois factores motiva o baixo valor da produção mundial de trigo "rijo", estimada em 110 a 120 milhões de quintais, o que corresponde a cerca de 5 % de idêntica produção de trigo "mole" (CEE, 1965).

Grande parte do Continente Português situa-se na zona de cultura do *T. durum*, na região designada por Bacia Mediterrânica. Esta aptidão natural é confirmada pelo grande número de variedades nativas da espécie, VASCONCELLOS (1933) classificou 40, correspondendo a 56 % do total de cultivares identificadas pelo referido autor (BARRADAS, 1967).

Os trigos tetraploides foram, desde longa data, cultivados em Portugal, onde tiveram grande expansão. As características dos genótipos antigos, quer "rijos", quer "moles", levaram a lavoura, durante muito tempo, a dar preferência aos primeiros para as terras fortes do Sul do País, em virtude de serem mais adequados às condições de secura, do que as variedades hexaploides então existentes.

Natural diminuição na área de cultura do trigo "rijo" tem sido, igualmente, observada entre nós, com reflexos negativos na produção global do país.

De 1955 a 1964, a redução da produção de *T. durum* foi de 39 528 ton., equivalendo a uma quebra de 35 % (BARRADAS, 1967). Isto significa que, apesar do acréscimo de preço incidente sobre o trigo "rijo" e, sendo Portugal grande consumidor de massas alimentícias (Quadro I), apresentando inclusivamente dos maiores consumos mundiais "per capita" (6,8 Kgs/ano) (MALIANI, 1967; VALLEGA, 1968), a sua cultura está a diminuir de interesse.

CUADRO 1.— *Movimiento anual de trigos laborados.*

Anos	Para massas (ton.)	% em relação a 1955
1955	46 785	100
1956	50 256	107
1957	47 033	100
1958	47 458	101
1959	49 115	105
1960	55 633	119
1961	53 266	116
1962	53 303	112
1963	60 368	129
1964	60 438	129

Um dos grandes obstáculos à cultura dos trigos “rijos” tem sido a impossibilidade de rivalizar com os “moles”, o que se verifica desde que Strampelli lançou as célebres variedades melhoradas.

Enquanto o melhoramento dos trigos hexaploides se tem mostrado compensador, tornando possível a obtenção de linhas manifestamente superiores aos ecótipos indígenas, a espécie *durum* tem-se comportado como bastante difícil de melhorar.

Esta persistente dificuldade reside, talvez, na sua natureza tetraploide, com menos cromossomas, logo menor número de genes para combinar, o que é uma consequência da falta do genótipo D no respectivo arranjo génico. A enorme pressão de selecção conduzida sobre populações nativas, já de si com características muito semelhantes, contribuiu para agravar o problema da concentração de idênticos genes desfavoráveis. Consequentemente, verifica-se pouco sucesso na aplicação do método das hibridações intraespecíficas, uma vez que os progenitores tradicionais não podem proporcionar ampla variação genética. Para solucionar esta dificuldade, os melhoradores recorrem a adequados esquemas de cruzamentos, empregando como genitores outras espécies e outros géneros que, apesar dos problemas inerentes ao diferente grau de ploidia têm conduzido a resultados prometedores. Também a indução artificial de mutações se pode considerar como mais um método de que se dispõe para alcançar a meta pretendida, sobretudo no dia em que for possível orientar a variação no sentido desejado.

Na Estação de Melhoramento de Plantas, o esquema habitual de trabalho para o *T. durum* inclui a observação de genótipos intro-

duzidos, a realização de cruzamentos artificiais e o estudo de indivíduos tratados com agentes mutagênicos.

Da experimentação sobre genótipos introduzidos ressalta o interesse de algumas variedades italianas, nomeadamente Capeiti 8 (incluída na lista oficial de variedades certificadas, desde 1967) e algumas linhas experimentais do grupo Giorgio, obtidas pelos Drs. VALLEGA e ZITELLI, além de Oviachic 65, a primeira cultivar anã desta espécie, seleccionada pelo Dr. BORLAUG no México.

Pelo emprego do método das hibridações têm-se conseguido novas constelações de genes, algumas com valor agrícola, destacando-se Amarelejo, com certificação de semente desde 1958.

Amarelejo é uma linha proveniente do cruzamento Alexandre × Preto Amarelo, sendo ambos os progenitores originários da nossa flora tritícola. Esta cultivar destaca-se pela maior capacidade produtiva relativamente aos genitores (18 % mais do que o mais produtivo — Alexandre) e até mesmo em relação às outras variedades tetraploides existentes na altura em que foi eleita (BARRADAS, 1965; BARRADAS e MALATO-BELIZ, 1961; VICTORIA PIRES, 1960, 1962). No aspecto tecnológico revela qualidade razoável, embora apresente tendência para o "amolecimento".

O tratamento com agentes mutagênicos (raios X e neutrões) tem igualmente conduzido a resultados interessantes, como a selecção de mutantes de Amarelejo com alguns caracteres em grau mais elevado do que a linha original (BARRADAS, 1965, 1966 a, 1966 b, 1967).

2. OBJECTIVOS DO MELHORAMENTO DO *T. durum*

Uma parte do trabalho no Departamento de Autofecundação da E.M.P. visa a obtenção de novos genótipos pelo método das hibridações artificiais, cujos esquemas são elaborados de molde a atingir objectivos básicos.

Os objectivos essenciais do melhoramento do trigo "rijo" são a produtividade e a qualidade. Há, porém, outros caracteres também importantes para as nossas condições agroclimáticas, como a precocidade de maturação, a resistência à acama e a resistência às

doenças, só por si capazes de originar grandes flutuações na produção.

Tratando-se de caracteres hereditários, interessa conhecer o respectivo mecanismo de transmissão e procurar possíveis fontes de genes, capazes de proporcionar o aparecimento de combinações favoráveis.

Os principais caracteres que se pretendem reunir numa variedade de *T. durum* são regulados por factores múltiplos, excepto a resistência a algumas enfermidades, controlada por hereditariedade simples. O potencial de cada carácter resulta, ainda, da interacção entre genes e meio ambiente, cuja influência pode alterar a expressão dos factores em jogo.

A detecção de sistemas génicos portadores destas características, dada a sua natureza varietal, permite, através a realização da técnica das hibridações artificiais, tornar possível a ocorrência da combinação desejada.

A escolha dos genitores para indução de determinado carácter desempenha papel de transcendente relevo na elaboração dos planos de cruzamentos, embora os resultados estejam condicionados às leis das probabilidades e a barreiras de ordem genética.

2.1. Produtividade

A produtividade é o primeiro objectivo a ser considerado, visto que a economia da produção dela depende primordialmente.

A capacidade produtiva está relacionada com as componentes morfológicas da produção, número de espigas por unidade de superfície, número de grãos por espiga e peso do grão, cujo produto constitue a produção.

Segundo alguns autores (MAC KEY, 1966, 1967; WIENHUES, 1960), em regiões de clima continental, o afilamento, carácter que interfere no número de espigas por unidades de superfície, desempenha o papel mais importante, dado ser o menos afectado no seu processo biológico, pelas condições adversas do clima.

Por outro lado, verifica-se uma interdependência entre as três componentes, sucedendo-se, em geral, ao aumento de uma delas, a diminuição das restantes (MAC KEY, 1966; MALIANI, 1966).

A excepcional adaptabilidade do *T. durum* às condições desfa-

voráveis de calor e secura e as características especiais da semente, proporcionam valores elevados para o peso do grão. Porém, os restantes índices de produtividade apresentam-se em nível inferior.

Ao estabelecer-se um plano de cruzamentos, a preocupação dominante é obter combinações génicas que possam conduzir à variação transgressiva positiva. Para o efeito escolhem-se, como genitores, variedades de grande rendimento unitário, recorrendo-se não só a linhas tetraploides, como aos principais genótipos do tipo *aestivum*. Dentro desta linha de trabalho realizam-se cruzamentos

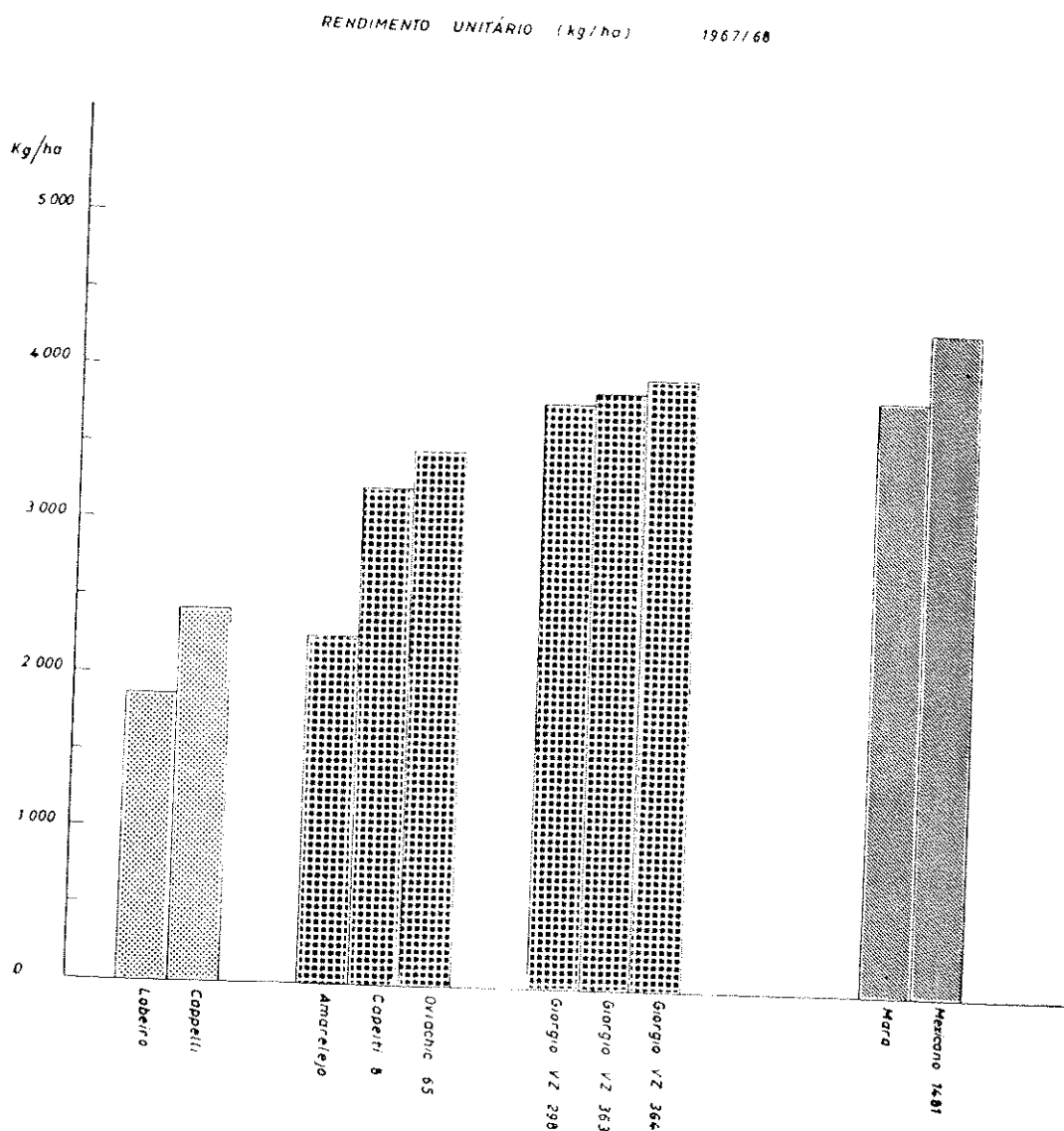


FIG. 1. Rendimento unitário de alguns genótipos

interespecíficos, principalmente com as cultivares mais produtivas originárias do México, Itália e Portugal.

Por meio duma tal orientação, pretende-se dotar a variedade *durum* com os genes de produtividade transportados pela linha hexaploide a que se recorre.

Do mesmo modo, constroem-se indivíduos a partir das linhas de *T. durum* de maior rendimento, figurando Oviachic 65 e Capeiti 8 como principais portadores dos genes requeridos, além de algumas linhas do grupo Giorgio (fig. 1).

2.2. Precocidade de maturação

Um dos defeitos tradicionais da espécie *durum* é o alongamento do seu ciclo vegetativo. A fase reprodutiva, sobretudo a parte final, realizando-se numa época em que as chuvas são geralmente raras e o calor é intenso, pode afectar profundamente o processo biológico do desenvolvimento do grão. Além disso, aumenta o risco de um possível ataque de *P. graminis tritici*, cujos efeitos são sempre de temer.

A precocidade de maturação impõe-se, portanto, como um objectivo imperioso para salvaguardar os bons resultados agrícolas e tecnológicos.

Apesar de ser um carácter condicionado por sistemas poligénicos e difícil de observar em parcelas heterogéneas, a selecção é facilitada pela existência duma correlação significativa positiva entre as datas de espigamento inicial, médio, ou total e a data de maturação (SANCHEZ-MONGE, 1960).

Para alguns autores, o sucesso deste tipo de melhoramento depende de caracteres específicos das variedades cruzadas, por se apresentar como dominante, ou parcialmente dominante, conforme as combinações.

Dentre as cultivares de *T. durum* destacaremos Capeiti 8, pela alta precocidade revelada, com ciclo vegetativo idêntico ao dos trigos hexaploides (Fig. 2).

Com altíssima precocidade (ciclos 5 e 6 dias mais curtos que Capeiti 8), foram recebidos este ano em Elvas alguns genótipos experimentais mexicanos, que começaram já a ser usados como progenitores.

Também se tem recorrido à introdução de genes de trigos “mo-

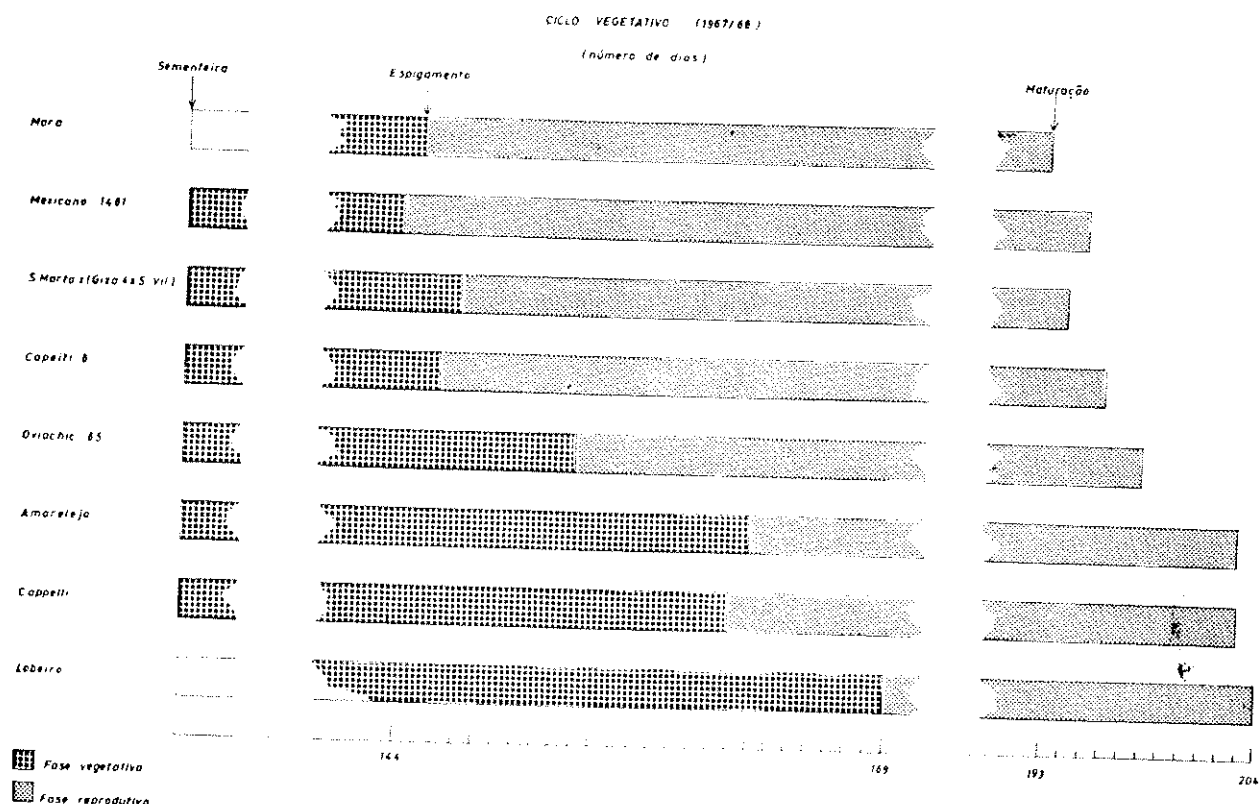


FIG. 2. Ciclo vegetativo de alguns genótipos.

les”, realizando hibridações com variedades desta espécie, possuidoras de ciclos vegetativos ajustados ao nosso clima.

Por observação das populações híbridas verificou-se o aparecimento de plantas mais precoces que os genitores em algumas novas combinações, transportando genes de Capeiti 8 e mais raramente de Oviachic. Nos cruzamentos interespecíficos, os melhores resultados foram encontrados em Mexicano 1518 \times Lobeiro, com indivíduos francamente mais precoces do que o nosso genótipo.

2.3. Resistência à acama

Como consequência lógica da intensificação cultural, surgiu a necessidade de criar trigos “rijos” que, à semelhança dos “moles”, possuam colmo curto e rígido, podendo suportar espigas grandes, com elevado número de grãos bem conformados, sem o risco de acamar.

Apesar de regulado por hereditariedade quantitativa, a selecção deste carácter é altamente eficiente, desde as primeiras gerações,

simplificada pela fácil detecção dos indivíduos com palha de características desejadas.

Foram os melhoradores mexicanos, com a criação de Oviachic, quem primeiro alcançou o objectivo pretendido. Este trigo anão resultou da transferência de genes de Norin 10, da cultivar hexaploide Pitic, para a tetraploide Tehuacán.

O referido híbrido, dadas as boas características, comprimento de colmo (80 a 90 cm) e elevada resistência à acama (melhor do que o melhor padrão *aestivum*-Mara), veio tornar-se um genitor indicado na transmissão deste importante carácter. A sua boa capacidade combinativa proporciona alta variação genética nos cruzamen-



FIG. 3. Variação numa população F_3 do cruzamento Oviachic \times Amarelejo.

tos com variedades nacionais e possibilita a escolha de indivíduos com colmo ajustado aos critérios mais rígidos de selecção.

Podemos referir os bons resultados verificados, em que se tem conseguido variação no sentido desejado, como sucede nas populações Oviachic \times Amarelejo e Preto Amarelo \times Oviachic (Fig. 3 e Fig. 4).

Boas perspectivas são, de igual modo, observadas nalguns cruzamentos entre variedades nativas e linhas hexaploides originárias do México. Na Fig. 5 ilustramos a variação genética numa F_3 de Mexicano 1518 \times Lobeiro.

O êxito resultante da adopção de genitores mexicanos na solução dos problemas de rigidez do colmo, é confirmado pelos trabalhos de RUSMINI (1967) em Itália.



FIG. 4. Variação numa população F_2 do cruzamento Preto Amarelo \times Oviachic.



FIG. 5. Variação numa população F_2 do cruzamento Mexicano 1518 \times Lobeiro.

2.4. Resistência a doenças

Os estudos especializados no campo das epifetias competem ao Laboratório de Fitopatologia, o qual se encarrega de detectar e isolar plantas geneticamente resistentes aos parasitas de maior importância económica no País. Assim, consta do plano de trabalhos deste Laboratório, experimentação sobre *P. graminis tritici*, *P. striiformis*, *Septoria* spp. e *Ustilago tritici*.

Idêntica colaboração, em estudos sobre a *P. recondita tritici*, é dada pelo Departamento de Fitopatologia de E.A.N.

A *P. graminis tritici* tem-se revelado como a enfermidade causadora de maiores apreensões, não só porque as principais variedades cultivadas entre nós são susceptíveis, como ainda possuem ciclo vegetativo longo, o que não lhes permite escapar à infecção.

Estudos levados a efeito pelo Dr. SANTIAGO e seus colaboradores, têm permitido o conhecimento das raças de *P. graminis tritici* prevalentes em Portugal (MOURA, 1957; SANTIAGO, 1962; SANTIAGO e PAIS, 1964). Por sua vez, as experiências conduzidas por MAC KEY demonstraram que o gene Sr 11, localizado no cromossoma 6 B, era suficiente para controlar resistência a todas as raças fisiológicas encontradas em Portugal e na Suécia, enquanto o gene Sr 6, transportado no cromossoma 2D, bastava para provocar idêntico efeito nos países escandinavos (MAC KEY *et al.*, 1963).

A maior parte das cultivares portuguesas e italianas apresentam alta susceptibilidade ao fungo; em contrapartida, os recentes genótipos introduzidos em ensaio, Oviachic, Giorgio e Alex, têm mostrado interessante resistência prática nas condições de campo de Elvas. Em relação aos dois últimos trigos, poderemos acrescentar que se trata de material seleccionado, alternadamente em Itália e Argentina, pela resistência em condições de laboratório e de campo a todas as raças de *P. graminis tritici* encontradas nesses países (VALLEGA, 1964, 1968). São resultantes da hibridação de Cappelli com trigos geneticamente resistentes, nas condições de Italia, provenientes dos Estados Unidos (Ld 390) e México (selecções sobre uma população F₂), respectivamente.

No caso de *Ustilago tritici*, é notório o bom comportamento das nossas variedades antigas, tendo sido detectadas algumas com apreciável grau de resistência (PAIS, 1962). Relativamente à *P. recondita tritici*, observa-se que o genótipo indígena Raposinho é apontado (FREITAS, 1963) como possuidor de resistência ao parasita.

Quanto à *P. striiformis* e à *Septoria*, a experiência ganha em Elvas indica-nos ser possível seleccionar, dentro do material português, linhas possuindo aceitável resistência prática contra tais enfermidades.

2.5. Qualidade

A avaliação da qualidade está ligada a uma série de observações analíticas, processadas desde o produto original (grão de trigo) até

às massas alimentícias dele obtidas. Análises das características morfológicas do grão, testes sobre as respectivas sêmolas e ensaios nas massas laboradas, revelam um conjunto de resultados, cujo equilíbrio permite a apreciação final sobre o genótipo em estudo. Esta experimentação está ligada à colaboração de duas entidades, Instituto Nacional do Pão e Federação Nacional dos Industriais de Moagem, em cujos laboratórios se realizam os ensaios das principais linhas eleitas.

A legislação portuguesa considera que sejam classificados como trigos “rijos” para massas, logo pagos como tal, os trigos com percentagens mínimas de grãos estranhos, sendo o preço estabelecido em função do peso do hectolitro.

A extrema complexidade da transmissão dos caracteres hereditários e a interacção de muitos componentes, dificultam e complicam a respectiva selecção.

No que se refere às características físicas do grão, o trabalho do melhorador incide sobre o peso do hectolitro, a cor e o “grau de enrijamento”, caracteres facilmente detectáveis e sobre os quais actua a selecção visual desde as primeiras gerações.

A natureza compacta do endosperma, originando grãos com grande densidade, vem influir no elevado peso do hectolitro da espécie. A eleição das linhas faz-se atendendo a esta referência, para que se exige um grau idêntico aos principais padrões, nomeadamente Capeti 8, Cappelli e Lobeiro.

A cor do grão é considerada fundamental pela indústria, por influenciar a cotação das sêmolas e massas. Os grãos escuros são susceptíveis de originar pontuações, cujo aspecto provoca a desvalorização do produto. Por isso, a designação de trigos “rijos” próprios para massas, engloba apenas os de grão claro, cuja coloração está compreendida entre amarelo-ambarino e amarelo-acastanhado (CEE, 1965; Regime cerealífero, 1965). Consequentemente, a selecção encaminha-se no sentido de se elegerem indivíduos dentro deste tipo, eliminando-se todas as linhas desviantes. A escolha de genitores com plasma germinal responsável por coloração adequada não é difícil, pois as principais cultivares existentes são, logicamente, portadoras de tal carácter.

O “enrijamento” é uma característica típica de *T. durum*, traduzindo a estrutura do endosperma que, devido ao elevado teor em gluten apresentado pelas células, é factor decisivo de valorização in-

dustrial. Embora favorecido por natureza varietal (MALIANI, 1963), o endosperma não se mantém estável, podendo ser alterado quer por factores ambientais, quer pelo próprio sistema cultural. Observa-se, então, um acidente chamado "amolecimento", que consiste na mudança total ou parcial da textura do grão, passando de córnea a farinosa e friável, com conseqüente quebra do seu valor semoleiro.

A lei Portuguesa (Portaria n.º 20 975 de 1/9/964) determina a existência de três classes, quanto ao "grau de enrijamento", correspondentes à percentagem de grãos de textura vítrea, mediante as quais se estabelece o preço do trigo. São as variedades nativas que, geralmente, apresentam valores mais apreciáveis para este índice.

Dos ensaios químico-tecnológicos verifica-se, pelos relatórios enviados, que LOBEIRO se mostrou capaz de originar massas alimentícias da melhor qualidade. Ainda susceptíveis de proporcionar produtos de boa capacidade industrial, encontram-se as cultivares Preto Amarelo, Cappelli e Capeiti 8. Amarelejo tem revelado resultados satisfatórios; no entanto, o seu valor tecnológico é influenciado negativamente, por apresentar "grau de enrijamento" inferior.

Quanto a Oviachic, com um ano apenas de experiência, para o grão produzido nas nossas condições, os resultados foram acentuadamente piores do que os dos genótipos referidos.

3. CONCLUSÕES

O melhoramento do *T. durum*, que durante anos conduziu a discretos resultados, encontra-se hoje num caminho promissor.

A problemática do trigo "rijo" gira à volta do binómio valor agrícola-qualidade, o que implica um tipo de melhoramento sobre uma ampla frente.

Até há pouco, o material de que se dispunha caracterizava-se pelo superior interesse tecnológico, mantendo-se a importância cultural em grau reduzido. Últimamente, têm sido criados alguns genótipos mais valiosos sob o ponto de vista agrícola, originando, porém, sêmolas de pior qualidade que os anteriores.

A inclusão destas modernas cultivares nos programas de hibridações artificiais veio enriquecer, grandemente, o património gené-

tico da espécie, que assim passou a dispôr de indivíduos mais adequados a uma triticultura intensiva.

Procura-se obter a reunião das boas características agrícolas e tecnológicas, escolhendo genitores adequados e empregando criteriosos esquemas de cruzamentos.

Na primeira fase, a orientação seguida visa, especialmente, isolar, por meio de severa selecção, plantas que contenham o fundo genético das novas variedades, bem adaptadas à agricultura moderna. Neste sentido realizam-se cruzamentos simples, triangulares, ou esquemas mais complicados, cuja finalidade é melhorar as cultivares de que dispomos, no mais curto espaço de tempo.

Num passo seguinte, tentaremos combinar as boas características já conseguidas, com a alta qualidade de certos genótipos constantes da flora nativa Mediterrânica, recorrendo a equilibrados esquemas de cruzamentos.

SUMARIO

Após breve introdução sobre a importância económica do *T. durum*, o A. refere sumariamente alguns dos principais problemas que se põem ao melhoramento da espécie e cita êxitos já conseguidos com a experimentação realizada em Elvas.

Salienta-se o emprego do método das hibridações artificiais, seguido de selecção, como a técnica mais utilizada, na E. M. P., para conseguir indivíduos portadores de sistemas génicos vantajosos.

Considera-se a produtividade e a qualidade como caracteres essenciais a atingir pelo melhoramento, destacando-se as principais fontes de genes usadas para criar novos plasmata germinais.

Com influência no interesse agronómico da espécie *T. durum*, realçam-se a precocidade de maturação, a resistência à acama e a resistência a doenças, enumerando-se alguns genótipos merecedores de serem usados como indutores de genes favoráveis.

Aponta-se o sucesso alcançado com a obtenção de indivíduos de palha rija, resultantes da aplicação de cruzamentos simples entre linhas provenientes do México e algumas variedades portuguesas.

SUMMARY

After a short introduction about the economical importance of the *T. durum*, the Author shortly refers some of the principal problems which are put to the breeding of this species and quotes some results already obtained with the experimentation achieved at Elvas.

The employment of the method of the artificial hybridizations, is pointed out, followed by a selection as the most common technic in the Plant Breeding Station-Elvas, to get some individuals bearing advantageous genic systems.

Productivity and quality are considered as essential characters to be obtained by breeding, standing out the principal sources of genes used to breed new germplasms.

With some influence in the agronomical interest of the species, the early maturity, the resistance to lodging and diseases are put in relief, reckoning up some genotypes deserving to be used as inducers of favourable genes.

It is also pointed out the success achieved with the isolation of some individuals of stiff straw, resulting from the application of single crosses between lines proceeding from Mexico and some Portuguese varieties.

BIBLIOGRAFIA CITADA

- BARRADAS, M. T.
1965 Problemas e tendências do melhoramento do trigo em Portugal. *Melhoramento* 28: 5-43.
- BARRADAS, M. T.
1966 a Alguns problemas do melhoramento do trigo em Portugal. *Genética Iberica* 17: 155-176.
- BARRADAS, M. T.
1966 b Alguns resultados positivos obtidos em experiências de mutações em *Triticum spp.* *Rv. Agrónom.* 49: 1-11.
- BARRADAS, M. T.
1967 Considerações sobre o melhoramento do trigo «rijo» em Portugal. *Comportamento agronómico de algumas linhas isoladas em descendências de sementes tratadas de trigo «Amaralejo»*. Symp. XXV, Aniv. E. M. P. (1967).
- BARRADAS, M. T. e MALATO BELIZ, J.
1961 «Amaralejo» e «Padeira». Trigos híbridos obtidos na Estação de Melhoramento de Plantas. *Agricultura* 10: 14-21.
- C. E. E. (Ed.)
1965 *Economie de la production, transformation et consommation du blé dur dans la C. E. E.* Ét. Ser. Agri. 18.

- FREITAS, A. P. de CARMO e
1963 Trigos resistentes à ferrugem castanha. *Agricultura* 18: 28-30.
- MAC KEY, J.
1966 The Wheat plant as a model in adaptation to high productivity under different environments. *Proc. 5th. Yugoslav Symp. Res. Wheat*, Novi Sad 1966, *Contemp. Agric.* 11-12: 37-48.
- MAC KEY, J.
1967 *Ecological adaptation of the yield structure in cereals*. Symp. XXV^o Aniv. E. M. P. (1967).
- MAC KEY, J., LEIJERSTAM, B. and WIBERG, A.
1963 Resistance to rust and mildew in cereals. *Plant Breeding Research*, Almqvist & Wiksell, Stockholm (Ed. E. Akerberg and Hagberg) 203-221.
- MALIANI, C.
1964 Risultati delle colture delle prime nuove varietà di grani duri ottenuti per incrocio interspecifico. IX Conv. Soc. It. Gen. Agr., Palermo 1963, *La prospettive aperte dal miglioramento genetico alla coltivazione del grano duro* (Ed. Barilla), 69-77.
- MALIANI, C.
1966 Il miglioramento genetico delle piante coltivate in Italia. *Proc. Conv. Interun. Rom. - It. Agr.* (1966) 167-192.
- MALIANI, C.
1967 *Importance du blé dur et son amélioration génétique par le moyen du croisement interspecificque*. Symp. XXV^o Aniv. E. M. P. (1967).
- MINISTERIO DA ECONOMIA (Ed.)
1965 *Regime cerealífero* (1966-1970).
- MOURA, J. P.
1957 Raças fisiológicas de *Puccinia graminis tritici* Eriks. et Henn.encontradas em Portugal (1951-1953). *Melhoramento* 10: 5-22.
- PAIS, A. LUNA
1962 O morrão de trigo. *Agricultura* 16: 19-20.
- RUSMINI, B.
1967 *L'amélioration génétique du blé dur (Triticum durum Desf.) au moyen d'hybridations entre variétés, espèces et genres en Italie du Nord*. Symp. XXV^o Anv. E. M. P. (1967).
- SÁNCHEZ - MONGE, I.
1960 Correlaciones en la mejora del trigo. *Melhoramento* 13: 37-46.
- SANTIAGO, J.
1962 Estudos de epidemiologia e de especialização fisiológica da ferrugem negra do trigo. *Melhoramento* 15: 7-89.
- SANTIAGO, J. e PAIS, A. LUNA
1964 *Evolution of physiologic specialization of the Wheat stem rust fungus in Europe during the period 1958/1963*. 3.rd Eur. Colloq. on black ruts of cereals. Cambridge 1964.
- VALLEGA, J.
1968 La produzione del grano duro in Italia e nel mundo. I Cong. Naz. «Scienza del cereali». Sep. *Scienza dell'Alimentazione* 1: 11-25.
- VALLEGA, J. and ZITELLI, J.
1964 *Incorporation of stem rust resistance factors in Italian Wheat*. Cereal Rust Conferences, 289-296.
- VASCACELLOS, J. C.
1933 Trigos portugueses ou de há muito cultivados no país. Sep. do *Bolt. de Agric. 1 e 2 - I Ser.*: 1-150.
- VICTORIA PIRES, D. R.
1960 A actualidade do melhoramento de plantas. *Melhoramento* 13: 1-35.
- VICTORIA PIRES, D. R.
1962 Valor económico de alguns novos híbridos de trigo portugueses. Sep. da *Rev. Econ. de Galicia*. Enero-Dic.

Alguns aspectos agronomicos de um ensaio de misturas de genotipos de *T. aestivum* ssp. *Vulgare* Makey

por M. T. BARRADAS y M. L. BARROS E SOUSA

Estação de Melhoramento de Plantas, Elvas y
Estação Agronómica Nacional, Oeiras

A B S T R A C T

Some authors, in the last years, suggest that the cereals productivity can be improved with the use of mixed cultures.

A study was conducted to determine the agronomic value of three well-adapted soft wheat varieties both in pure stand and in mixture. A set of yield trials was carried out at Elvas from 1961/62 to 1965/66. Of the three varieties Rural yielded systematically more than Impeto and Lusitano. Four blends returned yields corresponding to the expectation calculated from the pure varieties. However, the blend with the three varieties yielded more than the expectation but this increase was not statistically significant. The yield components: number of grains per ear and 1000 grain weight (g) were also studied and any different trends were observed.

INTRODUÇÃO

O melhorador ao trabalhar uma planta cultivada de alta importância social e económica, e além disso num País ou região onde as suas produções globais são, como via de regra, deficitárias, lógicamente desenvolverá os seus programas em ordem a aproximar-se dos objectivos básicos: aumento de rendimento e regularidade de produção.

Ao apreciarmos a problemática do trigo em Portugal, verifica-se que nas últimas décadas paralelamente aos avanços da ciência

agronómica, têm os agricultores sido beneficiados com os frutos do melhoramento. Em ritmo apreciável, continuam a ser entregues à lavoura cultivares crescentemente mais produtivas. Contudo, e mesmo se nos restringirmos às áreas onde a cultura é praticada em aconselháveis condições, tanto no que respeita a factores naturais (solo, exposição, etc.) como outros de ordem técnica (tipo de rotação, fertilização, práticas culturais, semente utilizada, etc.), observa-se, como aliás em toda a região mediterrânica, uma acentuada flutuação nos rendimentos. Deste acontecimento, facilmente transparece a conclusão que os altos potenciais produtivos intrínsecos das cultivares semeadas, são, em elevada frequência, e em escala variável, desaproveitados. A irregularidade climática ocorrida de ano para ano ao longo do ciclo vegetativo do trigo, é na maioria das vezes o agente causador de tais diferenças. Por outro lado, verifica-se que, apesar de todas as deficiências e faltas de progresso ainda existentes na cultura do trigo, quando os anos correm favoráveis, o País consegue atingir a auto-suficiência em tão básico alimento, como aconteceu por exemplo nos anos 1957 e 1958. Por conseguinte, quer-nos parecer, que, o problema da "regularidade de produção" é um dos mais importantes que, de momento, enfrenta o melhoramento de trigo.

Em tempos ainda não muito recuados, os agricultores de uma maneira geral e muito particularmente os triticultores, costumavam à semelhança dos seus companheiros mais primitivos, lançar à terra semente não apenas de uma variedade, mas sim autênticas populações, na convicção, possivelmente pouco consciente, de que uma seara constituída por ampla gama de tipos estaria em melhores condições de equilibrar as epidemias, pragas, e as oscilações climáticas anuais.

Para os cereais autogâmicos, razões de ordem científica e comercial avolumadas no decorrer deste século, estabeleceram o princípio de as variedades cultivadas obedecerem ao conceito de linha pura. Os seus méritos mostraram, sem dúvida, tratar-se de uma realidade francamente positiva, que muito contribuiu para dar expressão económica aos trabalhos de melhoramento nos últimos 60 anos, particularmente em trigos, aveias e cevadas.

Contudo, este princípio que parecia ainda há pouco fundamental e permanente, tem sido recentemente posto em dúvida por alguns genetistas e melhoradores.

GUSTAFSSON, em 1953, demonstrou que a resultante económica da cultura de cevada em condições de mistura poderia ser melhorada desde que se utilizassem certos genótipos em proporções determinadas experimentalmente.

Em 1958, o Dr. BORLAUG, no 1.º Simpósio Internacional de Genética do Trigo, não hesitou em afirmar que o conceito variedade-linha pura, se trata de um "método que deixa muito a desejar".

Este autor, na região onde exerce a sua actividade, isto é, o México, enfrenta o problema decisivo de neutralizar os efeitos desastrosos causados por agressivas epidemias de alforras constituídas por populações de raças em rápida e frequente variação. Perante uma situação tão delicada e dinâmica BORLAUG não se conformou com o sistema convencional da linha pura e raciocinando em moldes novos concebeu o método da variedade multilínea. Neste, uma variedade será composta por apreciável número de linhas com fenótipos semelhantes mas diferindo genéticamente no seu mecanismo de reacção às raças fisiológicas prevalentes.

Por sua vez, LACADENA (1962) analisando em termos matemáticos o efeito do emprego de variedades multilíneas sobre o aumento de rendimento pôde deduzir duas fórmulas teóricas: Uma, demonstra que o aumento de produção da variedade multilínea é função do número de linhas puras que a formam, enquanto a outra expressa que o aumento de produção de uma variedade multilínea cultivada em um determinado ano, depende do número de linhas puras que a constituem e do número de factores desfavoráveis presentes nesse mesmo ano.

Ainda um pouco dentro desta filosofia mas já em plano mais afastado e incomparavelmente mais revolucionário temos as ideias do norte americano SUNESSON (1964) concretizadas nos chamados "cruzamentos compostos". Estes, são populações constituídas por imensa diversidade genética, resultando de descendências em elevado estado de segregação de grande número de híbridos. Além disso na constituição dos híbridos que serviram de ponto de partida, figuram escolhidas linhas estéreis masculinas, o que irá garantir nas suas progenituras a existência de indivíduos em condição altamente heterozigótica. De certa maneira, os cruzamentos compostos assemelham-se às variedades dos agricultores primitivos, distinguindo-se no entanto por apresentarem incomparável-

mente maior variação genética e maior possibilidade de aproveitamento da heterosis.

Em suma: temos hoje em desenvolvimento uma corrente a indicar-nos, que no estágio actual do melhoramento de cereais autogâmicos se pode ir mais além com a cultura de misturas de determinados genótipos do que com a cultura de linhas puras.

MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios cujos resultados se apresentam tiveram como objectivo, colher informação sobre o comportamento agronómico da cultura de linhas de trigo em estado de pureza ou em mistura. Para tal escolheram-se as cultivares de *T. aestivum* ssp. *vulgare* MK de comprovado valor agrícola, designadas comercialmente por: Rural, Impeto e Lusitano.

Algumas das principais características destas variedades cultivadas (MALATO-BELIZ, 1952, BARRADAS, e MALATO-BELIZ, 1960, FORLANI, 1954) são:

Rural

Morfológicas: Porte sub-erecto a erecto, estatura elevada, côr (à maturação) branca, espiga aristada, longa, oblonga-fusifforme, não densa e grão de côr escura.

Fisiológicas e agronómicas: Hábito de primavera, muito susceptível à acama, muito resistente em condições de campo à *Puccinia striiformis* e muito susceptível às: *P. recondita* e *P. graminis tritici*, maturação precoce, alta capacidade produtiva e de adaptação. Cultivar recentemente divulgada na grande cultura.

Pedigree: Selecção da EMP de Elvas obtida nas descendências do hídrigo: Ideal × Mentana branco.

Impeto

Morfológicas: Porte subprostrado, estatura média a baixa, côr (à maturação) branca, espiga mútica, curta, aclavada, densa e grão de côr escura.

Fisiológicas e agronômicas: Hábito do tipo intermédio, resistente à acama, resistente em condições de campo à *P. striiformis* e susceptível às: *P. recondita* e *P. graminis tritici*. Maturação precoce. Boa capacidade produtiva e de adaptação. A partir de 1962 tornou-se o trigo mais divulgado na região cerealífera do sul do país.

Pedigree: É uma selecção do Instituto de Frassineto (Itália) obtida pelo Dr. M. MICHAHELLIS nas descendências do híbrido: Villa Glori × Frassineto 405.

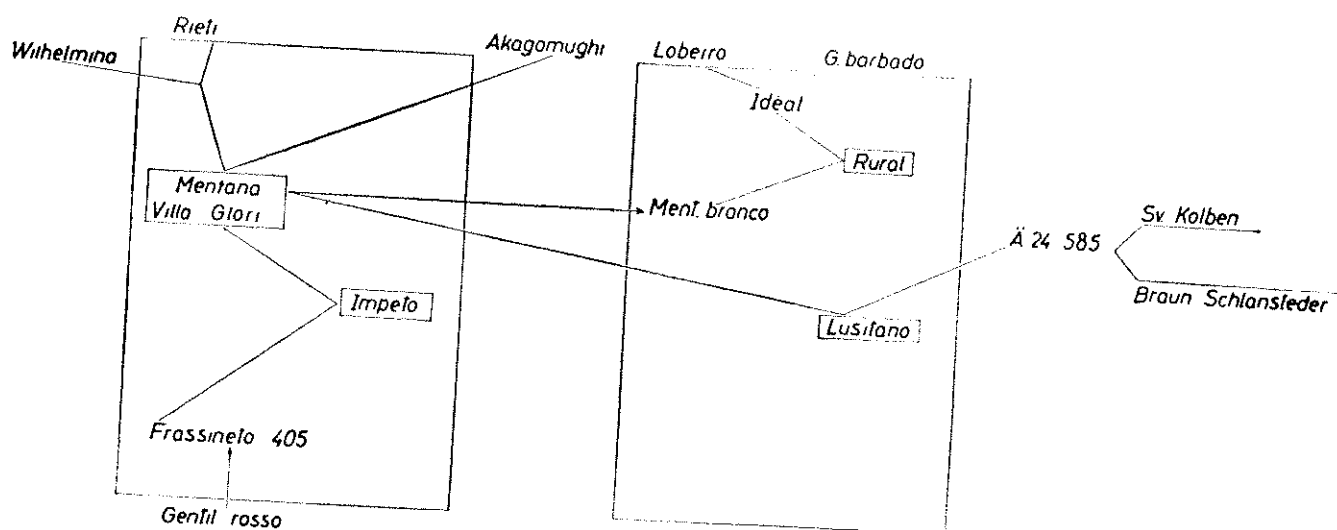
Lusitano

Morfológicas: Porte sub-erecto, estatura média a alta, cor (à maturação) ruiva, espiga mútica, fusiforme, curta a alongada, e grão de cor escura.

Fisiológicas e agronômicas: Hábito de primavera, média resistência à acama, muito resistente em condições de campo à *P. striiformis* e susceptível à *P. recondita* e *P. graminis tritici*. Maturação precoce. Boa capacidade produtiva e de adaptação. Um dos trigos actualmente mais divulgados no país.

Pedigree: Selecção da EMP de ELVAS obtida nas descendências do híbrido Mentana × Ä 24/585.

Conforme se pode verificar no Esquema 1 as cultivares descritas apresentam um fundo genético comum. Todas partem das co-



Esquema 1

nhecidas selecções de Strampelli - Mentana e Villa Glori, que têm como ascendentes o trigo japonês Akagomughi, o holandês Wilhelmina e o regional italiano Rieti.

Assim sobre um bloco de genes comum às três cultivares, temos em Rural e Impeto material hereditário fornecido por genitores provenientes da região mediterrânica, ou seja o trigo português Ideal para o Rural e o Italiano Gentil Rosso para o Impeto. Já para o Lusitano uma vez que resulta da combinação de Mentana com o trigo sueco de primavera Å 25/585 torna-se provável que transporte factores hereditários novos para a região considerada.

Apesar desta afinidade genética, os fenótipos destas cultivares são de tal maneira distintos, que fácil e rapidamente podem com segurança ser identificados.

Os ensaios realizaram-se em cinco anos agrícolas consecutivos, correspondendo ao período 1961/62 a 1965/66, nos campos experimentais da EMP (Elvas), em solos franco-argilo-arenosos. A cultura precedente das folhas onde foram implantados foi sempre uma leguminosa, variando no entanto a espécie. Nos dois primeiros anos a cultura anterior fôra a fava e nos três restantes a ervilhaca do Caia.

Em qualquer dos anos de ensaio as plantas desenvolveram-se normalmente e os talhões encontravam-se bem povoados. As práticas culturais adoptadas foram as normalmente em uso na EMP: Passagem de escarificador às primeiras chuvas, gradagem, adubação com superfosfato, gradagem ligeira, sementeira, monda, coberturas com adubações azotadas e finalmente ceifa e debulha.

Quanto a adubações applicara-se anualmente 71 Kg/ha de P_2O_5 em fundo e 90 Kg/ha de N. Este último à excepção do 1º ano, foi sempre repartido por duas coberturas-de 65 e 25 Kg/ha, respectivamente. No ano inicial o N foi lançado primeiro em fundo à razão de 60 Kg/ha e o restante em uma cobertura de 30 Kg/ha.

Além de observações de natureza agronómica e dos dados referentes à produção sobre os quais incide a análise estatística, todos os anos se procedeu ao arranque de uma repetição completa escolhida ao acaso. Em cada genótipo incluído em uma determinada modalidade determinou-se por uma amostragem casual de 100 plantas: o comprimento do colmo principal, comprimento do último entrenó, comprimento de espiga principal, número de espigas por planta, número de grãos por espiga e peso de 1 000 grãos.

O esquema estatístico adoptado foi o dos "Blocos casualizados" com 5 repetições e 7 modalidades. As parcelas têm uma área de $1,5 \times 3,00 \text{ (m)} = 4,5 \text{ m}^2$. A sementeira realizou-se pelo processo das tábuas furadas, à densidade de 320 plantas/m². As modalidades ensaiadas foram:

1. Rural 61 (1 440 grãos/talhão)
2. Impeto (1 440 grãos/talhão)
3. Lusitano (1 440 grãos/talhão)
4. 1/2 Rural 61 + 1/2 Impeto (720 R + 720 I)
5. 1/2 Rural 61 + 1/2 Lusitano (720 R + 720 L)
6. 1/2 Impeto + 1/2 Lusitano (720 I + 720 L)
7. 1/3 Rural + 1/3 Impeto + 1/3 Lusitano (480 R + 480 I + 480 L)

RESULTADOS E CONCLUSÕES

Ciclo vegetativo

As observações de campo relativas a ciclo vegetativo e alturas mencionam apenas as modalidades em estado de pureza, visto para este caso os dados registados nas misturas serem naturalmente inconsistentes.

Rural e Lusitano mostraram bastantes semelhanças morfológicas nas fases precedentes ao espigamento; Impeto consumiu comparativamente mais tempo nas fases de afilhamento e crescimento do colmo, pelo que veio a atingir o espigamento 4 a 5 dias mais tarde. Em contrapartida foi o trigo mais rápido a realizar o período da maturação, chegando em 1962/63 a antecipar-se 3 e 5 dias, respectivamente, ao Lusitano e Rural. Aliás estas duas variedades, à excepção do citado ano, apresentaram também neste período do ciclo vegetativo, comportamento de certo modo similar (tabela 1).

Em todos estes genótipos, durante o quinquénio considerado, registou-se, à excepção de 1962/63, aproximada simultaneidade de datas de maturação. Os desencontros verificados em 1962/63, poder-se-ão compreender melhor com o auxílio dos dados meteorológicos ocorridos após o espigamento. A primeira e segunda década de Abril, com temperaturas médias de 12° e 14°,4 C e quedas pluvio-

TABELA I

Modalidades	1961/62		1962/63		1963/64		1964/65		1965/66		Média do período 1961/62-1965/66	
	Esp.	Mat.	Esp.	Mat.	Esp.	Mat.	Esp.	Mat.	Esp.	Mat.	Esp.	Mat.
1-Rural	6.IV	26.V	2.IV	27.V	22.IV	26.V	5.IV	17.V	25.III	20.V	6.IV	23.V
2-Impeto	11.IV	26.V	6.IV	22.V	27.IV	25.V	8.IV	17.V	31.III	20.V	10.IV	22.V
3-Lusitano	6.IV	26.V	2.IV	24.V	23.IV	27.V	5.IV	17.V	26.III	20.V	6.IV	23.V
Data de sementeira	27/XI/61		16/XI/62		7/I/64		25/XI/64		26/XI/65			

métricas de 34,5 e 72,5 mm, contribuíram muito favoravelmente para que a floração e a fase após fecundação se processassem em boas condições, o que raramente acontece nesta região. Mas a última década de Abril e as duas primeiras de Maio trouxeram uma mudança radical de situação. As temperaturas subiram rapidamente (16°,4, 16°,9 e 19°,9) e o factor secura apareceu com os seus efeitos negativos (apenas 5 mm caídos em uma trovoadas na primeira década de Maio). Deste modo as fases relativas à acumulação de reservas e sobretudo a de dissecação do grão tiveram de se desenvolver em ambiente desvantajoso. A resposta a esta forçagem traduzida por antecipação de maturação foi provavelmente mais acentuada em Impeto, menos em Rural e em posição intermédia no Lusitano.

Alturas

As alturas observadas nos talhões já próximo do final do ciclo vegetativo (tabela 2) expressam acentuadas diferenças para os trigos estudados. O Lusitano e mais ainda o Rural apresentam, sob o ponto de vista de uma agricultura evoluída, este caracter em dimensão inaceitável, enquanto que em Impeto, se mostra bastante adequado.

TABELA 2. — *Alturas (cm)*

<i>Modalidades</i>	<i>1961/62</i>	<i>1962/63</i>	<i>1963/64</i>	<i>1964/65</i>	<i>1965/66</i>	<i>Média no período 1961/62-1965/66</i>
1-Rural	148	142	111	144	128	135
2-Impeto	101	113	89	112	104	104
3-Lusitano	132	138	104	135	124	127

No que respeita ao caracter resistência à acama, de transcendente importância na agricultura moderna, os dados reunidos na tabela 3 confirmam a superioridade de Impeto sobre Lusitano e mais ainda sobre Rural.

Torna-se interessante verificar que as modalidades misturas apresentaram comportamento intermédio ao das suas componentes. Os valores médios registados no quinquénio situam-se nas vizinhanças das médias calculadas a partir dos graus de resistência à acama avaliados para as suas variedades componentes.

TABELA 3.—*Resistência à acama (0-10)*

<i>Modalidades</i>	1962	1963	1964	1965	1966	<i>Média</i> 1962-66 (1)	<i>Valores</i> calculados (2)	<i>Diferença</i> (1)-(2)
1 — R	7,7	5,3	7,2	7,5	5,2	6,6	—	—
2 — I	9,2	7,5	8,4	8,4	6,8	8,1	—	—
3 — L	8,6	6,2	8,1	8,2	6,8	7,6	—	—
4 — R + I	7,9	6,3	7,7	7,5	5,7	7,0	7,4	-0,4
5 — R + L	7,8	6,3	8,0	7,5	5,8	7,1	7,1	0,0
6 — I + L	8,9	7,7	8,3	8,0	6,8	7,9	7,8	+0,1
7 — R + I + L	8,0	7,1	7,8	7,8	6,2	7,4	7,4	0,0

Produções

O estudo estatístico dos valores das produções obtidas fez-se de acordo com o seguinte esquema:

- a) Análise de variância dos resultados anuais.
- b) Análise conjunta dos resultados de vários anos.
Interpretação estatística.

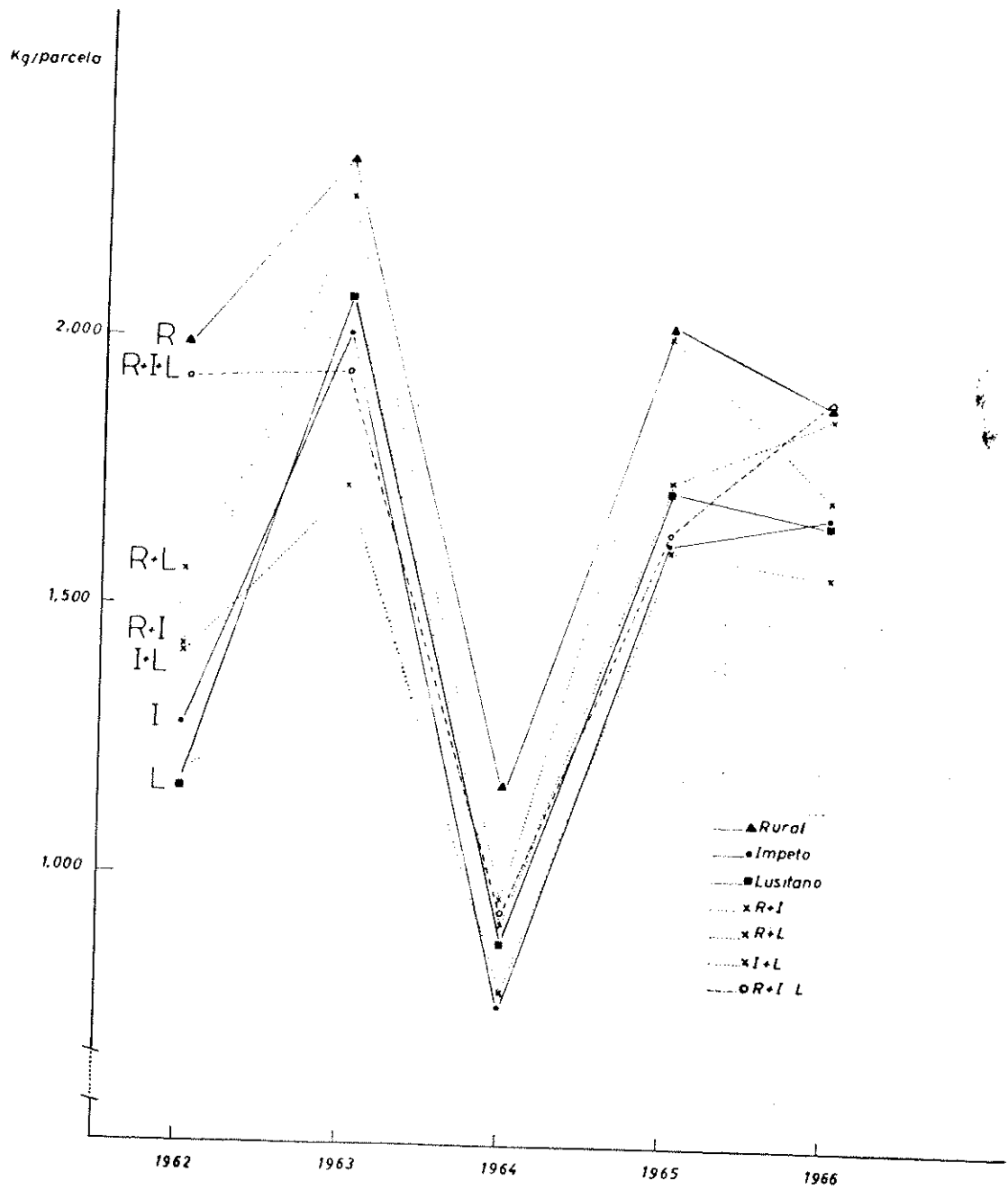
Resultados anuais

A análise estatística dos resultados fez-se de acordo com a técnica da análise de variância (tabela 4, Esquema 2).

Os dois primeiros anos de ensaio, e muito especialmente o primeiro, apresentam um elevado coeficiente de variação (desvio padrão expresso em percentagem da média).

Se exceptuarmos o ano agrícola de 1962/63, os restantes ensaios anuais acusam significância da variação associada a modalidades.

A observação imediata dos dados originais permite afirmar que, comparando as produções médias anuais das várias modalidades, a modalidade 1 (R) é sistematicamente superior às restantes. As mo-



Esquema 2

TABELA 4. — *Análise de variância anuais e médias dos tratamento (Kg/parcela). Individual analysis of variance and treatments means (Kg/plot)*

Origem de variação	Graus de liberdade	Quadrados médios (Mean squares)				
		1961/62	1962/63	1963/64	1964/65	1965/66
Repetições	4	0,2815 NS	0,0566**	0,1292**	0,1292**	0,190 NS
Modalidades	6	0,4923**	0,2272 NS	0,0972**	0,1697**	0,0838**
Erro experimental	24	0,1113	0,0918	0,0119	0,0272	0,0159
Média Modalidade 1		1,998	2,378	1,178	2,042	1,894
Média Modalidade 2		1,294	2,008	0,754	1,632	1,678
Média Modalidade 3		1,162	2,084	0,874	1,722	1,670
Média Modalidade 4		1,438	2,262	0,956	2,024	1,702
Média Modalidade 5		1,578	2,084	0,916	1,742	1,854
Média Modalidade 6		1,422	1,724	0,780	1,602	1,566
Média Modalidade 7		1,930	1,940	0,918	1,648	1,896
d.m.s. (P = 0,05)		0,436	0,395	0,045	0,215	0,052
d.m.s. (P = 0,01)		0,590	0,536	0,061	0,292	0,070

* — Significativo (nível 5 %).

** — Altamente significativo (nível 1 %).

NS — Não significativo.

dalidades 2 (I) e 3 (L), de um modo geral, não diferem significativamente entre si.

Quanto à modalidade 6 (I + L), parece, existir indicação dela ocasionar menor produção do que as modalidades 4 (R + I) ou 5 (R + L). Por seu lado, as modalidades 4 (R + I) e 5 (R + L) apresentam certa superioridade em relação às modalidades 2 (I) e 3 (L). Finalmente, a modalidade 7 (R + I + L) ocupa, de um modo geral, posição superior às modalidades 2 (I) e 3 (L).

Em resumo, e atendendo à composição de cada modalidade, pode dizer-se que o trigo Rural é o mais produtivo e parece ser responsável pela melhoria da produção observada nas combinações em que entra.

Resultados conjuntos dos vários ensaios

A análise conjunta de experiências, repetidas no tempo é necessária porque, tendo-se encontrado efeitos significativos, em algumas on em todas as experiências, mostrará se é possível uma generalização dos efeitos dos tratamentos ou se há interação significativa entre tratamentos e anos.

Numa análise preliminar, considerámos o conjunto dos 5 anos. A subdivisão dos graus de liberdade e da soma de quadrados total (COCHRAN & COX, 1957), na análise de variância, consta da tabela 5.

Como erro experimental podíamos considerar a variância associada ao que denominámos “restante”. Deste modo, verificámos a alta significância das “modalidades” e da interacção “anos × Modalidades”.

TABELA 5.— *Análise de variância combinada (Kg/parcela). Combined analysis of variance (Kg/plot).*

<i>Source of variation</i> <i>Origen de variação</i>	<i>g.l.</i> <i>d.f.</i>	<i>Somas de quadrados</i> <i>Sums of squares</i>	<i>Quadrado médio</i> <i>Mean squares</i>	<i>F</i> <i>vs (a)</i>	<i>F</i> <i>vs (b)</i>
Anos	4	26,2430	6,5608	**	**
Modalidades	6	3,9500	0,6583	**	**
Anos × Modalidades (b)	24	2,4710	0,1030	**	—
Repetições dentro dos anos	20	3,8765	0,1938	**	—
Restante (a)	120	6,1949	0,0516	—	—
TOTAL	174	42,7354	—	—	—

Na hipótese dos anos constituírem uma amostra casual — hipótese de aceitar por se tratar já de um período de 5 anos — testamos estatisticamente a variância das “modalidades” em face da variância da interacção “anos × Modalidades”, encontramos então um valor de $F(6,39)$ que excede o valor tabulado para o número de graus de liberdade correspondente.

Esta análise, todavia, está baseada na hipótese de que as variâncias dos “erros experimentais” anuais são homogêneas, isto é, podem ser consideradas como estimativas duma variância comum. Como o teste de Bartlett (1937) mostrou não ser verdadeira tal hipótese, não se deverão, pois, analisar conjuntamente essas experiências.

Le Clerg, Leonard and Clark (1962) sugerem, porém, que quando o teste de Bartlett dá um valor de Qui-quadrado (χ^2) muito alto se rejeitem algumas experiências — até que se obtenha um χ^2 não significativo. As experiências rejeitadas, se forem homogêneas, podem por sua vez agrupar-se. Assim, baseando-se no teste de Box (1953, 1954) de mais rápida e simples execução do que o de Bartlett agrupámos os anos da seguinte forma:

Grupo I. 1961/62 e 1962/63.

Grupo II. 1963/64, 1964/65 e 1965/66.

pois deste modo tais agrupamentos apresentam homogeneidade das variâncias do erro.

As respectivas análises de variância foram:

TABELA 6.— *Análises de variância combinadas por grupos de anos (Kg/parcela). Combined analyses of variance for groups of years (Kg/plot).*

Origem de variação Source of variation	1961/62 - 1962/63			1963/64 - 1964/65 - 1965/66		
	g.l. d.f.	s.qd s.s.	qd.m m.s.	g.l. d.f.	s.qd s.s.	qd.m m.s.
Anos	1	4,7789	4,7789**	2	16,9243	8,4622**
Modalidades	6	2,7690	0,4615**	6	1,5545	0,2591**
Anos × Modalidades	6	1,5478	0,2580**	12	0,5497	0,0458**
Erro combinado	48	4,8751	0,1016—	72	1,3197	0,0183—

Como se verifica, em ambos os grupos de anos foi altamente significativa tanto a variação associada a “modalidades” como à interacção “anos × modalidades” — quando comparadas com o erro combinado. Todavia, a hipótese de que as modalidades têm efeitos gerais apesar da presença de efeito dos anos tem de ser abandonada no 1º grupo ($F = \text{Modalidades/Anos} \times \text{Modalidades} = 1,79$ N. S.) mas é aceite no 2º grupo de anos ($\text{Modalidades/Anos} \times \text{Modalidades} = 5,66$ **). Note-se, a propósito, que o ensaio de 1962/63 não foi significativo.

Transformação dos resultados dos ensaios

Frequentemente torna-se necessário transformar os resultados dos ensaios repetidos no tempo e/ou no espaço, com o objectivo de conferir validade estatística à análise de variância (Jeffers, 1964, Pearce 1953 e 1955). Tal é o caso da apreciação estatística conjunta dos resultados de ensaios afins efectuados em diversos anos agrícolas e que não dão garantia de homogeneidade quanto às variâncias associadas aos erros experimentais anuais.

No presente estudo, tentou-se a transformação da raiz quadrada que parecia ser a mais apropriada em virtude da forma como as va-

riâncias dos erros e as médias dos ensaios anuais se associaram. Tentou-se também a transformação logarítmica. Nenhuma porém, modificou os testes de homogeneidade. A fim de não alongar demasiado o cálculo optámos por basear as conclusões na análise estatística com os dados originais.

Previsão das produções

Em todas as modalidades misturas as respectivas produções médias situam-se nas vizinhanças das produções médias calculadas a partir das suas componentes, o que está de acordo com as experiências levadas a efeito por Frankel (1939) há cerca de trinta anos. (Tabela 7).

TABELA 7. — *Produções médias 1961/62 - 1965/66 (Kg/parcela)*

<i>Modalidades</i>	<i>Observadas (1)</i>	<i>Calculadas (2)</i>	<i>Diferenças (1)-(2)</i>
1 — Rural	1,898	—	
2 — Impeto	1,473	—	
3 — Lusitano	1,502	—	
4 — R + I	1,676	1,686	-0,010
5 — R + L	1,635	1,700	-0,065
6 — I + L	1,419	1,488	-0,069
7 — R + I + L	1,666	1,624	+0,042

As produções anuais das misturas inclindo 50 % de Lusitano — Modalidades: 5 (R + L) e 6 (I + L) — são persistentemente inferiores às médias das produções anuais das respectivas componentes. Em 1963/64 a modalidade 5 (R + L) apresentou diferença altamente significativa da média calculada, e o mesmo aconteceu para a modalidade 6 (I + L) em 1965/66.

A modalidade que combina Rural e Impeto em partes iguais forneceu em 1965/66 uma produção significativamente inferior ($P = 0,01$) ao da correspondente média calculada. Os desvios nos restantes não são significativos.

A mistura mais complexa (R + I + L) foi a única que apresentou produção média desviando-se positivamente da média calculada. Tal acontecimento resultou por esta modalidade ter atingido

em 1961/62 e 1965/66 produções significativamente superiores aos das médias calculadas.

Para os outros anos as produções situam-se a níveis abaixo dos valores calculados, sem contudo diferirem significativamente.

Conclusões

As observações de campo registadas nas tabelas 1 e 2, para os três génotipos utilizados, mostram para o Rural e Lusitano —linhas seleccionadas no local da experiência— comportamento semelhante no que respeita a ciclo vegetativo. O trigo Impeto consome, em média, mais 4 a 5 dias a atingir o espigamento, em consequência da fase de afilhamento e de crescimento do colmo ser neste caso mais longa. Por outro lado parece ser o mais rápido a completar o período de maturação. À excepção do ano 1962/63, em que se observou maior precocidade em Impeto e Lusitano, nos restantes anos as três linhas apresentaram sensivelmente a mesma data de maturação.

Verifica-se, como seria de esperar, alta dependência do ritmo vegetativo com o meio ambiente. A secura e calor ocorridos durante o período de maturação são factores desvantajosos frequentes que em certa medida são atenuados pelo carácter genético de precocidade de maturação que estas linhas possuem.

O trigo Impeto é comparativamente o de menor estatura e de melhores características de palha. Rural além de ser o mais alto não possui resistência à acama em nível aceitável em moderna agricultura. Lusitano situa-se em posição intermédia.

Os valores médios de resistência à acama, no quinquénio estudado, das modalidades misturas situam-se nas proximidades das médias calculadas a partir das respectivas variedades componentes. (Tabela 3).

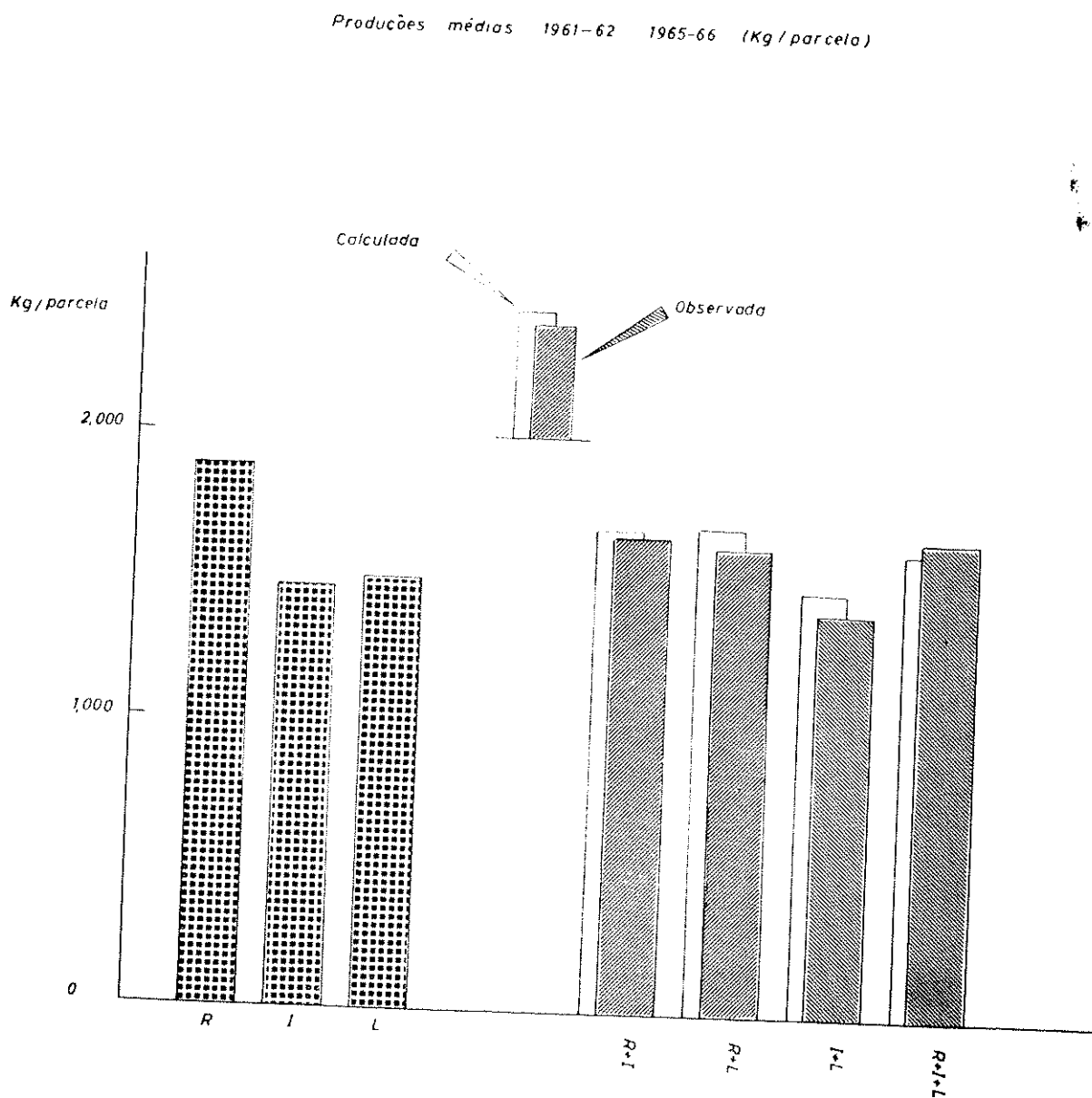
De acordo com os resultados das produções de grão incluídos tanto nas tabelas 4 e 6 como no esquema 2, parece concluir-se, que das três linhas de trigo ensaiadas Rural é em todos os anos o mais produtivo. As outras duas linhas, à excepção do ano 1963/64, em que Lusitano superiorizou Impeto por diferença altamente significativa, não apresentaram entre si desvios significativos.

As modalidades 4 (R + I) e 5 (R + L) em que Rural é misturado com Impeto ou com Lusitano, e embora ambas de menor pro-

dução que Rural quando semeado extreme, são quase sempre mais produtivas que Lusitano ou Impeto puros ou em combinação.

Também a combinação 1/3 Rural + 1/3 Impeto + 1/3 Lusitano (Modalidade 7) só se apresenta, em geral, melhor do que a combinação dos dois últimos em partes iguais [Modalidade 6 (I + L)], ou mesmo quando isolados [Modalidades: 2 (I) e 3 (L)].

Parece portanto que a alta produtividade do Rural (comparada com a do Impeto ou do Lusitano) influencia, favoravelmente a produção das misturas em que entra.



Esquema 3

A produção média dos ensaios varia de ano para ano, o que aliás é de prever dada a influência da componente ambiental na expressão de tal caracter. O ano 1963/64, corresponde ao de sementeira anormalmente tardia, de menor duração de ciclo vegetativo e de produção média mais baixa.

Note-se porém, que apesar da influência dos anos modificar o efeito das modalidades, nalguns casos, as conclusões gerais atraz apontadas mantêm-se mesmo quando agrupamos os anos (Tabela 6).

As diferenças entre as produções das modalidades em estado de pureza devidamente combinadas não diferem significativamente. Para a mistura apresentando maior diversidade genética, ou seja a modalidade 7 (R + I + L) parece esboçar-se, no entanto, desvio no sentido positivo.

APRECIACAO DAS COMPONENTES DA PRODUCAO

A apreciação das estruturas das plantas ensaiadas, ajudar-nos-ia certamente a compreender melhor o comportamento da produção. A que esboçamos, além de breve e incompleta, enferma ainda de omissão grave por não incluir elementos sobre o sistema radicular.

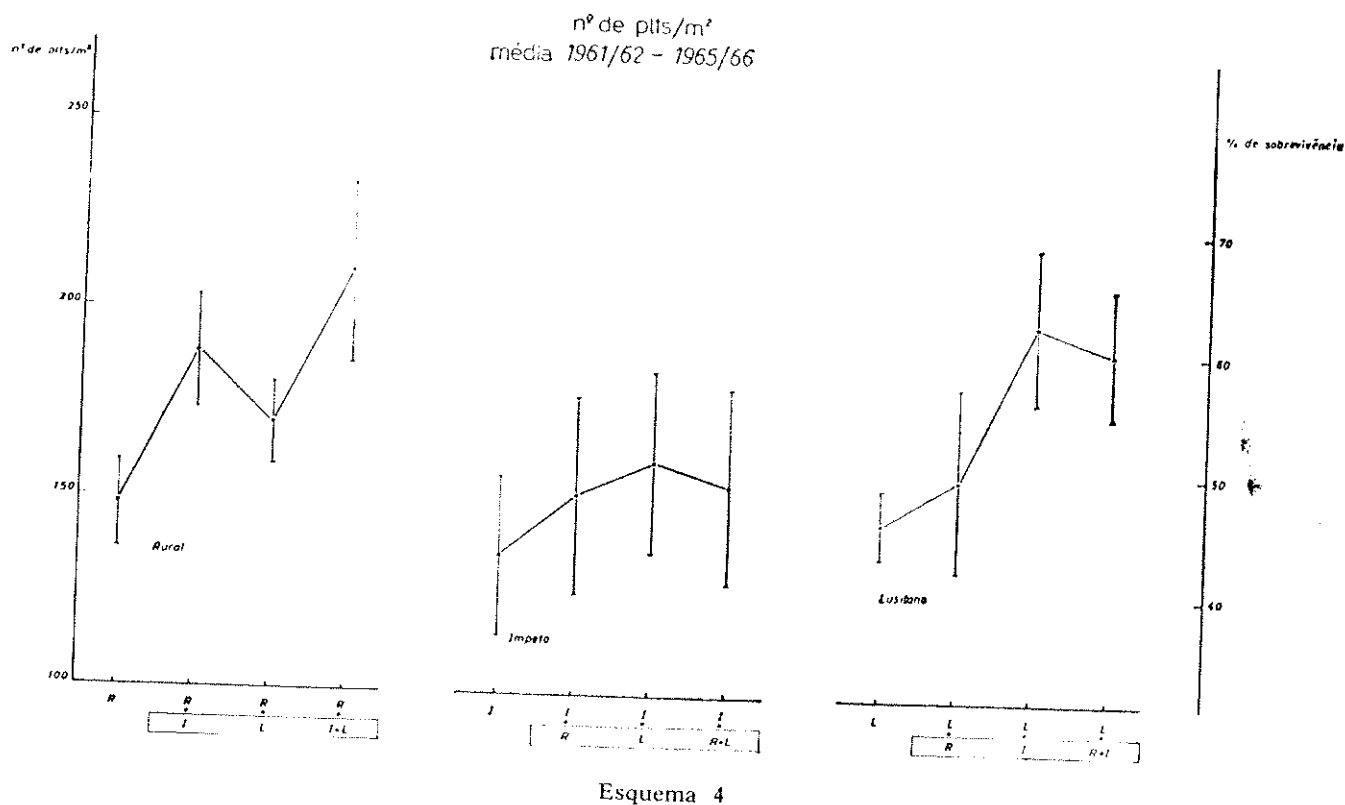
Diferenças acentuadas em algumas características morfológicas e fisiológicas dos órgãos aéreos dos genótipos —Rural, Impeto e Lusitano— com todas as probalidades estarão correlacionadas com variação nos respectivos sistemas radiculares.

No trigo as componentes morfológicas de produção desenvolvem-se ontogênicamente, e embora a sua expressão seja de natureza genética, é no entanto, fortemente influenciada pelo meio ambiente. Além disso a interdependência de umas para as outras marca um interessante efeito de compensação.

Número de plantas por unidade de superfície

A primeira componente a diferenciar-se consiste no número de plantas por unidade de superfície. Em princípio, deveria ser uma cópia fiel da densidade de sementeira aplicada. Contudo, na prática, acidentes inevitáveis de vária ordem motivam anualmente quebras

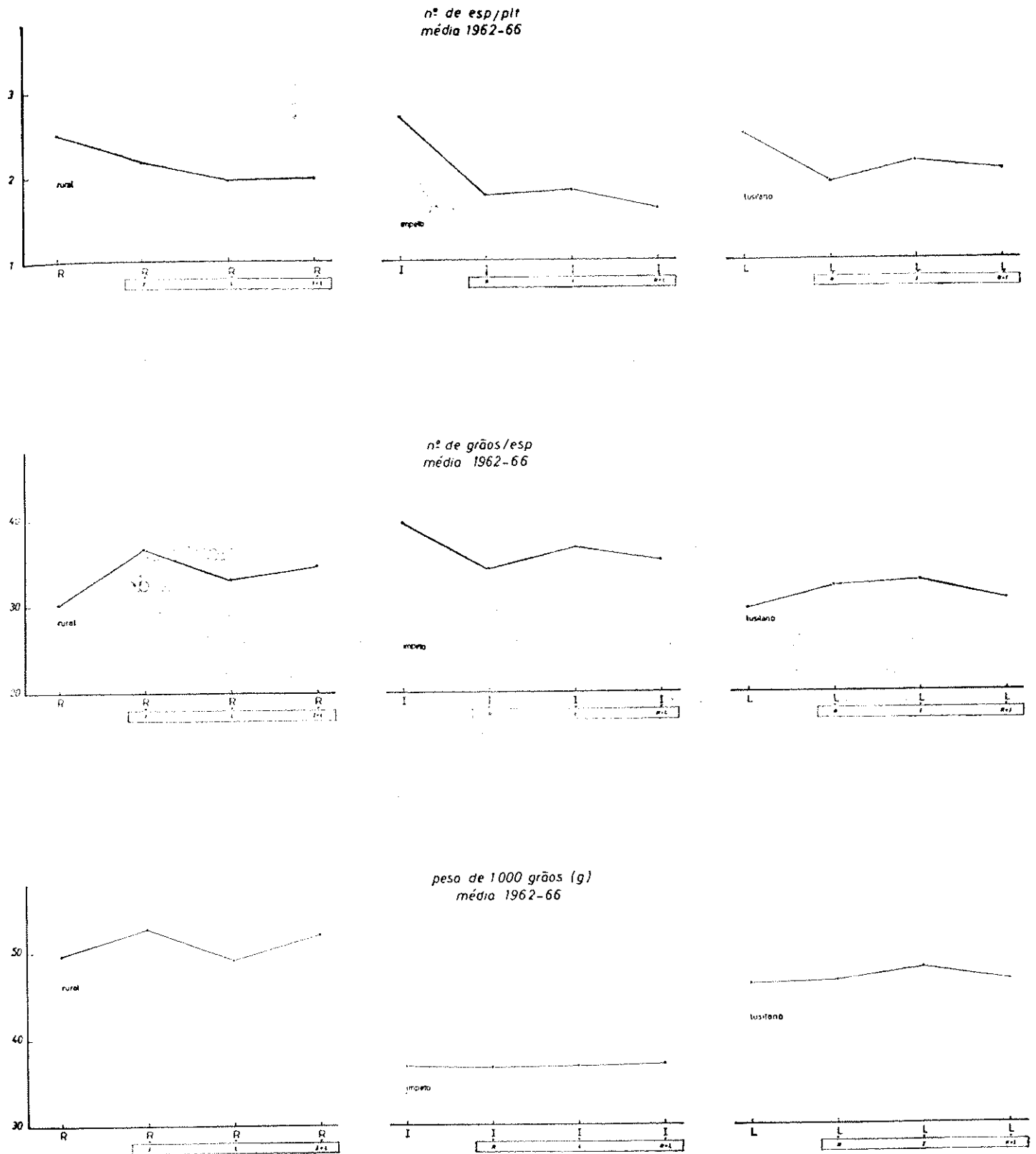
variáveis e acentuadas. Inferior poder germinativo da semente, ataques de insectos ou fungos, agressividade dos invernos, deficiente drenagem dos solos, etc., são exemplos dos muitos factores negativos causadores das reduções de povoamento.



Nestas experiências apesar de se terem seguido práticas esmeradas, e se ter utilizado semente de qualidade, verificou-se à semelhança do que sucede na grande cultura, em todas as parcelas e anos perdas variáveis no número de plantas por unidade de superfície. Assim os trigos: Rural, Impeto e Lusitano, quando em estado de pureza apresentaram taxas de sobrevivência média na ordem dos 46, 42 e 46 %, respectivamente. Mas estes mesmos genótipos, quando misturados nas combinações estudadas, parecem melhorar os valores médios do factor de produção considerado, não obstante as apreciáveis oscilações anuais registadas.

Número de espigas por planta

A capacidade de afilamento medida pelo número de espigas por planta é a segunda componente de produção a diferenciar-se.



Esquema 5

As variedades utilizadas não parecem, quanto a este caracter, mostrar diferenças apreciáveis entre si, embora em Impeto se observe um valor médio ligeiramente superior.

A capacidade de afilhamento de quaisquer destes genótipos embora em escala variável sofreu acentuada redução sempre que se cultivaram em estado de mistura. O trigo Impeto mostrou-se o mais sensível a tal efeito depressivo, sobretudo quando combinado com os dois restantes, ou seja na modalidade 7 (R + I + L).

Por outro lado, conforme anotámos, comportamento inverso ocorreu no que respeita à componente: número de plantas por unidade de superfície. Assim, os decréscimos registados para o afilhamento nas modalidades misturas, poderão, em certa medida ser uma consequência da interdependência entre povoamento e capacidade de formação de novos caules.

Número de grãos por espiga

Uma vez terminada a fase do afilhamento, correlativamente com o crescimento das plantas, os primórdios das espigas começam a desenvolver-se estabelecendo o número de espiguetas e flores por espiguetas. Mais tarde a fertilidade determinará a quantidade de sementes por espiga. Temos, por conseguinte, o factor de produção: número de grãos por espiga.

Quanto à dimensão desta componente a variedade italiana Impeto, mostrou-se, sem hesitações, a mais representativa. Rural e Lusitano sucedem-lhe a certa distância e em posições relativas muito aproximadas.

A expressão deste caracter nos genótipos estudados apresenta tendências diferentes, conforme se encontrem em estado de pureza ou em mistura. Assim para o Impeto em quaisquer das combinações ensaiadas observou-se forte efeito depressivo. Aliás reacção análoga e negativa mostrou também esta variedade quanto a outros órgãos aéreos, como por exemplo, comprimento do colmo, último entrenó e espiga, o que significa redução de vigor resultante da competição com Rural e/ou Lusitano. Por outro lado, o número de grãos por espiga das variedades Rural e Lusitano aumentou sistemáticamente quando estes trigos foram cultivados em mistura. Partindo de níveis semelhantes atingiram os maiores acréscimos nas combinações com Impeto — modalidades: 4 (R + I) e 6 (I + L).

Peso do grão

Finalmente, durante o período de maturação, as fases: acumulação de reservas e dissecação do grão contribuirão para o desenvolvimento total do grão, e por conseguinte da componente de produção —cronologicamente mais tardia— o peso do grão.

Uma das características do clima continental do local da experiência consiste no aparecimento precoce de condições de aridez. Deste modo, os cereais parganosos realizam frequentemente o período de maturação sob os efeitos do calor e secura. Por conseguinte o processo biológico de formação e desenvolvimento da semente ocorre com as plantas em excessiva transpiração e respiração e além disso com a superfície verde efectiva em acelerado declíneo o que implica decréscimos rápidos da taxa de assimilação e forçagem de maturação. Assim o melhoramento desta componente apresenta-se, sem dúvida, mais difícil nestes casos do que por exemplo nas regiões onde a humidade não falte nem se façam sentir altas temperaturas, como acontece nas zonas de forte influência marítima.

Ao apreciarmos os valores médios de “peso de 1 000 grãos (g)” fornecidos pelos genótipos ensaiados em cultura pura, facilmente deparamos com as boas posições alcançadas por Lusitano e mais ainda Rural, a par de uma dimensão modesta encontrada para o Impeto.

O aspecto positivo manifestado pelos trigos melhorados em Elvas, quanto à última componente de produção, mostra-nos que a selecção severa sobre material vegetando no condicionalismo ecológico para onde se destina favorece o isolamento de fenótipos transportando o caracter desejado.

O comportamento de peso do grão no Impeto, permanece aproximadamente constante, quer em estado de pureza, quer em quaisquer das misturas ensaiadas.

Em Lusitano cresce quando misturado com Rural e sobretudo com Impeto, baixando ligeiramente quando combinado com ambos.

O peso do grão em Rural cresce nas misturas incluindo Impeto e mantém-se aproximadamente inalterável quando associado com Lusitano.

Conclusões

O facto do genótipo Rural ter atingido entre todos os trigos estudados sistematicamente os mais altos rendimentos de grão, levamos a considerá-lo como o melhor adaptado. Das suas componentes de produção: o número de espigas por planta, embora se aproxime do das outras linhas, afigura-se-nos, no entanto, merecedor de melhoramento, e com mais forte razão o número de grãos por espiga. Quanto à última componente a diferenciar-se, isto é, o peso do grão, situa-se em nível francamente elevado, sobretudo se atendermos a que nos encontramos num clima onde com frequência se manifestam condições de aridez no período final do ciclo vegetativo.

As características de certos órgãos aéreos como sejam: apreciável comprimento do último entrenó, espigas e aristas longas, favorecem a estrutura desta planta em ordem à produção. (Mac Key, 1966, 67; Saghir et altera, 1968). Em contrapartida a alta susceptibilidade à acama, correlacionada com a excessiva estatura, necessitam urgentemente de melhoramento.

No Rural, verificou-se, quando em cultura misturada, acréscimos das componentes de produção: número de plantas por unidade de superfície, número de grãos por espiga e peso do grão, e por outro lado decréscimo do número de espigas por planta.

Mostrou além disso acentuada agressividade sobre o Impeto. O trigo Lusitano, embora em escala um pouco inferior apresentou comportamento análogo ao Rural.

O genótipo Impeto, seleccionado em Itália, superiorizou os restantes quanto à componente número de grãos por espiga, e características agronómicas da palha e resistência à acama. O peso do grão parece-nos, necessitado de franco aumento.

Mostrou-se bastante afectado quando misturado com as linhas utilizadas nestas experiências.

SUMARIO

Numa experiência realizada na EMP em Elvas no quinquénio 1961/62-1965/66 procurou-se obter informação, sob o ponto de vista agronómico, do cultivo de trigo em cultura pura ou em mistura de

genótipos. Para tal, escolheram-se as bem adaptadas cultivares de *T. aestivum* ssp. *vulgare*: Rural, Impeto e Lusitano, por serem de alto interesse económico, possuírem alguma afinidade genética e além disso características morfológicas, fisiológicas e agronómicas facilmente diferenciáveis.

De acordo com a apreciação estatística dos valores de rendimento de grão, parece concluir-se, que das três linhas ensaiadas Rural é sistematicamente a mais produtiva. Por sua vez, o Impeto e o Lusitano, apresentam quanto a este caracter comportamento similar.

As modalidades: 4 (R + I) e 5 (R + L) em que o Rural é semeado conjuntamente com o Impeto ou com o Lusitano, são quase sempre mais produtivas que o Lusitano ou o Impeto puros ou em combinação.

A combinação (modalidade 7) de 1/3 Rural + 1/3 Impeto + 1/3 Lusitano apresenta-se, em geral, melhor do que a combinação dos dois últimos em partes iguais (modalidade 6) ou os mesmos isolados (modalidades 2 e 3).

A mais alta produtividade relativa do Rural parece influenciar, favoravelmente, a produção das misturas em que entre.

As produções médias das modalidades misturas aproximam-se das produções calculadas a partir das suas componentes quando em cultura pura.

Uma breve apreciação da estrutura da produção mostra-nos desvios apreciáveis, quanto a valores das componentes de produção, entre os genótipos seleccionados em Elvas: Rural e Lusitano e o trigo italiano Impeto. Por sua vez as estruturas destas plantas quando misturadas, apresentam comportamentos diferentes, sendo notório o bom aspecto competitivo do trigo Rural.

SUMMARY

During the period 1961/62 to 1965/66 an experiment was carried out in the Portuguese Plant Breeding Station, at Elvas, to compare the production of pure cultivars of wheat with mixtures of these genotypes.

The pure lines (cultivars) used were Rural (n.º 1), Impeto (n.º 2) and Lusitano (n.º 3) all belonging to the species *Triticum aestivum*

ssp *vulgare* MAC KEY, which have a certain genetic affinity; besides they have quite different morphological, physiological and agricultural characteristics and possess high economical value.

The mixtures under study were:

N.º 4 — Rural and Impeto in proportion 1 : 1.

N.º 5 — Rural and Lusitano in proportion 1 : 1.

N.º 6 — Impeto and Lusitano in proportion 1 : 1.

N.º 7 — Rural, Impeto and Lusitano in proportion 1 : 1 : 1.

Among the pure cultivars Rural consistently proved to be the most productive. Meanwhile the yields of Impeto and Lusitano did not differ statistically.

Mixtures n.º 4 (Rural + Impeto) and n.º 5 (Rural + Lusitano) yield consistently more than Lusitano or Impeto alone or than the mixture of these two cultivars.

Mixture n.º 7 (composed of Rural + Lusitano + Impeto, in proportion 1 : 1 : 1) is generally better than a combination of the two last cultivars in proportion 1 : 1, which is mixture n.º 6, or each of them alone (cases n.º 2 and n.º 3).

Apparently, the yield of mixtures in which Rural is included, benefits from the presence of this cultivar and of his higher yield.

Mean yields of the different mixtures closely resemble the calculated values considering the yield of the components.

A brief appreciation of yield characteristics (v. g. number of plants per square meter, number of spikes per plant, number of kernels per spike, 1000 grain weight) shows marked differences between Elvas breed genotypes (Rural and Lusitano) and the italian cultivar Impeto.

The same characteristics show different results when the cultivars are cultivated as mixtures (n.º 4, 5, 6 and 7), the good competitiveness of Rural being strikingly noticeable.

BIBLIOGRAFIA CITADA

ATKINS, I. M. e M. J. NORRIS

1955 The influence of awns on yield and certain morphological characters of wheat. Agron. Jour. 47: 218-220.

- BARRADAS, M. T. e J. V. MALATO-BELIZ
1960 Como nasceram dois novos trigos. *Agricultura* 5: 12-16.
- BARTLETT, M. S.
1937 Properties of sufficiency and statistical tests. *Proc. Roy. Soc. London. Series A* 160: 268-282.
- BORLAUG, N. E.
1959 The use of multilineal or composite varieties to control airborne epidemic diseases of self-pollinated crop plants. *Proc. 1st. Int. Wheat Genet. Symp.* 1958, Public Press Ltd. Winnipeg, 12-27.
- BOX, G. E. P.
1953 Non-normality and test of variance. *Biometrika* 40: 318-335.
1954 Some theorems on quadratic forms applied in the study of analysis of variance problems. I-*Ann. Math. Stat.* 25: 290-302.
- COCHRAN, W. G. e GERTRUDE M. COX
1957 *Experimental design* - John Wiley & Sons, Inc., New York.
- FORLANI, R.
1954 *Il Frumento*. Tip. del Libro. Pavia.
- FRANKEL, O. H.
1939 Analytical yield investigations on New Zealand Wheat. IV-Blending varieties of wheat. *Jour. Agric. Sci.* 29: 249-261.
- GUSTASSON, Å
1953 The cooperation of genotypes in barley. *Hereditas* 39: 1-18.
- JEFFERS, N. J. R.
1962 *Experimental design and analysis in forest research*. Trad. Arlinda L. F. de Oliveira e Augusto J. de Oliveira. Centro de Estudos dos Solos Florestais. D.G.S.F.A., Lisboa.
- LACADENA, J. R.
1962 Estudio teórico sobre la utilidad de las variedades multilíneas en plantas autógamias. *An. Est. Exp. Aula Dei.* 7: 79-84.
- LE CLERG, E. L.; W. H. LEONARD e A. G. CLARK
1962 *Field plot technique*. Burgess Publishing Company, New York.
- MAC KEY, J.
1967 *Ecological adaptation of the yield structure in Cereals*. Symp. XXV Aniv. EMP (Elvas). Mimeo.
- MALATO-BELIZ, J. V.
1952 Novos trigos portugueses. Classificação e descrição botânicas. *Melhoramento.* 5: 1-120.
- PEARCE, S. C.
1953 Field experimentation with fruit trees and other perennial plants. Tech. Commun. Commonw. Bur. Host. Plant Crops-23.
1965 *Biological statistics. An introduction*. McGraw Hill., New York.
- SAGHIR, A. R.; A. R. KHAN e W. W. WORZELLA
1968 Effects of plant parts on the grain yield, kernel weight and plant weight of wheats and barley. *Agron. Jour.* 60 (1): 95-97.
- SÁNCHEZ-MONGE
1960 Correlaciones en la mejora del trigo. *Melhoramento.* 13: 37-46.

Notas sôbre algumas experiências de indução artificial de mutações com vista ao melhoramento de cevada para malte

por M. C. BARRADAS

Estação de Melhoramento de Plantas, Elvas

A B S T R A C T

Two-row malting barley, as an economical important crop is very recent in Portugal. Many efforts are being carried out in order to elect well-adapted germplasms to the main cereal area of that country. Dormant seeds of two-row barley Beka were treated both with ionizing radiations (X-rays and neutrons) and some vegetable oils (olive oil, groundnut oil, and castor oil). Remarkable differences regarding to survival rate, fertility and vigor of the M_1 plants were found correlatively to the different mutagenic agents applied. M_2 seedlings showing chlorophyll deficient mutations were detected only for descendents from X-rays and castor oil treatment. X-rays showed comparatively much higher mutagenic efficiency.

S U M A R I O

Neste trabalho dão-se a conhecer alguns dos resultados primários obtidos numa experiência de mutações, básicamente orientada no sentido de se isolarem indivíduos genéticamente alterados, mostrando-se progressivos sob o ponto de vista de melhoramento.

Sementes puras, a 11,99 % de humidade, da cevada de duas ordens Beka destinada à indústria de malte e que representa neste momento o genótipo de maior interesse, tanto no aspecto agromómico como tecnológico, foram tratadas a várias doses de radia-

ções ionizantes no Laboratório de Física e Energia Nuclear da Junta de Energia Nuclear.

Por sua vez, na E. M. P. e à semelhança das investigações de Swaminathan e Natarajan (1959), trataram-se sementes puras da mesma cevada (Beka) com óleos vegetais: azeite, amendoim e rícino.

Observações na 1.^a geração após tratamento (percentagem de sobrevivência no estado de plântula, comprimento médio do colmo principal, número médio de espigas por planta e classes de fertilidade) mostram-nos, em certa medida, os efeitos primários depressivos, causados pelos agentes mutagénicos e doses utilizadas.

Sementes M_2 foram semeadas na estufa para detecção de mutações de clorofila. Neste teste, que apenas se pode realizar com material proveniente dos tratamentos com raios X e óleos vegetais, por as doses de radiações de neutroões aplicadas terem sido letais, encontramos uma nítida supremacia dos efeitos mutagénicos da radiação X.

No que respeita aos óleos vegetais só encontramos mutações (todas do mesmo tipo e letais) nas plântulas resultantes do tratamento com óleo de rícino.

SUMMARY

In this work is given some information of the primary results obtained in an experiment of artificial induced mutations, aimed to the isolating of individuals, genetically changed, showing progression from the point of view of breeding.

Pure seeds with 11,99 % humidity, as two row Beka barley, destined for the malting industry, and representing at this moment the genotype of greatest interest, both agronomically and technologically, were treated with several doses of ionizing radiation in the Portuguese Physics and Nuclear Energy Laboratory.

At this time also at E. M. P. there was a similarity to the Swaminathan and Natarajan investigations (1959), where pure seeds of the same genotype (Beka), were treated with vegetable oils: olive oil, groundnut oil and castor oil.

The observations on the first generation after treatment (the percentage of survival in seedlings; the average length of straw,

the average number of tillers per plant, and the number of fertile plants) show us, in a certain way, the primary depressive effects caused by the mutagenic agents, and the doses that were most useful.

The seeds M_2 were sown in the greenhouse conditions for detecting chlorophyll mutations.

In this test was only used material from the X-rays and vegetable oils as the doses with neutron radiation were lethal. A clear supremacy of mutagenic effects from the X-ray treatment were observed.

With regard to the vegetable oils were only found mutations (all of the same type and lethal) from the treatment with castor oil.

INTRODUÇÃO

A cultura da cevada para alimentação do gado tem ocupado desde longa data acentuada importância na economia agrícola do País. Assim, no decénio 1956-65 uma média de 134.229 ha foram anualmente destinados ao cultivo deste cereal.

No entanto, apesar da grande tradição desta cultura e até da existência de apreciada riqueza génica no material que chegou até nossos dias, representativo de um longo processo de selecção, o que é facto, é o cultivo da cevada para a indústria de malte ser muito recente. Não longe vai o tempo em que agricultores e industriais assentavam no princípio que entre nós não existiam condições favoráveis para produzir esta matéria prima e por conseguinte havia que resignarmos-nos à fatalidade de perpétuos importadores.

No princípio dos anos quarenta, Victoria Pires e Valente de Almeida, atacam o problema e podem em 1944 demonstrar cientificamente a viabilidade económica da cultura da cevada para malte.

Passado pouco tempo a E. M. P. entrega à lavoura duas cultivares (Boa Fé e Esperança), seleccionadas a partir de material da Europa Central, que só não representaram maior impulso para a economia do país, devido ao então deficiente sistema de comercialização de semente adicionado a um certo cepticismo da parte da indústria.

Nos anos cinquenta, a indústria cervejeira beneficia de uma total renovação e mercê do dinamismo do seu corpo técnico inicia-se uma íntima cooperação com a E. M. P. e outros organismos oficiais, o que permitiu encarar o problema sob novas perspectivas.

Ampliada a equipa de trabalho e os meios financeiros necessários, tem-se podido desenvolver desde 1955 um bem elaborado programa, visando a solução do problema no seu duplo aspecto, agrícola e industrial.

Uma rede de ensaios estabelecida anualmente em diferentes locais representativos da região cerealífera, permitiu seleccionar génotipos bem adaptados e satisfazendo os objectivos focados.

Dentre as linhas seleccionadas merece especial relevo, quer pelo seu valor cultural, quer industrial, a cultivar Beka obtida pelo Dr. Bergal em França.

Esta cevada mantém-se desde 1961-62 na lista oficial.

Paralelamente, um somatório apreciável de ensaios agronómicos de vária ordem, deram-nos a conhecer as técnicas culturais mais aconselháveis para esta cultivar, de maneira a aproveitarem-se as suas vantajosas características hereditárias.

A partir de 1967 estabeleceu-se um novo sistema de comercialização que atraiu decisivamente os agricultores para a cultura da cevada para malte. Ao interesse por estes manifestado associou-se a útil soma de conhecimentos técnicos já adquiridos, o que contribuiu para que a colheita de 1968, fornecesse pela primeira vez quantidade suficiente deste produto para as necessidades do país. Deste modo, de uma situação tradicionalmente importadora, podesse passar à de autoabastecido.

O continuo aumento da procura de cevada para malte, a possibilidade de se cultivar em boas condições técnicas e económicas, a obtenção de matéria prima de qualidade e ainda a necessidade de se evitar a fuga de divisas, determinam que os trabalhos de melhoramento dediquem particular atenção a este cereal.

Pena é, que o programa planeado esteja restringido por limitações de vária ordem e assim não possua toda a dimensão exigida pela actual conjuntura.

Os estudos em curso procuram, em última análise, eleger génotipos com maior rendimento agrícola e industrial.

As linhas de pesquisa desenvolvidas distribuem-se da maneira seguinte:

- Estudos de adaptação com cultivares melhoradas em centros estrangeiros.
- Melhoramento através o método das hibridações.
- Indução artificial de poliplóides (Iniciado em Elvas pelo Eng^o Miguel Mota e continuado pelo mesmo na E. A. N., em Oeiras).
- Indução artificial de mutações em ordem a eleger mutantes progressivos.

MATERIAL E MÉTODOS

Nestas experiências foram utilizadas amostras de sementes dormentes a 11.99 % de humidade, de calibre superior a 2,5 mm da cevada de duas ordens Beka, provenientes de descendências controladas de uma planta típica daquela cultivar.

Os agentes mutagénicos ensaiados consistiram em radiações ionizantes (raios X e neutrões) e óleos vegetais (azeite, amendoim e rícino).

A aplicação das radiações esteve a cargo do Laboratório de Física e Energia nuclear da Junta de Energia Nuclear e consistiu:

a) Radiação X

- Uma amostra de 200 grãos a uma dose total de 16 Krad e a uma dose por unidade de tempo de 295 rad m⁻¹.
- Uma amostra de 200 grãos a uma dose total de 20 Krad e a uma dose por unidade de tempo de 295 rad m⁻¹.

b) Radiação de neutrões

- Uma amostra de 200 grãos a uma dose total de 750 rad e a uma dose por unidade de tempo de 132 rad m⁻¹.

Esta amostra foi irradiada na piscina do R P I e 90 % da dose foi provocada por neutrões rápidos:

- Uma amostra de 200 grãos a uma dose total de 900 rad e a uma dose por unidade de tempo de 30 rad m⁻¹. Esta dose é devida a neutrões lentos.

Por sua vez na E. M. P. mergulharam-se amostras de 200 grãos

durante 24 horas à temperatura controlada de 23° C nos seguintes óleos vegetais:

200 grãos mergulhados durante 24 horas em azeite

200 grãos mergulhados durante 24 horas em óleo de amendoim

200 grãos mergulhados durante 24 horas em óleo de rícino

Como testemunhas funcionaram uma amostra de 200 grãos que esteve durante as mesmas 24 horas mergulhada em água e uma amostra de 200 grãos que não sofreu qualquer tratamento.

As sementes tratadas com radiações ionizantes foram semeadas imediatamente após terem sido recebidas na E. M. P., no dia 5 de Dezembro de 1966. Nessa mesma data foram semeadas as sementes não tratadas.

As sementes mergulhadas em água e óleos vegetais uma vez completadas as 24 horas foram uma a uma cuidadosamente limpas com um pano e em seguida semeadas (7/XII/966).

Amostras de 100 grãos por agente e dose foram semeadas no campo, dentro de uma gaiola de rede afim de se garantir protecção contra os pássaros. O processo de sementeira adoptado consistiu no das tábuas furadas ficando as plantas espaçadas de 5 cm na linha e 25 cm entre as linhas.

Para cada tipo de tratamento e dose fizemos corresponder um talhão independente.

O restante material tratado foi semeado na estufa para ser utilizado em outras observações.

Assim, os valores biométricos apresentados dizem respeito ao material semeado em condições de campo, visto serem as que mais se aproximam do *habitat* desta cultura.

15 dias após a sementeira procedemos à contagem das plântulas sobreviventes em todos os talhões.

No fim do inverno e princípio da primavera, registaram-se ataques, sem grande severidade, de *Rhynchosporium secalis*, à excepção de uma mancha afectando grande número de plantas povoando o talhão testemunha (sementes não tratadas) que sofreram fortíssima infecção deste parasita, o que as prejudicou gravemente. Devido a este acidente resolvemos não o considerar daqui em diante para afeitos comparativos.

As condições metereológicas ocorreram favoráveis à cultura da

cevada, o que contribuiu para o material ter atingido a maturação sem acidentes de maior.

Em todos os talhões, depois das respectivas plantas estarem maduras procedeu-se ao arranque individual de cada uma, afim de serem observadas no laboratório.

Para cada tratamento e dose foram feitas determinações do número de entrenós, comprimento do colmo principal, comprimento da espiga principal, número médio de espigas por planta, fertilidade da espiga principal e espigas secundárias e classes de fertilidade por espiga.

As plantas resultantes do tratamento com neutrões (rápidos e lentos) não chegaram a atingir a floração, pelo que não puderam ser consideradas naqueles testes. Este facto parece indicar-nos que as doses 750 rad de neutrões rápidos e 900 rad de neutrões lentos nas condições em que o material foi cultivado, são letais para o genótipo em estudo. As progénies das plantas sobreviventes M_1 foram observadas em condições de estufa e em pleno campo. Metade da semente produzida por cada planta M_1 foi semeada na estufa para pesquisa de mutações deficientes de clorofila.

O restante material semeou-se no campo seguindo os princípios de um esquema de melhoramento dentro do método do pedigree.

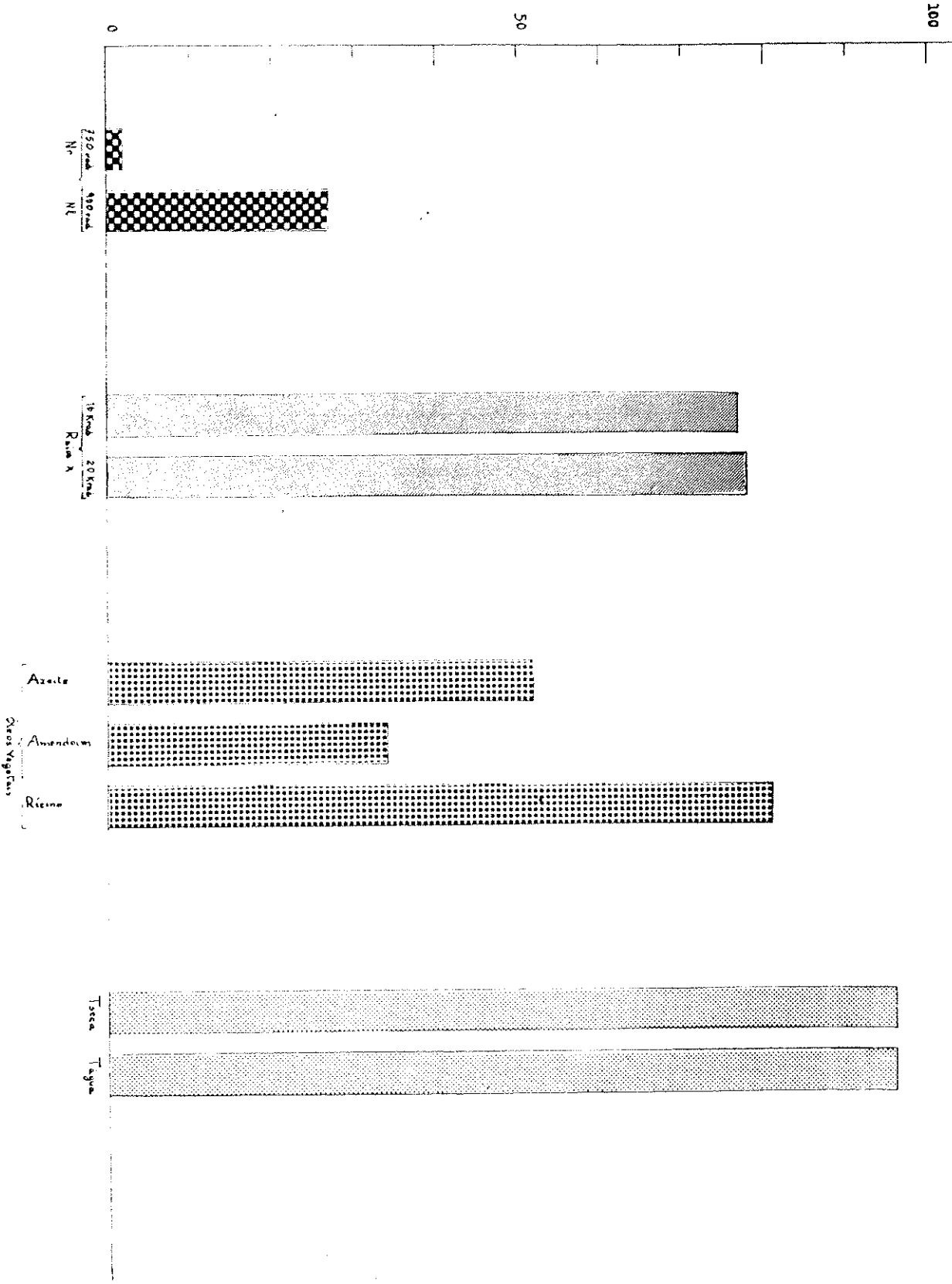
RESULTADOS E DISCUSSÃO

O atraso do crescimento foi o primeiro efeito depressivo observado nas plantas provenientes das sementes tratadas, quer com radiações, quer com óleos vegetais.

As contagens 15 dias após a sementeira das plântulas vegetando em pleno campo marcam para todos os tratamentos acentuado decréscimo em relação aos talhões testemunhas (Gráfico 1).

O óleo de rícino seguido de radiação X parecem ter sido os agentes que em menor percentagem afectaram a sobrevivência das sementes. Para os restantes óleos vegetais ensaiados o azeite e ainda mais vincadamente o óleo de amendoim induziram drásticas reduções na capacidade germinativa. Por outro lado as doses de radiações de neutrões aplicadas provocaram não só alta letalidade como ainda franca diminuição de vigor nas plântulas sobreviventes. Estes

% de plantas
15 días após semente



aspectos, parecem indicar-nos, que as doses ensaiadas tanto para neutrões rápidos como lentos não são aconselhadas para o genótipo e natureza da experiência.

Aliás o crescimento destas plântulas deu-se com a maior dificuldade apresentando-se sempre o material muito débil e acabando por morrer sem ter atingido a floração.

A letalidade é uma característica complexa resultando da soma de efeitos nucleares e citoplásmicos assim como de destruição e tolerância (Mac Key, 1960) e por conseguinte a sua determinação não nos fornece indicação convincente sobre o efeito genético dos agentes usados. Tanto mais, conforme se demonstrou, os raios X (Mac Key, 1951) exercem acentuada toxicidade nas células dos organismos tratados, e o mesmo acontecerá possivelmente para o caso dos óleos vegetais.

O Quadro 1 mostra-nos que á excepção do óleo de rícino todos os outros tratamentos mantiveram o efeito depressivo apresentando-se as plantas sobreviventes na altura da maturação diminuídas em relação à testemunha.

QUADRO 1. — Observações na M_1

Tratamento	Dose	Colmo principal		Comprim. médio de esp. princ. (cm)	N.º medio de esp/plt
		N.º de entrenós	Comprim. médio (cm)		
Testemunha (água)	Merg. 24h	6,9	75,3	12,3	7,6
Raios X	16 Krad	7,2	66,1	10,0	7,5
Raios X	20 Krad	7,5	51,9	10,4	6,0
Azeite	Merg. 24h	6,1	70,6	11,2	3,8
Óleo de Amendoim	Merg. 24h	6,2	74,2	12,0	7,0
Óleo de Ricino	Merg. 24h	7,2	80,3	11,8	8,8

A radiação X foi a que mais afectou o crescimento tanto do colmo como da espiga. Para este agente físico, verificou-se paralelamente ao aumento de dose, uma perda mais acentuada sobretudo no crescimento e capacidade de afilhamento.

No que respeita aos tratamentos com óleos vegetais encontramos para o óleo de rícino um comportamento diferente. Neste caso parece até existir um efeito estimulante, marcado por acréscimo de

comprimento do colmo e capacidade de afilamento, enquanto a dimensão da espiga se manteve sensivelmente ao nível da testemunha.

No óleo de amendoim as diferenças registadas em relação ao material não tratado são bastante reduzidas.

Por sua vez o azeite causou nítida diminuição de vigor (menor comprimento do colmo, da espiga e sobretudo do número de filhos).

Estes valores biométricos parecem mostrar-nos que os efeitos biológicos primários dependem, além de outras causas (momento do tratamento, estado metabólico do material, genótipo, meio ambiente) da natureza do agente e dose aplicada.

A apreciação do fenómeno da esterilidade tem ocupado desde as primeiras investigações de Gustafsson (1940-1947) e do grupo sueco (Gustafsson e Mac Key, 1948; Ehrenberg, Gustafsson e Lundqvist, 1961; Mac Key, 1951, 1954 a, 1958, 1960) particular interesse. Devido à favorável morfologia das espigas da cevada de duas ordens a esterilidade resultante de alterações fisiológicas é um acontecimento biológico facilmente determinável quantitativamente e por isso permite que se utilize apreciável número de plantas, o que implica encontrarem-se valores seguros. Neste aspecto situa-se em posição mais praticável que as investigações citológicas, pois estas são demoradas e além disso dificilmente se dispõe de meios humanos e materiais para se realizarem em escalas tão amplas como as contagens da esterilidade. Por outro lado, conforme Gaul (1964) aponta, as observações meióticas apenas fornecem fracção do quantitativo total das mutações cromosómicas que sobreviveram até à fase esporófito. Contudo e ainda segundo o mesmo autor, ambos os métodos de avaliação são indispensáveis quando se pretende investigar a resposta de um tratamento com um novo agente mutagénico.

A esterilidade M_1 pode ser causada por uma soma de efeitos fisiológicos de carácter não hereditário, por alteração na estrutura dos cromosomas ou dos genes. Para conhecidos agentes mutagénicos como sejam as radiações ionizantes (raios X e neutrões) a apreciação deste valor fornece indicação das modificações inter e intra-cromosómicas induzidas as quais causam desequilíbrios genéticos, meióticos e zigóticos (Gustafsson 1940). Nylan et altera (1964) põem em dúvida a correlação entre esterilidade e as frequências de distúrbios cromosómicos e de mutações, quando se consideram

certos agentes mutagénicos químicos capazes de induzir alta esterilidade, mas relativamente baixa frequência de aberrações cromosómicas, como sejam o EMS (ethyl-metano-sulfonato) e o DS (diethyl sulfato). Estes em comparação com as radiações ionizantes provocam menor número de desarranjos cromosómicos mas em compensação mais alta taxa de mutações ao nível do gene. (Ehrenberg, Gustafsson e Lundqvist, 1961 e cit. Nylan et altera, 1964).

Parece, por conseguinte, que os valores da esterilidade podem fornecer mais clara indicação sobre os distúrbios cromosómicos induzidos no caso dos tratamentos com radiações ionizantes.

Os agentes mutagénicos utilizados nestas experiências foram aplicados nas sementes e por conseguinte em organismos multicelulares, pelo que deve ter acontecido, umas tantas células terem sido destruídas, enquanto outras sofreram injúrias de vária ordem e algumas mantiveram-se sem alteração. Portanto é natural que as sucessivas divisões celulares ocorridas durante a diplofase e haplofase tivessem sido influenciadas pela pressão da selecção diplontica e haplontica, respectivamente, o que traduz eliminação de células desequilibradas e por conseguinte aumento relativo de fertilidade. O facto de na "zona sensitiva" da semente já existirem 4-5 primórdios de espigas e cada primórdio ser constituído por um grupo de células germinais, resulta que os indivíduos da 1ª geração podem expressar um pronunciado carácter quimérico (MacKey, 1951). Estes acontecimentos contribuem em certa medida para um abaixamento da correlação entre a frequência de distúrbios cromosómicos ocorrida nos primeiros ciclos mitóticos após a germinação e a taxa de esterilidade.

Como estamos tratando de experiências em organismos diplóides e portanto com fraca tolerância para suportarem profundos distúrbios cromosómicos, sucede que os indivíduos genéticamente alterados viáveis a esperar e que serão os únicos que poderão representar interesse dentro os objectivos pretendidos, transportarão provavelmente diminutas modificações na sua estrutura cromosómica ou mutações ao nível do gene. Assim, ainda que a apreciação do fenómeno da esterilidade seja de grande importância para nos orientar sobre o efeito genético de um dado agente, parece-nos, contudo, não conter garantia bastante para nos informar sobre a frequência de mutações a esperar. Conforme as investigações de EHRENBURG, GUSTAFSSON e LUNDQVIST (1956) demonstraram, a esterilidade (de-

pendente de arranjos cromosômicos) e mutação não são induzidos pelo mesmo mecanismo. Em tratamentos de semente de cevada com aldeído fórmico, em determinadas condições, já em 1950 FAVRET conforme os autores precedentes assinalam, verificara a inatividade mutagénica deste agente, não obstante ter induzido esterilidade. Em contrapartida para a nebularina, os autores suecos, encontraram reduzida esterilidade e elevadas taxas de mutações induzidas.

As contagens de fertilidade em percentagem efectuaram-se nas plantas sobreviventes e determinaram-se para cada tratamento e dose: a fertilidade média da espiga principal, a fertilidade média das espigas secundárias e a fertilidade média por planta (Quadro 2).

QUADRO 2.— *Fertilidade em M₁*

Tratamento	Dose	Fertilidade (%)		Fertilidade média por plt. M ₁ %	Desvio p. ^o a testem. em %
		Esp. princ.	Esp. secund.		
Testemunha (água)	Merg. 24h	95,59	92,58	94,13	—
Raios X	16 Krad	77,16	64,45	66,75	— 29,09
Raios X	20 Krad	53,96	36,06	40,22	— 57,27
Azeite	Merg. 24h	60,93	51,00	52,71	— 44,00
Óleo de Amendoim	Merg. 24h	76,88	64,45	68,19	— 27,56
Óleo de Rícino	Merg. 24h	84,89	70,24	72,92	— 24,66

Como é natural, em todos os casos considerados, a fertilidade mais elevada corresponde à espiga principal. No entanto, seja qual for o agente considerado, as plantas resultantes de sementes tratadas, apresentam, na generalidade, não só mais alta esterilidade, como ainda maior afastamento entre a espiga principal e as secundárias quanto à produção de fruto.

Tanto as investigações de EHRENBERG, GUSTAFSSON e LUNDQVIST (1961) como as de GAUL (1964) demonstraram que as três primeiras espigas que se formam na planta transportam frequência de mutações mais elevada em comparação com as posteriores. Assim ao nível da planta é provável que nas espigas com maior fertilidade se possam encontrar descendências com maior número de mutações induzidas.

Para o caso restrito das radiações X, registámos para quaisquer

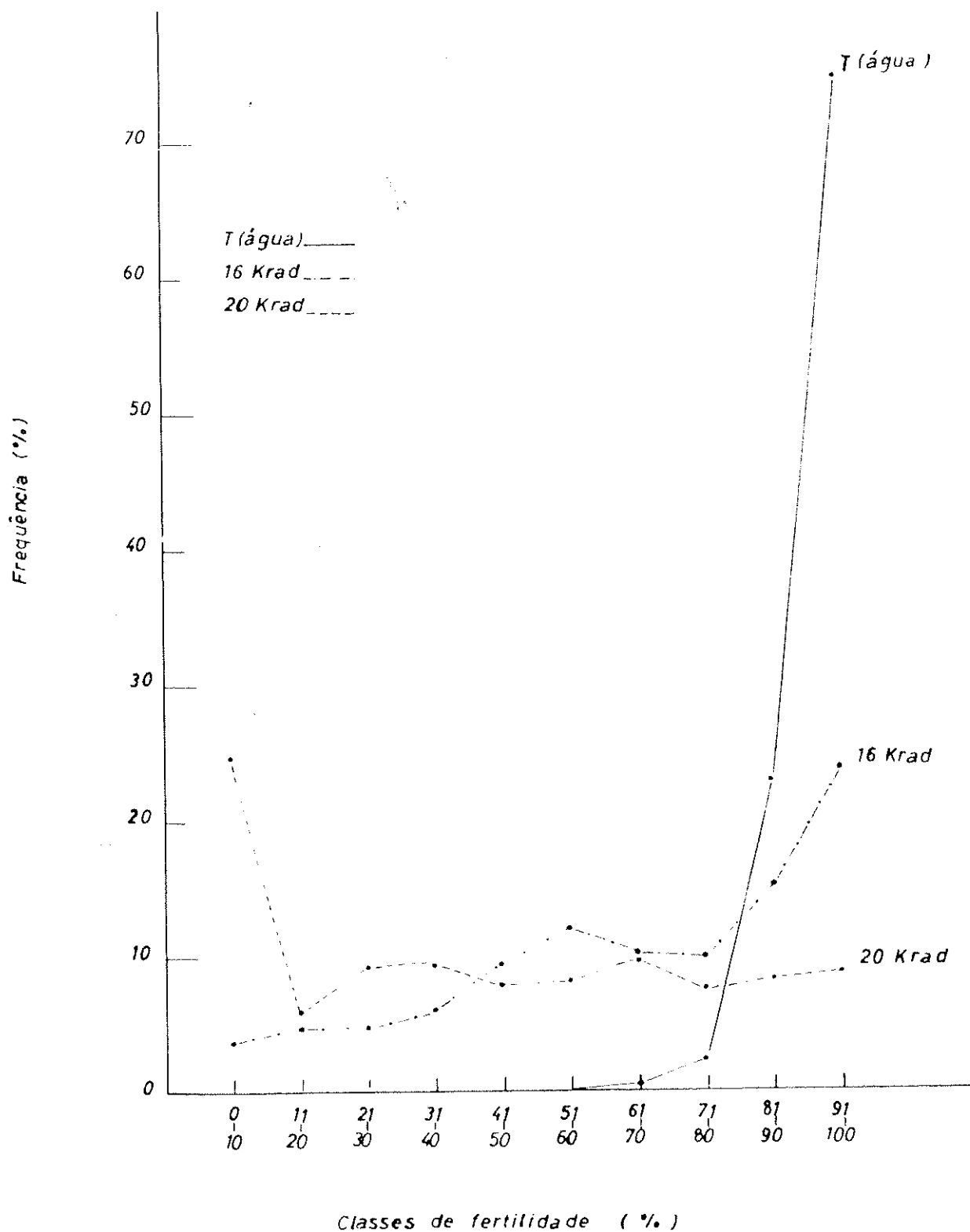
das doses aplicadas uma pronunciada indução de esterilidade M_1 a qual por sua vez é ainda agravada para o tratamento correspondente à dose 20 Krad, onde chega a ultrapassar os 50 %. Este comportamento está de acordo com experiências anteriores, e MATSUMURA (1959), admite que o decréscimo de fertilidade devido ao aumento de dosagem de raios X segue uma relação linear.

Para este tipo de radiação ionizante, segundo os resultados apresentados por EHRENBERG et altera (1961), seria de esperar mais alta frequência de mutações induzidas no tratamento causador de maior esterilidade.

A 1.^a geração descendente de tratamento com óleos vegetais, apresenta na totalidade uma acentuada redução de fertilidade. Nestas experiências, o azeite comportou-se como o agente indutor de esterilidade em maior grau.

Nas investigações de SWAMINATHAN e NATARAJAN (1959) em que se aplicou entre outros óleos vegetais, óleo de amendoim e óleo de rícino, em sementes de genótipos *Triticum* representativos dos três graus de ploidia que o caracteriza, verificou-se que os citados agentes induziram esterilidade no hexaplóide e tetraplóide sem que o mesmo se tivesse registado para o *T. monococcum*.

Dada a forte analogia comprovada em estudos de mutagenese entre esta espécie diplóide e a que vimos considerando (MAC KEY, 1954 e 1959) comportamento semelhante seria de esperar para o nosso caso. Contudo, registámos que tanto o óleo de amendoim como o de rícino, induziram em confronto com a testemunha (cevada Beka não tratada) redução de fertilidade na ordem dos 27,56 % e 24,66 % respectivamente. Assim a hipótese formulada pelos citados autores de que uma forte selecção intrassomática operada nos primeiros estágios a seguir ao tratamento seria a causa da eliminação da maioria das células afectadas, não deve no nosso caso, ter ocorrido com similar eficácia. Além disso nas citadas experiências de trigo as sementes diplóides estiveram mergulhadas durante 6 horas, enquanto nas que levámos a efeito permaneceram 24 horas o que possivelmente terá contribuído para a ocorrência de mais profundos distúrbios e assim a selecção intrassomática poderia não se ter feito sentir com força suficiente para eliminar as células desequilibradas e também provavelmente a adição mais intensa de fenómenos fisiológicos não hereditários provocados pelo tratamento. Nos Gráficos 2 e 3 apresentamos a distribuição das



espigas M_1 por classes de fertilidade para o caso dos tratamentos com radiações ionizantes e óleos vegetais, respectivamente. Estes gráficos foram construídos tomando como base a fertilidade por espiga e não a fertilidade por planta como seria mais preciso e até mais desejável. Mas dado o número relativamente baixo de indivíduos sobreviventes em alguns tratamentos, achamos preferível, por ser mais representativo, considerar para cada tratamento e dose o conjunto de valores fertilidade por espiga, e com estes elementos encontrar as frequências correspondentes às classes de fertilidade convencionadas.

Uma primeira apreciação permite-nos verificar que a distribuição das frequências de espigas por classes de fertilidade se comporta de maneira distinta conforme se trate de raios X ou óleos vegetais.

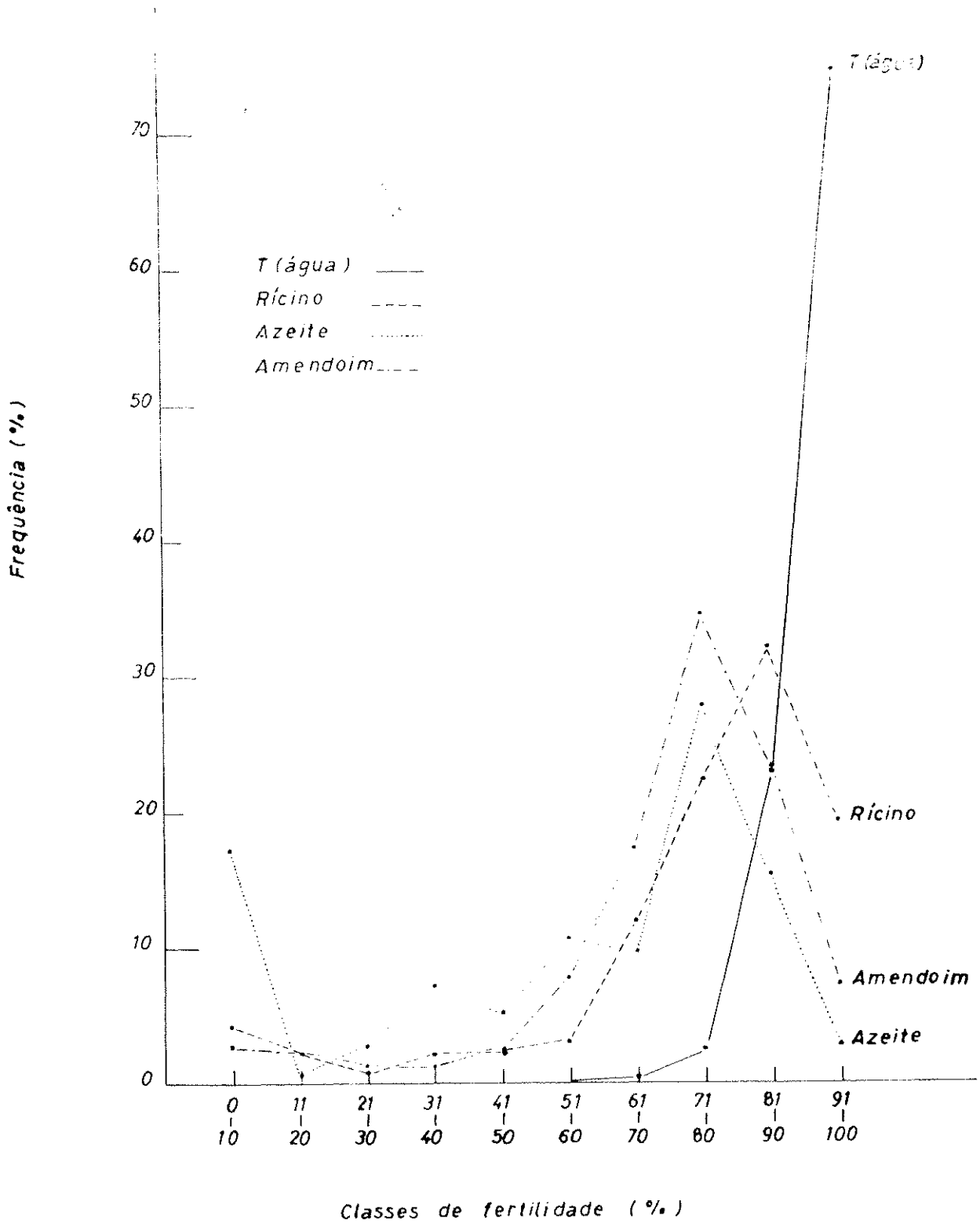
Enquanto a primeira geração após tratamento com raios X (Gráfico 2) correspondente à dose 16 Krad mostra tendência para o maior número de espigas pertencer às classes de fertilidade mais altas, já para a dose 20 Krad se nota que a maior frequência de espigas está incluída na classe mais estéril, distribuindo-se as restantes frequências aproximadamente com a mesma grandeza pelas correspondentes classes de fertilidade.

Independentemente da sua natureza os tratamentos com óleos vegetais parecem induzir comportamento semelhante entre si. Para qualquer dos óleos vegetais ensaiados observa-se um crescimento progressivo dos valores de frequência até se atingir um máximo que para o óleo de amendoim e azeite corresponde à classe 71 a 80 % (fertilidade por espiga). Uma vez atingido este ponto os valores de frequência decrescem rapidamente sobretudo para os dois primeiros óleos.

O azeite apresenta ainda a particularidade de ter uma frequência relativamente elevada de espigas com alta esterilidade. Registe-se também a alta fertilidade encontrada nas espigas das plantas que não sofreram tratamento com agentes mutagênicos o que em certa medida mostra a esplêndida produtividade da cevada Beka.

Testes na M_2 . — Frequência de plântulas M_2 deficientes de clorofila.

Desde as primeiras investigações em cereais se tem usado sis-



tematicamente o conhecido teste das mutações de clorofila como indicador de mutabilidade e eficiência mutagénica de um dado agente e dose. Contudo, a sua validade está amplamente condicionada, para além de outros factores de ordem técnica, pelo grau de ploidia dos organismos tratados. Assim para a cevada dística planta diplóide - é em nossos dias universalmente adoptado e GAUL (1964) chega mesmo a considerá-lo insubstituível. Mas já outrotanto não sucederia se trabalhássemos com plantas resultantes da adição de genómios iguais ou diferentes, pois em tais situações ocorreria, devido à condição de mutiplicidade génica um marcado efeito tampão, que faria descer a frequência de mutações de clorofila com o aumento do nível de ploidia como as investigações de MAC KEY (1954 a, 1959 e 1960) demonstraram.

Neste teste seguimos a técnica e os princípios estabelecidos por GUSTAFSSON (1940) para classificação de mutações de clorofila no estado de plântula.

Nos Quadros 3 e 4 reunimos os resultados encontrados.

QUADRO 3.— *Observações de plântulas M_2 deficientes de clorofila*

Tratamento	Dose	Totais observados			Frequência de mutações (%)	
		Progenies de planta M_1	Plânt. M_2	Plânt. M_2 def. de clorofi.	Por prog. planta M_1	Por plântulas M_2
Testemunha (água)	Merg. 24h	70	700	—	—	—
Raios X	16 Krad	79	2,204	32	40,5	1,45
Raios X	20 Krad	76	1.079	14	18,2	1,30
Azete	Merg. 24h	48	794	—	—	—
Oleo de Amendoim	Merg. 24h	36	1.364	—	—	—
Óleo de Rícino	Merg. 24h	114	4.994	4	3,6	0,08

QUADRO 4.— *Tipos de mutações deficientes de clorofila observadas em plântulas M_2 .*

Tratamento	N.º total de mut. def. de clorofi.	Distribuição dos mut. def de clorof. %		
		Albina	Viridis	Striata
Raios X	46 (100)	29 (63,0)	15 (32,6)	2 (4,3)
Oleo de Rícino	4 (100)	4 (100,0)	—	—

Conforme se poderá verificar o tratamento com raios X foi de longe o mais eficaz na indução de alterações génicas do mecanismo de formação da clorofila.

Contudo, o relativamente baixo número de progénies observadas não nos permite tirar conclusões generalizadas sobre qualquer dos agentes usados. Assim, é muito difícil encontrar-se explicação para as respostas correspondentes às duas doses de radiação X aplicadas. No entanto quando considerado este tratamento em confronto com o dos óleos vegetais podemos constatar que em 115 progénies X₁ estudadas se detectaram 46 mutantes deficientes de clorofila, enquanto que para os óleos vegetais apenas o óleo de rícino induziu 4 mutantes nas 114 progénies estudadas. Para o azeite e óleo de amendoim não encontramos nenhum fenótipo deficiente de clorofila, mas na verdade para estes tratamentos correspondeu também o menor número de progénies ensaiadas.

Para o tratamento com raios X verificou-se ser a mutação inviável do tipo albino a mais frequente, seguindo-se o fenótipo viridis e com muito maior raridade o striata.

O óleo de rícino induziu nestas experiências somente mutações albinas.

Dentre os óleos vegetais, o azeite e o amendoim induziram apreciável esterilidade sem que contudo se tivessem detectado nas plântulas M₂ fenótipos deficientes de clorofila. Embora o reduzido número de descendências de plantas M₁ limite grandemente as conclusões quer-nos parecer que estes agentes além de provocarem efeito de toxicidade não hereditário, possivelmente induziram sérios desarranjos cromosómicos que um organismo diplóide como é o da cevada dística não pode suportar.

Nas pesquisas de PAL et altera (1958) e de SWAMINATHAN e NATARAJAN (1959) comprovou-se que o óleo de rícino e ainda mais o de amendoim foram capazes de induzir alta frequência de mutações em trigo hexaplóide enquanto os dois últimos autores nem uma mutação encontraram para os genótipos de *T. monococcum* e *T. dicoccum* tratados com tais agentes. Os resultados por nós encontrados, para a 2.^a geração após tratamento limitam-se por enquanto ao isolamento e contagem de fenótipos deficientes de clorofila. Mas, como GAUL (1964) aponta, e é actualmente assumido por muitos autores, existe para a cevada uma proporcionalidade directa entre a frequência de mutações de clorofila e a de mutações vitais,

que são afinal para os nossos objectivos as que maior interesse poderão oferecer. Por conseguinte, parece-nos não ser de esperar pelo menos nestas experiências e para os óleos vegetais e genótipo utilizado a indução de variação genética, que dentro de um condicionalismo prático, permita a eleição de indivíduos progressivos, o que em termos de melhoramento nos leva a encarar com apreciável dose de cepticismo a utilização de tais substâncias. Em situação mais optimista já se nos afigura a aplicação de raios X, com a qual serão de esperar nas gerações M_2 e seguintes mais favoráveis frequências de genótipos alterados viáveis e por conseguinte maior probabilidade de se seleccionarem mutantes expressando acrescido interesse sob o ponto de vista de melhoramento.

O valor agrícola e industrial, e portanto evolucionário dos mutantes que vierem a ser escolhidos poderá ser medido por métodos exactos através da experimentação agronómica e testes de valor tecnológico a que serão submetidos.

OBRAS CONSULTADAS

- EHRENBERG, L., GUSTAFSSON, A. and LUNDOVIST, U.
1956 Chemically induced mutation and sterility in barley. *Acta Chem. Scand.*, **10**: 492-494.
- EHRENBERG, L., GUSTAFSSON, A. and LUNDOVIST, U.
1961 Viable mutants induced in barley by ionizing radiations and chemical mutagens. *Hereditas*, **47**: 243-282.
- FAVRET, E.
1960 Somatic mutations of four genes for albinism in barley induced by X rays and ethyl methane sulphate. *Hereditas*, **46**: 622-634.
- GAUL, H.
1964 Mutations in Plant Breeding. Reprint from *Radiat. Botany*, **4**: 155-232.
- GUSTAFSSON, A.
1940 The mutation system of the chlorophyll apparatus. Sep. *Lunds Univ. Arssk. N. F. A.* vd 2 B d 36-Nr 11.
- GUSTAFSSON, A.
1947 Mutations in agricultural plants. *Hereditas*, **33**: 1-100.
- GUSTAFSSON, A.
1963 Productive mutations induced in barley by ionizing radiations and chemical mutagens. *Hereditas*, **50**: 211-263.
- GUSTAFSSON, A.
1964 Characteristics and rates of high-productive mutants in diploid barley. Rep. *FAO/IAEA-Technical meeting hold in Rome* 323.

- HOLM, G.
1954 Chlorophyl mutations in barley. *Acta. Agric. Scand.*, **4**: 457-471.
- MAC KEY, J.
1951 Neutron and X-ray experiments in barley. *Hereditas*, **37**: 421-464.
- MAC KEY, J.
1954a Neutron and X-ray experiments in wheat and a revision of the speltoid problem. *Hereditas*, **40**: 65-180.
- MAC KEY, J.
1954 b Mutation breeding in polyploid cereals. *Acta. Agric. Scand.* **4**: 549-557.
- MAC KEY, J.
1959 Mutagenic response in *Triticum* at different levels of ploidy. *Proc.1st Int.Wheat Symp.* (1958). Winnipeg. 89-111
- MAC KEY, J.
1960 Radiogenetics in *Triticum*. *Sep. Genetica Agrária* **12**: 202-230.
- MATSUMURA, S.
1959 Effects of ionizing radiations upon the germination of seeds and the growth of seedlings. *Proc.1st Int.Wheat Genetic Symp.* (1958) Winnipeg. 112-133.
- MOËS, A.
1959 Les mutations induites par les rayons X chez l'orge distiche. *Bul.Inst.Agr.Stat.Rech. Gembloux.* **27**: 1-81.
- NILAN, R. A.; KONZAK, C. F.; HEINER, R. E. and FROESE-GERTZEN, E. E.
1964 Chemical mutagenesis in barley. *Proc.1st. Int. Barley Genetics Symposium* (1963) Wageningen 35-54.
- PAL, B. P.; SIKKA, S. M.; SWAMINATHAN, M. S. and NATARAJAN, A. T.
1958 Frequency and types of mutations induced in bread wheat by some physical and chemical agents. *Wheat Inf.Serv.* n.º 7: 14-15.
- SWAMINATHAN, M. S. and NATARAJAN, A. T.
1959 Cytological and genetic changes induced by vegetable oil in *Triticum*. *Jour. of Heredity* **50**: 177-187.

Sobre a descendência do cruzamento de triplóides em *Narcissus bulbocodium* L.

por A. FERNANDES & FILOMENA FRANÇA *

Instituto Botânico da Universidade de Coimbra

A B S T R A C T

Among the offspring of triploids of *Narcissus bulbocodium* ($3x = 21$) obtained by means of artificial pollination, are found individuals with 14, 15, 16, 18, 19, 20, 26, 30, 32, 33 and 34 chromosomes. From free pollination between these plants, arise individuals with 14, 21, 22, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42 and 54 chromosomes. It was found that, putting the diploids aside, the chromosome number was not always the same in all the equatorial plates from the same root, small oscillations occurring towards either more or less relative to the numbers cited above, which were the most frequent.

Analysis of the interphasic nuclei of the F_1 and of the F_2 showed that the most of the individuals that are not diploids possessed chromocentres whose number was, as a rule, difficult to determine. The presence of these chromocentres revealed the existence of heterochromatinosomes whose number was established in certain plants not only by counting the maximum number of chromocentres, but also, thanks to the fact that these chromosomes lose their colour more rapidly than the euchromatinosomes in the root tip meristems fixed in Navashin's solution and stained with gentian violet. The determination of the number of heterochromatinosomes present allowed us to come to the conclusion that the most of the plants that, from their chromosomal constitution, appeared to be in genetical unbalance were not so, since the supernumerary chromosomes corresponded to the heterochromatinosomes which are inert or possess a very weak genic activity. Plants were found with 21 and 22 chromosomes provided, respectively, with 7 and 8 heterochromatinosomes, as well as one with 42 which had 14.

In certain plants and in certain mitoses, the heterochromatinosomes, if not all at least some, have a retarded behaviour, placing themselves on the equatorial plate after the euchromatinosomes have began their poleward movement. In these conditions, they often suffer misdivision of the centromere, thus giving rise to telocentric chromosomes and afterwards to iso-

* Bolseira da Fundação Calouste Gulbenkian.

chromosomes. Other types may eventually arise by translocation with the euchromatinosomes. Sometimes the heterochromatinosomes do not come to be incorporated in the polar groups, being eliminated, which explains the variation found in the number of chromosomes.

All the observed facts can be explained on the assumption that in at least one triploid employed in the initial crossings there was present a dominant H gene determining the heterochromatinization of the supernumerary chromosomes that alter the genic balance. Furthermore, everything leads to the belief that the H factor acts not only in the zygote but also in the pollen and embryo sac. The progeny of these crossings is in reality almost composed only of balanced plants corresponding to diploids, triploids, tetraploids, pentaploids, etc. provided with heterochromatinosomes. The appearance in this progeny only of a few plants with supernumerary euchromatinosomes is explained by the selection of gametes with heterochromatinosomes and by the non-viability or small viability of the zygotes and of the genetically unbalanced plants.

Although also related to a mechanism of genic balance, the heterochromatinization of one of the chromosomes X of the females of Mammals seems to be determined by factors which act in a different manner from that of the H gene of *N. bulbocodium*.

INTRODUÇÃO

Como se sabe, os triplóides são geralmente estéreis ou apresentam uma fertilidade reduzida, pois que, em consequência da irregularidade da sua meiose, originam gâmetos desequilibrados inviáveis ou zigotos também inviáveis.

Contando os cromossomas na metafase da primeira mitose dos grãos de pólen em triplóides de *Narcissus poeticus* L. ($3x = 21$) e de *N. tazetta* L. ($3x = 30$), NAGAO (1935) verificou que, na primeira espécie, apareciam grãos com números cromossômicos compreendidos entre 7 e 14, correspondendo a 10 a classe mais frequentemente representada. As classes 7, 8 e 9 apresentavam uma frequência mais elevada do que a teoricamente esperada, a classe 10 aproximava-se bastante, enquanto as outras (11, 12, 13 e 14) mostravam uma frequência mais baixa. Em *N. tazetta* o máximo correspondia a 15, mas as duas últimas classes (19 e 20) não foram encontradas. As diferenças entre os números dos casos observados e os teoricamente esperados são atribuídas por NAGAO à eliminação de cromossomas que tem lugar durante a meiose dos triplóides.

FERNANDES (1949) analisou a descendência do cruzamento entre diplóides e triplóides de *N. bulbocodium*, em que não se encontrava

envolvido o gene determinante de heterocromatinização, tendo obtido os resultados apresentados no Quadro I.

QUADRO I. — *Diplóide* ♀ × *Triplóide* ♂

N.º de cromossomas	14	15	16	17	18	19	20	21	28	Total
Frequência	49	21	8	3	4	0	0	1	1	87

Triplóide ♀ × *Diplóide* ♂

N.º de cromossomas	14	15	16	17	18	19	20	21	28	Total
Frequência	1	6	10	14	11	8	4	0	0	54

A análise deste quadro mostra o seguinte:

1) Como acontece em *N. poeticus*, os triplóides de *N. bulbocodium* originam gâmetos com números de cromossomas compreendidos entre o haplóide e o diplóide.

2) Também de harmonia com o que se passa em *N. poeticus*, as classes dos grãos de pólen com números mais baixos mostram uma frequência mais elevada que a correspondente aos grãos com números mais altos.

3) Os resultados são diferentes conforme o triplóide funciona como macho ou como fêmea. Com efeito, no primeiro caso, o máximo de frequência corresponde aos indivíduos diplóides, enquanto a frequência dos outros vai baixando progressivamente à medida que os números cromossómicos se vão tornando mais elevados (o aparecimento de 3 indivíduos na classe 17 e 4 na 18, assim como a ausência de plantas com 19 e 20, devem, sem dúvida, ser atribuídos ao pequeno número de indivíduos observados). No segundo caso, em que os gâmetos femininos são originados pelo triplóide, o máximo da frequência corresponde à classe 17, diminuindo progressivamente para um e outro lado.

Como FERNANDES (1949, p. 40) acentuou, a diferença de comportamento assinalada resulta certamente do facto de os grãos de pólen com 7 cromossomas produzidos pelo triplóide originarem tubos polínicos que crescem mais rapidamente no estilete do diplóide que os provenientes dos grãos com números mais elevados. Nota-se

ainda que há concorrência entre os grãos com 8, 9 e 10, tornando-se menos eficientes à medida que o número de cromossomas, e, portanto, o desequilíbrio génico aumenta. Os grãos com 10 e 11, nos quais o desequilíbrio tem sensivelmente o mesmo valor, comportam-se de uma maneira semelhante. Os grãos com 12, 13 e 14 deveriam ser progressivamente mais eficientes que os das classes 10 e 11, mas os descendentes de fecundações em que entrem gâmetos masculinos daquele tipo são raros. Este facto poderá explicar-se pela eliminação de cromossomas durante a meiose (NAGAO, 1935) ou ainda pela circunstância de os tubos polínicos provenientes desses grãos se não encontrarem bem adaptados a crescer nos estiletos diplóides.

Quando o triplóide funciona como fêmea, formam-se oosferas com números cromossómicos compreendidos entre 7 e 14, estando provavelmente a frequência de cada classe de acordo com as leis da probabilidade. Pelo facto de não haver concorrência entre as oosferas e de os gâmetos masculinos possuírem 7 cromossomas, a distribuição referida (Quadro I) encontra imediatamente a sua explicação.

O indivíduo tetraplóide que apareceu no primeiro cruzamento resultou certamente da conjugação de um gâmeto masculino não reduzido (21 cromossomas) com uma oosfera haplóide.

Efectuando o cruzamento entre uma planta diplóide provida do gene determinante da heterocromatinização e outra triplóide normal, FERNANDES (1949) obteve o resultado referido no Quadro II.

QUADRO II. — *Diplóide* ♀ × *Triplóide* ♂

N.º de cromossomas	14	15	16	17	18	19	20	21	Total
Frequência	20	4	5	7	2	1	0	0	39

A comparação deste quadro com a parte que lhe corresponde no Quadro I mostra que a percentagem dos indivíduos das classes mais desequilibradas (17 e 18) é muito mais elevada, o que tende a mostrar que muitas plantas devem ser salvas pela heterocromatinização.

Apesar de possuímos já estes dados sobre a descendência do

cruzamento entre diplóides e triplóides, o cruzamento entre triplóides de *N. bulbocodium* não tinha sido ainda analisado. No entanto, seria também interessante obter esta descendência e seguir o seu comportamento como se as plantas se originassem nas condições naturais. O problema teria importância quer os triplóides possuíssem ou não factores H, sendo, porém, evidente que a importância seria maior no segundo caso, porquanto nos permitiria possivelmente obter mais dados sobre o interessante problema da heterocromatinização. Relatamos aqui os resultados das observações efectuadas até agora.

MATERIAL E TECNICAS

Na Primavera de 1942, FERNANDES efectuou 6 cruzamentos entre triplóides que apareceram numa população que vivia nos arredores de Leça do Bailio. Obtiveram-se sementes que foram semeadas no mês de Outubro. Três anos depois, quando os bolbos se encontravam já bem desenvolvidos, cada um deles foi separado em um vaso, ao mesmo tempo que os meristemas radiculares foram fixados no líquido de Navachine (modificação de Bruun). Em seguida, os vértices vegetativos foram incluídos em parafina seguindo a técnica clássica. Os cortes transversais, com uma espessura de 18 μ , foram corados pelo violeta de genciana.

Os vasos, contendo cada um uma planta da 1.^a geração, foram colocados uns junto dos outros formando um grupo. Estes indivíduos floresceram, tendo-se dado entre eles a polinização natural. As sementes produzidas foram semeadas e obtiveram-se plantas com as quais procedemos da maneira indicada para a F₁.

A observação do pólen foi feita em preparações não permanentes obtidas mediante a dissociação de anteras em gotas de carmim-acético.

As primeiras sementeiras (Tripl. \times Tripl.) têm nos nossos registos as designações Sem. 85 a Sem. 90. No entanto, só as plantas Sem. 85 e 86 produziram sementes mediante polinização livre. As plantas da F₂ correspondentes a estes números foram isoladas sob as designações Sem. XCIII, Ind. 1 a 8, e Sem. XCIV, Ind. 1 a 59. Mais bolbos provenientes da última sementeira foram conservados em conjunto num vaso, não tendo sido ainda examinados.

OBSERVAÇÕES

Os resultados obtidos pelo estudo cariológico da F_1 estão reunidos no Quadro III, onde mencionamos: o número de cromossomas mais frequentemente determinado, o qual era por vezes o único; o número de cromossomas longos ($Lp + li$) encontrado e o teòricamente esperado; o número de cromossomas curtos ($PP + Pp'$) observado e o calculado⁽¹⁾; os cromossomas de novo tipo, isto é, os distintos dos existentes na guarnição normal; a presença ou ausência de cromocentros que traduz a existência ou não existência de heterocromatinossomas; a indicação da figura correspondente às placas metafásicas ou aos núcleos intercinéticos; as fecundações possíveis que poderiam ter originado a planta; e as fecundações mais prováveis.

A análise do Quadro III e das figuras que o ilustram (figs. 1-4) mostra particularmente o seguinte:

1) Excepto nos casos em que há cromossomas de novo tipo, os números de elementos longos e curtos observados aproximam-se bastante dos calculados.

2) Na planta Sem. 85, Ind. 1, apareceram dois cromossomas novos, pertencentes aos tipos pp e pp' (fig. 1 *a*). Em algumas placas, porém, não conseguimos examinar senão um desses elementos, enquanto que noutras não observámos nenhum. Estes factos mostram que estes cromossomas são por vezes eliminados durante a mitose.

3) Na planta Sem. 86, Ind. 2, apareceu igualmente um cromossoma pp que pode também ser eliminado durante a mitose (figs. 2 *b, c*).

4) Poucas plantas, além das diplóides, eram desprovidas de cromocentros (ver Est. I) e, portanto, de heterocromatinossomas.

Os resultados obtidos pelo estudo cariológico das plantas F_2 encontram-se reunidos no Quadro IV, elaborado nos moldes do Quadro III. A análise deste Quadro e a observação das figuras que o ilustram (figs. 5-12) mostram que is números 1) e 4) referentes ao

(1) Como FERNANDES estabeleceu em trabalhos anteriores (1934, 1936), o idiograma de *N. bulbocodium* pode ser representado pela seguinte fórmula:

$$2n = 2 l_1 (A) + 2 Lp_1 (B) + 2 Lp_2 (C) + 2 Lp_3 (D) + 2 PP_1 (E) + 2PP_2 (F) + 2 Pp' (G)$$

A identificação de todos estes pares não se pode fazer senão em placas extremamente nítidas. Pelo facto de na maior parte dos casos o número de cromossomas ser elevado, não era possível fazer essa identificação. Por isso, limitamo-nos a distinguir dois grupos: longos e curtos.

QUADRO III. — Resultados dos cruzamentos triploide \times triploide

Des. gnção das plantas	Número de cromossomas (2n)	Número de cromossomas longos		Número de cromossomas curtos		Cromosomas de novo tipo	Cromo-centros (heterocromatissomas)	N.º da figura	Fecundações possíveis	Fecundações mais prováveis
		Obsv.	Calculado	Obsv.	Calculado					
Sem. 85, Ind. 1	34	17	19,42	17*	14,57	1pp+1pp'	Presentes	1 a 1-Est.I	20+14; 21+13	21 ♀ + 13 ♂
Sem. 85, Ind. 2	26	14	14,85	12	11,14	—	Presentes	1 b 2-Est.I	13+13; 14+12	12 ♀ + 14 ♂ **
Sem. 85, Ind. 3	19	10	10,85	9	8,14	—	Presentes	1 c 3-Est.I	10+9; 11+8; 12+7	10 ♀ + 9 ♂
Sem. 85, Ind. 4	16	8	9,14	8	6,85	—	Presentes	1 d	8+8; 9+7	8 ♀ + 8 ♂
Sem. 86, Ind. 1	32	18	18,28	14	13,71	—	Presentes	2 a 4-Est.I	18+14; 19+13; 20+12; 21+11	21 ♀ + 11 ♂
Sem. 86, Ind. 2	33	17	18,85	16	14,14	1pp	Presentes	2 b, c	19+14; 20+13; 21+12	21 ♀ + 12 ♂
Sem. 86, Ind. 4	33	19	18,85	14	14,14	—	Presentes	2 d	19+14; 20+13; 21+12	21 ♀ + 12 ♂
Sem. 86, Ind. 5	30	17	17,14	13	12,85	—	Presentes	2 e, f	19+11; 20+10; 21+9	21 ♀ + 9 ♂
Sem. 87, Ind. 1	14	8	8	6	6	—	Ausentes	3 a	7+7	7 ♀ + 7 ♂
Sem. 87, Ind. 3	18	10	10,28	8	7,71	—	Presentes	3 b	9+9; 10+8; 11+7	9 ♀ + 9 ♂
Sem. 87, Ind. 5	15	8	8,57	7	6,42	—	Presentes	3 c	8+7	8 ♀ + 7 ♂
Sem. 88, Ind. 3	20	10	11,42	10	8,57	—	Presentes	3 d	10+10; 11+9; 12+8; 13+7	10 ♀ + 10 ♂
Sem. 89, Ind. 1	19	11	10,85	8	8,14	—	Presentes	5,6-Est.I	10+9; 11+8; 12+7	10 ♀ + 9 ♂
Sem. 89, Ind. 3	33	19	18,85	14	14,14	—	Ausentes	4 a	19+14; 20+13; 21+12	21 ♀ + 12 ♂
Sem. 89, Ind. 4	16	8	9,14	8	6,85	—	Presentes	4 c	8+8; 9+7	8 ♀ + 8 ♂
Sem. 90, Ind. 1	33	19	18,85	14	14,14	—	Ausentes	4 d	19+14; 20+13; 21+12	21 ♀ + 12 ♂

* O número elevado de cromossomas curtos resulta da existência de elementos de novo tipo pp e pp'.

** Quando a fecundação recíproca tem a mesma probabilidade, não a referimos.

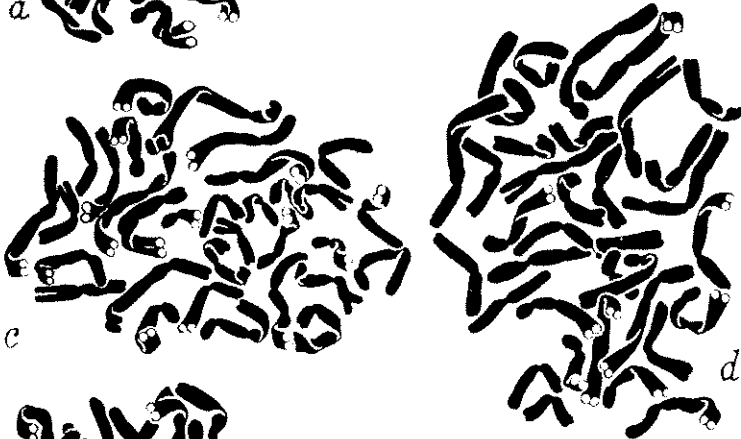
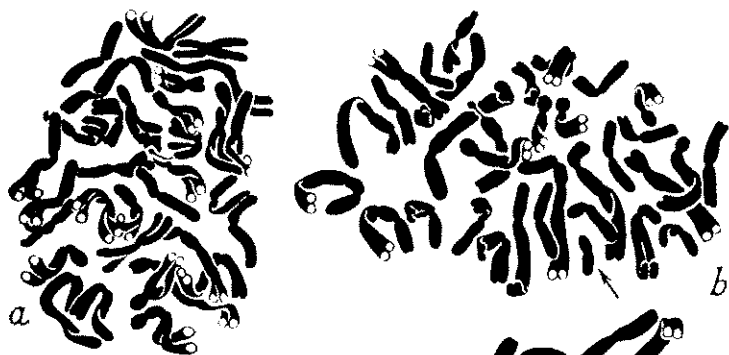


FIG. 1. Placas equatoriais em células do vértice vegetativo da raiz. As setas na fig. *a* indicam dois cromossomas de novo tipo *pp* e *pp'*. Demais explicações no Quadro III. \times ca. 2025.

FIG. 2. Placas metafásicas em células de meristemas radiculares. A seta na fig. *b* indica um cromossoma de novo tipo *pp*, o qual não aparece na fig. *c*. Outras explicações no Quadro III. \times ca. 2025.

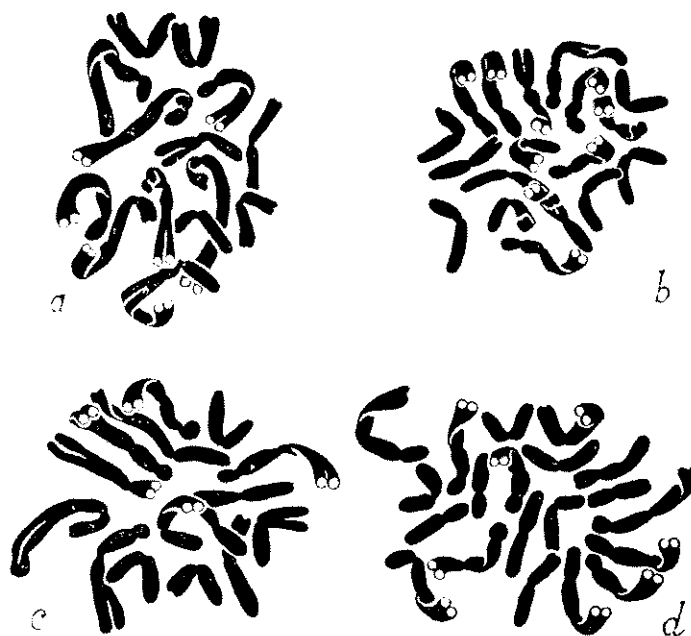


FIG. 3. Placas equatoriais em células do vértice vegetativo da raiz. Explicação no Quadro III. \times ca. 2025.



FIG. 4. Placas metafásicas em células de meristemas radiculares. Explicação no Quadro III. \times ca. 2025.

QUADRO IV. — (Continuação)

Designação das plantas	Número de cromossomas (2n)	Número de cromossomas longos		Número de cromossomas curtos		Cromossomas de novo tipo	Heterocromossomas	N.º da figura	Fecundações mais prováveis
		Observado	Calculado	Observado	Calculado				
Sem. XCIV, Ind. 15	37	21	21,14	16	15,86	1 TS	Presentes	8 d	18 ♀ + 19 ♂
Sem. XCIV, Ind. 16	41	24	23,42	17	17,58	—	Presentes	9 a 7-Est. II	30 ♀ + 7 ♂ 30 ♀ + 11 ♂ 33 ♀ + 8 ♂
Sem. XCIV, Ind. 17	40	23	22,85	17	17,14	—	Presentes	9 b	22 ♀ + 19 ♂ 32 ♀ + 8 ♂
Sem. XCIV, Ind. 20	41	21	23,42	20	17,58	1 Lp + 3 TS	?	9 c	20 ♀ + 20 ♂ 30 ♀ + 10 ♂ 33 ♀ + 8 ♂ 32 ♀ + 9 ♂
Sem. XCIV, Ind. 21	40	20	22,85	20	17,14	1 TS + 1 P.	Ausentes	9 d	30 ♀ + 11 ♂ 32 ♀ + 8 ♂ 20 ♀ + 20 ♂ 30 ♀ + 10 ♂
Sem. XCIV, Ind. 22	36	19	19,42	15	14,57	4 TS	Presentes	10 a	18 ♀ + 18 ♂
Sem. XCIV, Ind. 23	54	16	16,28	24	23,14	—	?	10 b	33 ♀ + 21 ♂
Sem. XCIV, Ind. 24	36	30	30,85	16	15,43	1 TS	Presentes	10 c	18 ♀ + 18 ♂
Sem. XCIV, Ind. 26	36	20	20,57	16	15,43	—	Presentes	10 d	18 ♀ + 18 ♂
Sem. XCIV, Ind. 27	39	21	22,28	18	16,72	2 TS	Presentes	8-Est. II 11 a	20 ♀ + 19 ♂ 30 ♀ + 9 ♂
Sem. XCIV, Ind. 29	37	20	21,14	17	15,86	—	Presentes	11 b	18 ♀ + 19 ♂
Sem. XCIV, Ind. 30	38	23	21,71	15	16,28	—	Presentes	11 c	30 ♀ + 7 ♂ 19 ♀ + 19 ♂
Sem. XCIV, Ind. 31	36	21	20,57	15	15,43	2 pp	Presentes	11 d, e	30 ♀ + 8 ♂ 18 ♀ + 18 ♂
Sem. XCIV, Ind. 33	38	21	21,71	17	16,28	—	Presentes	12 a	19 ♀ + 19 ♂ 30 ♀ + 8 ♂ 32 ♀ + 8 ♂
Sem. XCIV, Ind. 39	40	21	22,85	19	17,14	2 pp	Presentes	12 b	20 ♀ + 20 ♂ 30 ♀ + 10 ♂
Sem. XCIV, Ind. 42	38	23	21,71	15	16,28	—	Presentes	12 c	19 ♀ + 19 ♂ 30 ♀ + 8 ♂
Sem. XCIV, Ind. 58	42	22	24	20	18	2 TS	Presentes	9-Est. II 12 d	21 ♀ + 21 ♂
Sem. XCIV, Ind. 59	38	22	21,71	16	16,28	—	Presentes		19 ♀ + 19 ♂ 30 ♀ + 8 ♂

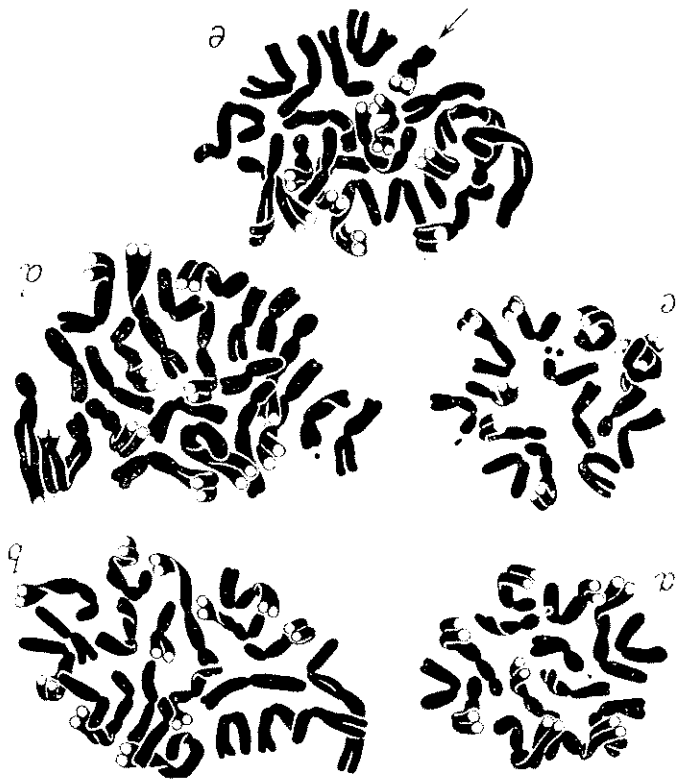


FIG. 5. Vistas polares de metafases em células de ápices vegetativos de raízes. A seta na fig. *e* indica um cromossoma de novo tipo lp. Outras explicações no Quadro IV. x ca. 2025.

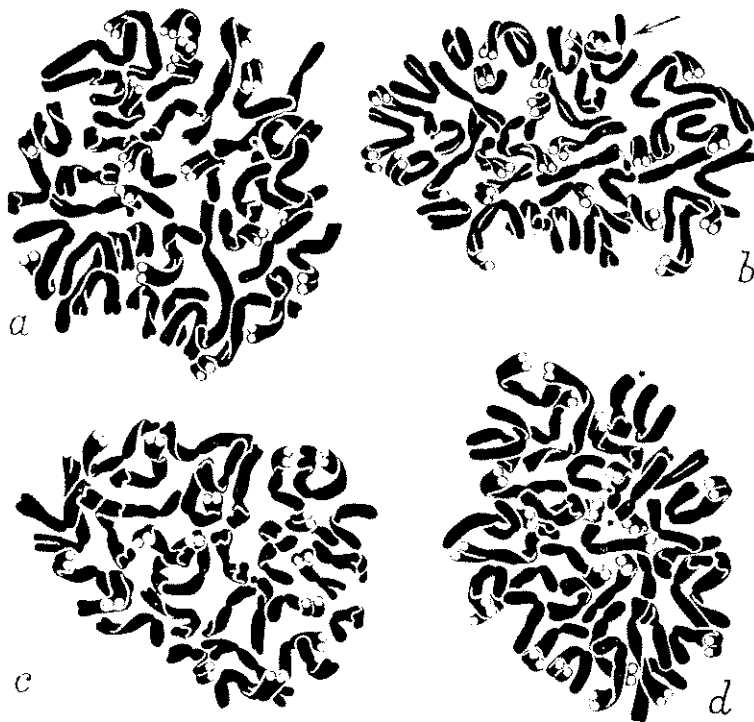


FIG. 6. Placas equatoriais em células de meristemas radiculares. A seta na fig. *b* indica um cromossoma de tipo TS. Demais explicações no Quadro IV. x ca. 2025.

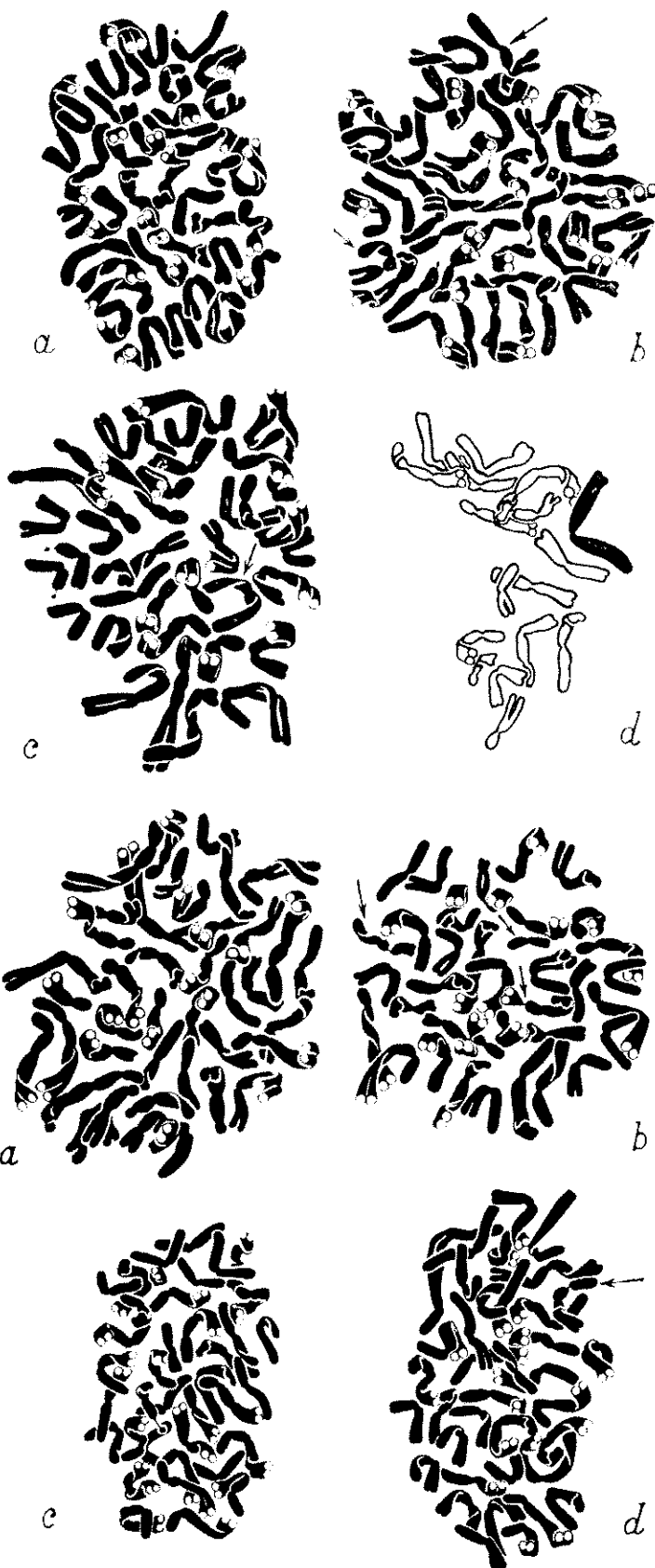


FIG. 7. Metafases em células de vértices vegetativos de raízes. Na fig. *b*, as setas indicam 2 cromossomas TS; na *c*, a seta indica 1 cromossoma II mostrado de maneira mais nítida na fig. *d*. Outras explicações no Quadro IV. \times ca. 2025.

FIG. 8. Placas metafásicas em células de meristemas apicais da raiz. As setas nas figs. *b* e *d* indicam cromossomas TS e 1 pp (fig. *b*). Demais explicações no Quadro IV. \times ca. 2025.



FIG. 9. Placas equatoriais em células de vértices vegetativos da raiz. Na fig. *c*, as setas indicam 3 cromossomas TS e 1 Lp'. Na fig. *d* indicam 1 TS e outro P. Demais explicações no Quadro IV. \times ca. 2025.

FIG. 10. Placas em meristemas radiculares. As setas na fig. *a* indicam 4 cromossomas TS, vendo-se, além disso, 2 heterocromatinossomas descorados e situados fora do plano equatorial. Na fig. *c*, a seta indica 1 cromossoma TS. Outras explicações no Quadro IV. \times ca. 2025.

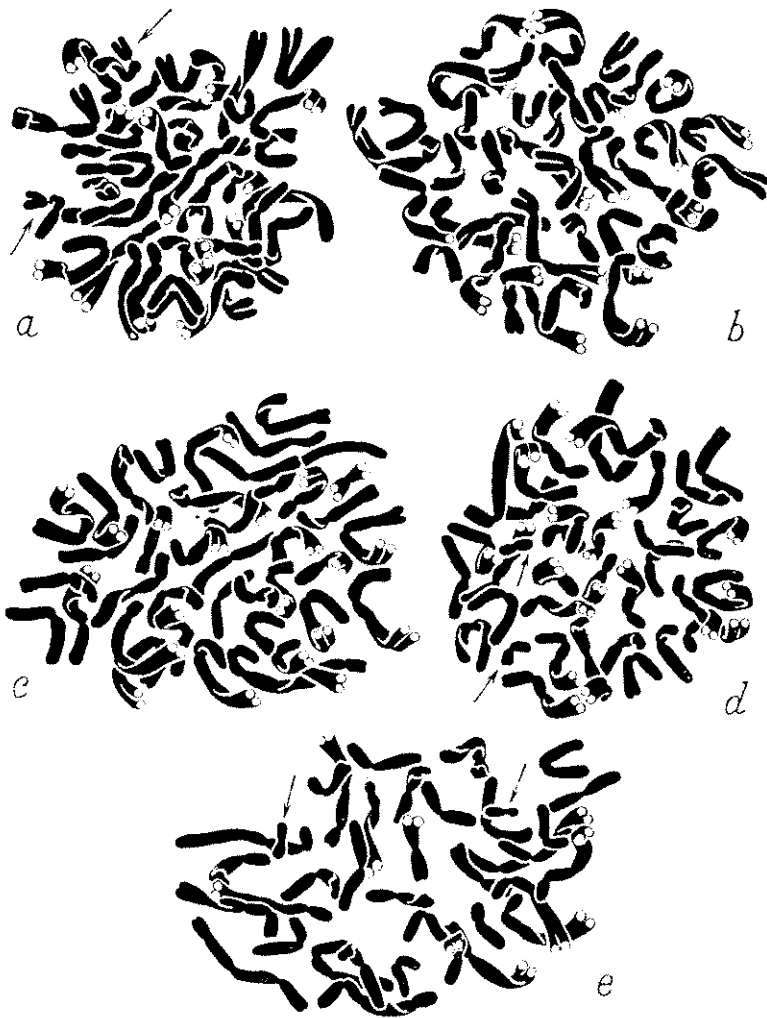


FIG. 11. Placas equatoriais em células de meristemas radiculares. As setas na fig. *a* indicam cromossomas TS, enquanto nas fig. *d* e *e* apontam para cromossomas pp. Demais explicações no Quadro IV. \times ca. 2025.

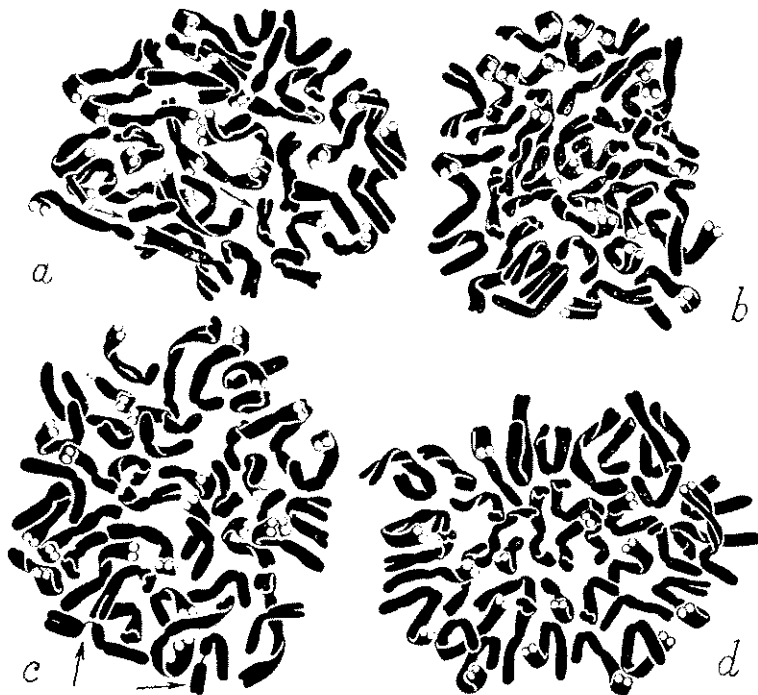


FIG. 12. Placas metafásicas em células de meristemas radiculares. As setas apontam cromossomas pp (fig. *a*) ou TS (fig. *c*). Mais explicações no Quadro IV. \times ca. 2025.

Quadro anterior se aplicam também a estas plantas. Quanto aos cromossomas de novo tipo, nota-se que são mais frequentes e variados do que nas plantas da F_1 , pois que, além dos elementos do tipo pp, aparecem outros dos tipos P., lp, ll, Lp' e ainda um outro que denominámos TS (ver Quadro IV). O elemento P. era um cromossoma cefalobraquial ou provávelmente telocêntrico correspondendo a um braço P de um cromossoma dos tipos PP ou Pp'; o elemento lp parecia corresponder a uma grande porção proximal do braço L de um cromossoma Lp₃; o elemento ll, dada a igualdade dos dois braços, representa provávelmente um isocromossoma formado a partir do cromossoma ll; o elemento' Lp' apresentava-se como um cromossoma de tipo Lp₃ provido de um satélite volumoso na extremidade proximal; e o elemento TS possuía o aspecto de um cromossoma Pp' para cujo satélite tivesse sido translocada uma porção de um outro cromossoma. É curioso notar que um cromossoma deste tipo foi por nós encontrado (fig. 13) em uma planta pertencente a uma população diplóide que crescia na Ponte do Cavalo, nos arredores de Mangualde (N.º 1336 dos nossos registos).



FIG. 13. Planta de uma população diplóide dos arredores de Mangualde provida de uma translocação mediante a qual um segmento se foi ligar ao satélite de um dos cromossomas Pp'. \times ca. 2025.

Devemos assinalar que o cromossoma TS foi o elemento de novo tipo que apareceu mais frequentemente: umas vezes um só nas placas, outras em número de 2, outras de 3 e ainda outras de 4 (ver Quadro IV). Algumas vezes ocorria com outros cromossomas de novo tipo (ver Quadro IV). Admitindo, como tudo leva a crer, que se trata de um cromossoma nucleolar, é provável que não seja heterocromático, pois que nunca vimos qualquer cromocentro que lhe correspondesse associado a um pequeno nucléolo (vide FERNANDES, 1951). Quanto ao cromossoma ll, a sua heterocromatinicidade não oferece dúvida, em virtude de termos tido o ensejo de observar o cromocentro que lhe correspondia (fig. 5, Est. II). A frequente eliminação sofrida pelos cromossomas pp e pp' mostra que eles são

igualmente heterocromáticos. Nenhuma conclusão, porém, foi obtida relativamente aos cromossomas Lp' e lp .

De entre as plantas que figuram nos Quadros III e IV, foram estudadas com mais pormenor e mostraram particularidades de bastante interesse as seguintes:

Sem. 85, Ind. 3

Nas placas equatoriais em que a diferenciação foi levada mais longe, notámos o aparecimento de 5 cromossomas ($2L + 3C$) que se descoravam mais rapidamente que os outros (fig. 14 *a*). Os 14 cromossomas que persistiam mais intensamente corados correspondiam à guarnição diplóide. O número máximo de cromocentros identificados nas intercineses foi de 5 (fig. 3, Est. I).

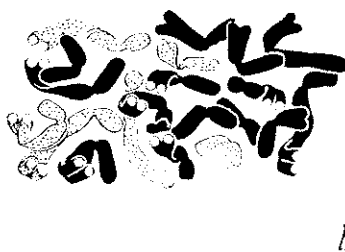


FIG. 14. *a*) Planta (Sem. 85, Ind. 3) provida de 19 cromossomas, em que, nas placas onde a diferenciação foi levada mais longe, se viam 14 cromossomas corados (correspondentes a uma guarnição diplóide) e 5 descorados (correspondentes aos heterocromatinossomas). *b*) Planta (Sem. 88, Ind. 3) com 20 cromossomas, mostrando 14 corados e 6 descorados. \times ca. 2025.

Sem. 88, Ind. 3

Nesta planta, em cujas placas contámos 20 cromossomas, notámos que 6 ($4L + 2C$) se descoravam mais rapidamente (fig. 14 *b*). Os núcleos interfásicos mostravam cromocentros (figs. 5 e 6, Est. I), por vezes só dois muito volumosos.

Sem. XCIII, Ind. 3

A análise das placas equatoriais mostrou-nos que esta planta tinha a guarnição correspondente à de um triplóide, porquanto foi possível identificar 3 cromossomas de cada um dos tipos existentes na guarnição haplóide (figs. 15 *a*, *b*, *c*). No entanto, contra a nossa

expectativa, encontrámos nos núcleos interfásicos um número de cromocentros que podia ir até 7 (fig. 8, Est. I e fig. 1, Est. II).

A verificação deste facto levou-nos a prosseguir a análise das metafases, tendo encontrado algumas dignas de nota: uma com 21 cromossomas mais um elemento fora do plano equatorial e que apresentava o aspecto de um telocêntrico (fig. 15 *d*); outra em que se viam os 14 cromossomas da guarnição diplóide mais um heterocromatinossoma satelitífero (reconhecível pelo seu elevado grau de contracção) no plano equatorial e 7 elementos mais ou menos fora desse plano, em que se notavam 4 elementos que pareciam corresponder a telocéntricos curtos divididos longitudinalmente e 3

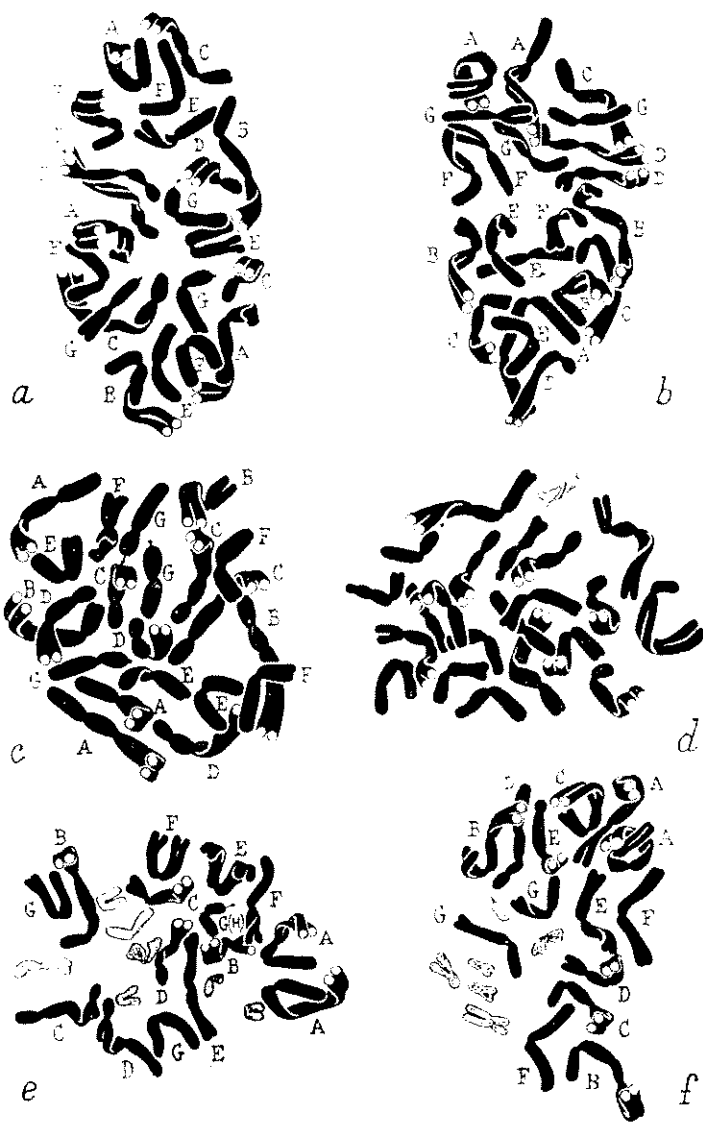


FIG. 15. Planta (Sem. XCIII, Ind. 3) com 21 cromossomas. *a-c*) Placas equatoriais, mostrando 3 guarnições haplóides indicadas pelas letras A-G. *d*) Placa em que se vê um heterocromatinossoma, possivelmente telocêntrico, fora do plano equatorial (em contorno) mais 21 elementos no plano. *e*) Metafase onde se vê a guarnição diplóide normal mais um heterocromatinossoma G(H) no plano equatorial e mais 7 outros fora do plano. Entre estes existem 5 que parecem corresponder a braços curtos de cromossomas Lp cujos centrómeros se dividiram transversalmente e 2 a cromossomas do tipo PP. *f*) Placa onde se vê a guarnição diplóide normal (pares A a G) mais 6 heterocromatinossomas, correspondendo 3 a cromossomas dos tipos PP e Pp e outros 3 a telocéntricos resultantes provavelmente da divisão transversal de centrómeros de cromossomas Lp em que persistiu somente o braço curto. \times ca. 2025.

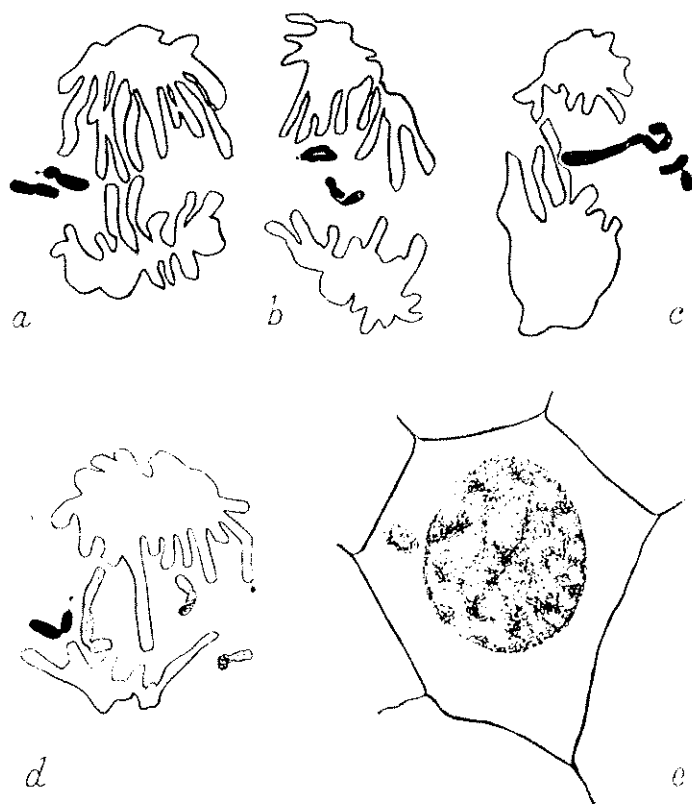


FIG. 16. Sem. XCIII, Ind. 3. *a-d*) Anafases mostrando heterocromatinossomas retardatários, alguns dos quais (fig. *d*) orientados longitudinalmente no plano equatorial. *e*) Célula mostrando um micronúcleo resultante da eliminação ou de um heterocromatinossoma (caso mais provável) ou de um cromatídio proveniente da sua divisão. \times ca. 2025.

isobraquiais ou quase que devem representar heterocromatinossomas do tipo PP (fig. 15 *e*); e outra em que apareciam também os 14 cromossomas da guarnição diplóide no plano equatorial e 6 elementos fora desse plano em que havia 3 correspondentes a cromossomas curtos (tipos PP e Pp) muito contraídos e três outros com o aspecto de telocêntricos (fig. 15 *f*). As figuras encontradas mostram, pois, que, na realidade, existiam nesta planta 7 heterocromatinossomas.

O estudo das anafases revelou que tanto os cromossomas longos como os curtos se podem comportar como retardatários (fig. 16 *a-d*), de um modo semelhante ao que acontece aos univalen-

FIG. 17. Sem. XCIII, Ind. 5. *a*) Placa mostrando 14 cromossomas corados e 8 descorados. *b*) Placa incompleta em que se vêem 2 telocêntricos, além de outros heterocromatinossomas descorados. \times ca. 2025.



tes na meiose. Por vezes, esses cromossomas orientam-se longitudinalmente (fig. 16 *d*), dividindo-se o centrómero transversalmente e originando telocêntricos, os quais correspondem geralmente aos braços curtos dos cromossomas longos. Por vezes, os retardatários ou os produtos da sua divisão não são incluídos nos grupos polares, originando micronúcleos (fig. 16 *e*).

Sem. XCIII, Ind. 5

Tivemos ensejo de verificar que nas placas equatoriais apareciam 8 cromossomas que se descoloravam mais rapidamente (fig. 17 *a*), o que revela a existência de 8 heterocromatinossomas. De acordo com esta conclusão, foi observado um número elevado de cromocentros nas interfases (fig. 2, Est. II). Também aqui a divisão transversal do centrómero origina telocêntricos (fig. 17 *b*).

Sem. 85, Ind. 2

Além de placas com 26, foram encontradas outras com 25 cromossomas. Numa destas notámos a existência de 4 cromossomas descolorados, sendo três longos e um curto (fig. 18 *a*). Como os outros elementos normais correspondiam precisamente à guarnição triplóide, estamos na realidade na presença de um triplóide provido de heterocromatinossomas. Nas intercineses, observámos também a presença de cromocentros (fig. 2, Est. I).

Nas anafases, os heterocromatinossomas retardatários apresentam-se geralmente muito descolorados, o que dificulta a sua observação. Na anafase representada na fig. 18 *b*, foi-nos possível observar um cromossoma longo que acabava de sofrer a divisão transversal do centrómero. A disposição longitudinal de dois cromossomas PP na mesma figura mostra que se encontram também em vias de sofrer divisão idêntica.

Sem. 86, Ind. 1

Nas placas em que a diferenciação foi levada mais longe notámos a presença de 4 cromossomas descolorados (fig. 19) e nas intercineses identificámos cromocentros (fig. 4, Est. I). Os 28 cromossomas res-



FIG. 18. Sem. 85, Ind. 2. Placa mostrando 21 cromossomas corados correspondentes a uma guarnição triplóide, mais 4 descorados. *b)* Anafase com 4 heterocromatinossomas retardatários dispostos longitudinalmente no plano equatorial. No heterocromatinossoma *Lp* indicado pela seta acaba de ter lugar a divisão transversal do centrômero, com a formação de dois telocêntricos. \times ca. 2025.

FIG. 19. Sem. 86, Ind. 1. Placas mostrando 28 cromossomas correspondentes a uma guarnição tetraplóide mais 4 descorados correspondentes a heterocromatinossomas. \times ca. 2025.



FIG. 20. Sem. XCIV, Ind. 26. *a)* Placa mostrando 28 cromossomas no plano equatorial mais 6 heterocromatinossomas (dos quais pelo menos 3 telocêntricos) fora do plano. *b)* Metade de uma anafase em que se vêem 4 retardatários no plano equatorial. *c)* Anafase com 2 retardatários no plano equatorial orientados verticalmente ou seja segundo a direcção do fuso. \times ca. 2025.

tantes correspondem exactamente à guarnição de um tetraplóide. Verificámos que também aqui se originaram telocêntricos.

Sem. XCIV, Ind. 26

O número cromossómico mais frequentemente encontrado nesta planta foi de 36. Deparamos-se-nos, porém, metafases, como a representada na fig. 20 *a*, em que se contavam 28 cromossomas normais e 6 fora do plano. Dois destes eram isobraquiais ou quase, podendo corresponder ou a cromossomas PP ou a isocromossomas, e 4 outros telocêntricos. Na fig. 20 *b* está representada metade de uma anafase com 4 retardatários descorados no plano equatorial. Na fig. 20 *c* encontram-se também dois cromossomas, um longo e outro curto, em posição que sugere irem sofrer divisão transversal do centrómero. Nas intercineses foram também observados cromocentros (fig. 7, Est. II).

Sem. XCIV, Ind. 1

Entre as placas observadas encontramos uma com 10 cromossomas descorados mais um pequeno fragmento (fig. 21 *a*). Os cromossomas não descorados correspondiam a 28, o que mostra que esta planta possui uma guarnição tetraplóide adicionada possivelmente de 11 heterocromatinossomas. Na fig. 21 *b*, nota-se um heterocromatinossoma que é provavelmente um isocromossoma formado por braços p de cromossomas Lp₃. Também nas intercineses foram observados cromocentros (fig. 4, Est. II).



FIG. 21. Sem. XCIV, Ind. 1. *a*) Placa equatorial mostrando 28 cromossomas corados, mais 10 e um fragmento (possivelmente telocêntrico) descorado. *b*) Placa com um cromossoma curto fora de plano. \times ca. 2025.

Sem. XCIV, Ind. 58

Na maior parte das placas equatoriais desta planta contámos 42 cromossomas. As interfases mostraram, porém, um número de cromocentros relativamente elevado (fig. 9, Est. II), facto que revelou que não estávamos em presença de um hexaplóide autêntico, o que aliás foi indicado também pela morfologia dos cromossomas (fig. 12 c). Em uma anafase, que consideramos notável (fig. 22), identificámos 14 retardatários no plano equatorial, dos quais 8 eram longos e 6 curtos, correspondendo, assim, aparentemente, a uma guarnição diplóide. Todos os cromossomas curtos tinham sofrido já divisão transversal do centrómero, sendo provável que os longos estivessem em vias de lhes acontecer o mesmo. Todos os retardatários apresentavam a particularidade de se encontrarem encurtados em grau extremo. Verificava-se, porém, que os elementos normais estavam também muito encurtados nesse estado da anafase. Estamos, pois, também em face de um tetraplóide com o elevado número de 14 heterocromatinossomas.

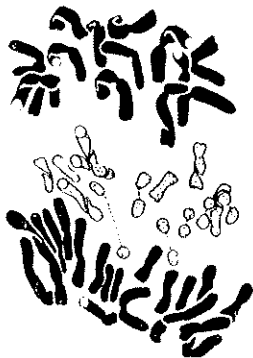


FIG. 22. Sem. XCIV, Ind. 58. Anafase, mostrando 14 heterocromatinossomas retardatários no plano equatorial, dos quais os de tipo PP e Pp' sofreram divisão transversal dos centrómeros. É de notar o grande encurtamento dos heterocromatinossomas. Deverá acentuar-se que os eucromatinossomas anafásicos se apresentavam também muito encurtados. \times ca. 2025.

O estudo da conformação dos grãos de pólen conduziu-nos aos resultados reunidos no Quadro V. Por ele se verifica que as plantas com $2n = 21$ cromossomas apresentam uma percentagem de pólen perfeito muito elevada. Este facto está de acordo com a conclusão obtida de que essa planta, aparentemente triplóide, é na realidade um diplóide provido de 7 heterocromatinossomas.

As plantas com 37, 38 e 40 cromossomas apresentam também uma percentagem de pólen perfeito bastante elevada, o que está de acordo com a ideia de que se trata de tetraplóides providos respectivamente de 9, 10 e 12 heterocromatinossomas.

O indivíduo com $2n = 42$ apresentou igualmente uma percentagem de pólen perfeito muito elevada. Neste caso especial foi-nos

possível verificar que se tratava na realidade de um tetraplóide com o elevado número de 14 heterocromatinossomas.

QUADRO V. — *Análise do pólen produzido por alguns indivíduos*

<i>Designação da planta</i>	<i>Número de cromossomas</i>	<i>Pólen perfeito %</i>	<i>Pólen imperfeito %</i>	<i>Total de grãos observados</i>
Sem. XCIII, Ind. 3 (1. ^ª observação)	2n=21	72,75	27,13	1274
Sem. XCIII, Ind. 3 (2. ^ª observação)	2n=21	81,01	18,95	1112
Sem. XCIII, Ind. 3 (3. ^ª observação)	2n=21	70,4	29,6	1507
Sem. XCIV, Ind. 7 (1. ^ª observação)	2n=37	66,7	33	1075
Sem. XCIV, Ind. 7 (2. ^ª observação)	2n=37	65,3	34,5	1238
Sem. XCIV, Ind. 42 (1. ^ª observação)	2n=38	65,48	34,43	1035
Sem. XCIV, Ind. 42 (2. ^ª observação)	2n=38	76,4	23,44	1339
Sem. XCIV, Ind. 59	2n=38	87,4	12,5	599
Sem. XCIV, Ind. 21 (1. ^ª observação)	2n=40	62,4	37,3	1082
Sem. XCIV, Ind. 21 (2. ^ª observação)	2n=40	60,8	39,0	1066
Sem. XCIV, Ind. 21 (3. ^ª observação)	2n=40	77,3	22,6	1225
Sem. XCIV, Ind. 58	2n=42	86,57	13,42	879

É provável que a diminuição da percentagem de pólen bem conformado que se nota possa ser devida à presença dos heterocromatinossomas que introduzirão certamente elementos de perturbação na meiose. Verifica-se, porém, que a fertilidade das plantas permanece em nível bastante elevado.

DISCUSSÃO

Analisando as descendências de cruzamentos diplóides × triplóides, triplóides × plantas providas de heterocromatinossomas e diplóides × plantas com heterocromatinossomas, FERNANDES (1949) chegou à conclusão de que os resultados se poderiam explicar, admi-

tindo que havia certos indivíduos diplóides utilizados nos cruzamentos (planta da população do Vale da Azenha) portadores de um gene dominante, que foi designado por H, responsável pela heterocromatinização dos cromossomas supernumerários que originassem de equilíbrio génico. Por outro lado, FERNANDES demonstrou também que o processo da heterocromatinização é irreversível em *N. bulbocodium* e acentuou que o fenómeno é de grande importância para a vida da espécie, porquanto pode evitar que muitas combinações zigóticas sejam inviáveis.

Os resultados agora obtidos mediante os cruzamentos efectuados confirmam inteiramente e ampliam as conclusões de FERNANDES (1949).

O Quadro VI mostra a frequência dos indivíduos, classificados segundo o seu número cromossómico, que resultaram do cruzamento entre triplóides e no Quadro VII encontram-se os dados referentes à F_2 obtida por polinização livre.

Verifica-se que estas descendências são particularmente constituídas por indivíduos a que correspondem constituições cromossómicas geneticamente desequilibradas. Esta constituição, porém, é somente aparente, porquanto todas essas plantas são providas de heterocromatinossomas e serão equilibradas se admitirmos que a inactividade dos genes dos heterocromatinossomas é total.

A análise a que procedemos mostrou-nos que havia diplóides

QUADRO VI

N.º de cromossomas	14	15	16	18	19	20	26	30	32	33	34
N.º de indivíduos	1	1	2	1	2	1	1	1	1	4	1

QUADRO VII

N.º de cromossomas	14	21	22	35	36	37	38	39	40	41	42	54
N.º de indivíduos	3	3	3	3	4	7	5	2	4	3	1	1

com um número de heterocromatinossomas que podia ir até 8, havendo, portanto, plantas com 21 e 22 cromossomas que não são na realidade triplóides e hipertriplóides. No entanto, encontraram-se também triplóides verdadeiros. Guarnições triplóides activas foram encontradas em plantas com 26 cromossomas em que havia 5 heterocromatinossomas. Guarnições tetraplóides activas foram encontradas mais frequentemente, pois caracterizavam plantas com 30, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38 e mesmo uma com 42 cromossomas. É provável que entre as plantas com $2n = 36, 37, 38, 39, 40$ e 41 existam dois tipos: um em que a guarnição activa é a tetraplóide e outro em que a mesma guarnição será a pentaplóide. A falta de tempo não nos permitiu resolver ainda este problema.

O que é certo, porém, é que a descendência destes cruzamentos, pondo de lado os poucos diplóides que surgiram, nos apareceu principalmente constituída por plantas providas de heterocromatinossomas. Havia, portanto, entre as plantas utilizadas nos cruzamentos iniciais um ou mais triplóides providos do gene H, o qual, pelo facto de ser dominante, se difundiu em larga escala e permitiu a formação de plantas aparentemente desequilibradas, mas que foram salvas em virtude de serem realmente diplóides, triplóides, tetraplóides e possivelmente pentaplóides.

Vimos que os heterocromatinossomas mostram alociclia, em virtude de se apresentarem intensamente corados na interfase e na profase e descorarem-se mais rapidamente que os eucromatinossomas na metafase e anafase quando se usa como fixador o Navachine e como corante o violeta de genciana. Esta alociclia é semelhante àquela que se nota nos heterocromatinossomas de certos animais e nos das Bryophyta. Este paralelismo era de esperar em virtude da identidade de constituição. A análise da alociclia é reservada para um outro trabalho.

Além desta particularidade, notámos ainda que os heterocromatinossomas apresentavam um comportamento especial em algumas mitoses de certas plantas. Efectivamente, esses cromossomas atrasam-se muitas vezes relativamente aos eucromatinossomas, aparecendo fora do plano equatorial quando estes já se encontram dispostos em metafase. Depois de iniciada a ascensão polar dos eucromatinossomas, alguns ou todos os eucromatinossomas presentes deslocam-se então para o plano equatorial, orientando-se muitas ve-

zes longitudinalmente e sofrendo frequentemente divisão transversal do centrómero, o que origina telocêntricos que podem depois produzir isocromossomas. Os cromossomas provenientes da divisão quer normal, quer anormal dos heterocromatinossomas poderão ser incluídos nos núcleos-filhos ou ser eliminados no citoplasma, com formação de micronúcleos.

Verifica-se, assim, que o comportamento dos heterocromatinossomas em certas mitoses tem o seu paralelo no dos univalentes durante a meiose. Em consequência deste comportamento, os heterocromatinossomas inteiros ou os produtos da sua divisão podem ser eliminados. Por outro lado, podem dar origem a novos tipos de cromossomas. Entre estes dominam os telocêntricos que, como se sabe, originam frequentemente isocromossomas. Além disso, em virtude da divisão transversal do centrómero, os telocêntricos estão também em condições de se unir a pedaços resultantes da fractura de outros cromossomas e a originar outros tipos por translocação.

Os novos tipos pp e ll devem corresponder a isocromossomas, formados, respectivamente, a partir dos braços curtos (p) de cromossomas do tipo Lp e dos braços l do cromossoma li. O cromossoma TS não parece ser heterocromático, devendo provavelmente ter sido originado em consequência de quebras que tenham tido lugar durante a meiose nos triplóides iniciais. É de salientar que este cromossoma foi identificado em 10 plantas entre 34, algumas vezes em pares nas placas (uma vez mesmo em dois pares), o que revela que este cromossoma de novo tipo tem tendência a estabelecer-se na descendência.

Na nossa opinião, o comportamento especial dos heterocromatinossomas que descrevemos é consequência da heterocromatinização. Efectivamente, o factor H, por um processo que nos é ainda desconhecido, actua sobre os genes inactivando-os ou tornando-os muito pouco activos (vide FERNANDES, 1951). Como os genes, os centrómeros são também influenciados pela heterocromatinização, sendo tornados menos activos. Por esse facto, os heterocromatinossomas que se atrasam na mitose são muitas vezes eliminados, sofrem divisão transversal do centrómero, etc. Poderemos encarar esta divisão transversal como um processo que permite aos heterocromatinossomas lutar pela sua sobrevivência, porquanto, ficando reduzidos a um dos braços do cromossoma inicial, o seu peso diminuirá consideravelmente, harmonizando-se com a força do centrómero que poderá

transportar uma carga mais pequena. De acordo com este ponto de vista, verifica-se que aparecem mais frequentemente cromossomas correspondentes a braços curtos que a braços longos, sendo também mais frequentes os isocromossomas pp.

É curioso assinalar que existem plantas onde os heterocromatinossomas se comportam quase como os eucromatinossomas, enquanto que noutras sofrem uma acção mais drástica. Na nossa opinião, esse fenómeno dependerá da constituição genética da planta. Se se tratar de uma planta com a constituição HH, a sua acção será mais enérgica do que se for Hh. O que se disse para os diplóides aplica-se também aos poliplóides. É provável que actuem também factores do meio ambiente, mas, se assim é, estes são-nos inteiramente desconhecidos. De qualquer modo, poderemos dizer que, além de os inactivar, as plantas em que existe o factor H tentam eliminar os cromossomas supernumerários dos seus núcleos. Efectivamente, como FERNANDES (1949, 1951) referiu, raramente se deve conseguir uma inactivação génica total, de modo que as plantas providas de heterocromatinossomas são sempre um tanto desequilibradas e o equilíbrio perfeito só se poderá conseguir mediante a eliminação completa. No entanto, como FERNANDES (1946, 1949) e FERNANDES & MESQUITA (1963) acentuaram, os heterocromatinossomas possuem, por assim dizer, a capacidade de lutar pela sua sobrevivência, experimentando as plantas dificuldades em os eliminar.

Um outro problema que vale a pena discutir é o referente ao momento em que a heterocromatinização se opera. Terá esta lugar no momento da formação dos micrósporos e dos macrósporos? Terá lugar no zigoto? Terá lugar em quaisquer outras células do ciclo do desenvolvimento?

Analisemos os casos das plantas cujo estudo foi feito com mais pormenor. A planta Sem. XCIII, Ind. 3 parece possuir a constituição de um triplóide autêntico, visto ter a seguinte guarnição:

A A A

B B B

C C C

D D D

E E E

F F F

G G G

Se realmente fosse esta a constituição da planta, não haveria dúvidas de que a heterocromatinização teria tido lugar nos micrósporos e macrósporos, ou então parte em um dos esporos e parte possivelmente no zigoto. Quer dizer, se ambos os esporos possuísem o factor H, formar-se-iam por exemplo os seguintes dois tipos de gâmetos em que os cromossomas supernumerários sofreriam a heterocromatinização (em itálico no esquema):

♀ (H)		♂ (H)		Z (HH)
A A		A		A A A
B		B B		B B B
C C		C		C C C
D	×	D D	=	D D D
E E		E		E E E
F		F F		F F F
G		G G		G G G

No caso de um dos gâmetos possuir o factor H e o outro ser h, teríamos por exemplo:

♀ (h)		♂ (H)		Z (Hh)
A A		A		A A A
B		B B		B B B
C C	×	C	=	C C C
D		D D		D D D
E E		E		E E E
F		F F		F F F
G		G G		G G G

Acontece, porém, que os pares de cromossomas C e D por um lado e E e F por outro são muito semelhantes, sendo muito difícil distinguir-los. Por esse facto, a planta com 21 cromossomas poderia não ser um autêntico triplóide, mas uma forma desequilibrada cuja formação poderia ser por exemplo representada no esquema seguinte, onde se admite que a heterocromatinização teve lugar no momento da formação do zigoto:

♀ (h)		♂ (H)		Z (Hh)
A A		A		A A A
B		B B		B B B
C C		C C		C C C C
D	×	D	=	D D
E		E E		E E E
F		F F		F F F
G G		G		G G G

A resolução do problema depende, pois, inteiramente de se saber se estamos ou não na presença de um verdadeiro triplóide. A morfologia dos cromossomas parece indicar-nos que é esse o caso e, portanto, que a heterocromatinização poderá ter lugar nos esporos quando neles existir o factor H.

Outros argumentos poderão ser invocados a favor desta ideia, entre os quais apontaremos:

a) Existência de plantas com 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41 e 42 cromossomas providos de 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 e 14 heterocromatinossomas e que são na realidade tetraplóides. É evidente que, no caso de a heterocromatinização não ter lugar nos esporos, deveriam formar-se com mais frequência verdadeiros pentaplóides, assim como pentaplóides com heterocromatinossomas.

b) Aparecimento de descendências constituídas quase exclusivamente por plantas providas de heterocromatinossomas. Este facto revela que houve selecção de gâmetos em que foram muitas vezes eliminados os que possuíam eucromatinossomas supernumerários. Ora isto só poderia ter acontecido se a heterocromatização teve lugar nos micrósporos e macrósporos.

c) É lógico admitir que o factor H manifieste a sua acção em células tão sensíveis ao desequilíbrio génico como são as células haplóides.

No que respeita pròpriamente aos cromossomas supernumerários levados pelos gâmetos de constituição h, a sua heterocromatinização deverá certamente ocorrer na formação do zigoto, ao realizar-se a fusão com um gâmeto H. Tentativas serão feitas no futuro para melhor elucidação deste problema.

Discutimos o modo como a planta com 21 cromossomas poderia ter sido produzida. É provável que a origem das outras que foram estudadas com mais pormenor tenha sido a seguinte:

Sem. 85, Ind. 3	=10 (7+3) + 9 (7+2) = 19 (14+5 H) ³
Sem. 88, Ind. 3	=10 (7+3) + 10 (7+3) = 20 (14+6 H)
Sem. XCIII, Ind. 5	=11 (7+4) + 11 (7+4) = 22 (14+8 H)
Sem. 85, Ind. 2	=14 + 12 (7+5) = 26 (21+5 H)
Sem. 86, Ind. 1	=21 + 11 (7+4) = 32 (28+4 H)
Sem. XCIV, Ind. 26	=18 (14+4) + 18 (14+4) = 36 (28+8 H)
Sem. XCIV, Ind. 1	=19 (14+5) + 19 (14+5) = 38 (28+10 H)
Sem. XXIV, Ind. 58	= 21 (14+7) + 21 (14+7) = 42 (28+14 H)

O gene H existe também noutras plantas, porquanto observações não publicadas (FERNANDES & MARGARIDA QUEIRÓS) mostram que se encontra em *Agrostis Pourretii* Willd., onde actua como em *N. bulbocodium*. Dada a frequência com que se encontram heterocromatinossomas nas *Gramineae*, é de presumir que se encontrem também em vários outros géneros dessa família.

É bem conhecido o fenómeno da heterocromatinização de um dos cromossomas X da fêmea dos Mamíferos (ver BARR, 1966). Essa heterocromatinização é, porém, reversível e apresenta ainda bastantes outras diferenças relativamente ao caso de *N. bulbocodium*. Sendo assim, o mecanismo da heterocromatinização deve ser diferente nos dois casos.

Sobre a maneira como o factor H actua de modo a ocasionar a inactividade total ou o enfraquecimento da actividade dos cromossomas que provocam desequilíbrio génico nada poderemos acrescentar por enquanto às hipóteses formuladas por FERNANDES (1949).

RESUMO E CONCLUSOES

1. Entre os descendentes do cruzamento de triplóides de *N. bulbocodium* ($3x = 21$) obtidos por meio de polinização artificial, encontraram-se indivíduos com 14, 15, 16, 18, 19, 20, 26, 30, 32, 33 e 34 cromossomas, com as frequências referidas no Quadro VI e cuja origem provável é indicada no Quadro III.

2. Da polinização livre entre essas plantas da F_1 , surgiram indivíduos com 14, 21 e 22 cromossomas, bem como outros com números compreendidos entre 35 e 42 e um com 54.

3. Pondo de lado os diplóides, notou-se, em certos casos, uma

ligeira variação para mais ou para menos dos números de cromossomas apresentados pelas placas de uma mesma raiz. Os números indicados foram, porém, os encontrados mais frequentemente.

4. A análise destes números revela que estão presentes tanto na F_1 como na F_2 plantas que correspondem a classes que deveriam ser genéticamente desequilibradas.

5. A análise dos núcleos intercinéticos revelou que a maior parte das plantas possuíam cromocentros, sendo o seu número em geral tanto maior quanto mais elevada a diferença relativamente aos números diplóide, triplóide e tetraplóide.

6. A presença de cromocentros corresponde à existência de heterocromatinossomas, os quais apresentam alociclia, posta em evidência mediante a fixação em Navachine e coloração pelo violeta de genciana, pelo facto de esses cromossomas se descolorarem mais rapidamente que os eucromatinossomas quando a diferenciação é levada um tanto longe.

7. A determinação do número de heterocromatinossomas mostrou que muitas plantas pertencentes a classes que deviam ser desequilibradas genéticamente não o são, visto as suas guarnições possuírem eucromatinossomas que correspondem aos números diplóide, triplóide, tetraplóide e possivelmente pentaplóide e hexaplóide.

8. Foram encontradas plantas com 21 e 22 cromossomas que possuíam, respectivamente, 7 e 8 heterocromatinossomas, bem como uma outra de $2n = 42$ que possuía 14.

9. Em certas plantas e em certas mitoses, todos ou pelo menos alguns heterocromatinossomas comportam-se como retardatários, colocando-se no plano equatorial depois de os eucromatinossomas terem iniciado a ascensão polar. Nestas condições, dispõem-se longitudinalmente e os seus centrómeros dividem-se com frequência transversalmente, produzindo telocêntricos que podem originar depois isocromossomas. Algumas vezes ou os cromossomas ou os produtos da sua divisão não chegam a ser incluídos nos grupos polares e são eliminados, o que explica a variação do número de cromossomas assinalada.

10. Os factos observados levam à conclusão de que em algum ou alguns dos triplóides iniciais existia um gene dominante, H, que determinou a heterocromatinização dos cromossomas supernumerários que ocasionariam desequilíbrio génico.

11. O fenómeno da heterocromatinização deu ensejo a que fos-

sem salvos muitos indivíduos que seriam inviáveis em consequência do desequilíbrio génico.

12. O factor H inactiva total ou parcialmente os genes dos cromossomas supernumerários e enfraquece-lhes os centrómeros. Este enfraquecimento é a causa de se comportarem em muitas mitoses como retardatários, de uma maneira semelhante à dos univalentes na meiose.

13. Parece, por assim dizer, travar-se uma espécie de luta entre as plantas e os cromossomas supernumerários, da qual a primeira fase é a heterocromatização. A segunda é a tentativa de eliminação contra a qual os cromossomas lutam mediante a divisão transversal do centrómero, pela qual, reduzindo-se a simples braços, diminuem o peso (é de notar que são em regra mais frequentes os cromossomas correspondentes aos braços curtos) e a formação de isocromossomas graças à qual adquirem maior estabilidade.

14. É provável que as plantas com a constituição HH lutem com mais eficiência contra os heterocromatinossomas que as da constituição Hh.

15. Tudo leva a crer que a heterocromatinização tenha logo lugar nos micrósporos e macrósporos portadores do factor H. Fala a favor desta ideia o facto de se ter encontrado uma planta que, pela morfologia dos cromossomas, parece ser um verdadeiro triplóide e possui 7 heterocromatinossomas que devem ter sido já trazidos pelos gâmetos. O encontro de plantas que parecem também ser verdadeiros pentaplóides e possuem 7 heterocromatinossomas fala no mesmo sentido. Por outro lado, o aparecimento de poucas plantas com eucromatinossomas supernumerários (estas são por via de regra as que possuem números de cromossomas vizinhos do pentaplóide e do hexaplóide) indica que os gâmetos que lhe poderiam ter dado origem foram eliminados em concorrência com aqueles em que os supernumerários estavam já heterocromatinizados e, portanto, inactivados. É ainda lógico que se admita que o factor H actue nos gâmetos em que exista, evitando, assim, que sejam eliminadas células tão sensíveis ao desequilíbrio génico.

Os supernumerários transportados pelos gâmetos h só deverão sofrer a heterocromatinização no zigoto, ao encontrarem-se com gâmetos H, quer estes levem heterocromatinossomas ou não.

16. Embora também relacionada com um mecanismo de desequilíbrio génico, a heterocromatinização de um dos cromossomas X

das fêmeas dos Mamíferos parece ser determinada por factores que actuam de uma maneira diferente da do gene H em *N. bulbocodium* e noutras plantas.

17. Por enquanto não se conhece nada de positivo sobre a natureza e o mecanismo mediante o qual o factor H actua.

BIBLIOGRAFIA

BARR, M. L.

- 1966 The significance of sex chromatin. *Intern. Rev. Cytol.* **19**: 35-95.

FERNANDES, A.

- 1934 Nouvelles études caryologiques sur le genre *Narcissus* L. *Bol. Soc. Brot. sér. 2*, **9**: 3-198.
- 1936 Les satellites chez les Narcisses - II. Les satellites pendant la mitose. *Bol. Soc. Brot. sér. 2*, **11**: 88-146.
- 1946 Sur le comportement des chromosomes surnuméraires hétérochromatiques à la méiose - I. Chromosomes longs hétérobrachiaux. *Bol. Soc. Brot. sér. 2*, **20**: 93-154.
- 1949 Le problème de l'hétérochromatinisation chez *Narcissus bulbocodium* L. *Bol. Soc. Brot. sér. 2*, **23**: 5-88.
- 1951 Sur l'hétérochromatinisation des chromosomes nucléolaires. *Bol. Soc. Brot. sér. 2*, **25**: 249-286.

FERNANDES, A. & MESQUITA, J. F.

- 1963 Sur le comportement des chromosomes surnuméraires hétérochromatiques à la méiose - II. Chromosomes courts hétérobrachiaux et isobrachiaux. *Portug. Acta Biol. (A)*, **7**: 139-168.

NAGAO, S.

- 1935 Distribution of chromosomes in pollen grains in certain triploid and hypertriploid *Narcissus* plants. *Jap. Journ. Genet.* **11**: 1-5.

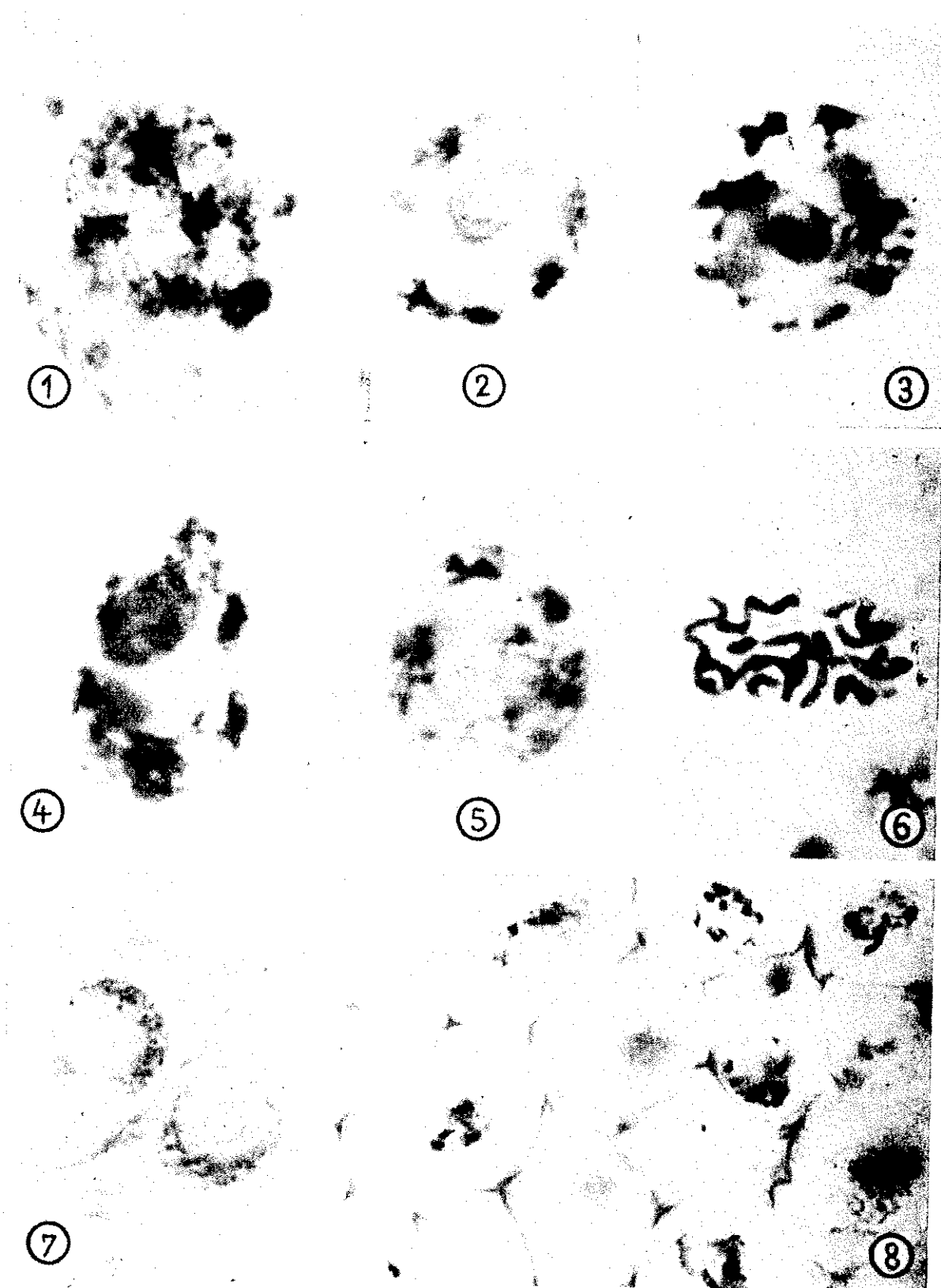


FIG. 1. Sem. 85, Ind. 1. Núcleo mostrando cromocentros (ver Quadro III).
 » 2. » 85, » 2. Idem (ver Quadro III).
 » 3. » 85, » 3. Idem (ver Quadro III).
 » 4. » 86, » 1. Idem (ver Quadro III).
 » 5. » 88, » 3. Idem (ver Quadro III).
 » 6. » 88, » 3. Placa metafásica, mostrando os euromatinossomas corados e os heterocromatinossomas descorados (ver Quadro III).
 » 7. » XCIII, Ind. 2. Planta com 14 cromossomas desprovida de cromocentros (ver Quadro IV).
 » 8. » XCIII, » 3. Aspecto geral de uma porção do meristema radicular cujos núcleos mostram cromocentros (ver Quadro IV).

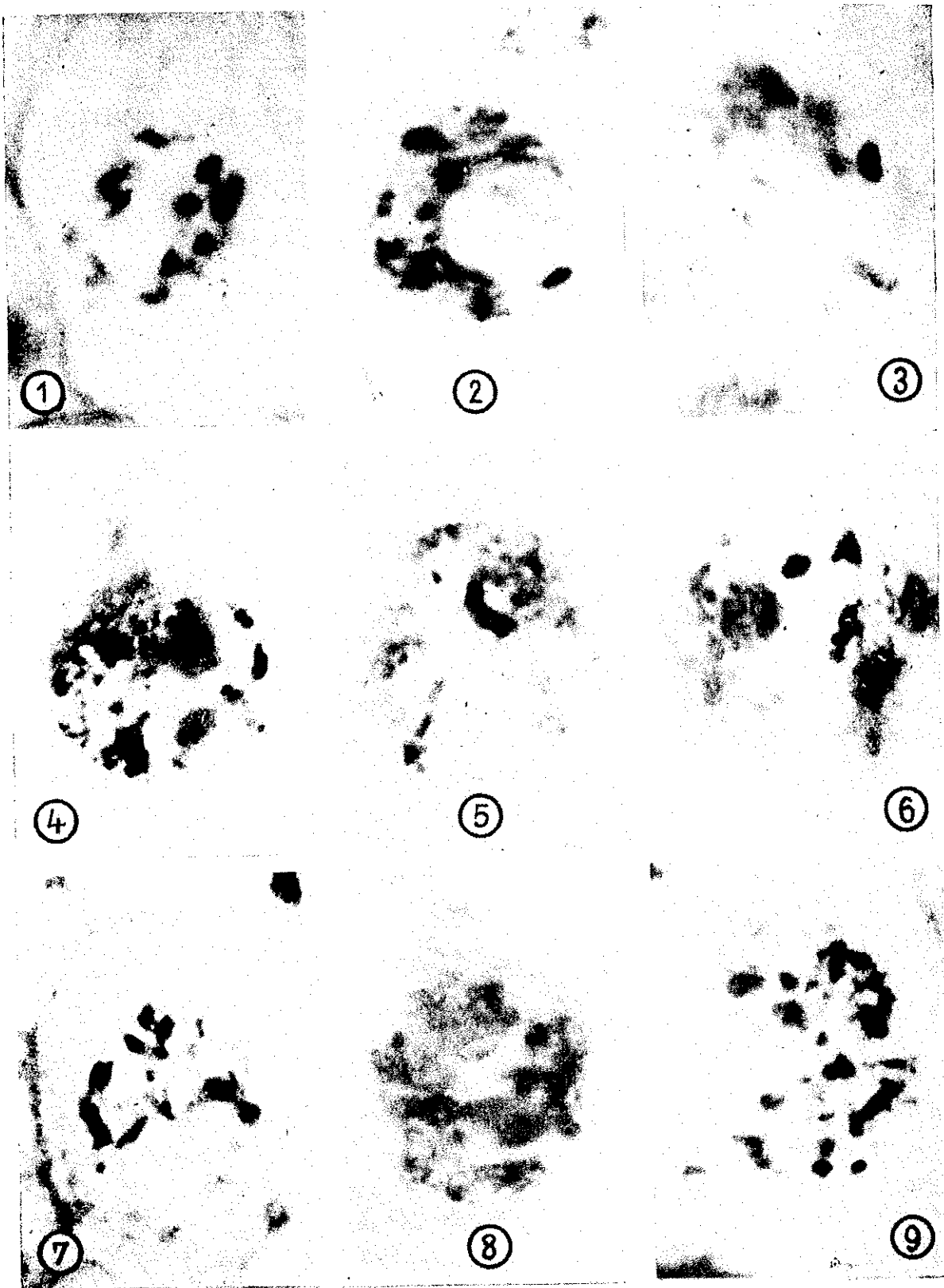


FIG. 1. Sem. XCIII, Ind. 3. Núcleo mostrando cromocentros (ver Quadro IV).
 » 2. » XCIII, » 5. Idem (ver Quadro IV).
 » 3. » XCIII, » 5. Heterocromatinossomas descorados fora do plano equatorial (ver figura 17b).
 » 4. » XCIV, » 1. Núcleo mostrando cromocentros (ver Quadro IV).
 » 5. » XCIV, » 9. Núcleo interfásico em que, além de outros, se vê um cromocentro, correspondente a um heterocromatinossoma que se mostra constituído por dois cromatídios.
 » 6. » XIV, » 9. Outro núcleo mostrando cromocentros (ver Quadro IV).
 » 7. » XCIV, » 16. Idem (ver Quadro IV).
 » 8. » XCIV, » 26. Idem (ver Quadro IV).
 » 9. » XCIV, » 58. Núcleo com numerosos cromocentros (ver Quadro IV).

Contribuição para o conhecimento cário-sistemático do género *Myosotis* L.

por ROSETTE FERNANDES & MARIA TERESA LEITAO

Instituto Botânico da Universidade de Coimbra

Nas duas mais recentes e importantes obras sobre a flora portuguesa, isto é, na Flora de Portugal de P. COUTINHO (1.^a ed.: 497, 1913; 2.^a ed.: 591, 1939) e na Flora Portuguesa de G. SAMPAIO (pág. 529, 1947), dentro do grupo de espécies de *Myosotis* cujo cálice possui pêlos aplicados, são distinguidas, além de *M. caespitosa* C. F. Schultz, de cujo estudo não nos ocupamos no presente artigo, mais duas entidades: *M. Welwitschii* Boii. & Reut. e *M. stolonifera* (DC.) Gay ex Salmon*.

M. Welwitschii foi descrita por BOISSIER & REUTER (Diagn. Pl. Or. Nov. Sér. 2, **3**: 138, 1856), baseando-se em exemplares colhidos por WELWITSCH em Portugal (Belas e Sintra) e por FAUCHÉ (próximo a Cádiz) em Espanha. A espécie é indicada pelos dois botânicos portugueses acima mencionados para quase todo o nosso território.

M. stolonifera, descoberta por GAY nas montanhas das Astúrias, foi referida posteriormente para algumas serras do norte e centro de Portugal. O mesmo taxon existe também na Inglaterra, onde C. E. SALMON (in Journ. Bot., London, **64**: 294-295, 1926) o descreveu com o nome de *M. brevifolia*, supondo tratar-se de uma espécie independente. A identidade entre as duas foi reconhecida recentemente por J. GRAU (in Mitt. Bot. Staatssamm. München, **5**: 675, 680 e 687,

* A nomenclatura do último taxon é por nós tratada num outro trabalho. G. SAMPAIO subordina *M. Welwitschii* e *M. stolonifera*, como raças, a *M. lingulata* Roem. & Schult. (= *M. caespitosa*). Este ponto de vista não se justifica, porquanto aquelas duas diferem muito da última espécie. Por outro lado, as combinações empregadas por SAMPAIO são ilegítimas, pelo facto de a categoria de raça não ser admitida em nomenclatura botânica.

P. COUTINHO considera *M. stolonifera* como variedade de *M. Welwitschii*.

1965) e confirmada pelo botânico inglês WELCH (in *Watsonia*, **6**: 279, 1967). Também nós pudemos verificar a semelhança entre as plantas peninsulares e as inglesas durante uma estadia que fizemos no British Museum. No entanto, as plantas inglesas têm os segmentos do cálice obtusos e são calcícolas, enquanto as portuguesas os possuem agudos e vivem em montanhas graníticas.

A mesma investigadora alemã (op. cit.: 683) assinalou para Portugal a presença de *M. secunda* A. Murray (= *M. repens* G. Don ex Borrer), espécie atlântica que se encontraria disseminada pela Irlanda, Grã-Bretanha, norte de França e de Espanha e Ilha da Madeira. *M. secunda*, que pertence ao mesmo grupo que os dois taxa acima referidos, apareceria, no nosso país, na Póvoa de Lanhoso (Minho), e na Serra de Monchique (Algarve), isto é, em dois locais distanciados um do outro por cerca de 400 km. Afirmando ainda GRAU (op. cit.: 687) que, em Portugal, só conhece *M. Welwitschii** dos arredores de Lisboa, surgiu-nos a seguinte pergunta: a que taxon pertencem os exemplares portugueses de numerosíssimas localidades que têm sido incluídos pelos nossos botânicos nessa espécie?

Por outro lado, se, de facto, *M. secunda* se encontra em dois pontos tão afastados um do outro e de condições climáticas diferentes, é natural supor que exista em locais intermediários, tanto mais que, de acordo com a afirmação de WELCH (op. cit.: 278), os botânicos ingleses que têm herborizado no nosso país referiram a *M. secunda* e não a *M. Welwitschii* o material por eles colhido.

Em face destas dúvidas, propusemo-nos fazer a revisão de todo o material português deste grupo arquivado nos herbários lusitânicos, servindo-nos para isso das chaves publicadas por GRAU (op. cit.: 678-679), nas quais os três taxa são considerados ao nível específico. Várias dificuldades se nos depararam, visto que alguns dos caracteres aí empregados não têm constância que permita a sua utiliza-

* A mesma autora refere também *M. Welwitschii* para Marrocos. A distribuição disjunta por ela indicada leva imediatamente a pensar que a planta se encontra ao sul do Tejo e em Espanha. De facto, WILLKOMM (Suppl. Prodr. Fl. Hisp.: 165, 1893) cita-a para Cádiz, com a indicação, porém, de a não ter visto. Além disso, o mesmo autor (loc. cit.) menciona *M. maritima* Hochst. ex Seub. para Algeciras, igualmente com a indicação n. v. Numa carta que PAU escreveu a MERINO (cf. Fl. Galicia, **2**: 167, 1906), esse botânico pensava que *M. maritima* era idêntica a *M. Welwitschii*, afirmando ainda que a possuía da Península e que os dois exemplares do sul da Espanha, citados por WILLKOMM, pertenciam ambos à mesma espécie. Não vimos os espécimes em questão, mas, em face do exposto, acreditamos que *M. Welwitschii* existe no sul de Espanha. Quanto à identidade estabelecida por PAU entre este taxon e *M. maritima* está errada, pois que a última é uma espécie endémica dos Açores, diferente de *M. Welwitschii*.

ção como base discriminativa. Assim, como carácter de separação mais importante, é indicada, nas chaves, a disposição dos pêlos do caule, os quais seriam aplicados em *M. stolonifera* e patentes (pelo menos os da base) em *M. secunda* e *M. Welwitschii*. Verifica-se, porém, que bastantes espécimes portugueses de *M. stolonifera* e até o holótipo da espécie (cf. SALMON, op. cit.: 295) possuem pêlos patentes. Igualmente WELCH (loc cit.) observou pêlos patentes em 4 dos 6 exemplares de *M. stolonifera* que estudou.

O carácter da orientação dos pêlos não tem, portanto, tão grande valor como GRAU lhe atribui. No entanto, embora existam plantas de determinação duvidosa, *M. stolonifera* é uma espécie bem caracterizada sob determinados aspectos, particularmente devido ao tamanho das flores e dos aquênios e à presença de estolhos bastante típicos.

M. Welwitschii e *M. secunda*, ambas com caules densa e patentemente vilosos na parte basilar e mediana, distinguem-se entre si principalmente (este carácter é colocado nas chaves de GRAU em primeiro lugar) pela presença de estolhos* na última e ausência dessas formações na primeira. Sendo assim, a determinação de plantas vivas, colhidas com a parte basilar completa, não ofereceria dúvidas: pertenceriam a *M. secunda* as estolhosas e a *M. Welwitschii* as que não possuíssem estolhos. Do mesmo modo, sempre que um exemplar de herbário apresentasse na base do caule os estolhos característicos de *M. secunda* não haveria que hesitar em incluí-lo nesta espécie. No que respeita aos espécimes sem estolhos, nunca pode haver a certeza se os teriam ou não possuído, porquanto pode dar-se a eventualidade de não terem sido colhidas plantas completas ou de os estolhos terem caído durante a manipulação dos exemplares. Atendendo às grandes semelhanças existentes entre os dois taxa, há por isso muitas vezes dificuldade em determinar certos espécimes desprovidos de estolhos. Por outro lado, vários exemplares, apesar de os possuírem, não concordam, sob alguns aspectos, com *M. secunda*. Estão neste caso numerosas plantas dos arredores de Coimbra e de outros pontos do centro do país, mais ou menos robustas, com caules densamente peludos. Além disso, as corolas dessas plantas têm diâmetro muito próximo das de *M. Welwitschii* e os seus

* Os estolhos de *M. secunda* seriam, segundo GRAU, diferentes dos de *M. stolonifera*, aparecendo nesta espécie simples ou ramificados e bastante numerosos, não só na base do caule, mas também nas axilas das folhas, por vezes até à proximidade da inflorescência, enquanto em *M. secunda* se mostrariam sempre simples, formando-se unicamente na base do caule.

aquênios dimensões aproximadas dos desta espécie. Como determinar, então, tais plantas? Atendendo a que GRAU fez o estudo cariológico das três entidades, resolvemos proceder igualmente a estudos dessa natureza com o fim de elucidar o problema. Caso as plantas estolhosas apresentassem o mesmo número de cromossomas que aquela autora indica para *M. secunda*, haveria que filiá-los neste taxon, a pesar das dimensões excepcionais dos seus órgãos vegetativos, das flores e dos frutos.

MATERIAL E METODOS

As plantas foram trazidas directamente dos locais de colheita, tendo o cuidado de não desprender o seu sistema radicular da terra que o envolvia. Geralmente, de cada colheita, fizeram-se observações in loco com o fim de verificar a presença de estolhos, para o que se procedia à lavagem basilar de algumas plantas, o que permitia desprender a terra ou lodo sem quebrar ou afectar os estolhos. Transportadas as primeiras em sacos de plástico, foram postas em vasos no Jardim Botânico de Coimbra, vasos que se mantiveram constantemente húmidos ou mesmo cobertos de água, fornecendo-se-lhes, deste modo, condições tanto quanto possível comparáveis àquelas em que se encontravam no campo. Os vértices vegetativos das raízes foram depois fixados em Navachine, seguido-se a inclusão em parafina, segundo a técnica clássica. Os cortes transversais, de 12-15 μ de espessura, foram corados pelo violeta de genciana.

As plantas estudadas provieram das seguintes localidades:

1. a 2 km de Castro Daire
2. Serra de Freita
3. Pinhança, estrada da Beira, em frente de Gouveia.
4. Ermida, estrada de Mira à Tocha
5. entre S. Frutuoso e Segade
6. entre Carapinheira e Arazede
7. Ribeira da Misarela
8. Figueiró do Campo
9. estrada de Lisboa a Sintra, pr. Sintra
10. Serra de Sintra, entre Seteais e Monserrate

OBSERVAÇÕES

Todas estas plantas, com excepção da de Serra de Freita, são diplóides, com $2n = 24$ (fig. 1 e 2). A de Serra de Freita é um tetraplóide com $2n = 48$ (fig. 2 d). Os cromossomas são pequenos, a maior parte deles com constricção mediana ou submediana. Por vezes, devido às pequenas dimensões dos cromossomas, a constricção torna-se difícil de localizar, parecendo, no entanto, haver alguns cefalobraquiais. Satélites foram observados nalgumas placas, variando o seu número de 1, 1-2, 1-3, 1-4. Em muitas placas não foram observados satélites, como por exemplo, nas da plantas da Serra de Freita. Conhece-se, porém, a grande labilidade do filamento satelitífero, o que explica o facto de se apresentarem visíveis ou não. No entanto, não resta dúvida de que em muitas plantas existem dois pares de cromossomas com satélite.

Pelos seus caracteres morfológicos, as plantas de Castro Daire pertencem a *M. stolonifera*. O número de cromossomas que encontramos está de acordo quer com o que MERXMÜLLER & GRAU indicaram para esta espécie em 1963 (in Ber. Deutsch. Bot. Ges. **76**: 24), o qual foi determinado em duas plantas espanholas, uma das Astúrias (Leitariegos) e outra de Castela (Serra de Guadarrama), quer com o que a última autora refere em 1965 (op. cit.: 677, fig. c)*. GRAU afirma ainda que parte dos cromossomas tem constricção mediana e outra parte subterminal e que existem dois cromossomas com satélite, embora na figura não represente nenhum. O seu desenho não é muito elucidativo quanto à morfologia dos cromossomas, o que também não é de admirar, dado o seu pequeno tamanho. Nas plantas portuguesas de Castro Daire observaram-se também dois cromossomas satelitíferos.

Atendendo aos seus caracteres morfológicos, as plantas de Sintra, localidade para onde GRAU indica *M. Welwitschii*, incluem-se nesta espécie. O número de cromossomas $2n = 24$ por nós encontrado (fig. 1 b, c) concorda com o que GRAU indica para este taxon (loc. cit.: fig. b), na única planta que estudou, proveniente de Sacavém. Todavia, nas numerosas placas observadas das plantas de Sintra, não se viram mais do que dois satélites, enquanto aquela investigadora refere e representa 4.

* GRAU não indica a que planta pertencia a placa representada nesta figura.

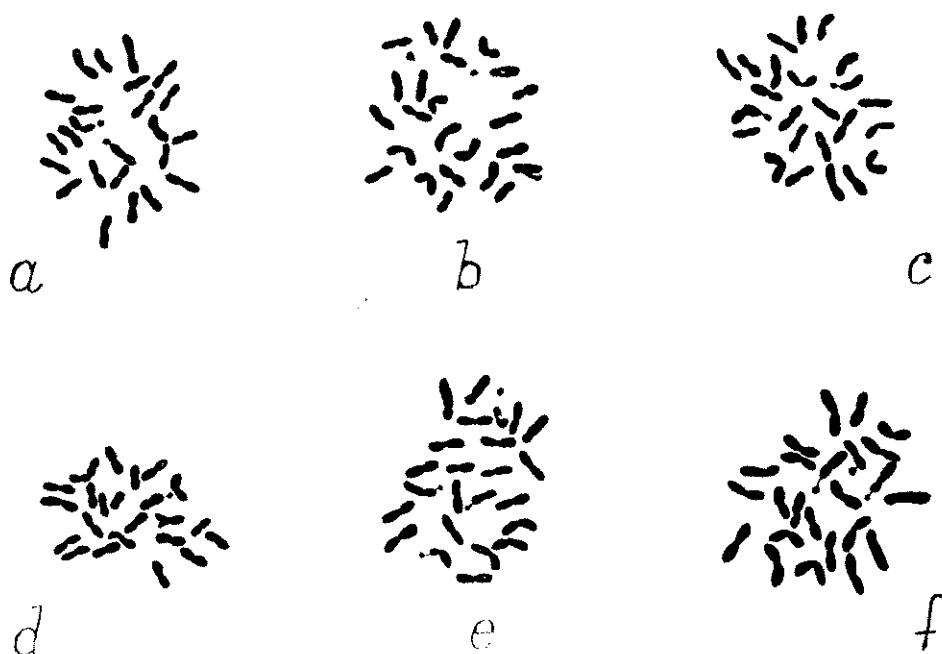


FIG. 1. Placas metafásicas de: a) *M. stolonifera* (DC.) Gay ex Salmon (planta de Castro Daire); b, c) *M. Welwitschii* Boiss. & Reut. (plantas, respectivamente, de estrada de Lisboa a Sintra, pr. Sintra e Serra de Sintra, entre Seteais e Monserrate); d) *M. secunda* A. Murray? (planta de Ermida, entre Mira e Tocha); e) *M. secunda* A. Murray? (planta de Figueiró do Campo); f) *M. secunda* A. Murray? (planta de entre S. Frutuoso e Segade). \times ca. 3000.

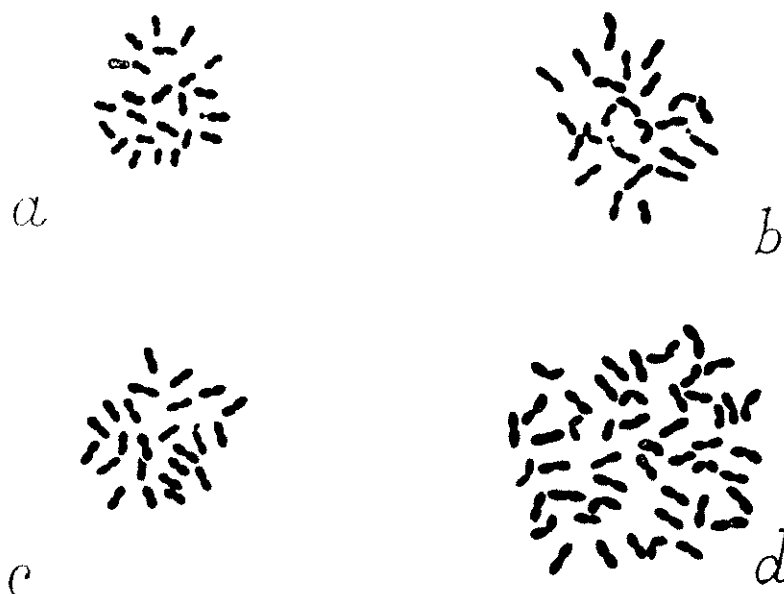


FIG. 2. Placas metafásicas de: a) *M. secunda* A. Murray? (planta da ribeira de Misarcla); b) *M. secunda* A. Murray? (planta de entre Carapinheira e Arazede); c) *M. secunda* A. Murray? (planta de Pinhança, estrada da Beira, enfrente de Gouveia); d) *M. secunda* ou tetraplóide de *M. stolonifera*? (planta da base da Serra de Freita) \times ca. 3000.

A primeira observação cariológica feita em *M. Welwitschii* deve-se a D. M. BRITTON (Cytogenetic studies on the *Boraginaceae*, in Brittonia, **7**: 244, fig. 58, 1951), o qual, na lista dos números cromossômicos, indica $n = 24$, representando na figura $2n = 24$, isto é, a espécie poderia ser tetra- e diplóide, caso o primeiro resultado não tenha sido consequência de uma gralha ou erro.

MERXMÜLLER & GRAU (loc. cit., 1963) tinham referido a *M. Welwitschii* uma planta espanhola, também das Astúrias (La Espina), na qual contaram $2n = 48$, fazendo seguir o seu resultado do que BRITTON refere no texto, ou seja $2n = 48$. Isto é, nessa altura, consideravam como exacto o número 48 e não 24 que a figura do último autor representa. A crença de que o tetraplóide de La Espina se identificava com *M. Welwitschii* é confirmada pelos autores alemães no texto (op. cit.: 27) em que afirmam: "...die robustere *M. welwitschii* auf der tetraploiden Stufe ($2n = 48$)". O exemplar de La Espina não é, porém, referido no trabalho de GRAU de 1965, nem na lista dos espécimes de *M. Welwitschii* nem na dos *M. secunda*, estudados por essa investigadora, a qual não lhe faz também qualquer menção no texto. Nesta data, GRAU muda de opinião quanto ao resultado de BRITTON, afirmando agora (op. cit.: 676) que o número haplóide $n = 24$, indicado por esse autor, corresponde a um erro, sendo exacta a figura que representa uma placa somática com $2n = 24$.

As restantes plantas diplóides por nós estudadas foram herborizadas na Beira Litoral, exceptuando a de Gouveia (Beira Alta). Apresentam todas o mesmo aspecto morfológico (ver figs. 3 e 4): plantas mais ou menos elevadas, algumas atingindo mais de 1 m de altura, com caule geralmente robusto, chegando a medir c. de 1 cm. de diâmetro na base, revestido de pêlos mais ou menos abundantes e patentes; inflorescência frouxa; corolas de cor azul celeste, medindo à volta de 7-10 mm de diâmetro; e pedicelos inferiores (os frutos não tinham atingido ainda maturação completa) bastante alongados, atingindo por vezes 17-22 mm (cerca 5-6 vezes mais longos que o cálice). Apesar da grande altura e da espessura do caule, as folhas, quase sempre de grandes dimensões (algumas medindo 16×30 cm), têm consistência bastante ténue, variando a sua forma de oblenga a oblongo-lanceolada, com ápice quase sempre obtuso. Todas as plantas, com excepção das de Gouveia, possuem estolhos fortes na base do caule, geralmente simples, raras vezes ramificados. Estas formações diferem bastante das de *M. stolonifera* não só

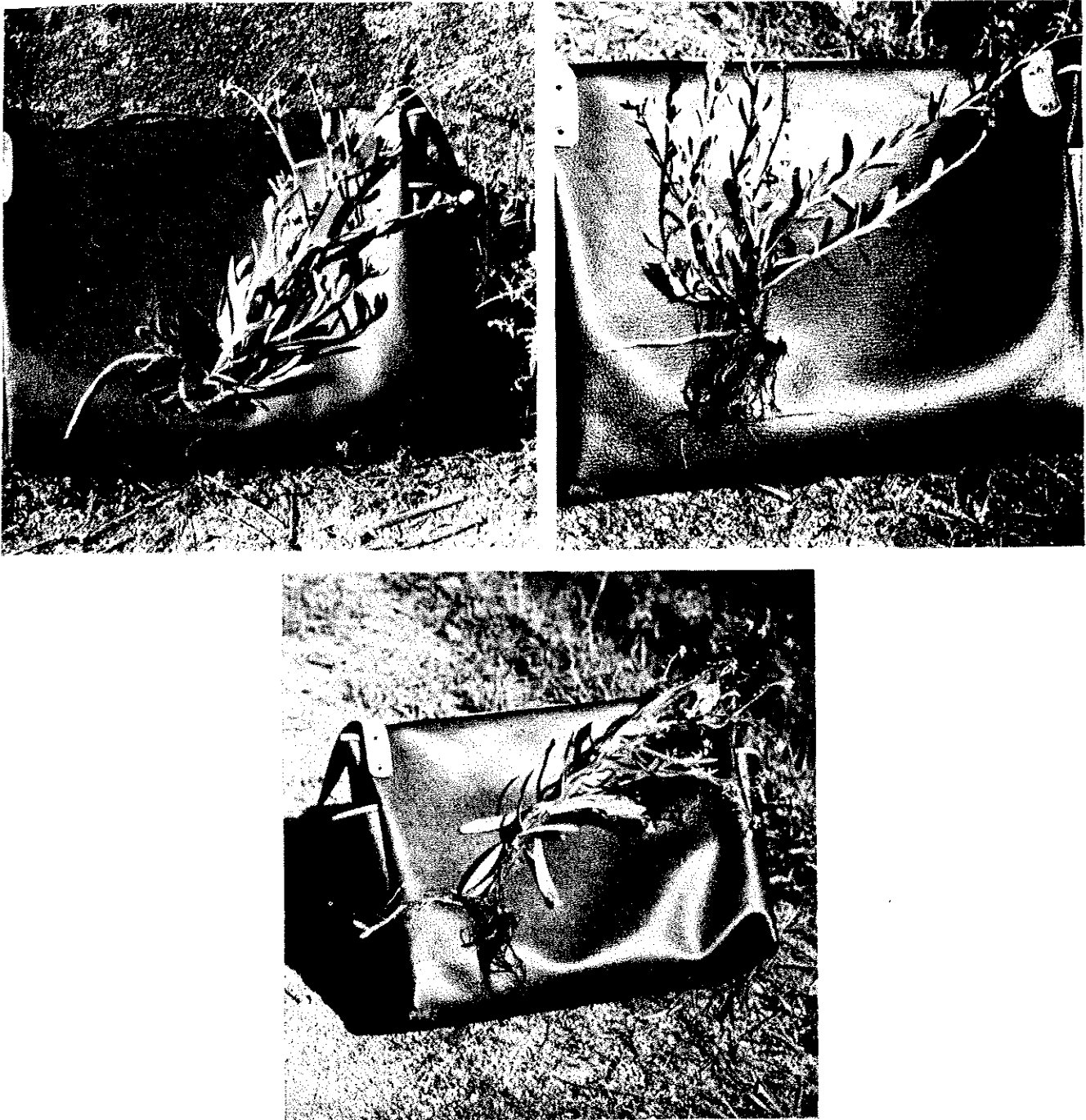


FIG. 3. Três plantas de «entre S. Frutuoso e Segade», mostrando os estolhos na base do caule; o da planta inferior é ramificado.

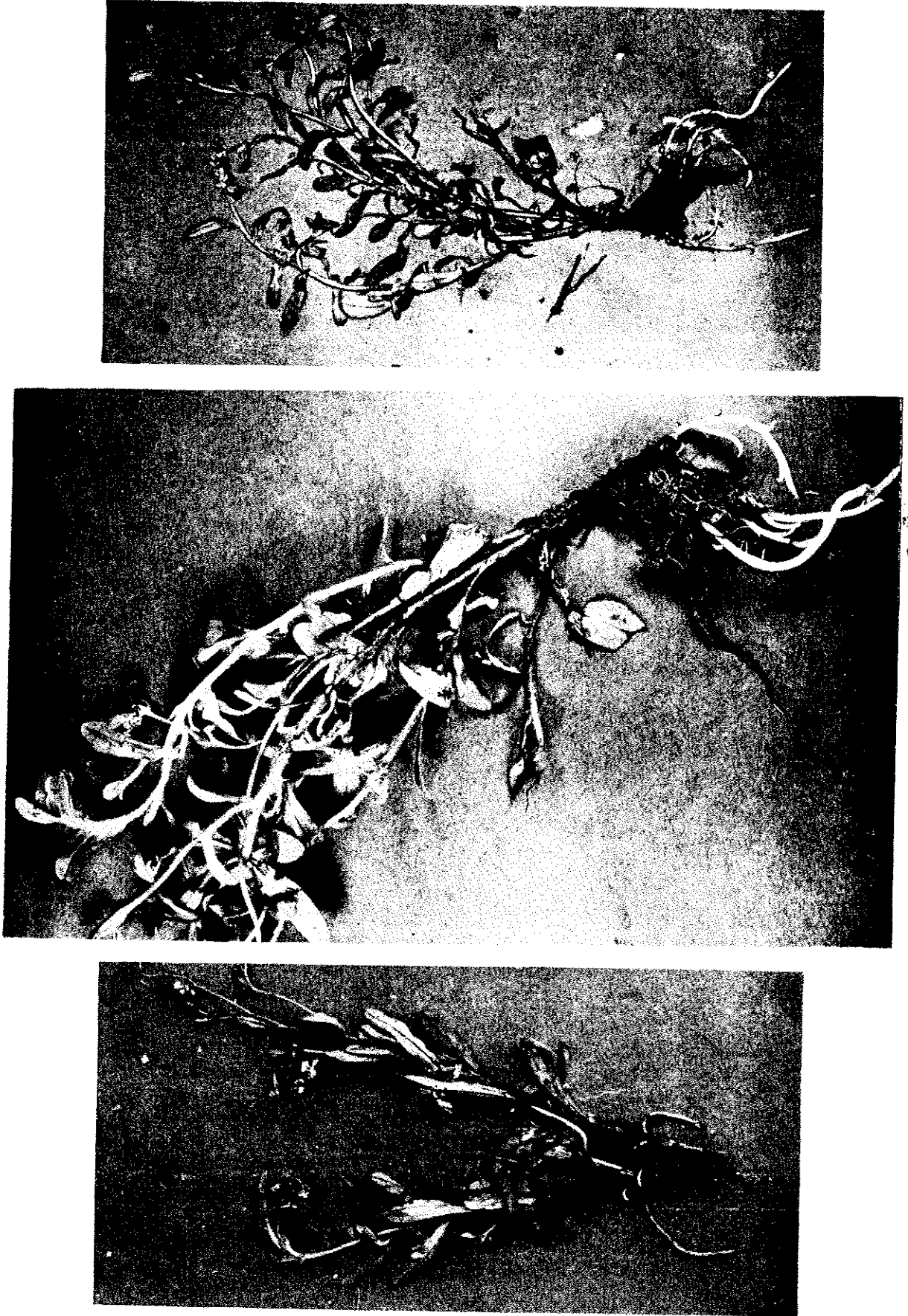


FIG. 4. Da esquerda para a direita, plantas de: Pinhaça, em frente de Gouveia; ribeira do Casal da Misarela; e Ponte da Mucella. Todas elas mostram estolhos na base do caule, sendo os da planta do centro distintamente ramificados.

pela robustez muito maior, mas também pela sua situação hipógea e não epígea, donde a sua cor predominantemente branca e não verde como os daquela espécie. Apenas o ápice, que por fim se torna ascendente, se mostra esverdeado e coberto com folhas pequenas e verdes, enquanto as restantes são brancas. Os estolhos destas plantas parecem formar-se mais tardiamente do que os de *M. stolonifera*, pois os desta espécie aparecem em fase bastante precoce do desenvolvimento, ao passo que naquelas, apesar de em muitos casos existirem já frutos quase maduros, eles estão ainda bastante atrasados. Embora pela considerável altura dos caules, grande comprimento das folhas e grandes dimensões das corolas não difiram de *M. Welwitschii*, distinguem-se desta espécie pelas folhas proporcionalmente mais largas e menos espessas, pelas cimeiras mais frouxas, pelos pedicelos (principalmente os inferiores) bastante mais alongados, pelos cálices frutíferos menos abertos, pelos botões florais ovóides e não subglobosos, pelos lobos da corola suboblongos e não suborbiculares. Além disso, possuem estolhos, o que não acontece em nenhum dos exemplares de *M. Welwitschii* das proximidades de Lisboa que examinámos. Pondo de lado as dimensões excepcionais, os caracteres que os afastam de *M. Welwitschii* aproximam-nos de *M. secunda*. Os seus cromossomas não diferem aparentemente nem dos desta espécie nem dos de *M. stolonifera*.

Os únicos indivíduos tetraplóides que se encontraram foram colhidos na base da Serra de Freita (Douro Litoral), na encosta virada para Arouca. Trata-se de plantas medianamente robustas, providas de alguns estolhos epígeos mas mais fortes do que os de *M. stolonifera* e não hipógeos nem tão espessos como os das plantas diplóides atrás mencionadas. Embora alguns pedicelos sejam relativamente compridos, a maior parte não ultrapassa 1,5-2 vezes o comprimento dos cálices frutíferos, os quais são grandes e bastante abertos. Na guarnição cromossómica da planta da base da Serra de Freita os cromossomas são semelhantes aos já referidos para os diplóides.

DISCUSSÃO

Se as plantas de Castro Daire e de Sintra se podem atribuir, respectivamente, a *M. stolonifera* e a *M. Welwitschii*, não havendo dú-

vidas quanto à sua identificação, o mesmo não sucede quer no que respeita aos diplóides providos de estolhos, quer ao tetraplóide.

Como dissemos na introdução, GRAU indicou para Portugal a existência de *M. secunda*. Segundo a autora, esta espécie poderia ser um anfidiplóide com $2n = 48$, resultante da duplicação da guarnição cromossómica do híbrido entre *M. Welwitschii* e *M. stolonifera*. Para dar esta sugestão, baseou-se no aspecto morfológico que, na sua opinião, *M. secunda* apresenta relativamente aos possíveis progenitores. Além de várias plantas de herbário, GRAU observou uma planta viva inglesa e três espanholas, não esclarecendo, porém, se todas as últimas foram estudadas cariológicamente e se em todas encontrou o mesmo número ($2n = 48$). Deve ainda salientar-se que uma dessas plantas de Espanha foi colhida nas Astúrias, em Leitariegos, precisamente para onde cita o diplóide *M. stolonifera*, já estudado em 1963 (cf. MERXMÜLLER & GRAU, loc. cit.).

Se, de facto, sob certos aspectos *M. secunda* se mostra intermediário entre *M. stolonifera* e *M. Welwitschii*, o mesmo não sucede no que respeita a outros, como, por exemplo, o tamanho dos pedicelos frutíferos. Com efeito, das três espécies, é *M. secunda* a que os apresenta mais compridos. WELCH (op. cit.: 277), que procedeu a estudos biométricos em *M. secunda* e *M. brevifolia* (= *stolonifera*), verificou que, embora existindo uma sobreposição parcial de determinados caracteres considerados isoladamente, cada uma dessas espécies tem a sua própria e única combinação de caracteres. Seria, pois, necessário efectuar também medições em *M. Welwitschii* típico a fim de verificar se *M. secunda* é de facto intermediário entre ele e *M. stolonifera*.

Outro aspecto a encarar é ainda o da possível existência de indivíduos tetraplóides tanto em *M. Welwitschii* como em *M. stolonifera*. Por outro lado, tendo sido investigada apenas uma planta inglesa de *M. secunda*, não se pode ter a certeza se todas as plantas dessa região são de facto tetraplóides, ou se não haverá ali também diplóides. A existência de poliplóides nestes taxa não seria de estranhar dado que a poliploidia se encontra noutras espécies do género, como em *M. alpestris* F. W. Schmidt ($2n = 24; 48; 72$, dentro da mesma variedade — var. *alpestris*), em *M. suaveolens* Waldst. & Kit. ($2n = 24; 48$, cf. GRAU in Österr. Bot. Zeitschr. **111**: 604, 606, 1964), em *M. palustris* ($2n = 22; 44; 88$, cf. GRAU in Ber. Deutsch. Bot.

Ges. **77**: 99, 1964). Além disso, em determinadas espécies, como em *M. alpestris*, têm sido distinguidas morfológicamente do tipo específico, por algumas botânicos, subespécies e variedades com o mesmo número, diplóide ou tetraplóide, que existe no tipo. Isto quer dizer, por um lado, que o facto da mesma guarnição se encontrar repetida 4 e 6 vezes em certas plantas, nalguns casos não lhes afecta o aspecto morfológico (subsp. *alpestris* var. *alpestris*); por outro lado, que plantas com o mesmo número cromossómico podem apresentar aspectos morfológicos distintos, o que não é novidade para ninguém e tem sido relatado numerosas vezes em grande número de géneros.

A existência de séries poliplóides no género induz-nos a pensar que igualmente em *M. stolonifera*, *M. Welwitschii* e *M. secunda* elas possam também encontrar-se. Além disso, o aparecimento em Portugal de plantas diplóides que, embora robustas*, se devem filiar em *M. secunda* por numerosos caracteres, leva-nos a pôr em dúvida a sugestão de GRAU de que esta espécie é um anfidiplóide. Outro facto a considerar é que o tetraplóide português da Serra de Freita não concorda totalmente com os espécimes ingleses de *M. secunda* que examinámos, mais parecendo indivíduos robustos de *M. stolonifera*. Serão as plantas da base da Serra de Freita tetraplóides desta última espécie, a qual existe no cimo da Serra? *M. stolonifera*, embora facilmente identificável quando vivendo no cimo das montanhas, adquire, em locais de menor altitude, aspectos de transição que a tornam mais difícil de caracterizar: maior robustez, folhas, flores e aquénios maiores. Serão estes caracteres devidos unicamente às condições do meio? Ou tratar-se-á de formas tetraplóides? Infelizmente, não nos foi possível estudar cariológicamente as formas mais robustas de *M. stolonifera*. E serão as plantas com $2n = 48$ cromossomas que GRAU encontrou em Leitariegos, nas Astúrias, não *M. secunda*, mas indivíduos tetraplóides de *M. stolonifera*, espécie que também aí existe? Parece-nos, pois, que, no estado actual dos nossos conhecimentos sobre a biosistemática deste grupo, é prematuro concluir-se pela origen híbrida de *M. secunda*. Torna-se necessário efectuar mais estudos cariológicos, particularmente de plan-

* Na descrição apresentada por GRAU, *M. secunda* tem de altura 20-40 cm., possuindo caules delicados. No entanto, os autores ingleses (CLAPHAM, TUTIN WARBURG, Fl. British Isles: 839, 1957; BUTCHER, A New Illustr. British Flora: 187, 1961) indicam como altura máxima 60 cm.; e a planta figurada na última obra tem aspecto relativamente robusto, com ramificação profusa e entrenós pouco alongados.

tas de *M. secunda*, da Inglaterra *, região onde não existe *M. Welwitschii* e onde *M. stolonifera* tem área diferente da daquela.

Em resumo, podemos concluir o seguinte:

1) O número de observações é ainda pequeno para que se possa confirmar a sugestão de GRAU de que *M. secunda* é um anfidiplóide, resultante do cruzamento entre *M. stolonifera* e *M. Welwitschii*.

2) A existência de plantas portuguesas diplóides com estolhos (plantas muito diferentes de *M. stolonifera*) leva-nos a pensar que existirão em *M. secunda* indivíduos diplóides e outros tetraplóides (ingleses e espanhóis?).

3) Atendendo a que, em *M. stolonifera*, aparecem plantas mais robustas do que habitualmente, mas que, pelos seus caracteres, dificilmente se podem filiar em *M. secunda*, é de encarar a possibilidade de também na primeira espécie se encontrar poliploidia. É possível que alguns dos exemplares considerados por certos autores como *M. secunda* sejam indivíduos tetraplóides de *M. stolonifera*.

Tencionamos prosseguir as nossas investigações neste grupo de plantas, levando a efeito, além dos estudos cariológicos, a observação e a medição dos grãos de pólen, etc.

* Infelizmente, as únicas sementes que obtivemos de Inglaterra, rotuladas como pertencendo a *M. secunda*, pertenciam a outra espécie, pelo que não nos foi ainda possível efectuar o estudo cariológico daquela entidade.

Interacción genotipo temperatura en cepas isogénicas de *Drosophila melanogaster*

por A. FONTDEVILA

Centro de Genética Animal y Humana, C. S. I. C.
Facultad de Ciencias (Universidad de Barcelona)

INTRODUCCION

Como resultado de varios años de trabajo se han ido reuniendo datos experimentales sobre los fenómenos de interacción genotipo ambiente. El problema resulta no sólo de interés para comprender mejor los procesos evolutivos, sino también por estar estrechamente relacionado con los métodos de mejora genética. No es de extrañar, pues, que hayan sido utilizados diversos materiales para detectar este fenómeno, ni tampoco el que los caracteres estudiados sean de índole diversa.

Ciertos autores como TINDELL *et al.* (1966), COOK *et al.* (1962), HALE, R. W. (1961) y otros han estudiado caracteres de interés económico utilizando material avícola. También existen trabajos relacionados con la nutrición y el crecimiento de *Drosophila* (F. W. ROBERTSON, 1959). THODAY (1953) y posteriormente PARSONS (1959) han estudiado fenómenos de interacción entre viabilidad y temperatura en *D. melanogaster*. Este último encuentra interacciones significativas no sólo en cepas consanguíneas, sino también en la F_1 y la F_2 obtenidas con estas cepas.

Sin embargo, no abundan los trabajos sobre fenómenos de interacción relacionados con la temperatura. Parece, pues, interesante

proseguir no sólo los estudios sobre viabilidad y temperatura, sino también tratar de comprender mejor los fenómenos de interacción con otros caracteres que forman parte de la eficacia biológica.

El presente trabajo trata del estudio de la interacción genotipo-temperatura utilizando cepas isogénicas de *D. melanogaster*, y pretende aprovechar las ventajas de este material para ejercer un mayor control sobre los genotipos estudiados.

MATERIAL Y METODOS

La población natural denominada Prat (Barcelona) constituye el material original del experimento. Dicha población procede de unas 60 hembras salvajes capturadas en dicha localidad durante el verano de 1963. A partir de esta fecha la población se ha mantenido a 17° C en caja de poblaciones de unos 5.000 individuos como mínimo.

Las cepas isogénicas 4V y 8III se obtuvieron mediante cruzamientos con la cepa de letales equilibrados J268, procedente del Department of Biology de Bowling Green State University de Ohio (USA). En ella se encuentran como genes marcadores w^a ; Cy/Pm; Sb/Ubx; spa^{pol} . Las cepas isogénicas obtenidas poseen un cromosoma Y perteneciente a la población natural Prat, debido a que dicho cromosoma se incorporó a los machos de la cepa J268 utilizados en el cruzamiento inicial.

Las cepas isogénicas se conservan a 17° C utilizando como método de seguridad el de cruzamiento entre hermanos. El método de cultivo empleado en el experimento es el normal de harina de maíz con agar y levadura viva. Las siembras se realizan en frascos de vidrio con un número de huevos por frasco igual a 150. Esta cifra no introduce, de acuerdo con nuestra experiencia anterior, efectos mayores de competencia.

Las pesadas se hacen al cabo de un número fijo de días a partir de la fecha de la siembra. Este plazo se elige de modo que hayan emergido prácticamente la mayoría de los adultos (un 90 %). El número de días resulta ser 11, 22 y 42 días para las temperaturas de 25°, 17° y 13° respectivamente.

Los caracteres estudiados son viabilidad total y peso individual.

Las pesadas se realizan con 10 individuos de cada sexo por réplica y tratamiento. Se han probado tres temperaturas y 4 genotipos distintos (dos isogénicos y dos híbridos), además de la población natural Prat que actúa como control.

RESULTADOS EXPERIMENTALES

Viabilidad.

En el cuadro I se han calculado las medias con sus errores del número de adultos emergidos.

CUADRO I.—*Viabilidad total en cepas isogénicas e híbridos de D. melanogaster.*

Genotipos	Temperatura		
	25° C	17° C	13° C
4 V	42,2 ± 6,3	39,2 ± 5,4	17,8 ± 3,5
8 III	29,9 ± 4,0	23,9 ± 4,6	0,7 ± 0,4
4 V × 8 III	48,5 ± 7,0	49,3 ± 7,6	39,7 ± 5,5
8 III × 4 V	35,1 ± 5,0	38,5 ± 4,2	20,2 ± 4,9
PRAT	57,5 ± 4,6	56,6 ± 7,6	47,0 ± 5,2

Los datos indican número de adultos (%).

Destacan en este cuadro los bajos valores de la cepa 8III, que a 13° C se muestra como casi letal. Al mismo tiempo se aprecia un claro efecto materno, unido a una dominancia de la cepa 4V creciente con la temperatura.

Si observamos la figura 1, vemos cómo existe una tendencia decreciente muy acentuada entre 17 °C y 13 °C. A pesar de que los híbridos presentan una pequeña tendencia creciente para 17 °C, los valores entre 25° y 17° no resultan significativos.

El análisis de la varianza para los datos transformados a arco seno $\sqrt{\text{viabilidad}}$ muestra que los valores de la interacción global son significativos (cuadro II). Si calculamos la interacción con los datos transformados, separando cepas isogénicas de híbridos (cuadro III), aparece un fenómeno de interacción significativo para las

primeras, mientras que los híbridos muestran un comportamiento aditivo.

VIABILIDAD TOTAL DE CEPAS ISOGENICAS E HIBRIDOS DE D.m.

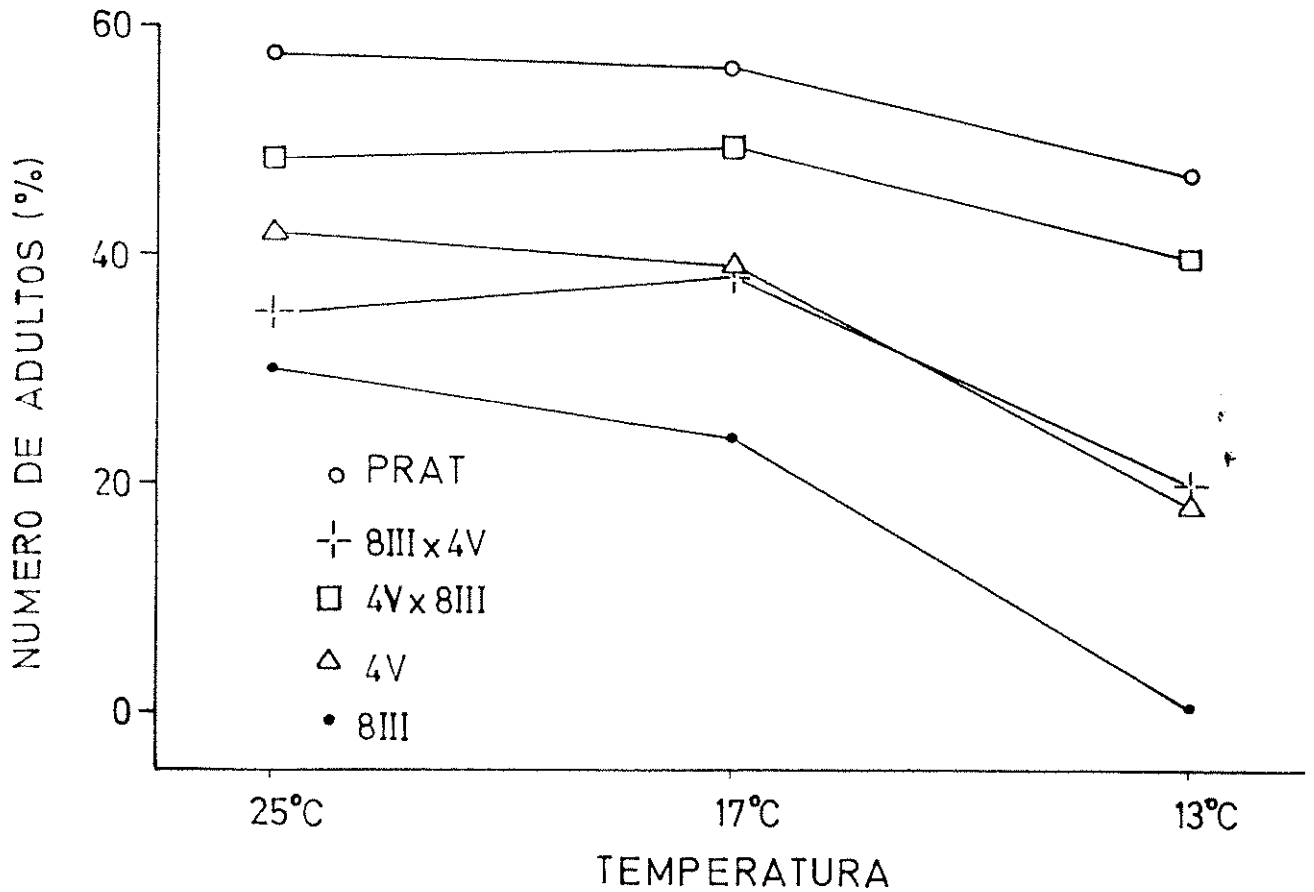


FIG. 1. Representación gráfica de los datos de viabilidad total a las tres temperaturas estudiadas.

Peso individual.

En el cuadro IV se dan los valores del peso individual con sus errores. Faltan los valores de la cepa 8III a 13° C debido a la baja viabilidad de la misma a esa temperatura, que ha impedido obtener un número suficiente de individuos adultos.

El comportamiento de las hembras (figura 2) muestra también una tendencia general decreciente con la temperatura. Sin embargo, los machos se comportan de forma diferente, mostrando un máximo a 17° C (figura 3).

CUADRO II.— *Análisis de la varianza para viabilidad total transformada.*

<i>Origen de variación</i>	<i>G. L.</i>	<i>S. C.</i>	<i>S. C. M.</i>	<i>F</i>
TRATAMIENTOS	11	19461,56	1769,23	17,17***
GENOTIPOS	3	8308,68	2769,56	26,88***
TEMPERATURAS	2	8756,56	4378,28	42,49***
INTERACCION	6	2396,31	399,38	3,87**
ERROR	121	12466,98	103,03	
TOTAL	143	40399,37		

*** $P < 0,001$ ** $P < 0,01$ CUADRO III.— *Análisis para viabilidad transformada en capas isogénicas.*

	<i>G. L.</i>	<i>S. C.</i>	<i>S. C. M.</i>	<i>F.</i>
TRATAMIENTOS	5	12653,25	2530,65	36,86***
GENOTIPOS	1	3315,66	3315,66	48,30***
TEMPERATURAS	2	8860,65	4430,32	65,54***
INTERACCION	2	476,94	238,47	3,47*
ERROR	55	3775,44	68,64	

Análisis para viabilidad transformada en híbridos.

		<i>S. C.</i>	<i>S. C. M.</i>	<i>F.</i>
TRATAMIENTOS	5	3523,06	704,61	6,35***
GENOTIPOS	1	1707,62	1707,62	15,39***
TEMPERATURAS	2	1513,81	756,90	6,82**
INTERACCION	2	301,62	150,81	1,35
ERROR	55	6100,14	110,91	

*** $P < 0,001$ ** $P < 0,01$ * $P < 0,05$

Para las temperaturas relativamente altas (17° y 25°) los genotipos isogénicos difieren de los híbridos más en hembras que en machos, siendo ambas diferencias significativas. Sin embargo, las diferencias entre ambas cepas isogénicas sólo resultan significativas en machos a esas temperaturas (cuadro V).

PESO DE CEPAS ISOGENICAS E HIBRIDOS DE D.m.

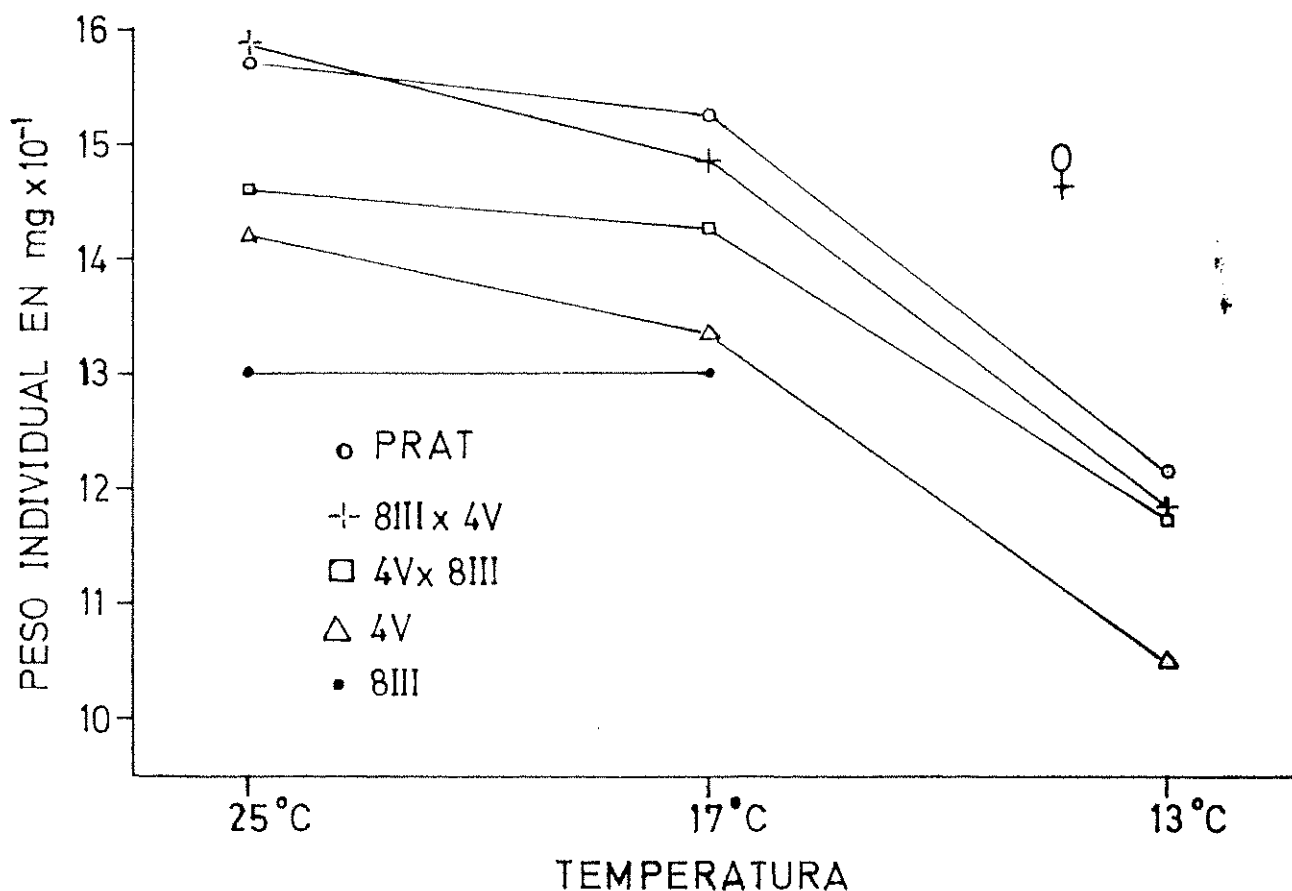


FIG. 2. Representación gráfica del peso individual en hembras a las tres temperaturas estudiadas.

Como es lógico esperar, las diferencias entre temperaturas sólo resultan significativas entre 13° y 17° C para hembras, mientras que para machos las temperaturas extremas son significativas respecto a la intermedia.

No hemos encontrado fenómenos de interacción a 25 y 17° C. A 13° C sólo hemos podido calcular los valores de la interacción global, sin contar con la cepa 8III, para la cual no tenemos datos

CUADRO IV. — Peso individual de cepas isogénicas e híbridos de *D. melanogaster* (Datos en $mg \times 10^{-2}$).

	25° C		17° C		13° C	
	♀	♂	♀	♂	♀	♂
4V	142,09 ± 5,85	87,47 ± 1,88	133,05 ± 4,78	96,66 ± 1,49	104,63 ± 3,02	85,39 ± 2,75
8III	130,66 ± 4,79	77,00 ± 1,87	130,18 ± 3,28	87,87 ± 1,68	—	—
4V × 8III	146,03 ± 6,52	88,98 ± 1,89	142,52 ± 5,42	97,14 ± 1,53	116,28 ± 1,81	90,13 ± 1,38
8III × 4V	158,66 ± 5,08	86,32 ± 2,38	148,76 ± 5,74	92,55 ± 1,92	118,46 ± 2,03	86,97 ± 1,62
PRAT	157,24 ± 6,66	91,34 ± 2,23	152,50 ± 9,54	99,06 ± 2,51	121,27 ± 2,11	90,86 ± 2,36

CUADRO V.—Análisis del peso individual a 17 y 25° C.

Origen de la varianza	17° C		25° C	
	G. L.	F.	G. L.	F.
TRATAMIENTOS	7	2,87*	7	11,26***
GENOTIPOS	3	5,81**	3	12,78***
4V vs 8III	1	1,50	1	30,49***
4V × 8III vs 8III × 4V	1	3,28	1	1,80
Isogénicas vs Híbridos	1	12,66***	1	6,05*
TEMPERATURA	1	1,08	1	40,22***
INTERACCION	3	0,52	3	0,10

* P < 0,05

** P < 0,01

*** P < 0,001

CUADRO VI.—Análisis del peso individual para hembras (4V + Híbridos).

Origen de la varianza	G. L.	S. C.	S. C. M.	F.
TRATAMIENTOS	8	532992,00	66624,00	3,09*
GENOTIPOS	2	79472,00	39736,00	1,84
TEMPERATURAS	2	384352,00	192176,00	8,92**
INTERACCION	4	69168,00	17292,00	0,80
ERROR	24	516497,81	21520,74	

* P < 0,05

** P < 0,01

PESO DE CEPAS ISOGENICAS E HIBRIDOS DE D.m.

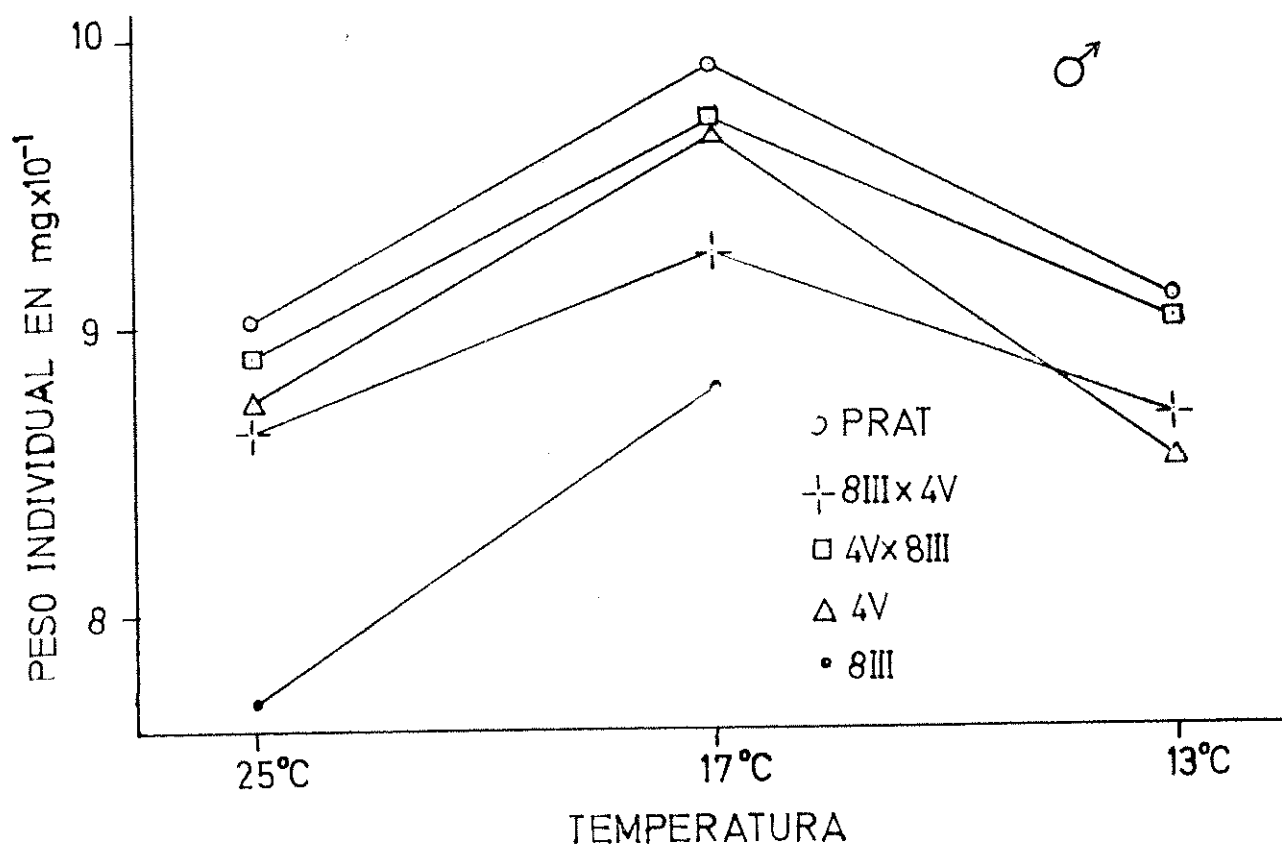


FIG. 3. Representación gráfica del peso individual en machos a las tres temperaturas estudiadas.

(cuadro VI). Dicha interacción no es significativa, aunque no podemos afirmar que no exista dentro de las cepas isogénicas, pues hubiera podido quedar tamponada.

COMENTARIOS

En general, los datos obtenidos detectan un comportamiento claro del material estudiado.

Viabilidad.

La forma del gráfico de viabilidad total sugiere que entre 17 y 13° C nos alejamos del óptimo. Si admitimos que éste se encuentra entre 25 y 17° C, obtenemos una curva teórica en forma de parábola. Esta curva estaría de acuerdo con lo encontrado por otros autores como David y Clavel (1966), para caracteres que como la mortalidad larvo-ninfal constituyen un componente fundamental de la viabilidad total estudiada.

El efecto materno no sólo indica una acción del genitor femenino sobre la viabilidad huevo-larva, sino también sobre la viabilidad larva-adulto, como PARSONS (*op. cit.*) pone de manifiesto.

Los valores de interacción encontrados resumen perfectamente el cuadro general de los resultados. La interacción es significativa para las cepas isogénicas, lo cual explica la existencia de factores no aditivos y deletéreos. Sin embargo, los híbridos presentan una homeostasis elevada. En otros trabajos (DOBZHANSKY and WALLACE, 1953; LERNER, 1954; LEWONTIN, R. C., 1956, y otros) se dan pruebas de este comportamiento para diversos caracteres y factores ambientales.

Los valores significativos que PARSONS encuentra para viabilidad larva-adulto difieren algo de los nuestros. En su caso la interacción en la F_1 resulta significativa, aunque algo menor que la encontrada en las cepas consanguíneas. Una explicación que nos parece lógica atribuiría esta diferencia al material utilizado.

Los híbridos de la F_1 de PARSONS proceden de poblaciones no emparentadas y cabe pensar que sus sistemas genéticos presenten poca coadaptación. Este se traduciría en efectos adversos por lo que se refiere a la homeostasis de sus híbridos. El carácter isogénico de nuestras cepas no sólo asegura una F_1 con un alto grado de heterocigosis, sino que además, por proceder de la misma población, la coadaptación de sus genomas es elevada. Por tanto, es lógico que no se presente interacción.

Peso individual.

Los comentarios sobre peso resultan más difíciles, sobre todo porque a menudo es complicado ver una relación estrecha entre caracteres de tipo morfológico y la eficacia biológica (LEWONTIN, 1956). En nuestro caso se encuentra un comportamiento distinto entre

hembras y machos, lo cual sugiere quizás un óptimo térmico distinto para cada sexo.

Por una parte, parece como si los genotipos masculinos, de menor tamaño, estuvieran afectados adversamente por temperaturas próximas a 25° C, con lo cual ésta resultaría ser un poco extrema para ellos. Por otro lado, el hecho de que existan diferencias significativas entre cepas isogénicas en machos, pero no en hembras (cuadro V) parece indicar un comportamiento homeostático diferente para ambos sexos.

La verdadera relación existente entre peso y temperatura sólo podrá estudiarse a fondo ejerciendo un control fino sobre factores que tienden a aumentar la variabilidad ambiental. Por eso sería deseable que para estos estudios se utilizasen medios de cultivo definido y estéril (SANG, 1956), lo mismo que se hace ya para el estudio de factores de crecimiento y nutrición (ROBERTSON y REEVE, diversos trabajos).

RESUMEN

Se demuestra que existe homeostasis para el carácter viabilidad. Esta homeostasis es importante en los heterocigotos y no lo es en las cepas isogénicas (homocigotos). Esto pone de manifiesto una vez más que sólo es válido hacer predicciones sobre este carácter en el caso de individuos con pequeños niveles de homocigosis. En individuos consanguíneos u homocigóticos la interacción puede ser lo suficientemente alta como para que los resultados sean muy depresivos e inesperados en ambientes térmicos para los cuales no están adaptados. Se discute además la posible curva térmica teórica y la situación del óptimo.

Por lo que respecta al peso individual se demuestra un comportamiento distinto para machos y hembras y se insinúan posibles causas de este comportamiento diferencial. Se observan también algunos factores depresivos para temperaturas extremas.

REFERENCIAS

- COOK, R. E.; C. W. HESS; J. L. CARMON and E. F. DEMBNICKI
1962 Importance of genotype-environment at various ages in broiler type chickens. *Poultry Sci.* **41**: 1.637.
- DAVID, M. JEAN et CLAVEL, Mlle. MARIE-FRANÇOISE
1966 Essai de définition d'une température optimale pour le développement de la *Drosophila*. *C. R. Acad. Sc. Paris*, t. 262 p. 2.159-2.162 (16 mai 1966).
- DOBZHANSKY, TH. and B. WALLACE
1953 The genetics of homeostasis in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* **39**: 162-171.
- HALE, R. W.
1961 Genotype-environment interactions in a comparison of the cage and semi-intensive systems for laying hens. *Brit. Poultry Sci.* **2**: 145-157.
- LERNER, I. M.,
1954 Genetic Homeostasis. Oliver and Boyd. Edinburgh.
- LEWONTIN, P. C.
1956 Studies on homeostasis and heterozygosity. *Am. Naturalist* **90**: 237-255.
- PARSONS, P. A.
1959 Genotypic-Environmental Interactions for Various Temperatures in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, Vol. 44 No. 6, Part. 3, November, 1959.
- ROBERTSON, F. W.
1959 Gene-Environment Interaction in Relation to the Nutrition and Growth of *Drosophila*. Biological Contributions, The University of Texas, Austin, Pub. No. 5.914.
- ROBERTSON, F. W. and REEVE E. C. R.
1952 Heterozygosity, Environmental Variation and Heterosis. *Nature*. Vol. 170, p. 296.
- SANG, J. H.
1956 The quantitative nutritional requirements of *Drosophila melanogaster*. *J. Expt. Biol.* **33**: 45-72.
- THODAY, J. M.
1953 Components of fitness. *Symposia Soc. Exptl. Biol.* **7**: 96-113.
- TINDELL, L. D.
1967 Genotype-Environment Interactions in Broiler Stocks of Chickens. *Poultry Sci.* Vol. XLVI, No. 3 May.

Linhas monogénicas de trigo na diferenciação de *Puccinia recondita* Rob. ex Desm.

por ALBERTO PALYART DO CARMO E FREITAS

(Estação Agronómica Nacional, Oeiras)

A B S T R A C T

DIFFERENTIATION OF *Puccinia RECONDITA* STRAINS BY MONOGENIC LINES OF WHEAT. — Data obtained with nine cultures of *P. recondita* showed the adequacy of ten monogenic lines of wheat as differentials. Virulence formulae were established concerning the resistance genes present in those lines. These formulae suggest to plant breeders which resistance genes are able to overcome the virulence genes present in the pathogenicity variants of the rust occurring at the time in a given area.

INTRODUÇÃO

A divergência de patogenicidade entre culturas de *Puccinia recondita* Rob. ex Desm. do trigo foi admitida por MELCHERS & PARKER (1920) nos seus ensaios, em Kansas, realizados entre 1914 e 1918. A susceptibilidade manifestada pelo trigo Malakof em relação a duas culturas, como excepção à resistência que patenteava a muitas outras, deu início à diferenciação em “formas biológicas” daquela ferrugem, quanto ao que foi designado por “capacidade de ataque” (MAINS & JACKSON, 1921). Desde então procuraram-se outras variedades de trigo capazes de agir como diferenciadoras. Aqueles mesmos autores (*Ibid.*, 1923) ensaiaram duzentas variedades e conseguiram distinguir doze variantes da ferrugem, pelas reacções observadas em sete dos trigos que actualmente constituem a série dife-

renciadora básica internacional. Ainda os mesmos investigadores apresentaram mais tarde, em 1926 (*Ibid.*, 1926) a descrição de tipos de infecção correspondentes às reacções, bem como uma chave de classificação, baseada nas reacções em seis trigos diferenciadores. Foram caracterizadas, deste modo, doze variantes de *P. recondita* designadas então como “formas fisiológicas”.

O magistral trabalho de JOHNSTON & MAINS (1932) estabelece, na base das reacções, obtidas em oito trigos diferenciadores, uma chave analítica de identificação e uma tabela de reacções que diferenciavam 53 variantes patogénicas de *P. recondita*, designadas ainda por “formas fisiológicas”. Novos trabalhos foram aumentando sucessivamente o número de variantes caracterizadas a ponto de, na sétima revisão do registo internacional de raças fisiológicas de *P. recondita* f. sp. *tritici* (JOHNSTON & BROWDER, 1966), se encontrarem descritas 228 raças fisiológicas. A ideia de estabelecer um critério único que permitisse, internacionalmente, uniformidade na descrição das variantes patogénicas desta ferrugem, tornava necessário o uso universal de uma única série de trigos diferenciadores. Por várias razões, entre as quais as de primazia, da soma de trabalho envolvida e da possibilidade que manifestava na caracterização de diferenças de patogenicidade, foi mantida a série de JOHNSTON & MAINS como básica de conceito de raças fisiológicas.

A posterior observação de que diversas culturas, consideradas idênticas quando diferenciadas na série padrão, manifestavam diferenças de patogenicidade, caracterizáveis noutras cultivares de trigo, originou o conceito de subraças ou biótipos. Este facto demonstrou a impossibilidade de caracterização dos diversos genótipos de ferrugem, condicionantes da patogenicidade, através daquele grupo restrito de oito cultivares de trigo.

Tendo-se verificado a existência de numerosas variantes génicas em diferentes raças fisiológicas, foram seleccionados mais tarde outros trigos, considerados diferenciadores adicionais, com a pretensão de estabelecer, através das reacções neles obtidas, novas raças complementares das definidas na série básica internacional. Sob este aspecto tomou vulto, em especial, o sistema preconizado pelo “Committee of North American Wheat Leaf Rust Research Workers” (1959) que também estabeleceu uma nomenclatura própria para as novas raças de *P. recondita*. Na designação destas raças foi estabe-

lecido indicar os números referenciadores das raças determinadas na série básica e na série suplementar, assim como a especificação, pelas iniciais "NA", de se referirem a diferenciadores seleccionados para as raças de América de Norte. Uma vez que foi admitida a possibilidade de alteração futura no conjunto dos diferenciadores suplementares, deveriam ser incluídos na designação desta raças os dois últimos algarismos do ano para o qual aqueles diferenciadores foram eleitos. De facto novo grupo de diferenciadores suplementares, considerado mais valioso, foi designado para 1961 (Committee of North American Wheat Leaf Rust Research Workers, 1961). Em 1965 nova alteração se verificou (YOUNG & BROWDER, 1965). Esta última série ficou constituída por cinco variedades ('Dular' 13 373, 'Lee' 12 448, 'Waban' 12 992, 'Sinvalochó' 12 595 e 'Exchange' 12 635) e resultou da troca de 'Westar' 12 110 dos diferenciadores NA61 por 'Dular' 13 373 e 'Exchange' 12 635.

Toda a tentativa de caracterização mais pormenorizada das variantes da ferrugem é vantajosa, por corresponder a maior informação sobre as suas características. Todavia do ponto de vista internacional, o valor comparativo das descrições das raças padrão, de sub-raças, ou de raças definidas também por diferenciadores suplementares, tem-se mostrado cada vez mais restrito, principalmente porque as populações de ferrugem se podem apresentar genéticamente distintas em diversas regiões. Para Portugal, por exemplo (FREITAS, 1968 a), concluiu-se que os diferenciadores suplementares seleccionados para a América do Norte não satisfaziam para a caracterização das variantes patogénicas existentes nas culterras de *P. recondita* isoladas; tendo-se verificado que outras cultivares se manifestavam como mais apropriadas para a sua diferenciação.

O número de diferenciadores suplementares, na base de trigos genéticamente desconhecidos quanto à resistência, mas capazes de distinguir as variantes patogénicas isoladas da ferrugem, irá, deste modo, aumentando cada vez mais e, se bem que possa originar informação copiosa, ela será desordenada e portanto ineficiente para permitir uma linguagem comum entre os fitopatologistas de regiões diferentes bem como um franco progresso no estudo do sistema parasitário *P. recondita* : *Triticum*.

A pretensão de caracterizar genes responsáveis pela resistência dos trigos às ferrugens tomou grande desenvolvimento com o apa-

recimento da teoria de gene-para-gene, estabelecida por FLOR (1955) como resultado dos seus trabalhos (FLOR, 1940, 1941, 1942, 1946 e outros) no sistema parasitário *Linum usitatissimum* : *Melampsora lini*.

A interacção genética estabelecida naquela teoria relativa a hospedeiro e parasita tem permitido caracterizar genes de virulência na ferrugem através de genes de resistência, bem definidos, presentes nos genómos de trigos. Na base de um esquema eficiente deste tipo encontra-se o estabelecimento de uma série completa de trigos monogénicos para a resistência, que tem sido objecto de atenção e de trabalho de vários investigadores.

Aquele processo afigura-se eficaz não só no que se refere à descrição das variantes patogénicas da ferrugem mas também na sua nomenclatura, pelas indicações que implicitamente as próprias designações podem conter.

Uma vez conseguida uma caracterização deste tipo, parece viável admitir a possibilidade de controlar o sentido de variação da virulência deste parasita, através de condicionamento do sentido da pressão de selecção exercida pelos genes de resistência das linhas de trigo usadas em cultura (FREITAS, 1968 *b*). É admissível que um tal esquema permita a possibilidade de fechar um ciclo dos genes de resistência utilizados e, por consequência, muito provavelmente restringir a relativamente poucos, os genes necessários ao controle da ferrugem.

MATERIAL E MÉTODOS

No presente trabalho usaram-se dez linhas de trigo, consideradas monogénicas quanto à resistência à *Puccinia recondita*, amavelmente cedidas pelo Dr. SAMBORSKI. Salvo apenas uma excepção, aquelas linhas possuem o progenitor comum 'Thatcher' tomado como recorrente. A excepção apontada refere-se ao trigo 'Prelude' que agiu como recorrente na obtenção da linha 'Prelude'⁶ × 'Loros'.

Segundo DYCK & SAMBORSKI (1968), SAMBORSKI & DYCK (1968), SOLIMAN *et al.* (1964) e ainda SAMBORSKI, por informação pessoal, os genes de resistência contidos nas diversas linhas monogénicas de

trigo a que nos referimos são representados pelas seguintes designações:

- 'Thatcher' ⁶ × 'Webster' — Lr 2
- 'Prelude' ⁶ × 'Loros' — Lr 2¹ (gene alelomórfico no locus Lr 2)
- 'Thatcher' ⁶ × 'Democrat' — Lr 3
- 'Thatcher' ⁶ × 'Centenario' — Lr 1
- 'Thatcher' ⁶ × 'Exchange' (1) — Lr. 10
- 'Thatcher' ⁶ × 'Exchange' (2) — Lr 16
- 'Klein Lucero' × 'Thatcher' ⁶ — Lr 17
- 'Thatcher' ⁷ × 'Africa 43' — Lr 18

Os genes de resistência existentes nas linhas monogénicas 'Thatcher' ⁶ × 'Maria Escobar' e 'Thatcher' ⁶ × 'Aniversario' não possuem ainda símbolos definitivos, sendo por essa razão designados provisoriamente, neste trabalho, por Lr X e Lr Y respectivamente.

As culturas de *P. recondita* utilizadas neste estudo fazem parte da colecção de variantes patogénicas isoladas em Portugal, estabelecidas a partir de esporo-único. A identificação das raças realizou-se na série de JOHNSTON & MAINS (1932) e a caracterização em subraças foi estabelecida nos diferenciadores adicionais seleccionados em Portugal: 'Tremés Rijo 854, 'Xérès' 1165 e 'Ardito' 61 534 (FREITAS, 1968 b).

As inoculações foram realizadas na primeira folha das plantas jovens. Após 24 h de incubação em câmara-húmida transferiram-se os vasos com as plantas para a bancada da estufa onde se mantiveram nove a dez dias até à observação das reacções. Os ensaios decorreram a temperaturas cujos limites se mantiveram entre 25°C de dia e 15°C de noite. Na classificação das reacções usaram-se os tipos descritos por STAKMAN *et al.* (1962).

OBSERVAÇÕES E CONCLUSÕES

O Quadro I mostra as reacções obtidas nas diversas linhas de trigo, monogénicas quanto à resistência à *P. recondita*, quando inoculadas com nove culturas diferentes, cujas designações se referem à nomenclatura de raças fisiológicas identificadas na série padrão de

JOHNSTON e MAINS e à subraças estabelecidas nos trigos adicionais já indicados.

Aquelas linhas de trigo permitiram uma diferenciação satisfatória das diversas culturas de *P. recondita* estudadas. Para aquele conjunto de culturas nem todas aquelas linhas monogénicas seriam necessárias à sua diferenciação. Os trigos portadores dos genes Lr 2, Lr 2¹, Lr 3, Lr 10, Lr 18 e Lr Y, por exemplo, bastariam para conseguir aquela distinção.

QUADRO I.— *Reacções em linhas monogénicas de trigo*
Reactions of monogenic lines of wheat

Linhas monogénicas <i>Monogenic lines</i>		Raças e subraças <i>Races and subraces</i>								
Designações <i>Designations</i>	Genes de resistência <i>Resistance Genes</i>	1 A,	1 C,	11 A,	15,	20,	58 A,	58 B,	58 C,	68
Tc.6 × Centenario	Lr 1	0	0	0	0	4	0	0	0	0
Tc.7 × Webster	Lr 2	0	0	2-	0	4	0	1	1	4
Prel.6 × Loros	Lr 2 ¹	2-	1+	4	1-	4	4	4	4	4
Tc.6 × Democrat	Lr 3	0	0	1	4	1	4	3	4	2-
Tc.6 × Exchange (1)	Lr 10	1-	2+	3	4	2+	4	4	2+	4
Tc.6 × Exchange (2)	Lr 16	1-	2-	2	2+	2	2-	1	2	2-
Klein Lucero × Tc.6	Lr 17	0	0	0	1	3	1-	0	0	1-
Tc.7 × Africa 43	Lr 18	1-	X	4	4	4	4	3	3	4
Tc.6 × M. ^a Escobar	Lr X	0	X	4	4	4	3	3	3	4
Tc.6 × Aniversario	Lr Y	1-	0	2+	1-	1-	1	3	1+	2-

Examinando o Quadro I observa-se que alguns dos genes existentes naqueles trigos não tiveram oportunidade de manifestar a sua capacidade diferenciadora. Estão neste caso os genes Lr 1 e Lr 17 cujos trigos que os contêm apresentaram reacções muito semelhantes em relação a cada uma das culturas estudadas. Além destes, também os trigos que transportam os genes Lr X e Lr 18 se apresentaram com comportamento semelhante, perante cada uma daquelas culturas.

Admitindo, segundo a teoria de gene-para-gene (FLOR, 1955), que para cada gene de resistência do hospedeiro existe um gene de virulência específico, no parasita, que torna inefectivo o correspondente gene de resistência, as reacções de susceptibilidade nas linhas

monogénicas de trigo indicarão a existência dos correspondentes genes de virulência na ferrugem. Deste modo as variantes génicas para a virulência poderão ser caracterizadas pela indicação do conjunto dos genes de resistência que se mostrarem inefectivos perante cada uma das culturas.

No Quadro II figuram as fórmulas de virulência para as culturas em estudo, relativas aos dez genes de resistência disponíveis para este trabalho em trigos monogénicos.

A possibilidade de diferenciação destas culturas, pelas reacções daqueles trigos, originou como consequência verificar-se distinção entre as respectivas fórmulas de virulência.

QUADRO II. — *Fórmulas de virulência de variantes patogénicas de Puccinia recondita*

Virulence formulae of pathogenic strains of *Puccinia recondita*

Raças e subraças <i>Races and subraces</i>	Fórmulas de Virulência (1) <i>Virulence formulae</i>
1 A	Prt: —
1 C	Prt: 18, X
11 A	Prt: 2 ⁴ , 10, 18, X
15	Prt: 3, 10, 18, X
20	Prt: 1, 2, 2 ⁴ , 17, 18, X
58 A	Prt: 2 ⁴ , 3, 10, 18, X
58 B	Prt: 2 ⁴ , 3, 10, 18, X, Y
58 C	Prt: 2 ⁴ , 3, 18, X
68	Prt: 2, 2 ⁴ , 10, 18, X

(1) Referente aos genes de resistência:

Concerning the resistance genes: Lr 1, Lr 2, Lr 2⁴, Lr 3, Lr 10, Lr 16
Lr 17, Lr 18, Lr X e Lr Y

A subraça 1A não manifestou possuir quaisquer genes de virulência correspondentes aos genes de resistência transportados pelos trigos monogénicos referidos. Nas outras raças e subraças determinaram-se diversos conjuntos de genes de virulência, variáveis qualitativa e também, dum modo geral, quantitativamente. Entre todas as culturas analisadas destacaram-se, pelo número de genes, as designadas por 20 e 58B que manifestaram, cada uma, a presença de seis genes de virulência.

PERSON (1959) no seu esquema das relações de gene-para-gene

analisou a interacção dos sistemas parasita: hospedeiro e mostrou ser o uso de linhas monogénicas do hospedeiro o processo ideal para a caracterização das variantes patogénicas do parasita, tal como FLOR (1954) já tinha sugerido para o sistema parasitário *Linum usitatissimum* : *Melampsora Lini*. Nesta ordem de ideias, a selecção de trigos com características de resistência, a obtenção de linhas monogénicas do hospedeiro e a caracterização desses genes têm merecido a melhor atenção de quantos se preocupam directa ou indirectamente, no campo da Genética, no da Fitopatologia e no do Melhoramento com o combate às ferrugens do trigo.

As fórmulas de virulência das variantes patogénicas de uma dada ferrugem, presentes em determinada região e em certa ocasião, fornecem por si só ao melhorador a indicação dos genes de resistência que o espectro genético da virulência daquelas variantes pode tornar inefectivo. Consequentemente, aquelas fórmulas sugerem como valiosos, na obtenção de trigos resistentes, os genes de resistência ensaiados que não se encontrem representados nas descrições daquelas variantes patogénicas.

A eficiência do método e a facilidade de escolha de genes de resistência eficazes em melhoramento serão tanto maiores quanto mais larga for a gama de genes de resistência disponíveis.

RESUMO

Nos sistemas parasitários, em que seja aplicável a teoria de FLOR, admite-se que o método mais prometedor, para a diferenciação de variantes patogénicas dos parasitas, consiste na caracterização dos genes de virulência, através das reacções em linhas monogénicas para a resistência do hospedeiro.

Observou-se eficácia no uso de dez linhas de trigo, monogénicas para a resistência, na diferenciação de nove culturas de *Puccinia recondita*. Estabeleceram-se ainda fórmulas de virulência daquelas variantes patogénicas da ferrugem castanha do trigo em relação aos genes de resistência contidos nas linhas monogénicas mencionadas.

Refere-se o facto das fórmulas de virulência poderem sugerir aos melhoradores quais os genes de resistência valiosos na obtenção de trigos capazes de tornar inefectivos os genes de virulência nelas designados.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

COMMITTEE NORTH AMERICAN WHEAT LEAF RUST RESEARCH WORKERS

- 1959 A proposed modification of the system of wheat leaf rust race identification and nomenclature. *Pl. Dis. Repr.* **43**: 613-615.
- 1961 The north american 1961 set of supplemental differential wheat varieties for leaf rust race identification. *Pl. Dis. Repr.* **45**: 444-446.

DYCK, P. L. & SAMBORSKI, D. J.

- 1968 Genetics of resistance to leaf rust in the common wheat varieties Webster, Loros, Brevit Carina, Malakof and Centenario. *Can. J. Genet. Cytol.* **10**: 7-17.

FLOR, H. H.

- 1940 New physiologic races on flax rust. *J. agric. Res.* **60**: 575-591.
- 1941 Inheritance of rust reaction in a cross between the flax varieties Buda and J. W. S. *J. agric. Res.* **63**: 369-388.
- 1942 Inheritance of pathogenicity in *Melampsora lini*. *Phytopathology* **32**: 653-669.
- 1946 Genetics of pathogenicity in *Melampsora lini*. *J. agric. Res.* **73**: 335-357.
- 1954 Identification of races of flax rust by lines with single rust-conditioning genes. *Tech. Bull. U. S. Dep. Agric.* **1087**: 1-25.
- 1955 Host-parasite interaction in flax rust. Its genetics and other implications. *Phytopathology* **45**: 680-685.

FREITAS, A. P. CARMO e

- 1968a *Supplemental varieties for wheat leaf rust differentiation in Portugal*. Apresentado à Conf. Intern. Fer. Cer., 5-14 Agosto, Oeiras (Dactil.).
- 1968b *On the control of wheat rusts*. Apresentado à Conf. Inte. Fer. Cer., 5-14 Agosto, Oeiras (Dactil.).

JOHNSTON, C. O. & BROWDER, L. E.

- 1966 Seventh revision of the international register of physiologic races of *Puccinia recondita* f. sp. *tritici*. *Pl. Dis. Repr.* **50**: 756-760.

— & MAINS E. B.

- 1932 Studies on physiologic specialization in *Puccinia triticina*. *Tech. Bull. U. S. Dep. Agric.* **313**: 22 pp.

MAINS, E. B. & JACKSON, H. S.

- 1921 Two strains of *Puccinia triticina* on wheat in the United States. (In Abstracts of papers presented at the twelfth annual meeting of the American Phytopathological Society, Chicago. Decembre 28-31, 1920) *Phytopathology* **11**: 40.
- 1923 Strains of leaf rust of wheat, *Puccinia triticina*, in United States. (In Abstracts of papers presented at the fourteenth annual meeting of American Phytopathological Society, Boston. December 27-30, 1922) *Phytopathology* **13**: 36 (1923).
- 1926 Physiologic specialization in the leaf rusts of wheat, *Puccinia triticina* Erikss. *Phytopathology* **16**: 89-120.

MELCHERS, L. E. & PARKER, J. H.

- 1920 Three winter wheat varieties resistant to leaf rust in Kansas. *Phytopathology* **10**: 164-171.

PERSON, C.

- 1959 Gene-for-gene relationship in host : parasite systems. *Can. J. Bot.* **37**: 1101-1130.

SAMBORSKI, D. J. & DICK, P. L.

- 1968 Inheritance of virulence in wheat leaf rust on the standard differential wheat varieties. *Can. J. Genet. Cytol.* **10**: 24-32.

SOLIMAN, A. S., HEYNE, E. G. & JOHNSTON, C. O.

1964 Genetic analysis for leaf rust resistance in the eight differential varieties of wheat.
Crop. Sci. 4: 246-248.

STAKMAN, E. C.; STEWART, D. M. & LOEGERING, W. Q.

1962 *Identification of physiologic races of Puccinia graminis var. tritici.* *Scient. J. Ser., Minn. Agric. Exp. Stn, Pap.* 4691.

YOUNG, H. C. Jr. & BROWDER, L. E.

1965 The north american 1965 set of supplemental differential wheat varieties for identification of races of *Puccinia recondita tritici.* *Pl. Dis. Reprt.* 49: 308-311.

Síntesis de proteínas y relaciones citogenéticas en el grupo *Aegilops-triticum*

por FRANCISCO GARCIA OLMEDO

Sección de Química y Tecnología de los Cereales, Centro de Cerealicultura,
Instituto Nacional de Investigaciones Agronómicas, Madrid.

A B S T R A C T

Kernel proteins from *Aegilops-Triticum* species were extracted and fractionated by a simplified procedure. Diploid species relationships as established by this method are parallel to a great extent to those established by cytogenetical methods. Protein distributions of *Aegilops* allopolyploids are reconstructed by mixture of the diploid parental species. *Triticum* tetraploids are not satisfactorily reconstructed this way, a fact which is consistent with the uncertainty of the *B* genome origin.

I N T R O D U C C I O N

Las especies comprendidas en los géneros *Aegilops* y *Triticum* constituyen uno de los grupos mejor caracterizados desde un punto de vista citogenético. Los estudios cariomorfológicos de SENJANINOVA-KOROZAGINA (1) y CHENNAVEERAI AH (2) y, sobre todo, el análisis genómico realizada por KIHARA y su escuela por el método llamado de los analizadores (3), han permitido establecer la constitución genómica de los aloplopoloides y las relaciones citogenéticas entre los genomios básicos del mencionado grupo. Estas especies constituyen, por tanto, un material muy adecuado para estudiar hasta qué punto los métodos bioquímicos pueden duplicar o complementar los resultados obtenidos por métodos citogenéticos. Por otra parte, una caracterización bioquímica detallada permitiría eventualmente establecer secuencias evolutivas sobre la base de las relaciones genómicas ya establecidas.

En el presente trabajo hemos estudiado por un método simplificado, susceptible de ser aplicado a pequeñas muestras, las distribuciones electroforéticas de las proteínas del grano de las diez

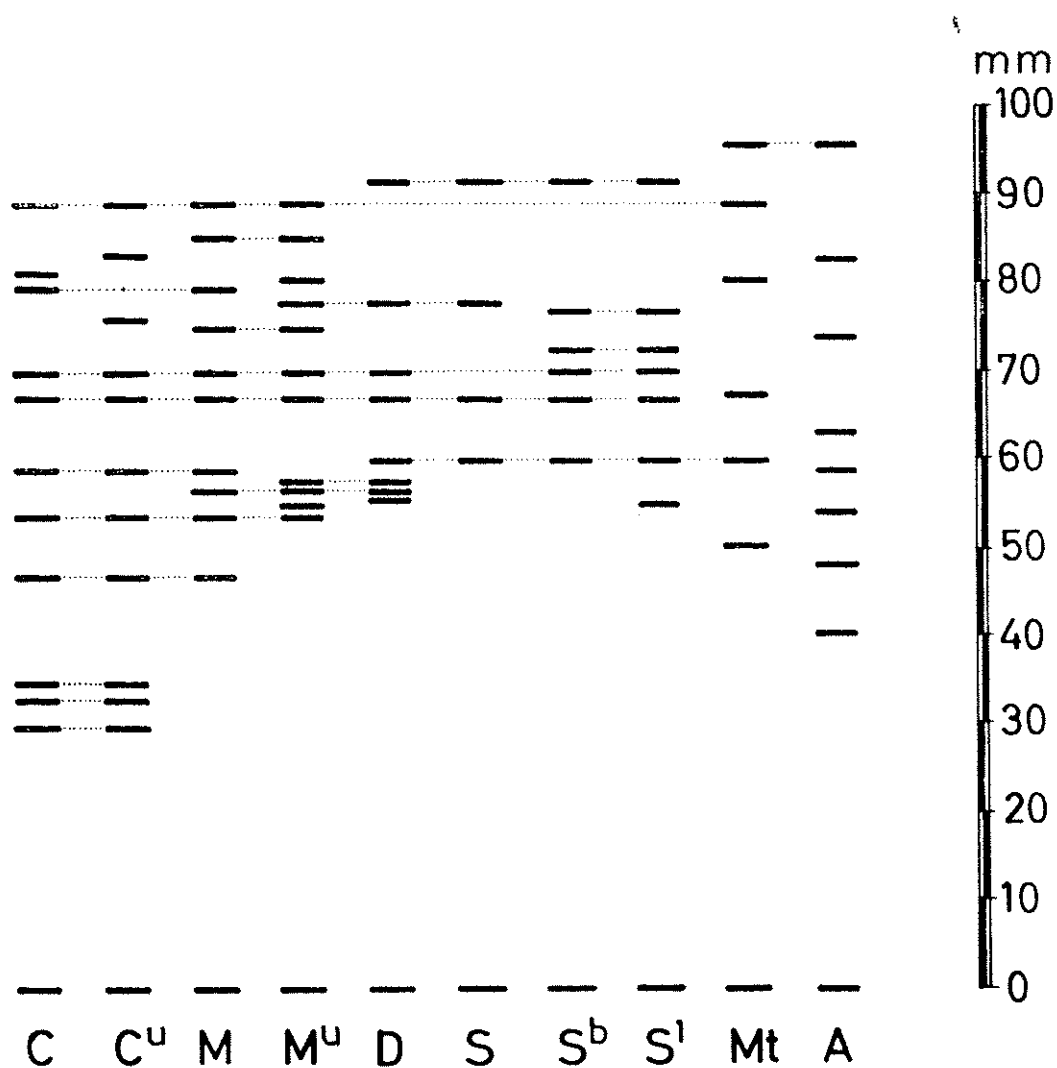


FIG. 1. Esquema de las distribuciones de proteínas del grano de las especies diploides *Ae. caudata* (C), *Ae. umbellulata* (C^u), *Ae. comosa* (M), *Ae. uniaristata* (M^u), *Ae. squarrosa* (D), *Ae. speltoides* (S), *Ae. bicornis* (S^b), *Ae. longuissima* (S^l), *Ae. mutica* (M_l) y *T. monococcum* (A).

especies diploides con genomios diferenciados (4) y de los alopolioides naturales derivados de ellas.

MATERIAL Y METODOS

Muestras

Se obtuvo manualmente semilla (1 gr.) de cada una de las siguientes especies:

<i>Especies</i>	<i>Tipo de Genomio</i>
<i>Ae. speltoides</i>	S
<i>Ae. longuissima</i>	Sl
<i>Ae. bicornis</i>	Sb
<i>Ae. squarrosa</i>	D
<i>Ae. comosa</i>	M
<i>Ae. uniaristata</i>	M ^u
<i>Ae. mutica</i> (*)	M _t
<i>Ae. caudata</i>	C
<i>Ae. umbellulata</i>	C ^u
<i>T. monococcum</i>	A
<i>Ae. crassa</i>	DM ^{er}
<i>Ae. ventricosa</i>	DM ^v
<i>Ae. cylindrica</i>	DC
<i>Ae. juvenalis</i>	DCcMj
<i>Ae. columnaris</i>	C ^u M ^c
<i>Ae. biuncialis</i>	C ^u M ^b
<i>Ae. triaristata</i>	C ^u M ^{tr}
<i>Ae. ovata</i>	C ^u M ^o
<i>Ae. variabilis</i>	C ^u S ^v
<i>Ae. triuncialis</i>	C ^u C
<i>T. durum</i>	AB
<i>T. polonicum</i>	AB
<i>T. carthlicum</i>	AB
<i>T. timopheevi</i>	AB'
<i>T. aestivum</i>	ABD

(*) De esta muestra sólo dispusimos de 50 mg. Las muestras se molturaron en un molino Culatti.

Extracción y electrofóresis de las proteínas

Muestras de 50 mg. se maceraron durante 21 horas a 4° C con 125 microlitros de Urea 2M o con 75 microlitros de agua. Los extractos así obtenidos fueron fraccionados directamente por electroforesis sobre gel de almidón. La inserción se verificó mediante cuadrados de papel Whatman n.º 3 (3 mm. × 10 mm.) previamente embebidos en los extractos. Los geles se prepararon con Urea 3M, tampón lactato de aluminio, pH 3,2, fuerza iónica 0,1 y almidón (Conaught Medical Res. Lab.) al 10 %. Se aplicó una caída de potencial de 15 voltios/cm. durante 3 horas. La tinción se verificó con nigrosina (0,5 % en ácido acético : agua 1 : 1 v/v) durante 12 horas y se destiñó con etanol al 70 % durante 6 horas. Las determinaciones densitométricas se hicieron con un Cromoscan (JOYCE & LOEBL).

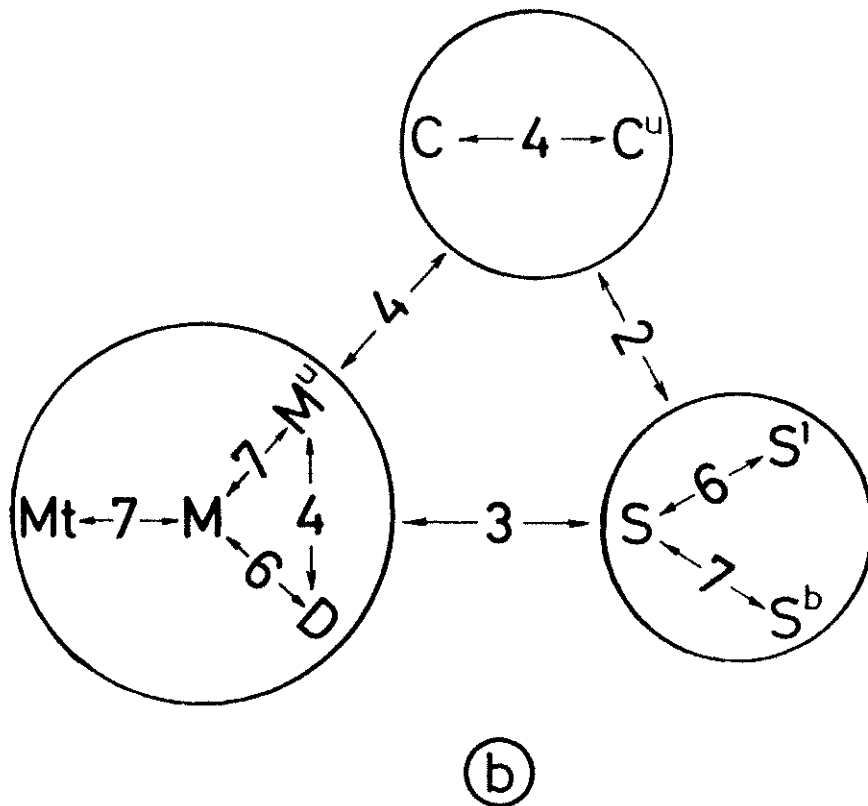
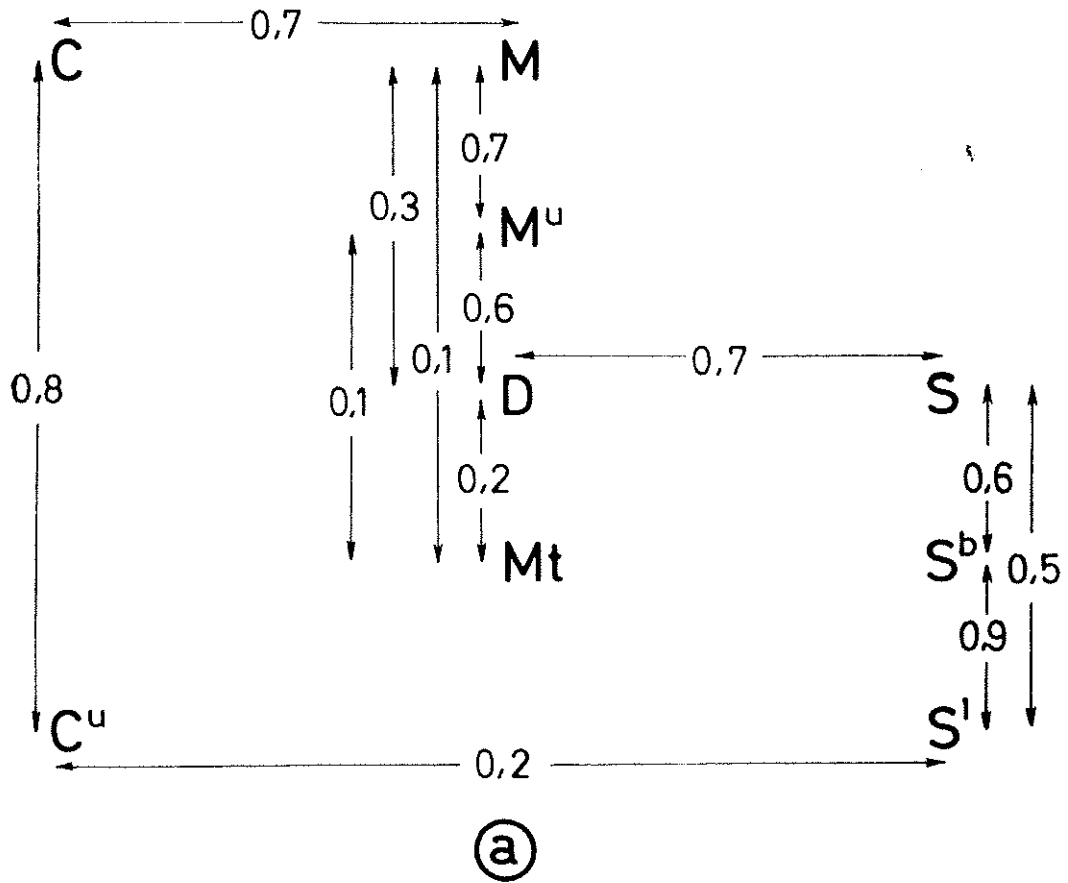


FIG. 2. a) Relaciones deducidas de la fig. 1 entre las especies diploides del grupo *Aegilops-Triticum*. b) Relaciones entre las mismas especies basadas en la afinidad cromosómica (número modal de bivalentes) según Kihara.

RESULTADOS Y DISCUSION

Sobre el método

La interpretación de los resultados que expondremos a continuación requiere tener presentes una serie de hechos relativos al método empleado en nuestro estudio:

a) A igualdad de condiciones las proteínas homólogas serán igualmente solubilizadas. Las extracciones realizadas no son cuantitativas, pero sí reproducibles en cuanto al número y proporción relativa de los componentes detectados.

b) Al efectuarse la electroforesis directamente con el extracto se evitan posibles modificaciones de la proteína durante las manipulaciones posteriores. Las proteínas extraídas por el agua en nuestras condiciones son igualmente extraídas por urea 2M, que extrae además otras proteínas con movilidad electroforética correspondiente a las gliadinas, que no han sido consideradas en nuestro estudio por no ser claramente resueltas.

c) Por extraer las proteínas de la totalidad del grano, hemos de interpretar con cautela las relaciones cuantitativas entre componentes, ya que vendrán afectadas por variaciones de la relación endospermo/cubiertas/germen en las distintas especies.

d) La movilidad electroforética es sólo una propiedad de las proteínas, pudiendo presentar la misma movilidad más de un componente. Las proteínas con igual movilidad serán consideradas como potencialmente homólogas y las de distinta movilidad como no homólogas.

Especies diploides

Entre las especies diploides de *Aegilops* y *Triticum* existen diez con genomios diferenciados, de los que sólo uno pertenece a *Triticum* y el resto a *Aegilops* (4). Las relaciones citogenéticas entre estos genomios han sido establecidas por KIHARA (3) basándose principalmente en la afinidad cromosómica (número modal de bivalentes) y, en menor grado, en la fertilidad de los híbridos interespecíficos. Según estos criterios, los nueve genomios de *Aegilops* pueden clasificarse en tres grupos.

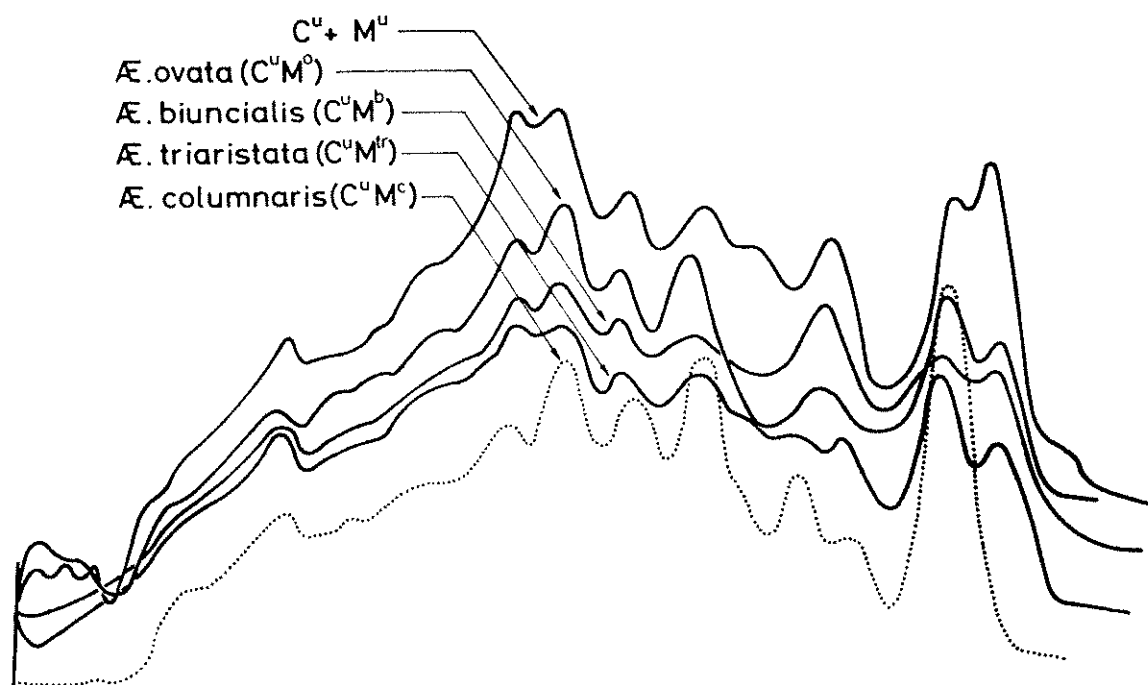


FIG. 3. Comparación de los densitogramas de las especies del grupo CM con el testigo $Cu + Mu$. En esta figura y siguientes el punto de inserción y el electrodo positivo están a la izquierda.

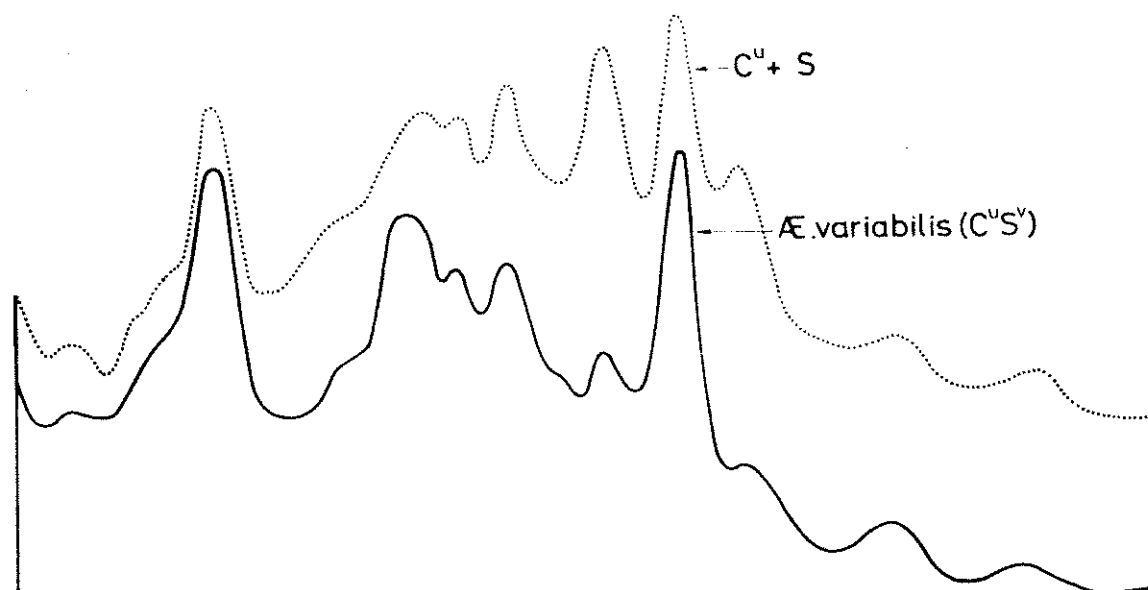


FIG. 4. Comparación del densitograma de la especie *Ae. variabilis* con el testigo $Cu + S$.

- | | | |
|-------------|---|--|
| 1. Grupo C: | <i>Ae. caudata</i> (C), | <i>Ae. umbellulata</i> (C ^u) |
| 2. Grupo M: | <i>Ae. comosa</i> (M), | <i>Ae. uniaristata</i> (M ^u) |
| | <i>Ae. squarrosa</i> (D), | <i>Ae. mutica</i> (M _i) |
| 3. Grupo S: | <i>Ae. speltooides</i> (S), | <i>Ae. bicornis</i> (S ^b) |
| | <i>Ae. longissima</i> (S ^l) | |

En la figura 1 hemos simbolizado las distribuciones electroforéticas de las proteínas del grano de estas especies atendiendo exclusivamente a su movilidad relativa. Para expresar en forma aproximada el grado de homología entre dos distribuciones dadas hemos empleado el cociente entre el número de componentes potencialmente homólogos y el número total de componentes detectados.

Los resultados obtenidos por este método se comparan con los obtenidos por KIHARA (3) en la figura 2. La concordancia entre ambos esquemas es considerable. El grupo *M* resulta prácticamente equidistante entre el *C* y el *S*, siendo bajo el grado de homología entre estos dos últimos grupos. Dentro de cada grupo existen relaciones bien definidas entre genomios que, en general, son similares en los dos esquemas. Sin embargo, existen algunas discrepancias entre las que merece resaltarse la escasa homología entre la distribución del genomio *M_i* y las de los genomios *M*, *M^u* y *D*, que no es la que cabría esperar de la gran afinidad cromosómica entre *M_i* y *M*. Los genomios *C* y *C^u* resultan más próximos entre sí en nuestro esquema que en el de KIHARA, pero es de señalar que, según el mismo investigador, el alopoloide de constitución genómica *C C C^u C^u* es prácticamente un autotetraploide. En el grupo *S* existen un mayor grado de homología entre los genomios *S^l* y *S^b* que entre *S* y cualquiera de estos dos.

Entre los grupos *M* y *C*, el punto de contacto está representado por *Ae. comosa* (*M*) y *Ae. caudata* (*C*). Entre los grupos *M* y *S*, el par *Ae. squarrosa* (*D*) y *Ae. speltooides* (*S*) presenta el mayor grado de homología.

Aunque en nuestro esquema no se han tenido en cuenta las relaciones cuantitativas entre componentes, debe mencionarse que éstas refuerzan en general las conclusiones basadas en la movilidad electroforética.

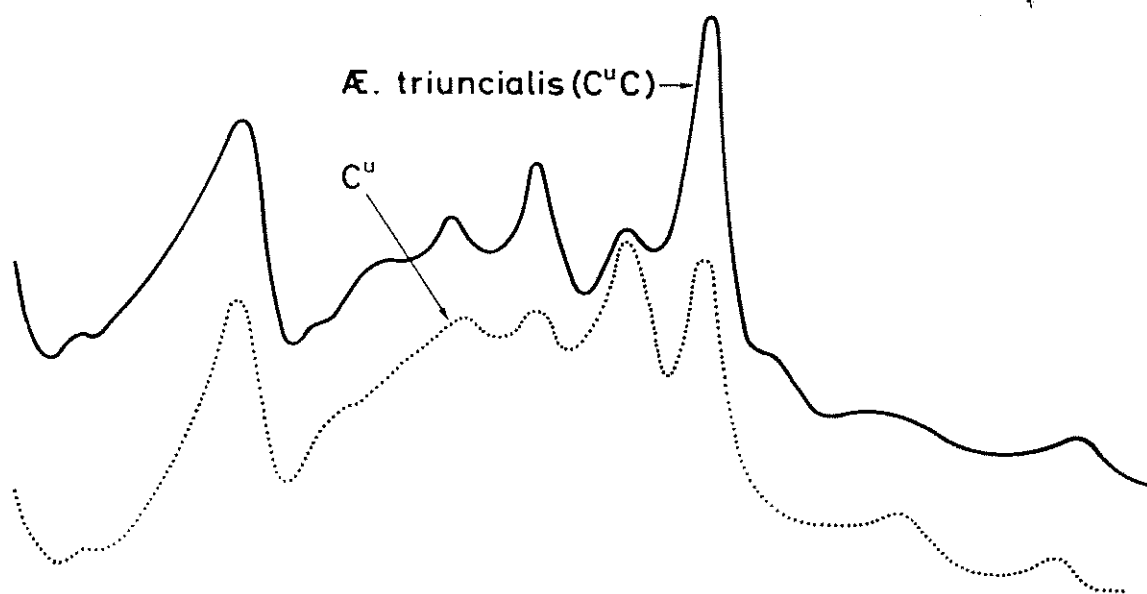


FIG. 5. Comparación de *Ae. triuncialis* ($C^u C$) con *Ae. umbellulata* (C^u).

Especies aloploides

En el estudio de los aloploides naturales de *Aegilops* y *Triticum* hemos empleado como testigos mezclas por partes iguales de las especies diploides que aportaron los genomios constituyentes del aloploide. Por este procedimiento hemos podido comprobar que, para los grupos de aloploides que poseen como genomios básicos

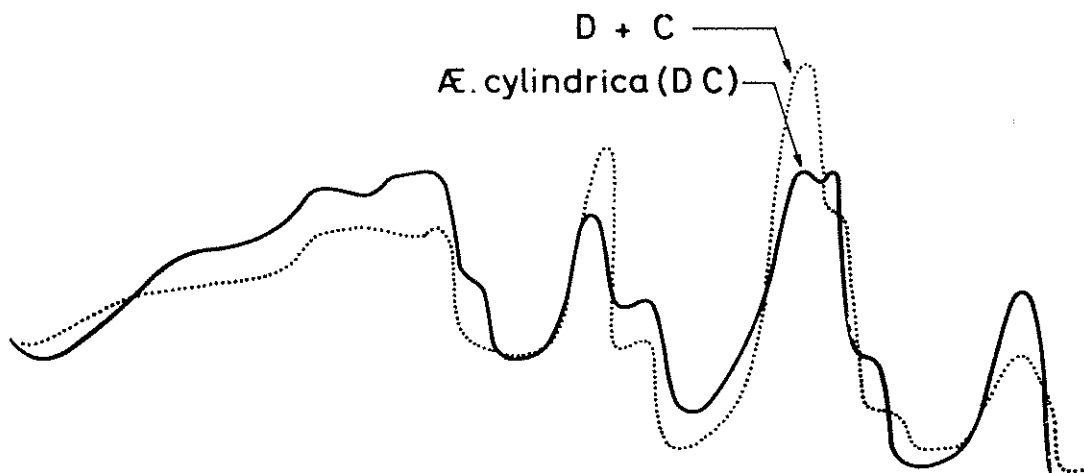


FIG. 6. Comparación de *Ae. cylindrica* (DC) con el testigo $D + C$.

el C^u y el D , la síntesis de proteínas específicas de cada genomio se superpone en el aloploide.

Según puede observarse en las figuras 3 a 7, el grado de homología entre las distribuciones de proteínas de los testigos y de los aloploides naturales es considerable.

Entre los aloploides cuyo segundo genomio es del grupo M (Fig. 3) es de resaltar, además del alto grado de homología, la buena concordancia en las relaciones cuantitativas entre componentes. La especie *Ae. columnaris* ($C^u M^u$) no presenta el componente de mayor movilidad, que está presente en las demás especies del grupo y cuya síntesis está regulada por el genomio M .

La gran similitud entre las distribuciones de proteínas de los genomios C^u y C se refleja en el hecho de que *Ae. triuncialis* ($C^u C$) presenta una distribución casi idéntica a la de *Ae. umbellulata* (C^u) (Fig. 5).

En la figura 8 se presentan las distribuciones de proteínas correspondientes a aloploides del género *Triticum*. Para los alotetraploides se han usado dos testigos: uno con *Ae. speltoides* (S) y el otro con *Ae. bicornis* (S^b). Es de señalar que *T. polonicum* (AB) *T. carthlicum* (AB) y *T. durum* (AB), presentan distribuciones prácticamente idénticas, siendo la de *T. timopheevi* (AB') distinta.

Ninguno de los testigos presenta un grado de homología con los trigos tetraploides del mismo orden que el observado en los aloploides del género *Aegilops*. Esto no es sorprendente si tenemos en cuenta que no se ha encontrado hasta el presente una especie diploide que se corresponda exactamente con el genomio B , si bien es casi seguro que el genomio B se derivó de sitopsis (genomios S , S^1 y S^b) (4). No obstante, la posible interacción entre genomios no debe ser descartada como origen de las desviaciones observadas entre los testigos y las especies aloploides. El estudio de las interacciones y particularmente el de la posible formación de proteínas híbridas (proteínas a las que cada genomio aporta una cadena polipeptídica) requeriría disponer de trigos tetraploides sintéticos, lo que no nos ha sido posible por el momento.

La distribución de proteínas de *T. aestivum* (ABD) no se reconstruye satisfactoriamente a partir de las tres especies ancestrales, pero sí se obtiene una buena aproximación por mezcla de *T. durum* (AB) y *Ae. squarrosa* (D). En este caso hemos dispuesto de un alohexaploide sintético, *T. spelta* (*T. carthlicum* (AB) y *Ae.*

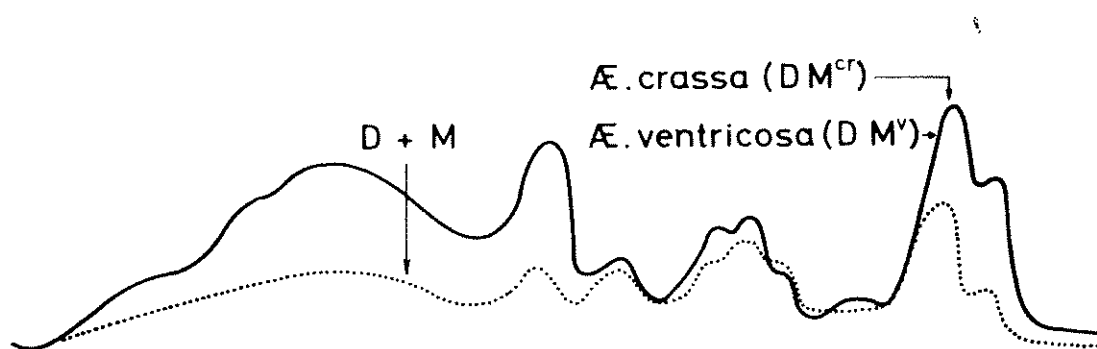


FIG. 7. Comparación de *Ae. crassa* (DM^{cr}) y *Ae. ventricosa* (DM^v) con el testigo $D + C$.

squarrosa (D) y su distribución de proteínas ha resultado ser idéntica a la de *T. aestivum*. El mencionado *T. spelta* sintético fue obtenido por KIHARA y nuestra observación concuerda con su hipótesis de que el trigo hexaploide se originó del tetraploide cultivado y de *Ae. squarrosa*.

En conclusión diremos que el método que se propone puede proporcionar valiosa información complementaria a los experimentos citogenéticos. Es evidente que en determinados casos no será discriminatorio, pero tiene la enorme ventaja de su simplicidad.

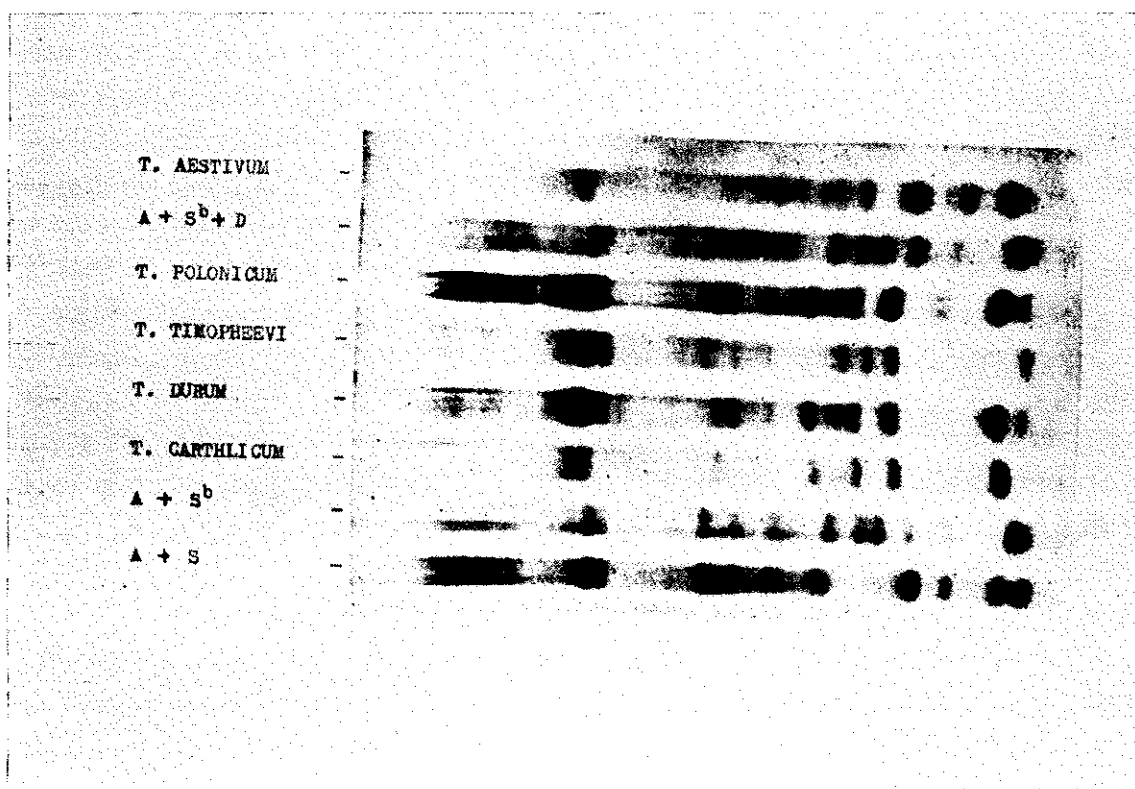


FIG. 8. Distribución de proteínas de trigos tetraploides y hexaploides.

R E S U M E N

Se propone un método simplificado para la extracción y fraccionamiento de las proteínas del grano de diversas especies. Se estudian por dicho método las especies diploides del grupo *Aegilops-Triticum* y se investiga el paralelismo entre síntesis de proteínas del grano y las relaciones citogenéticas entre las especies del grupo. Las distribuciones de proteína de los aloploides se reconstruyen por mezcla de las especies diploides parentales.

B I B L I O G R A F I A

- SENJANINOVA-KOROZAGNINA, M.
1932 *Bull. Appl. Bot. Gen. en Pl. Breed.*, ser. 2.
- CHENAVERAJAH, M. S.
1960 *Acta Horti Gotoburgensis*, 23: 85
- KIHARA, H.
1954 *Cytologia*, 19: 336.
- KIHARA, H.
1966 *Indian J. Genet.*, 26A, 14.

Polimorfismo de esterases en *Drosophila subobscura*

por R. GONZALEZ-DUARTE y A. PREVOSTI

Centro de Genética Animal y Humana del C. S. I. C.
y Departamento de Genética, Facultad de Ciencias, Universidad de Barcelona.

Recientemente se ha demostrado que los polimorfismos de proteínas en las poblaciones naturales de muchas especies (véase, principalmente, HUBBY and LEWONTIN (1966), LEWONTIN and HUBBY (1966), LEWONTIN (1967) y O'BRIEN, S. J. and R. J. MAC INTYRE, en preparación) son muy frecuentes. Esto ha puesto de manifiesto la posibilidad de investigar numerosos problemas de genética de poblaciones a un nivel de resolución de una finura imposible hasta ahora. No sólo la debatida cuestión del lastre genético resulta con ello susceptible de análisis en términos más realistas, sino que la caracterización de poblaciones mediante las frecuencias génicas resulta factible de una manera muy general, con todas las posibilidades que ello implica para el estudio de la dinámica evolutiva, de la taxonomía, la filogenia e incluso de la ecología de las mismas. Además es muy posible que la gran variabilidad que presentan los caracteres llamados cuantitativos o de variabilidad continua, dependa, por lo menos en parte, de estas pequeñas variantes bioquímicas. Así, su estudio constituye también una nueva posibilidad de análisis de esta clase de caracteres.

Por estas razones se inicia con el presente trabajo la investigación de los polimorfismos moleculares en *Drosophila subobscura*, en cuyas poblaciones se viene trabajando desde hace tiempo, por las ventajas que ofrece entre las especies europeas indígenas. Uno de

(1) Este trabajo se ha realizado durante el disfrute por el primer autor de una beca del P. I. O. y de una ayuda del F. I. U. por el segundo autor.

los puntos que parece de más interés en esta especie, es investigar las relaciones entre el polimorfismo estructural de los cromosomas, por inversiones, con estos polimorfismos moleculares.

Se ha estudiado, en primer lugar, el posible polimorfismo en las esterasas, por tratarse de unos enzimas que en otras especies de *Drosophila* presentan sistemas polimórficos integrados, a menudo, por varios alelos. Así, se ha detectado polimorfismo para estos enzimas en *D. melanogaster* (WRIGHT, 1961 y 1963), *D. simulans* (WRIGHT, T. R. F. and R. J. MAC INTYRE, 1963), *D. pseudoobscura* (HUBBY and LEWONTIN, 1966), *D. ananassae* (JOHNSON et al., 1966 b), *D. virilis*, *D. americana* y *D. novomexicana* (Mc REYNOLDS, 1967) y *D. aldrichi* y *D. mulleri* (JOHNSON et al., 1968). Las esterasas de otras muchas especies de *Drosophila* han sido estudiadas por JOHNSON et al. (1966 a) desde el punto de vista de su especificidad para el sustrato y la activación por el alcohol n-propílico, para relacionar estas características con la posición taxonómica de las especies analizadas.

MATERIAL Y METODOS

Se han analizado electroforéticamente 24 cepas de *Drosophila subobscura*, todas ellas mantenidas en el laboratorio y la mayor parte de poblaciones españolas.

La electroforesis en gel de acrilamida se ha efectuado según la técnica descrita por HUBBY (1963) y HUBBY y LEWONTIN (1966). Para la detección enzimática de las esterasas los geles se incuban en sustratos específicos, α -Naftil Acetato y β -Naftil Acetato, usándose como colorante Fast Red TRN y Fast Blue RR, según JOHNSON et al. (1966).

RESULTADOS

Los datos obtenidos, a partir de estos análisis, demuestran la existencia de un polimorfismo enzimático para la esterasa -5 (E-5),

controlado por varios alelos presentes en las distintas poblaciones de *Drosophila subobscura*. Dicha E-5 de *Drosophila subobscura* es la homóloga de la E-5 de *Drosophila pseudoobscura* según el criterio de hibridación expuesto por HUBBY y NARISE (1967). Además se confirma experimentalmente que la movilidad relativa de la primera respecto a la E-5 de *Drosophila pseudoobscura* es del orden esperado por los anteriores autores. Que se trata de la E-5 se confirma también por la presencia de las bandas correspondientes a las esterasas 1 a 4, situadas entre el origen y la que estudiamos. (Fig. 1).

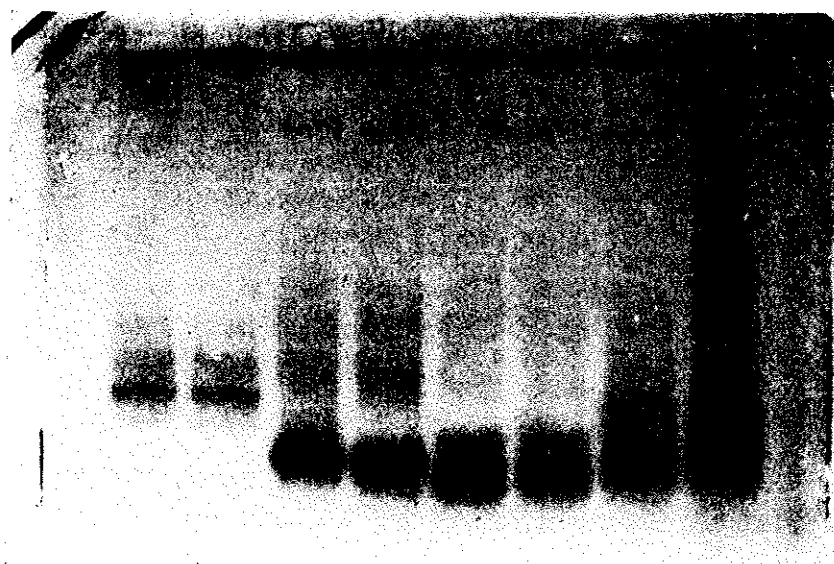


FIG. 1. Movilidad relativa de la E-5 de *Drosophila subobscura* respecto a la de *Drosophila pseudoobscura*. Una cepa de *D.pseudoobscura* (las dos primeras muestras de la izquierda) se compara con tres de *D.subobscura*; las muestras 3 y 4 corresponden a una cepa homocigótica y las 5 a 8 a cepas con variabilidad en el locus de E-5. Cada muestra se ha obtenido a partir de 10 individuos.

De las cepas analizadas, tres presentaron una sola banda, demostrándose que eran homocigóticas para la E-5. En todas las demás cepas se encontraron diferencias individuales y casos de heterocigosis para la E-5 que se manifiestan por la aparición de dos o tres bandas en la electroforesis.

Las cepas que se han obtenido homocigóticas son K-99, 9-11-1 y S₂. La E-5 de la K-99 se ha tomado como referencia, movilidad

igual a 1,00 ($E-5^{1.00}$). Las movilidades respectivas de la 9-11-1 y S_2 son $E-5^{0.19}$ y $E-5^{0.94}$.

Se han llevado a cabo los siguientes cruzamientos:

K-99/9-11-1	todos ($n = 27$)	$\rightarrow E-5^{0.19/1.00}$
K-99/ S_2	todos ($n = 6$)	$\rightarrow E-5^{0.94/1.00}$
S_2 /9-11-1	todos ($n = 12$)	$\rightarrow E-5^{0.19/0.94}$

Se observan sus movilidades respectivas en la fig. 2. Los híbridos del cruzamiento S_2 /9-11-1 mostraron una sola banda de movilidad intermedia respecto a los homocigotos de las dos cepas. Sus movilidades relativas son demasiado próximas para ser diferenciadas en los heterocigotos. En la fig. 2, la E-5 de S_2 se observa claramente diferenciada de la E-5 de K-99 en los híbridos K-99/ S_2 ya que, al no ser tan próximas sus movilidades respectivas, pueden ser separadas electroforéticamente. Se compara en la misma muestra con las movilidades de los híbridos K-99/9-11-1 y puede verse que la E-5 de S_2 tiene una movilidad intermedia entre la E-5 de 9-11-1 y E-5 de K-99.

Los datos obtenidos concuerdan con lo esperado teóricamente, es decir, los híbridos de la F_1 poseen todos las dos estererasas corres-

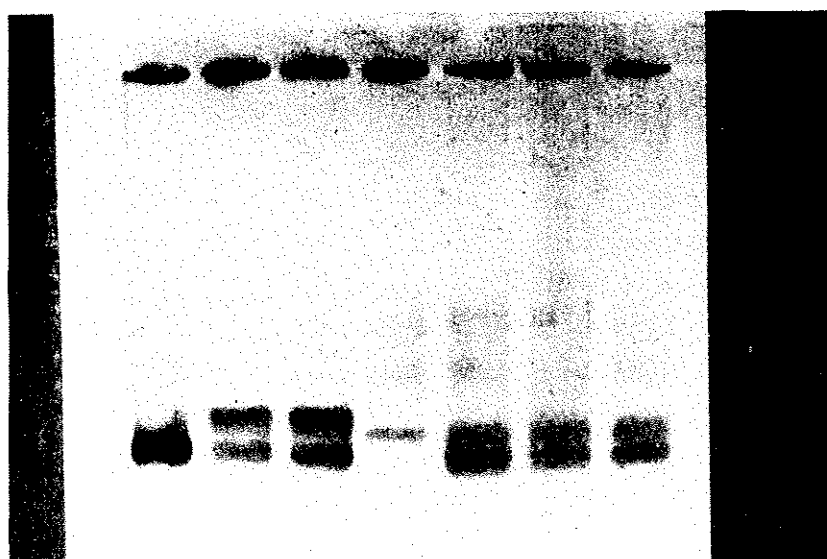


FIG. 2. La primera muestra de la izquierda corresponde a un individuo de una cepa homocigótica para $E-5^{1.00}$, las 2 y 3 son de híbridos F_1 del cruzamiento de dicha cepa con otra homocigótica para $E-5^{0.89}$. La muestra cuatro corresponde a una cepa homocigótica para $E-5^{0.94}$ y las 5 a 7 son de híbridos F_1 de cruzar dicha cepa con la homocigótica $E-5^{1.00}$.

pondientes y a veces se observa la formación de un enzima híbrido de los dos precursores. Los individuos de la F_2 segregan según la proporción esperada. (Fig. 3).

Cruzamiento	Número de individuos (F_2) analizados	Movilidades relativas número de individuos		
		0,89/1	0,89	1,00
K-99/9-11-1	32	15	9	8

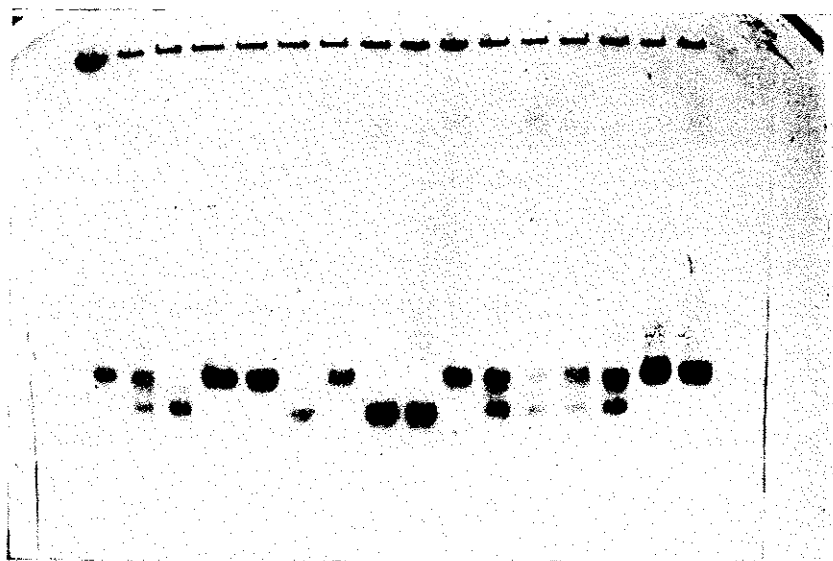


FIG. 3. Análisis electroforético de 16 individuos de la F_2 del cruzamiento E-50,89 \times E-51,00. Obsérvese la presencia de homocigotos para los dos alelos y de heterocigotos.

Tanto los machos como las hembras híbridos presentan dos o tres bandas, lo que demuestra que a diferencia de lo que ocurre en *Drosophila pseudoobscura* este carácter no está ligado al sexo. HUBBY y LEWONTIN (1966) piensan que la E-5 de *Drosophila pseudoobscura*, ligada al sexo, es la homóloga de la E-6 de *Drosophila melanogaster* que no está ligada al sexo. El cromosoma X de *Drosophila pseudoobscura* tiene 2 brazos mientras que el de *Drosophila melanogaster* sólo tiene uno, el otro está incorporado a un autosoma. En *Drosophila subobscura* los seis elementos básicos del cariotipo del género *Drosophila* son todos independientes, correspondiendo uno de ellos (un autosoma) a uno de los brazos del cromosoma X de *Drosophila pseudoobscura*.

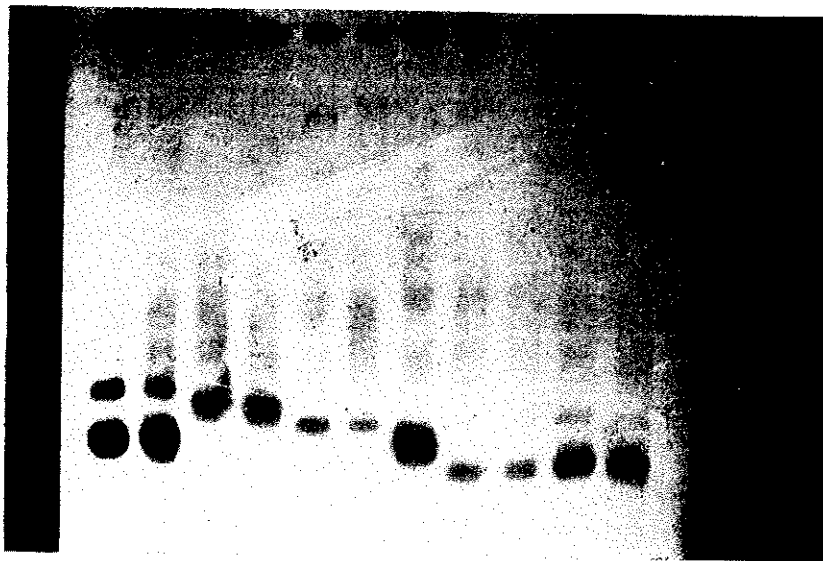


FIG. 4. Obsérvese en las 2 primeras muestras la presencia de bandas correspondientes a E-50,85 y E-51,00, en 3 y 4 a E-50,89, en 5 y 6 a E-50,94, en 7 a E-51,00 y en 8 a 11 a E-50,92 y E-51,06.

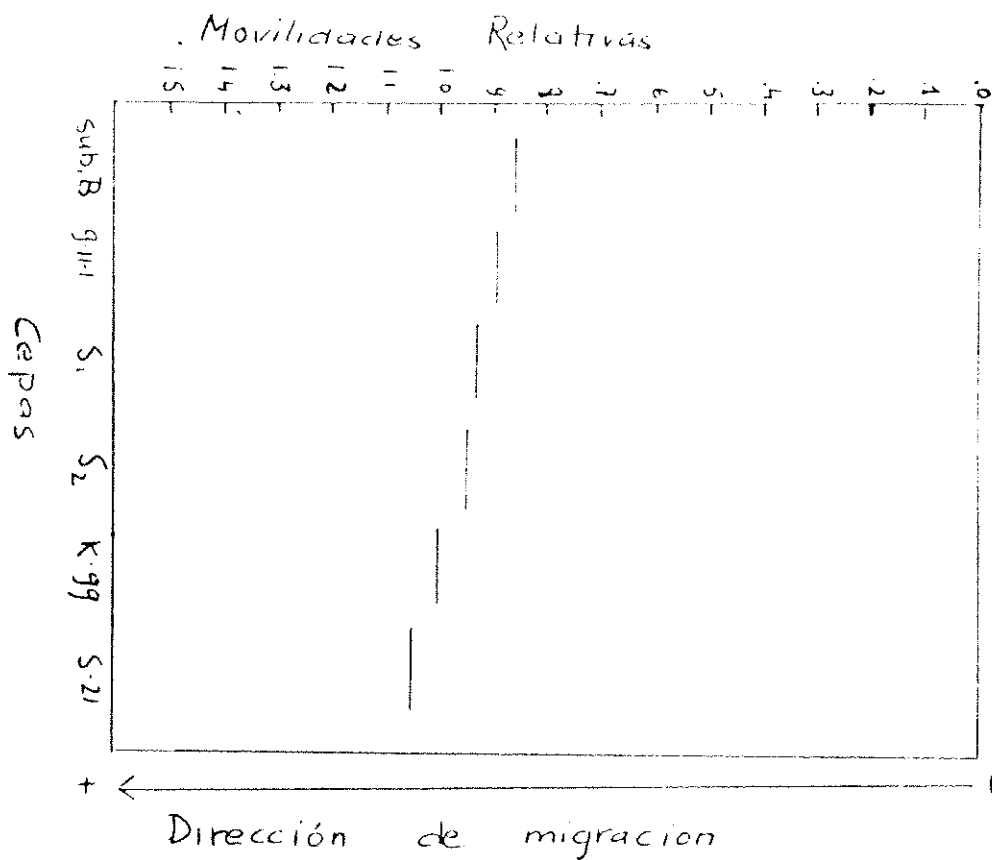


FIG. 5. Esquema de las movilidades relativas de las 6 isoesterasas identificadas en la región de la E-5 de *D. subobscura*.

Además de las cepas homocigóticas en las que se han llevado a cabo los cruzamientos, se encuentran bandas correspondientes a distintos alelos que segregan esterases con movilidades respectivas E-5^{0.85}, E-5^{0.92} y E-5^{1.06} (fig. 4). En total se han identificado 6 isoesterasas cuyas movilidades relativas pueden observarse en la fig. 5. Según los datos experimentales obtenidos se cree existen además otros alelos que contribuyen al polimorfismo de la E-5 en *Drosophila subobscura*.

DISCUSION

Como en otras especies de *Drosophila* se detecta polimorfismo en las esterases de *D. subobscura*, caracterizado por un elevado número de alelos. En relación con este punto debe tenerse en cuenta que el número real puede ser bastante más elevado que el encontrado hasta ahora porque:

1.º Tenemos indicaciones de la existencia de otros alelos en las poblaciones estudiadas.

2.º Al analizar nuevas poblaciones pueden aparecer más alelos.

3.º Los alelos que determinan substituciones de aminoácidos que dan lugar a moléculas con movilidades electroforéticas iguales, no pueden detectarse con la técnica utilizada.

4.º Si dichas movilidades son poco diferentes también puede ser difícil distinguirlas.

El número elevado de alelos de un locus reduce la frecuencia de los homocigotos, con lo cual si el polimorfismo se mantiene por superioridad de los heterocigotos, se reduce también el lastre genético que comporta dicho polimorfismo. No obstante, antes de analizar poblaciones naturales y tener datos sobre el número de alelos que suelen presentarse dentro de cada una de ellas, es prematuro discutir el alcance que puede tener este hecho en el polimorfismo que aquí estudiamos.

LEWONTIN y HUBBY (1966) encuentran polimorfismo para la esterase 5 de *Drosophila pseudoobscura* en cepas conservadas durante largo tiempo en el laboratorio. Esto se encuentra también en el caso de *Drosophila subobscura*, pues sólo tres de todas las cepas

analizadas han resultado homocigóticas para el locus que controla la esterasa 5. Estas tres cepas tienen ambas una historia con considerable consanguinidad. Una de ellas es una cepa en la que se están realizando cruzamientos consanguíneos para obtener homocigosis estructural de los cromosomas y otra es una cepa de Küssnacht homocigótica por la ordenación standard de todos los cromosomas pero sometida, además a cruzamientos consanguíneos, durante 99 generaciones consecutivas, en el University College de Londres.

En las cepas de laboratorio de *Drosophila subobscura* se conserva también indefinidamente el polimorfismo por las ordenaciones cromosómicas. Se plantea, por tanto, la relación que esto puede tener con la conservación de polimorfismos enzimáticos.

RESUMEN

Se demuestra la existencia de un sistema polimórfico, constituido por lo menos por 6 alelos, en el locus que rige la síntesis de la esterasa-5 de *Drosophila subobscura*. En esta especie dicho locus no está situado en el cromosoma X, a diferencia de lo que ocurre en *Drosophila pseudoobscura*.

PUBLICACIONES CITADAS

- HUBBY, J. L.
1963 Protein differences in *Drosophila*. I. *Drosophila melanogaster*. *Genetics*. **48**: 871-879.
- HUBBY, J. L. and LEWONTIN, R. C.
1966 A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations. 1. The number of alleles at different loci in *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics*. **54**: 577-594.
- HUBBY, J. L. and NARISE, S.
1967 Protein differences in *Drosophila*. III. Allelic differences and species differences in *in vitro* hybrid enzyme formation. *Genetics*. **57**: 291-300.
- JOHNSON, F. M. ET AL.
1966 a An operational classification of *Drosophila* esterases for species comparisons. *The University of Texas Publication*. **6615**: 517-532.

- JOHNSON, F. M. ET AL.
1966 b An analysis of polymorphisms among isozyme loci in dark and light *Drosophila ananassae* strains from American and Western Samoa. *Proc. Nat. Acad. Sciences U. S. A.* **56**: 119-125.
- JOHNSON, F. M. ET AL.
1968 Isozyme variability in species of the genus *Drosophila*. III. Qualitative comparison of the esterases of *D.aldrichi* and *D.mulleri*. *Biochemical Genetics.* **1**: 239-247.
- LEWONTIN, R. C. and HUBBY, J. L.
1966 A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations of *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics.* **54**: 595-609.
- LEWONTIN, R. C.
1967 An estimate of average heterozygosity in man. *American Journal of Human Genetics.* **19**: 681-685.
- McREYNOLDS, M. S.
1967 Homologous esterases in three species of the virilis group of *Drosophila*. *Genetics.* **51**: 527-540.
- O'BRIEU, S. J. and R. J. MAC INTYRE
En preparación. An analysis of isozyme and chromosome variability in natural populations of *Drosophila melanogaster* and *Drosophila simulans*.
- WRIGHT, T. D. F.
1961 The genetic control of an esterase in *D.melanogaster*. *Amer. Zool.* **1**: 476.
- WRIGHT, T. R. F.
1963 The genetics of an esterase in *Drosophila melanogaster*. *Genetics.* **48**: 787-801.
- WRIGHT, T. R. F. and McINTYRE, R. J.
1963 A homologous gene-enzyme system, Esterase 6, in *Drosophila melanogaster* and *D.Simulans*. *Genetics.* **48**: 1717.

Acción de mercuriales en mitosis vegetales

por RAMONA LORENTE

Instituto de Genética y Antropología. Sección de Citogenética Vegetal, C. S. I. C.
Serrano, 113, Madrid (España)

A B S T R A C T

The p-chloromercuriphenylsulfonate (PMPS) acts on mitosis of *Allium cepa* as a substance typically c-mitotic. We observed metaphases with the classic c-pairs as well as polyploid cells, multipolar anaphases, polynucleate and aneuploid cells. These effects were observed from the first 24 hr post-treatment and after 12 and 15 days of recuperation in some cases. These effects by PMPS are immediate and persist in root meristematic cells of *Allium cepa*.

INTRODUCCION

Este trabajo aborda un aspecto parcial del estudio que estamos realizando sobre la acción citológica de mercuriales en vegetales.

Se han estudiado algunos compuestos de mercurio que han resultado ser activos sobre la división celular. Así Kostoff (1940) estudió la acción del cloruro de etil-mercurio sobre células vegetales, encontrando mitosis anormales y efectos de poliploidia. MacFarlane y Schmock (1948) observaron que los efectos citológicos ocasionados por el hidroxifenil-mercurio y por el nitrato básico de fenil-mercurio en mitosis de *Allium cepa*, eran comparables a los inducidos por colchicina. Ambos agentes fueron productores de poliploidía y pre

sentan la típica reacción de la colchicina. También aseguran estos autores que otras sales de mercurio (fosfato de etil-mercurio y cloruro de etil-mercurio) tienen efectos colchicínicos.

Posteriormente Bruhin (1955) estudió la acción poliploidizante del agrimax (fenilmercuri-dinaftil-metan-disulfonato) sobre semillas de *Crepis capillaris*.

Yan (1963) empleó fu-min-nung (anilida del fenilmercuri-p-sulfon tolueno), un compuesto inductor de poliploidía en centeno, arroz y triticale.

Angulo y col. (1965) demostraron la similitud de efectos del p-cloromercuribenzoato (PCMB), con los ocasionados por la colchicina en la división celular de ápices radiculares de *Allium cepa*, poniendo de relieve cómo ambos agentes se caracterizan por ser típicamente c-mitóticos, debido a su acción inhibidora sobre el mecanismo de la formación del huso acromático.

Un estudio muy reciente de Ramel (1968) sobre la acción de metil-mercurio y fenil-mercurio en la segregación cromosómica de *Allium cepa* y *Drosophila*, muestra que ambos mercuriales resultaron ser agentes c-mitóticos.

La actividad citológica del PCMB similar a la de la colchicina por una parte, y por otra su capacidad para bloquear grupos —SH— propiedad común de todos los mercuriales—, invitaba a proseguir estudiando si citológicamente estos compuestos ocasionaban iguales o parecidos efectos, y en qué grado se manifestaba su acción y, sobre todo, como medio de profundizar en el por qué de su similitud con los efectos citológicos inducidos por la colchicina.

Continuando en la línea de trabajo de la Sección de Citogenética Vegetal del C. S. I. C. sobre acción de sustancias bloqueantes de sulfhidrilos, iniciamos el estudio del mecanismo de acción de mercuriales orgánicos sobre células vegetales, utilizando el salyrgan (Lorente, 1967). Estudiamos sus efectos citológicos sobre mitosis de *Allium cepa* y *Vicia faba*, comparándolos con los inducidos por la colchicina en idénticas condiciones experimentales, observándose cómo la *Vicia faba* muestra una mayor sensibilidad respecto al *Allium cepa* frente al estímulo químico del salyrgan, el cual muestra acción sobre nucleoproteínas, ligeros efectos c-mitóticos y propiedades radiomiméticas muy débiles.

En esta ocasión estudiamos otro mercurial, el p-cloromercurifenilsulfonato (PMPS) sobre mitosis vegetales. Elegimos este mercurial

por presentar una fórmula estructural muy semejante a la del PCMB, y porque, consultada la bibliografía, no hemos encontrado ninguna referencia sobre trabajos citológicos, pero, en cambio, abundan los trabajos de índole bioquímica preferentemente sobre inhibición de enzimas. Entre éstos, solo los estudios de Koukol (1961) trataban de enzimas extraídos de vegetales, haciendo referencia a la fenilalanina-desaminasa extraída del *Hordeum vulgare*, que quedaba inhibida por el PMPS en concentración 1×10^{-5} M en el cien por cien de los casos ensayados.

MATERIAL Y METODOS

Hemos utilizado meristemos radiculares de bulbos de *Allium cepa*, germinados en agua, en la oscuridad y en condiciones adecuadas de ventilación y temperatura, la cual ha oscilado entre los 20° y 25° C a lo largo de todas las experiencias. Las raíces fueron tratadas con soluciones acuosas de PMPS 1×10^{-2} M, 1×10^{-3} M y 1×10^{-4} M respectivamente. La duración de los tratamientos ha sido de 1, 2 y 4 horas.

El p-cloromercurifenilsulfonato sódico, es una sustancia blanca, ligera, de peso molecular 415 y su solubilidad en agua no es inmediata; se consigue con cierta facilidad calentando ligeramente el agua o bien alcalinizando el medio con 2 ó 3 gotas de sosa normal.

La técnica seguida para la tinción de las células ha sido la de Tjio y Levan (1950). Se han hecho preparaciones con raíces fijadas y sin fijar. Las preparaciones se montaron en definitivo según la técnica de la nieve carbónica y el euparal.

Las microfotografías se han hecho con un foto-microscopio Carl Zeiss n.º 62494 ocular 8 x y objetivo 40 x Apo, inm. y película Kodak ortocromática.

OBSERVACIONES

Como efectos generales del PMPS sobre *Allium cepa*, comunes a las tres concentraciones ensayadas, observamos lo siguiente: des-

pués de 1 hora de tratamiento y entre las 20-24 horas de recuperación, aparece la correspondiente aglutinación de la sustancia cromática y un principio de c-mitosis. Asimismo, en estas condiciones observamos células binucleadas excepto en el caso de la concentración intermedia (1×10^{-3} M).

A las 48, 72 y 96 horas de recuperación siguen apareciendo estos mismos efectos si bien las binucleadas son abundantes al cuarto día de recuperación en el caso de la concentración mayor, es decir, la 1×10^{-2} M.

Con 2 horas de tratamiento la observación entre las 20-24 horas de recuperación, así como las correspondientes al segundo, tercero y cuarto día después de los tratamientos, muestran los mismos efectos, si bien más acusados.

Además de estos efectos comunes se han observado aberraciones citológicas que describimos a continuación, ordenándolas por concentraciones (de mayor a menor) y tiempos distintos de recuperación.

DISCUSION

Desde hace tiempo vienen estudiándose los efectos de los mercuriales en distintas ramas de la biología. La acción de estos compuestos, incluida la citológica, está íntimamente relacionada con la actividad bioquímica de los grupos —SH. Se sabe que inhiben enzimas, aunque carecen de especificidad hacia enzimas particulares según LEYDEN WEBB (1966). Cuando células vivas son atacadas por un mercurial, no puede establecerse hasta hoy qué enzimas son afectados más rápidamente.

Existen varios trabajos realizados con PMPS sobre inhibición de enzimas extraídos de órganos de animales, levaduras y bacterias pero no procedentes de vegetales a excepción del trabajo de KOUKOL (loc. cit.).

Por otra parte se conoce desde hace tiempo la relación íntima que hay entre los grupos —SH y la división celular, así como también que la concentración de grupos tiólicos es máxima justamente al final del período G_2 del ciclo de división celular.

Los efectos observados inmediatamente después de los trata-

<i>Concentración</i>	<i>hs. trat.</i>	<i>hs. recup.</i>	<i>Observaciones</i>
$1 \times 10^{-2} M$ de PMPS	1	20-24	Células binucleadas, así como algunas células aneuploides.
»	»	48	Algunas bimitosis y aspecto aglutinado de los cromosomas.
»	»	72	Abundantes células en división, muy aglutinadas.
»	»	96	Células binucleadas tanto en interfase como en división. Anafases desorganizadas y aglutinación.
»	2	20-24	A las 21 horas de recuperación en material no fijado, células polinucleadas. A las 24 horas aparecen abundantes células binucleadas y efectos c-mitóticos, así como núcleos deformados.
»	»	48-72	El aspecto del material es más normal.
»	»	96	Células binucleadas, tanto en división como en interfase.
»	4	22-72	Los mismos efectos que con 2 horas de tratamiento que persisten incluso después de 12 días de recuperación en los que también aparecen polinucleadas (fig. 3, lám. I).
»	»	96	Es frecuente observar campos con células binucleadas y otras con micronúcleos e incluso algún fragmento. En este cuarto día el aspecto de los cromosomas es de típica c-mitosis, como igualmente al día séptimo de la recuperación. Asimismo induce la formación de células poliploides, como puede apreciarse en las figuras 1 y 2 de la lám. I.
$1 \times 10^{-3} M$ de PMPS	1	21-24	Efectos en general poco manifiestos, a excepción de la aglutinación y el principio de c-mitosis.
»	»	48	C-mitosis y células binucleadas.
»	»	72	No se observaron efectos.
»	»	96	Aparecieron células tetraploides, y también metafases con ligero aspecto c-mitótico.
»	2	0	En raíces teñidas sin previa fijación aparecen células binucleadas; metafases y anafases desorganizadas.

Concentración	hs. trat.	hs. recup.	Observaciones
$1 \times 10^{-3} M$ de PMPS	1	21-24	El efecto c-mitótico es muy acusado: abundantes metafases (fig. 13, lám. III), anafases desorganizadas (fig. 11, lám. II) y (figs. 13 y 14, lám. III); anafases tetrapolares (fig. 11, lám. II). También células aneuploides (figs. 7 y 8, lám. II). Bimiosis: en metafase (fig. 10, lám. II); en anafase avanzada casi telofase (figura 12, lám. II). Células binucleadas y polinucleadas.
"	"	48	Aglutinación todavía muy acusada. Metafases c-mitóticas. Bimiosis (fig. 15, lámina III).
"	"	72	Células binucleadas en abundante número, tanto en interfase como en mitosis.
"	"	96	Abundantes efectos c-mitóticos en metafases y anafases; células poliploides.
"	"	en días sucesivos hasta el día 15 post-tratamiento	Siguen apareciendo los mismos efectos, aunque van disminuyendo en número conforme aumentan los días de recuperación. C-metafase (fig. 16, lám. III) y célula desorganizada (fig. 9, lám. II) observadas en el día 8. Célula aneuploide (fig. 17, lám. III) en el día 9. Las células binucleadas se observaron hasta el día 15.
$1 \times 10^{-4} M$ de PMPS	1	22 hs.-7 días	Efectos c-mitóticos en pequeño número de células. Aparecen algunas células binucleadas que se siguen viendo el día 7 post-tratamiento.
"	2	22 hs.	Se aprecian ligeros efectos de c-mitosis.
"	"	48 "	Células en c-mitosis y células binucleadas en división y en interfase.
"	"	72 "	Células en división con cromosomas muy acortados. Células binucleadas con cromosomas muy contraídos.
"	"	94-98 hs.	Efectos de c-mitosis con notable contracción de los cromosomas, anafases desorganizadas (figs. 5 y 6, lám. I); células poliploides en metafase (figs. 4, lám. I, y 18, lám. III).
"	"	en días sucesivos hasta el día 10 post-tratamiento	Aparecen células en c-mitosis poco marcada. Se siguen observando células binucleadas tanto en interfase como en mitosis a los 7 y 10 días de recuperación.

mientos con PMPS durante 2 horas, hablan en favor de que la acción de este mercurial es inmediata y de que resultarán preferentemente afectadas las células que se encuentren en estado de premitosis en el momento de los tratamientos.

Desde los primeros ensayos realizados con PMPS en ápices radiculares de *Allium cepa* hemos observado sus efectos c-mitóticos, células poliploides, células tetrapolares, células binucleadas y polinucleadas así como también aneuploides, conforme era de esperar de este mercurial, por su semejanza química estructural con el PCMB. Cabe pensar que los efectos citológicos similares de ambos mercuriales se deben al mismo mecanismo bloqueante de grupos tiólicos de las nucleoproteínas, y como consecuencia la interferencia sobre el aparato mitótico y demás mecanismos celulares en los que intervengan grupos —SH.

A la vista de nuestras observaciones puede decirse que el PMPS es una sustancia c-mitótica y que su acción sobre células de *Allium cepa* es inmediata y persistente. Inmediata porque se observan sus efectos dentro de las 24 horas primeras incluida la hora 0 de recuperación; persistente porque se observan células afectadas después de 12 y 15 días post-tratamiento.

Se vienen realizando estudios sobre el tiempo de duración de la mitosis y de la interfase según el material, y en función de las condiciones en que se trabaje desde que HOWARD y col. (1953), dividieran el ciclo de división celular en cuatro estadios principales: mitosis, período de presíntesis (G_1), período de síntesis del DNA (S), período interfásico de post-síntesis (G_2). Así VAN'T HOF (1963), en mitosis de *Pisum sativum*, con colchicina y timidina tritiada en concentraciones y tiempo adecuado de tratamiento, consiguió el marcado simultáneo de células en dos momentos diferentes del ciclo mitótico. El intervalo de tiempo entre el tratamiento de la colchicina y la aparición subsiguiente y distribución de las células mitóticas tetraploides, da la duración de la mitosis, así como también la de los demás períodos del ciclo de división celular. LÓPEZ-SÁEZ y col. (1966) determinaron el tiempo de duración del ciclo de división de las células meristemáticas de *Allium cepa* en función de la temperatura, utilizando cafeína en el marcado de las células. MAC LEOD (1968) ha estudiado en *Vicia faba* la duración de este ciclo empleando la quinetina en sus experiencias.

Según las observaciones sobre *Allium cepa* la duración del ci-

clo de división de sus células a los 20° y 25° C (temperaturas entre las cuales hemos realizado nuestras experiencias) es repectivamente 18,8 y 13,5 horas. Así, pues, puede decirse que el PMPS actúa sobre *Allium cepa* con acción inmediata por observarse sus efectos c-mitóticos en el primer ciclo de división celular post-tratamiento y cuya persistencia se pone de manifiesto porque se sigue observando c-mitosis en ciclos sucesivos, incluso después del ciclo de división 21 ó 22 que correspondería a nuestras observaciones del día 15 después de la recuperación del material tratado.

RESUMEN

Por los resultados obtenidos en estas experiencias con PMPS sobre mitosis de *Allium cepa*, podemos decir que este mercurial actúa como una sustancia c-mitótica. Su acción sobre los grupos —SH de las nucleoproteínas debe ser inmediata, como ocurre en otros mercuriales, y que interfiriendo la formación normal del aparato mitótico, da lugar a la c-mitosis, células poliploides, células binucleadas, polinucleadas y aneuploides. Los efectos citológicos del PMPS son inmediatos y persistentes en el meristemo radicular de *Allium cepa*, observándose desde las primeras 24 horas post-tratamiento, y en algunos casos hasta 15 días después de la recuperación.

SUMMARY

From the results obtained in these experiments by PMPS on mitosis of *Allium cepa*, we may conclude that this mercurial substance acts as a c-mitotic agent. Its action on —SH groups of the nucleoproteins prevents the normal formation of the mitotic apparatus, producing abnormalities such as metaphases with the classic c-pairs, as well as polyploid, polinucleate and aneuploid cells. The cytological effects of PMPS are supposed to be immediate, and persist in meristematic root cells of *Allium cepa* from the first

24 hr. post-treatment to more than 15 days after recuperation, in some cases.

REFERENCIAS

- ANGULO, M.^o D.; SILIÓ, F. y FIGUERAS, C.
1965 Acción de sustancias bloqueantes de sulfhidrilos sobre división celular. *Genet. Iber.* **17**: 269-302.
- BRUHIN, A.
1955 Polyploidizing action of a seed treatment material. *Phytopath. Zeitschr.* **23** (4): 381-394.
- GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, A.; LÓPEZ-SÁEZ, J. F. and GIMÉNEZ-MARTÍN, G.
1964 Inhibition of cytokinesis: bimitosis and polymitosis. *Phyton* **21** (2): 157-165.
- HOWARD, A. and PELC, S. R.
1953 Synthesis of desoxyribonucleic acid in normal and irradiated cells and its relation to chromosome breakage. *Heredity* **6**: 261-273.
- KOSTOFF, D.
1940 A typical growth abnormal mitosis and polyploidy induced by ethyl-mercury chloride. *Phytopath.* **13**: 91-96.
- KOUKOL, J. and CONN, E. E.
1961 The metabolism of Aromatic Compounds in Higher Plants. IV Purification and properties of the phenylalanine deaminase of *Hordeum vulgare*. *J. Biol. Chem.* **236**: 2692.
- LEYDEN WEBB, J.
1966 Enzyme and Metabolic Inhibitors. *Academic Press*, New-York and London Vol. II: 729.
- LÓPEZ-SÁEZ, J. F.; GIMÉNEZ-MARTÍN, G. and GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, A.
1966 Duration cell division and its dependence on temperature. *Zeits. für Zellf.* **75**: 591-600.
- LORENTE, R.
1967 Efectos de un derivado orgánico de mercurio sobre mitosis de *Allium cepa*. *Rev. Biol.* (Lisboa) **6**, n.^o 3-4: 313-325.
- MAC FARLANE, E. W. E. and SCHMÖCK, N. G.
1948 The Colchicine and Colchicine-like Reaction as a Possible Response to Enzymic Poisoning. *Science* **108**: 712-13.
- MAC LEOD, R. D.
1968 Changes in the Mitotic Cycle in Lateral Root Meristems of *Vicia faba* following Kinetin Treatment. *Chromosoma* **24**: 177-187.
- RAMEL, C.
1968 The effect of organic mercury compounds on chromosome segregation in *Allium cepa* and *Drosophila*. *Proc. XII Inter. Congr. Tokio*. Vol. I: 195.
- VAN'T HOF, J. and HUEI-KUEN YING
1963 Simultaneous labeling of *Pisum* root cells in different segments of the mitotic cycle with colchicine and tritiated thymidine. *J. Cell. Biol.* **19** (2): 71 A.
- TJIO, J. H. and LEVAN, A.
1950 The use of oxiquinoline in chromosome analysis. *An. Est. Exp. Aula Dei* **2**: 21-62.
- YANG, Y. R.
1963 Fu-min-nung, a new compound for inducing polyploidy. (J. Bot.) *Acta Bot. sin.* **11**: 238-51.

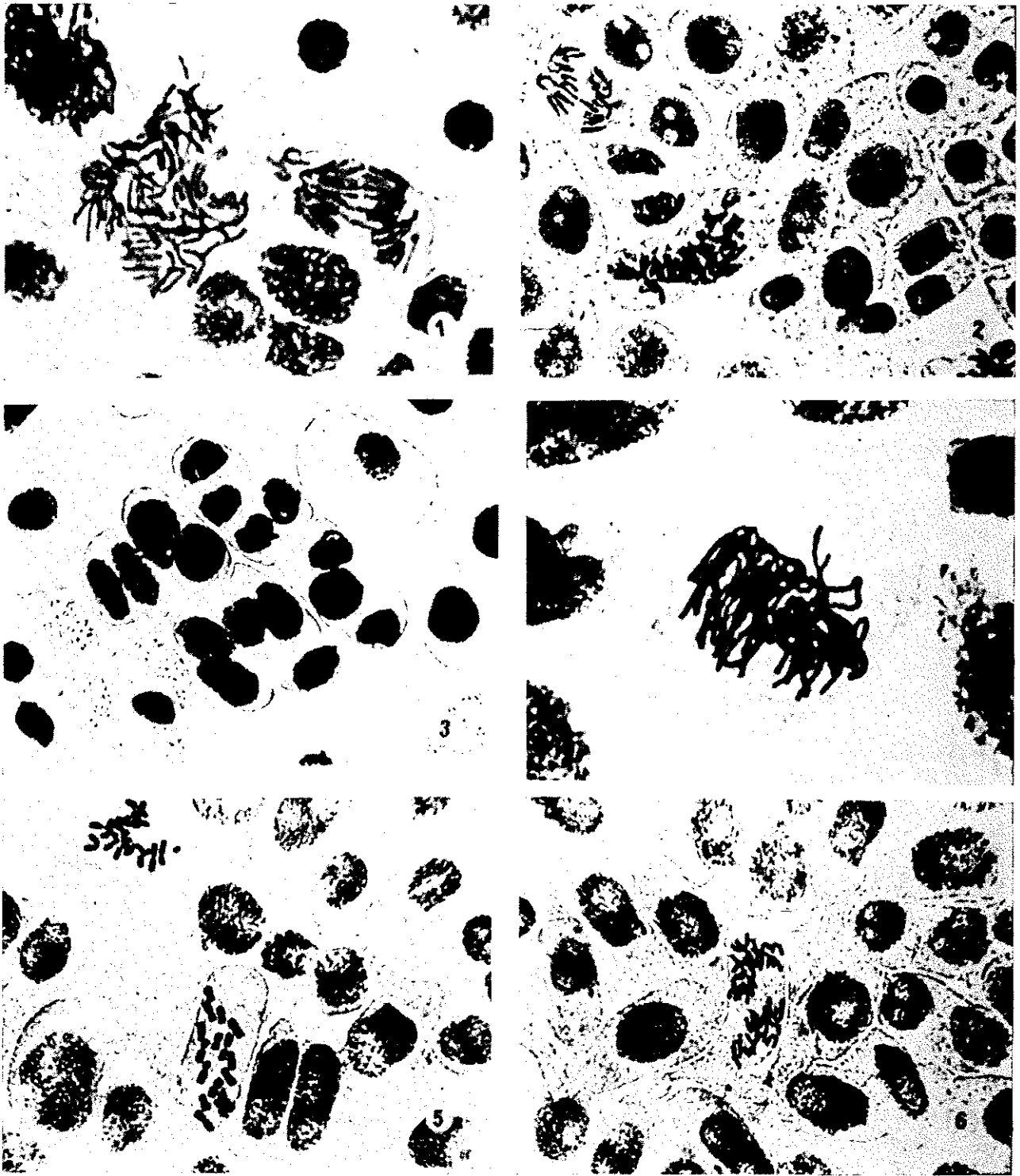
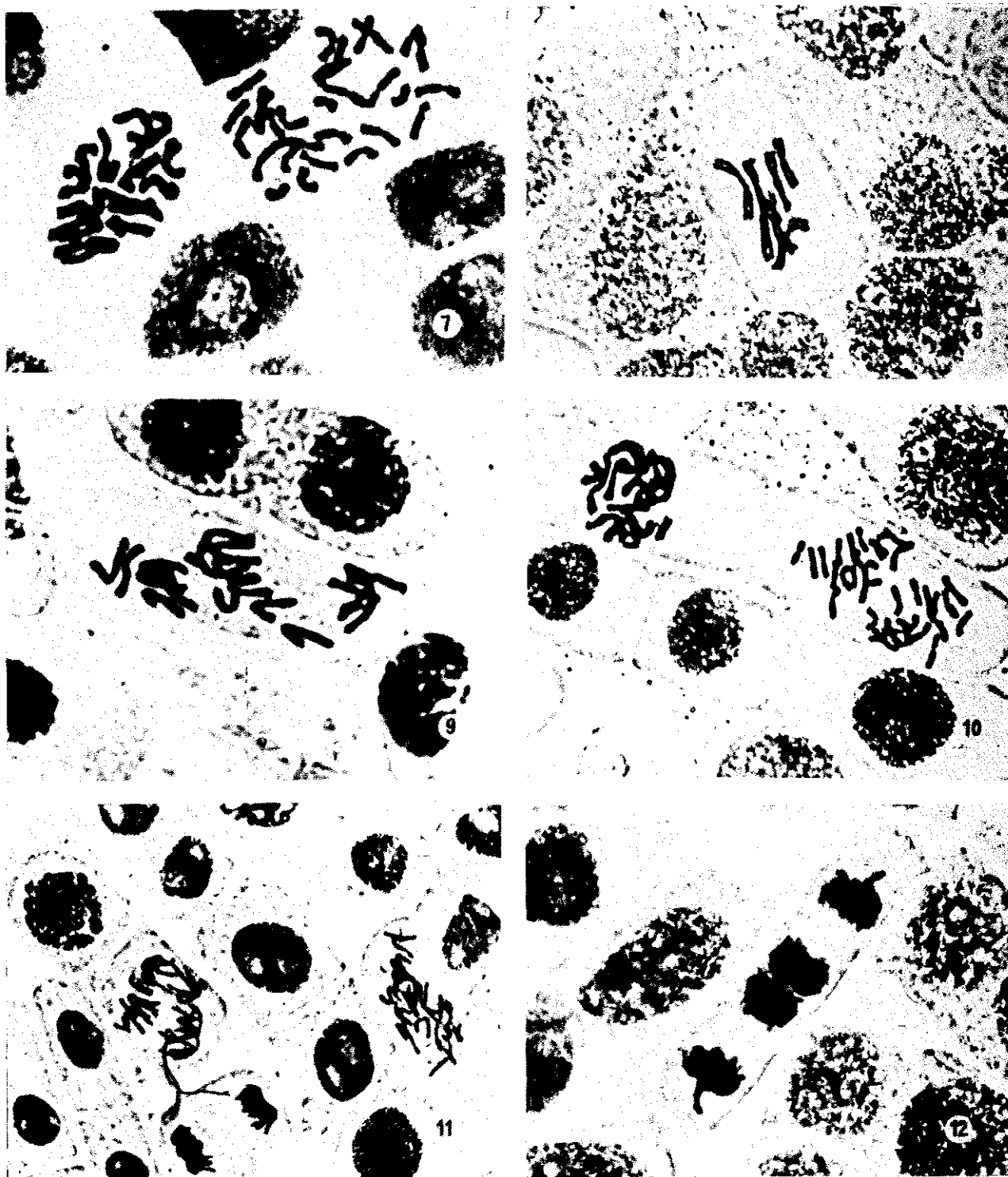


LÁMINA I. Efectos obtenidos en *Allium cepa* con concentración $1 \times 10^{-4} M$ de P M P S: FIG. 1) Anafase poliploide junto a otra con puente (4hs. de tratamiento y 96 de recuperación); FIG. 2) Metafase c-mitótica con alteración en el número de cromosomas observada a lcs 7 días post-tratamiento; FIG. 3) Células binucleadas y polinucleadas (con 3 y 4 núcleos), después de 12 días de recuperación. Concentración $1 \times 10^{-4} M$ (2hs tratamiento); FIG. 4) Metafase poliploide (98hs de recuperación); FIG. 5) Efectos c-mitóticos con notable acortamiento de los cromosomas (94hs post-tratamiento); FIG. 6) Anafase desorganizada con desequilibrio de la orientación cromosómica (94hs de recuperación).



LAMINA II. Efectos obtenidos en mitosis de *Allium cepa* con concentración $1 \times 10^{-3} M$ de PMPS: FIG. 7) Célula aneuploide con 28 cromosomas, junto a una metafase c-mitótica (21 hs. recuperación); FIG. 8) Célula aneuploide con 7 cromosomas (21 hs. recuperación); FIG. 9) Célula desorganizada y con desequilibrio en la orientación de los cromosomas (8 días recuperación); FIG. 10) Bimittosis (metafase con cromosomas desorientados) (21 hs. recuperación); FIG. 11) Anafase tetrapolar, junto a otra anafase desorganizada (21 hs. recuperación); FIG. 12) Bimittosis (anafase muy avanzada, casi telofase) (24 hs. recuperación).

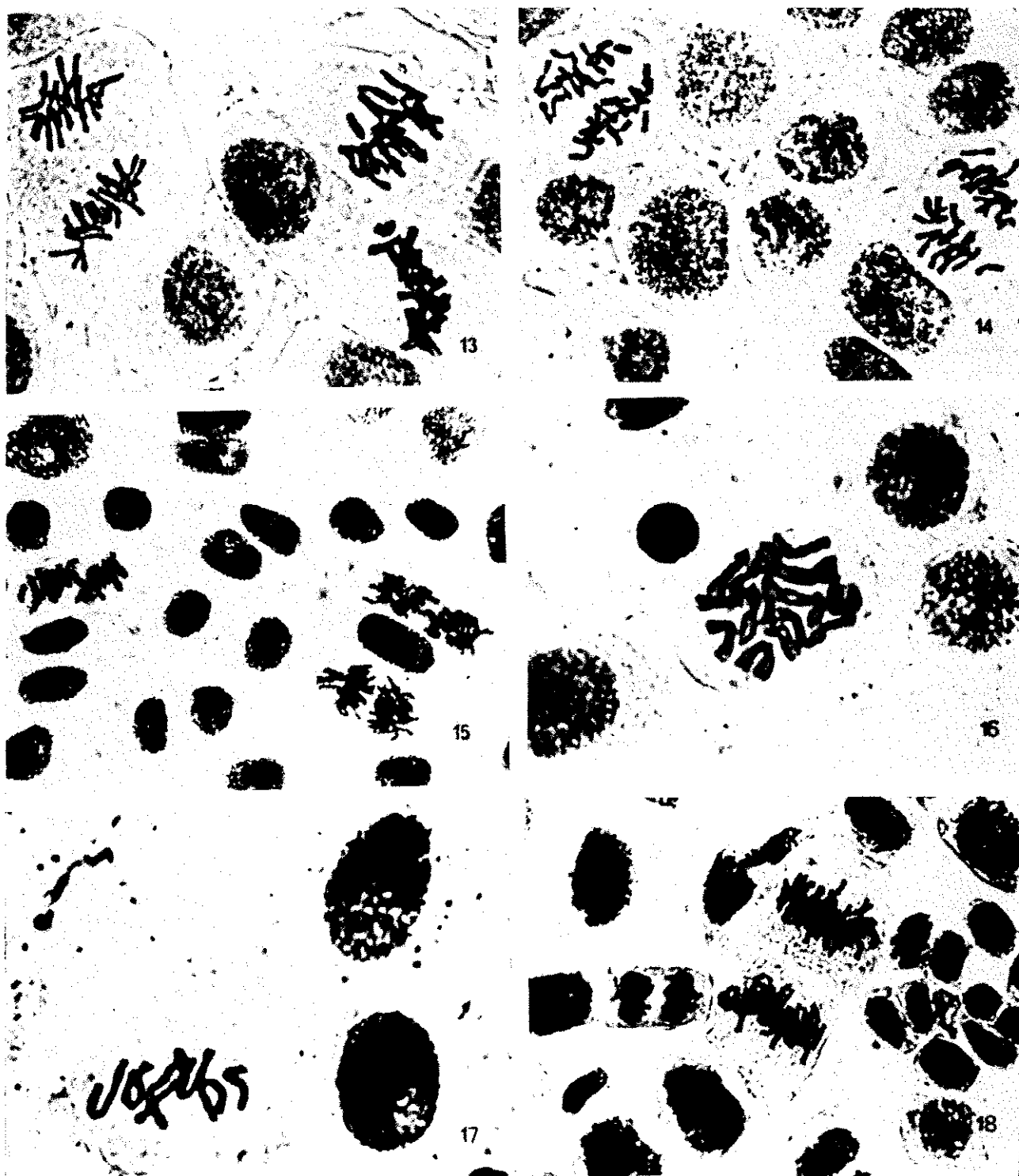


LÁMINA III. Efectos obtenidos en *Allium cepa* con concentración $1 \times 10^{-3} M$ de PMPS: FIG. 13) Metafase c-mitótica y anafase desorganizada con cromátidas desorientadas; FIG. 14) Dos anafases desorganizadas; FIG. 15) Una doble metafase, anafase doble y anafase anormal; FIG. 16) Metafase c-mitótica observada en el día 8 post-tratamiento; FIG. 17) Célula aneuploide después de 9 días de recuperación.

Concentración $1 \times 10^{-4} M$: FIG. 18) Dos metafases poliploides observadas a las 98 hs. de recuperación.

Ultraestrutura e involução do nucléolo. O corpo nucleolóide citoplásmico

por M. J. XAVIER MORATO e M. J. RODRIGUES CORREIA

Instituto de Histologia e Embriologia
Centro de Estudos de Histologia e Embriologia
«Celestino da Costa» do Instituto de Alta Cultura
Faculdade de Medicina de Lisboa, Universidade de Lisboa
(Dir.: Prof. M. J. Xavier Morato)

Como é sabido, tanto ao microscópio óptico como ao electrónico o nucléolo apresenta uma estrutura variável conforme o tipo celular e o estado funcional das células que se consideram.

Desde 1964, um de nós (M. J. XAVIER MORATO) tem chamado a atenção para a existência de nucléolos com uma estrutura lamelar e lamelo-reticular, o que foi observado em ovócitos de Mamíferos (Fig. 1 e 2). Semelhante concepção opõe-se como é óbvio, à doutrina da estrutura filamentosa do nucléolo, de ESTABLE e SOTELO.

Sabe-se que, segundo estes Autores, o nucléolo seria representado por um novelo de material argirófilo (*nucleolonema*) separado por um material argiróforo (*pars amorpha*). No decurso da mitose, quando o nucléolo involui, o nucleolonema fragmentar-se-ia e esses fragmentos associar-se-iam aos cromosomas. Muitos autores não tiveram dúvida em descrever um nucleolonema nas fotografias electrónicas do nucléolo (BORYSKO e BANG, 1952; BERNHARD e col., 1952; VINCENT, 1955; DE ROBERTIS, 1956; HORSTMANN e KNOOP, 1957; KUROSUMI e AKIYAMA, 1958; YASUZUMI e col., 1958; BROWN e RIS, 1959; KUROSUMI, 1961; MARINOZZI, 1964). Mas também outros, antes de nós, já haviam duvidado da existência dum nucleolonema (WEBER, 1956; JOHNSTON, SETTERFIELD e STERN, 1959). E o próprio CAJAL,

profeticamente, havia anunciado, em 1933, que a textura filamentosa que se pode observar no nucléolo é devida a um efeito óptico que resulta da compressão de vacúolos nucleolares, uns contra os outros.

A verdade é que, segundo julgamos, não pode generalizar-se a todos os nucléolos a estrutura observada num dado tipo celular. Muitos parecem maciços, embora sempre com um certo grau de heterogeneidade (Fig. 12) e em alguns tipos celulares apresentam-se como uma coroa, isto é, como uma porção densa, periférica, que circunda um território, provavelmente nucleoplásmico, central (Fig. 3).

Na história científica do nucléolo, há um pormenor impressionante. Desde HERTZ (1931) e da noção do organizador nucleolar, muitos investigadores se têm interessado pelo mecanismo íntimo da diferenciação do nucléolo. Pelo contrário, as imagens da involução do nucléolo, o mecanismo da sua desapareção como elemento figurado da célula, não têm sido estudados.

No mesmo material cujas imagens nos fizemos arquitetar a doutrina da estrutura lamelar e lamelo-reticular do nucléolo, tivemos ocasião de observar modificações da sua estrutura que fomos levados a interpretar como a tradução da sua involução. Uma dessas imagens representam perda da continuidade das lamelas nucleolares (Figs. 4 e 5), o que é acompanhado pelo aumento do número dos chamados *grãos intercromatínicos* nucleares. A desagregação que acompanha essas fracturas lamelares pode conduzir a que o nucléolo seja apenas representado por pequenos fragmentos de lamelas (Fig. 6).

Outra modificação estrutural muito evidente pode ser aquilo a que chamamos simplificação nucleolar. As interrupções lamelares são nulas ou escassas; as lamelas adelgaçam-se e os espaços interlamelares, preenchidos por nucleoplasma, alargam-se (Figs. 7 e 8). Dir-se-ia que há desagregação sem fragmentação.

Nos cortes, o desenho das lamelas nucleolares torna-se muito evidente. Esta forma da involução do nucléolo também é acompanhada pelo aumento dos grãos intercromatínicos. No final desta forma de involução, o nucléolo pode ficar reduzido a uma estrutura que toma uma disposição lamelar que, dir-se-ia, tende a desenrolar-se (Figuras 9 e 10).

Esta questão de involução do nucléolo é um tema que ainda

não está esgotado, apesar dos trabalhos que mais recentemente lhe têm sido dedicados (BEAMS e SEHKON, 1967; FAVARD-SÉRÉNO, 1968).

Um assunto particularmente aliciante é o das relações do nucléolo com a membrana nuclear e o das imagens representativas da passagem de produtos figurados, do núcleo para o citoplasma.

Quanto ao primeiro ponto, MONGOMERY, em 1898, foi o primeiro a afirmar que, quando único, o nucléolo ocupa quase sempre uma posição excêntrica e que pode estar em contacto com a membrana nuclear. Muitos têm querido ver nesta situação do nucléolo uma tradução morfológica da sua importância fisiológica (ALTMANN, 1952), na actividade elaboradora de célula (GRESSON e THREADGOLD, 1962; Hsu, 1962; WESSING, 1965; KESSEL, 1966).

Imagens como as das figuras 11, 12 e 13 são, de facto muito sugestivas para que se admita que representam um aspecto figurado dum mecanismo fisiológico, dinâmico, de transferência de materiais do nucléolo para o citoplasma. Na figura 11 entre a massa central, compacta, do nucléolo e a membrana nuclear estabeleceu-se uma ponte de material nucleolar. Nas figuras 12 e 13 (fotografias do mesmo corte e do mesmo núcleo) mostra-se um nucléolo em desagregação cujo material se põe em contacto com a membrana nuclear.

Do lado do citoplasma, nos territórios opostos às condensações intranucleares, podem ver-se zonas densas, ao mesmo tempo que a membrana nuclear deixa de ser perceptível (Fig. 13). Imagens semelhantes tem sido descritas por outros autores, em diferentes materiais (ANDERSON e BEAMS, 1956; CONE e SCALZI, 1967). É possível que um mecanismo desta ordem esteja na génese dos corpos nucleolóides citoplásmicos a que, a seguir, vamos fazer referência.

Um de nós (M. J. RODRÍGUEZ CORREIA) teve ocasião de observar no citoplasma dos espermátocitos e das espermátides de Rato elementos estruturais cujo aspecto geral lembra os nucléolos.

Apresentam-se como territórios citoplásmicos fortemente opacos aos electrões e desprovidos de membrana periférica. São constituídos por lâminas intensamente anastomosadas que deixam entre si espaços claros preenchidos por material citoplásmico no qual se podem distinguir cisternas do retículo endoplásmico (Fig. 14).

Estas formações de que temos observado uma ou duas em cada célula ocupam sistematicamente uma posição justanuclear e por vezes parece haver continuidade entre as trabéculas que as formam e a membrana nuclear (Fig. 15). A estrutura íntima de cada uma das

lâminas ou trabéculas que constituem esta inclusão citoplásmica é de natureza granulo-filamentosa.

Não se encontraram quaisquer relações especiais entre estes elementos e o condrioma ou o aparelho de Golgi.

A semelhança entre os nucléolos lamelo-reticulares e as formações que acabamos de descrever é impressionante o que nos leva a admitir por hipótese a sua natureza ribonucleica.

Estas observações não podem deixar de aproximar-se das realizadas por SHIMIZU e ISHII (1965), KOULISH (1965) e FAVARD-SÉRÉNO (1968).

SHIMIZU e ISHII descreveram, no citoplasma das células nervosas dos núcleos hipotalâmicos do Rato, estruturas que se assemelhavam a nucléolos e que os autores designaram como "nucleolus-like-bodies". Admitem uma transformação gradual desta inclusão em ribossomas e, embora nunca tivessem observado qualquer imagem demonstrativa duma extrusão nucleolar, aceitam que os "nucleolus-like bodies" tenham essa origem.

KOULISH, nos ovocitos dum Tremátode (*Gorgoderina*) descreveu a existência de formações citoplásmicas cujo contorno e estrutura reproduzem as do nucléolo.

Também FAVARD-SÉRÉNO teve ocasião de observar no citoplasma dos ovocitos de Grilo, e na vizinhança do núcleo, um corpo de aspecto granuloso e fibrilar, de disposição esponjosa e lamelar que, no conjunto, imitava um nucléolo. Deve-se a esta autora a designação de "pseudo-nuéolos" atribuída a estas formações. Nós preferimos chamar-lhes *corpos nucleolóides citoplásmicos* o que, na essência, corresponde à tradução do nome dado por SHIMIZU e ISHII.

No caso dos espermátocitos e das espermátides, fomos levados a admitir uma identidade entre os corpos nucleolóides citoplásmicos observados e os "corpos cromatóides safraninófilos" descritos, nessas mesmas células, por REGAUD, em 1901. Esta identidade é tanto mais de aceitar quanto é certo que DAoust e CLEMONT (1955) demonstraram a natureza ribonucleica desse componente celular das células seminais.

No que se refere à origem desta estrutura, julgamos poder afirmar que não é o resultado da migração do nucléolo para o citoplasma através da membrana nuclear. A existência de cisternas endoplásmicas nos alvéolos do corpo nucleolóide é a prova de que esta formação se organizou "in situ", embora não possa excluir-se que

seja o resultado duma condensação de materiais de origen nucleolar migrados através dos poros da membrana nuclear. Quanto à sua significação funcional, é-nos por agora totalmente desconhecida.

BIBLIOGRAFIA CITADA

- ALTMANN, H. W.
1952 *Zeitschr. Krebsforsch.*, **58**: 632.
- ANDERSON, E. e BEAMS, H. W.
1956 *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **2** (suppl.), 439.
- BEAMS, H. W. e SEHKON, S. S.
1967 *J. Cell Biol.*, **35** (n.º 2 P. 2), 151 A.
- BERNHARD, W., HAGUENAU F. e OBERLING, Ch.
1952 *Experientia*, **8**: 58.
- BORYSKO, E. e BANG, F. B.
1951 *Bull. Johns Hopkins Hosp.*, **89**: 468.
- BROWN, C. A. e RIS, H.
1959 *J. Morphol.*, **104**: 377.
- CAJAL, S. R. e TELLO, J. F.
1933 *Histology, William Wood and Co. Baltimore.*
- CONE, M. W. e SCALZI, H. A.
1967 *J. Cell Biol.*, **35**: 163 A.
- DAOUST, R. e CLERMONT, Y.
1955 *Am. J. Anat.*, **96**: 255.
- De ROBERTIS, E.
1954 *J. Histochem. Cytochem.*, **2**: 341.
- ESTABLE, C.
1955 *Fine structure of Cells. Groningen*, 170.
- ESTABLE, C. e SOTELO, J. J.
1951 *Inst. Inv. Biol. Publ.*, **1**: 105.
- FAVARD-SÉRÉNO, C.
1968 *J. Microsc.* **7**: 205.
- GRESSON, R. A. R. e THREADGOLD, L. T.
1962 *Quart. J. Microsc. Sci.*, **103**, 141.
- HEITZ, E.
1931 *Planta*, **12**: 775.
- HORSTMANN, E. e KNOOP, A.
1957 *Zeitsch. Zellforsch. mikr. Anat.*, **46**: 100.
- HSU, W. S.
1962 *Zeitschr. Zellforsch. mikr. Anat.*, **58**: 17.
- JOHNSTON, F. .; SETTERFIELD, G. H. e STERN, H.
1959 *J. Bioph. Bioch. Cytol.*, **6**: 53.

- KESSEL, R. G.
1966 *J. Ultrast. Res.*, **15**: 181.
- KOULISH, S.
1965 *Development. Biol.*, **12**: 248.
- KUROSUMI, K.
1961 *Int. Rev. Cytol.*, **11**: 1.
- KUROSUMI, K. e AKIYAMA, J.
1958 *Arch. Histol. Japan*, **14**: 291.
- MARINOZZI, V.
1964 *J. Ultr. Res.*, **10**: 433.
- MORATO, M. J. X.
1964 *Arch. Port. Sci. Biol.*, **15**: 83.
1964 *Bull. Assoc. Anat.*, (49.ª R.), Madrid.
1965 *C. R. Soc. Biol.*, **159**: 1633.
- REGAUD, Cl.
1901 *Arch. Anat. Microscop.*, **4**: 101.
1901 *Arch. Anat. Microscop.*, **4**: 231.
- SHIMIZU, N. e ISHII, S.
1965 *Zeitsch. Zellforsch. Mikr. Anat.*, **67**: 367.
- VINCENT, V. S.
1955 *Int. Rev. Cytol.*, **4**: 269.
- WEBER, A.
1956 *Acta Neuroveget.*, **13**: 5.
- WESSING, A.
1965 *Zeitsch. Zellforsch. Mikr. Anat.*, **65**: 445.
- YASUZUMI, G.; SAWADA, T.; SUGIHARA, R.; KYRIYAMA, M. e SUGIOKA, M.
1958 *Zeitschr. Zellforsch. mikr. Anat.*, **48**: 10.



FIG. 1. Ovário de feto de Gato de 119 mm. Dois ovócitos com grandes nucléolos de estrutura lamelo-reticular (1). Ampliação 9 150 X.



FIG. 2. Ovário de feto de Gato de 110 mm. Nucléolo dum ovócito. Estrutura tipicamente lamelar. Ampliação 34 020 X.



FIG. 3. Testículo de Ratinho adulto. Nucléolo de um espermatócito. Disposição em coroa. Ampliação 30 000 X.

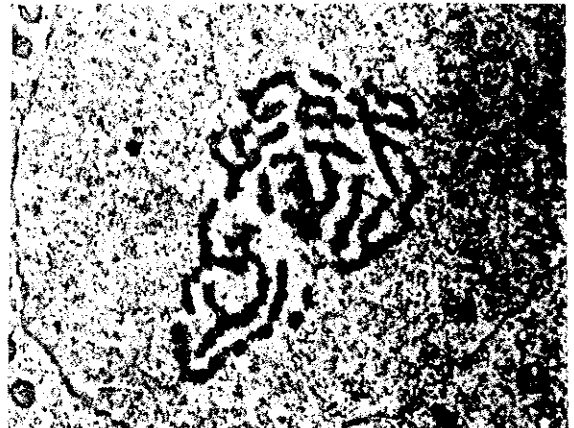


FIG. 4. Ovário de Gato de 2 dias de idade. Início da fragmentação do nucléolo de um ovócito. Ampliação 15 800 X.

(1) O material de ovário de Gato foi fixado em ácido ósmico a 1 %, segundo PALADE, incluído em metacrilato de butilo e observado sem contraste. O material de testículo de Rato foi fixado em aldeído glutárico a 5 %, post-fixado em ácido ósmico a 1 %. Inclusão em araldite, contraste pelo citrato de chumbo de REYNOLDS, segundo THIÉRY.



FIG. 5. Ovário de Gato de 2 dias de idade. Outro aspecto de fragmentação do nucléolo de um ovócito. Ampliação 23 100 X.



FIG. 6. Ovário de feto de Gato de 130 mm. Imagem terminal da fragmentação do nucléolo de um ovócito. Ampliação 18 300 X.

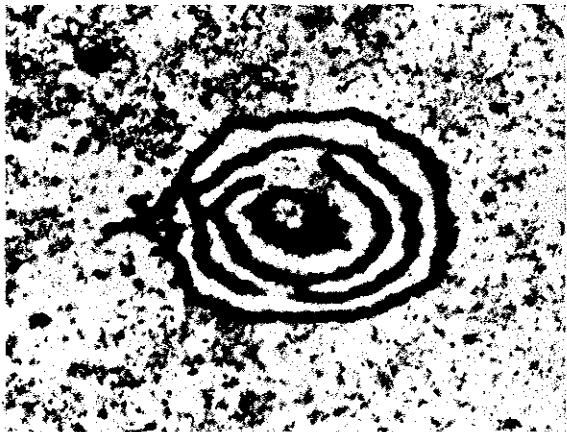


FIG. 7. Ovário de feto de Gato de 119 mm. Simplificação involutiva dum nucléolo de um ovócito, reduzido a lamelas concêntricas. Ampliação 18 300 X.

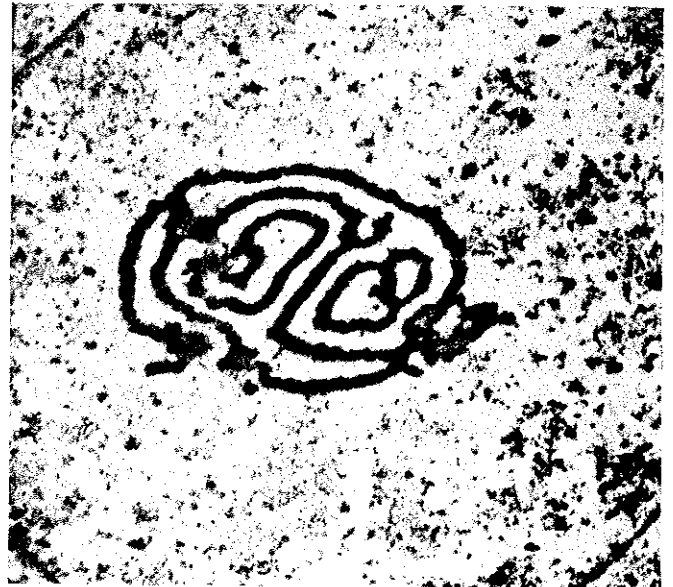


FIG. 8. Ovário de feto de Gato de 119 mm. Outro aspecto da simplificação involutiva do nucléolo de um ovócito. Ampliação 18 300 X.

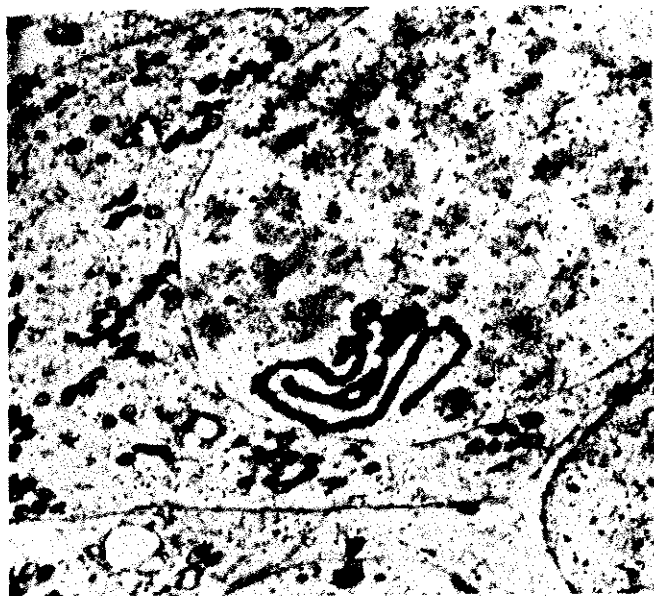


FIG. 9. Ovário de feto de Gato de 119 mm. Nucléolo simplificado de um ovócito cujo aspecto sugere um desenrolamento das lamelas constitutivas. Ampliação 12 200 X.

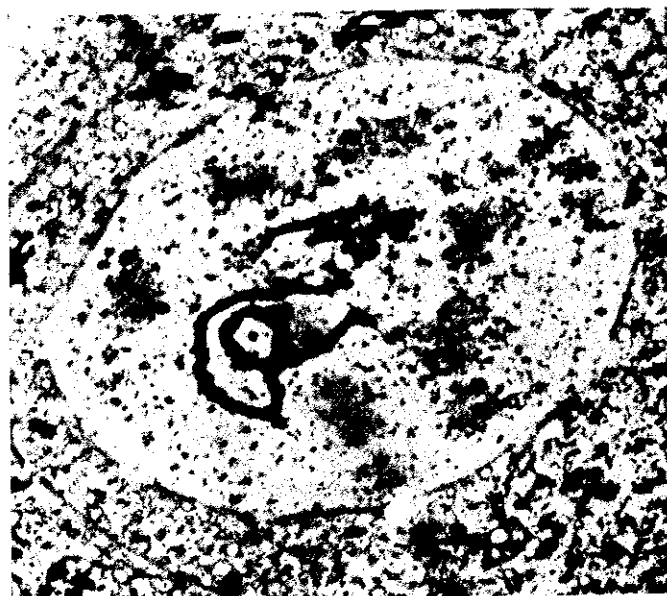


FIG. 10. Ovário de feto de Gato de 119 mm. Imagem terminal da involução do nucléolo. Ampliação 12 200 X.

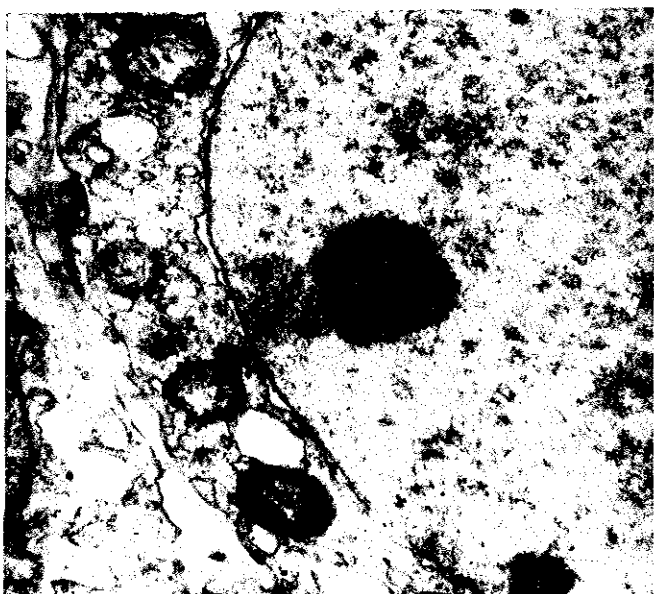


FIG. 11. Testículo de Ratinho. Célula intersticial. Aspecto particular das relações entre o nucléolo e a membrana nuclear. Ampliação 30 000 X.

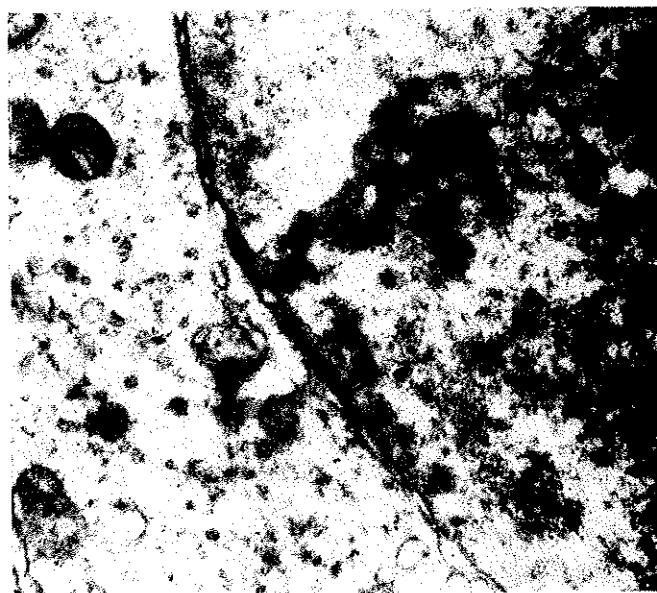


FIG. 12. Testículo de Ratinho. Espermatócito. Contacto íntimo entre o material nucleolar em fragmentação, e a membrana nuclear. Ampliação 30 000 X.

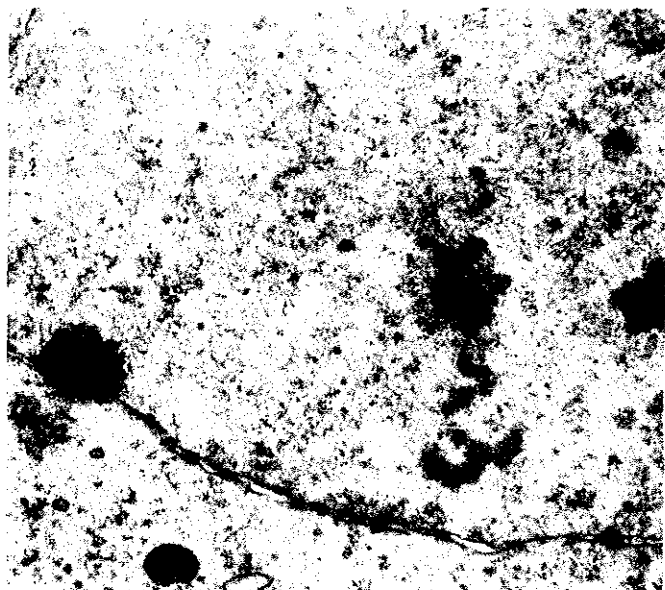


FIG. 13. Testículo de Ratinho. Espermatócito. Relação topográfica entre os materiais nucleares e citoplásmicos de um e outro lado da membrana nuclear. Ampliação 30 000 X.



FIG. 15. Testículo de Ratinho. Espermatídide. A maior parte da figura está ocupada pelo núcleo cuja parte superior está deprimida pela vesícula acrosômica. A esquerda e para fora do núcleo um corpo nucleolóide citoplásmico de aspecto reticular em cujos alvéolos existem cisternas endoplásmicas. Note-se a sua intimidade com a membrana nuclear. Ampliação 30 000 X.

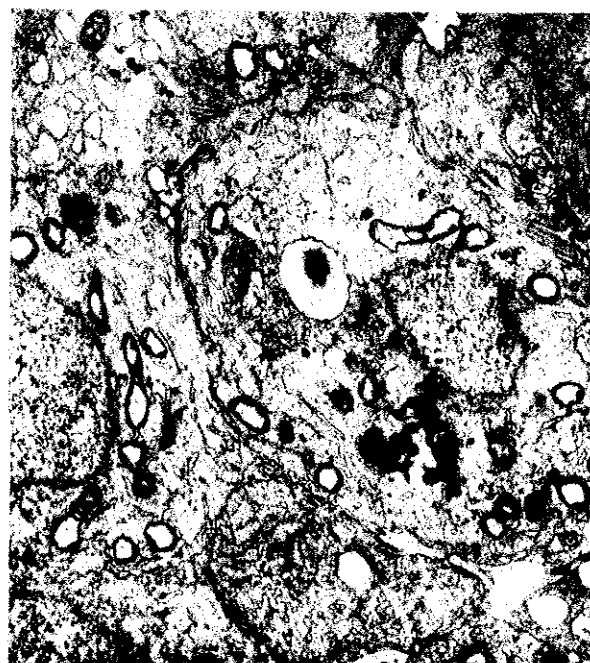


FIG. 14. Testículo de Ratinho. Espermatídide. Núcleo intersectado excêntricamente. Por baixo, na sua proximidade, corpo nucleolóide citoplásmico, de aspecto ramificado. Um pouco mais acima e à esquerda, vesículas e lamelas golgianas. Na sua vizinhança, a vesícula acrosômica com o grânulo acrosômico. No citoplasma, numerosas mitocôndrias com o aspecto característico que adquirem neste material. Ampliação 19 250 X.

Transferencia interespecífica del factor episómico que condiciona la segregación de glutamato en *Citrobacter intermedium* C 3

por R. PARÉS-FARRÁS y J. GUINEA

Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Barcelona

A B S T R A C T

C. intermedium C3 is a bacterial strain which has as extrachromosomal genetic factor (S factor) that in his integrated state produces a failure on the regulation of amino acid synthesis, by showing extracellular glutamate accumulation (2) (3) (8).

The episomal nature of S factor is principally based on the studies of transfer within the same *C. intermedium* C3 and on the effects of O. A. and agitation (4) (9).

The present work shows the experiments that have made possible to transfer S factor from *C. intermedium* C3 to *Paracolobactrum intermedium* (ATCC 1166) which had never shown glutamate segregation.

I N T R O D U C C I O N

Con la cepa auxotrófica glutamato dependiente *Leuconostoc mesenteroides* P-60 (ATCC 8042) ha sido posible mostrar la acumulación de glutamato alrededor de colonias de *C. intermedium* C3 (C.C.B. 362), obtenidas en placas con un medio mineral con glucosa. Con esta técnica también se ha puesto de manifiesto la existencia de colonias que no acumulan glutamato a su alrededor (tipo C). La fracción de colonias segregadoras o de tipo A es constante para cualquier cultivo de la cepa C3, incluso para los obtenidos a partir de una pequeña fracción de individuos de una colonia de tipo C (2) (8).

El fenómeno de la referida heterogeneidad colonial de *C. intermedium* C3 ha sido interpretado como resultado de la presencia simultánea de individuos segregadores (sg^+) y no segregadores (sg^-). El análisis de la fluctuación de la fracción de colonias A obtenidas de cultivos derivados de muy pocas células tomadas de colonias C, ha mostrado que los individuos sg^- pueden pasar a sg^+ con una alta probabilidad (2) (3) (8).

Ha sido posible llevar a cabo experimentos que permiten determinar la velocidad del cambio $sg^- \rightarrow sg^+$, a partir de la frecuencia de las células sg^+ calculadas con las frecuencias de colonias A y con el valor de la probabilidad de que una célula sg^- dé una colonia A. La velocidad encontrada por célula y generación es de 3×10^{-2} (3) (4) (9).

La consideración detenida de los resultados de las pruebas de la fluctuación de la fracción de colonias A junto al alto valor del cambio genético $sg^- \rightarrow sg^+$, ha sugerido la posible intervención de un factor extracromosómico como determinante de la segregación del glutamato en la cepa C3 (factor S) (4) (9). Ulteriormente esta hipótesis se ha visto singularmente apoyada por nuevos experimentos que muestran que el cambio $sg^- \rightarrow sg^+$ puede ser prácticamente suprimido por efecto de la agitación y por efecto del naranja de acridina (4) (9).

El presente trabajo tiene por objeto mostrar los experimentos de transferencia del factor S desde *C. intermedium* C3 a *P. intermedium* ATCC 1166, que en ningún caso presenta la propiedad de acumular glutamato extracelularmente.

MATERIAL Y METODOS

Cepas bacterianas y medios.

La cepa *C. intermedium* C3 ha sido aislada en agua blanca de una papelera. Su cultivo se lleva a cabo en un medio hecho con agua destilada, de la siguiente composición (expresada en gramos por 1.000 ml.): NH_4Cl , 7; glucosa, 20; KH_2PO_4 , 1; y $MgSO_4$, 0,5. Se ajusta el pH a 7,5 con NaOH y se esteriliza a $120^\circ C$ durante 15 minutos (M1) (1).

L. mesenteroides P-60 (ATCC 8042) se mantiene en *Glutamic Inoculum Broth* (Difco). Para la detección del ácido glutámico alrededor de las colonias de *C. intermedium* C3 se utiliza una suspensión de la cepa P-60 de *L. mesenteroides* en *Glutamic Assay Medium* (Difco) con 7 g/l. de agar.

Análisis colonial.

Suspensión en Ringer 1/4 de una población de *C. intermedium* C3. Extensión de 0,1 ml. en placas con 10 ml. de medio de cultivo solidificado con 10 g/l. de agar. Incubación a 30° C (25-30 horas). Se vierten sobre cada placa 12 ml. de la suspensión de *Leuconostoc* en *Glutamic Assay Medium* con agar (45-50° C). Se incuba 33-35 horas a 37° C.

Separación de Paracolobactrum intermedium ATCC 1166 y análisis colonial.

La propiedad de fermentar muy lentamente la lactosa permite separar la fracción conveniente de una población de *P. intermedium* ATCC 1166 que se ha incubado junto a *C. intermedium* C3. Para ello, 0,1 ml. de una dilución suficiente del cultivo mixto se extiende sobre agar McConkey y se incuba durante 24-30 horas a 30° C. Las colonias de *C. intermedium* C3 aparecen rosadas y las de *P. intermedium* blancas. Estas últimas pueden trasladarse una a una sobre agar M1. Después de 24 horas de incubación a 30° C, se practica el análisis de las mismas como se ha indicado anteriormente.

RESULTADOS

Análisis colonial de P. intermedium ATCC 1166 con L. mesenteroides P-60.

Siguiendo la misma técnica utilizada para el análisis colonial de la cepa C-3, se ha investigado la posible acumulación de glutamato alrededor de las colonias de *P. intermedium* ATCC 1166. Las diluciones correspondientes se han obtenido a partir de cultivos

en agar ordinario y en agar M1 inclinados. En ningún caso se han obtenido halos de crecimiento de la cepa auxotrófica de *Leucostoc* (fig. 1).



FIG. 1.— Ausencia de crecimiento de *L. mesenteroides* P-60 alrededor de las colonias normales de *P. intermedium* ATCC 116 (x 150).

Transferencia del factor S.

Se han obtenido colonias de *P. intermedium* que acumulan glutamato a su alrededor creciendo sobre agar M1. Estas colonias son el resultado de la incubación con *C. intermedium* C3 y es posible ponerlas en evidencia por el método del *L. mesenteroides* P-60.

Una colonia A de *C. intermedium* C3 se dispersa en 10 ml. de M1 líquido y se incuba durante 24 horas a 30° C. Paralelamente se siembra en agar M1 inclinado un asa del crecimiento de 24 horas a 30° C de *P. intermedium* en agar ordinario. A las 24 horas de incubación se dispersa una asa del crecimiento obtenido en 10 ml. líquido. A 10 ml. de M1 líquido se añade 0,1 ml. del cultivo de 24 horas de la cepa C3 y 1 ml. del cultivo de *P. intermedium*. Se lleva un control del número de células viables de estos dos cultivos para que la mezcla en M1 corresponda lo más aproximadamente posible a la proporción 1/10 entre C3 y *Paracolobactrum*. Después

de 2 horas de incubación en reposo a 30° C se practican diluciones en Ringer 1/4, a partir de las cuales se obtienen colonias separadas en placas de agar McConkey. Las colonias de *Paracolobactrum* se trasladan a M1 y se revelan con *L. mesenteroides* P-60.

En el cuadro I se consignan los resultados obtenidos en seis experimentos de transferencia según se ha descrito. El aspecto microscópico de las colonias de *Paracolobactrum intermedium* ATCC 1166, después del revelado es el de la microfotografía de la fig. 1. Las colonias denominadas segregadoras en el cuadro I presentan el aspecto de la microfotografía de la fig. 2.

En el experimento núm. 6 no se obtuvo ninguna colonia segregadora de *Paracolobactrum*, entre las 69 analizadas. En este caso la proporción entre individuos de la cepa dadora y de la cepa aceptora fue de 1 : 2, en lugar de 1 : 10.

CUADRO 1.—*Transferencia del factor S de Citrobacter intermedium C3 a Paracolobactrum intermedium ATCC 1166.*

Experiencias	Número de colonias analizadas con <i>L. mesenteroides</i> P160	Número de colonias segregadoras de ácido glutámico	Observaciones
1	164	24	Tiempo de incubación con C3: 6 horas
2	90	3	
3	57	2	
4	100	16	
5	53	2	
6	76	0	

Se han obtenido también colonias segregadoras de *P. intermedium* ATCC 1166 partiendo de crecimiento de 24 horas en agar M1 inclinado en lugar de una colonia A, para preparar la población de la cepa C3 que se incuba con la bacteria aceptora. En estos casos también se han obtenido colonias segregadoras de *Paracolobactrum*.

Algunas de las colonias segregadoras obtenidas han sido cultivadas en M1 o simplemente dispersadas en Ringer 1/4 para ser luego sometidas al análisis colonial con *L. mesenteroides* P-60. Entre 200 colonias procedentes de un cultivo de 24 horas en M1, no se encontró ninguna segregadora. Entre 50 colonias analizadas de una suspensión en Ringer 1/4 tampoco pudo encontrarse ninguna.

DISCUSION

Al parecer, no hay duda que las colonias de *Paracolobactrum intermedium* ATCC 1166 segregadoras de glutamato, son el resultado de la incubación en presencia de *Citrobacter intermedium* C3. Esto constituye una confirmación destacada del modelo episómico propuesto para explicar la segregación de glutamato por esta última cepa (4) (9). La transferencia episómica ha sido demostrada para el factor F de *E. coli* K-12 (5), algunos factores Col (10) y algunos factores R (11). Otros plásmidos no han podido ser transferidos de una a otra bacteria hasta el momento (6) (7).

Hasta donde alcanzan las experiencias realizadas, no es posible dar un valor definido para la frecuencia de la transferencia, pero es probable que sea superior al 1%. Este valor es realmente alto comparado con los relativos a la mayor parte de los factores episómicos antes citados (5) (10) y (11). La transferencia del factor S dentro de la cepa C3 es mucho más eficaz, a pesar que la frecuencia de la transferencia es del mismo orden de magnitud (4) (9). Esto puede interpretarse bajo el supuesto que el factor S es menos estable en *Paracolobactrum* o no se divide. Esto último estaría de acuerdo con la falta de estabilidad del carácter segregador en *Paracolobactrum*, si bien las experiencias llevadas a cabo en este sentido no lo demuestran por el insuficiente número de colonias analizadas.

El factor S interfiere la normal capacidad de regulación de la economía del metabolismo, por lo menos cuando la bacteria que lo posee se desarrolla en las condiciones referidas en este trabajo. Por lo tanto constituye un nuevo y sorprendente mecanismo responsable de un estado patológico de la bacteria que puede transmitirse tanto por herencia como por infección dentro de la cepa C3 y, por lo menos por este último mecanismo, a la cepa *Paracolobactrum intermedium* ATCC 1166.

SUMMARY

Interespecific Transfer of a Episomic Factor that determines Glutamate segretion in Citrobacter intermedium C3.

Glutamate accumulation round colonies of *Citrobacter intermedium C3* could be visible through *Leuconostoc mesenteroides P-60* (ATCC 8042) auxotrophic strain. Colonies of *Citrobacter intermedium C3* were obtained on the same medium by adding 1,5 % agar. After 35 hr, incubation at 30°C, a suspension of *Leuconostoc mesenteroides* growth in *Glutamic Assay Medium* (Difco) was poored on the *Citrobacter intermedium C3* colonies, as thin layer. After 30 hr of new incubation at 37°C, microcolonies of *L. mesenteroides P-60* were develope producing haloes round *C. intermedium C3* colonies (2) (8). Nevertheless not every colony of *C. intermedium C3* shows the same conduct. Colonies, which are denominated A type, showed a clear halo, that easily one could catch sight of it, which is constituted by a great number of *L. mesenteroides P-60* microcolonies, whose diameter is gradually diminishing towards the halo share. Other colonies, C type, did not show ever growth round glutamate dependent strain.

Phenomena of the later colonial heterogenity of *C. intermedium C3* was interpreted as a result of the simultaneous presence of segregators forms (sg^+) and no segregators forms (sg^-), at populations of *C. intermedium C3* submitted to colonial analysis.

Therefore a C type colony would be constituted, esentially by a population of sg^- . Cultures with these kind of populations were made on a stadistic basis, begining with cells number between 1 and 10. After 12 hr incubation at 30°C the colonial analysis was practiced from a great number of these cultures. So, it has been found *A colonies* frequencies obtained from an only massive culture, it has put up of no doubt the possibility that the mentioned fluctuation was due at random. As it is known, these results should be interpreted be on the way that there is a genetic exchange between $sg^- \rightarrow sg^+$, similar to mutation. However the study of results got up two very particular characteristics; a) The $sg^- \rightarrow sg^+$ change ought to occur with a frequency by cell and generation quite superior to what is usual by mutation on determining the frequency of A colonies on the same platers where also growth

C colonies. A colonies frequencies distribution on the microcultures of fluctuation test, is anomalous. The great amount of microcultures with the extremes values (0 and nearest 100 for A frequencies) got into mind that the probability of $sg^- \rightarrow sg^+$ change is not the same for each microculture (2) (3).

Consideration of the preceding facts suggested the possibility to exist two different types of sg cells, one of which would have episomic material. This later in its integrated state would determine the change to sg^+ , and in its free state, would multiplie quicker than nuclear material, and could be transfer to sg^- without episome. This hipothesis was the basic of new experiments in which was prove the effect of O. A. and agitation. It was previous determined the change velocity $sg^- \rightarrow sg^+$, starting on sg^+ frequencies deduced from A colonies frequencies, and from the experimental determination of the definded probability with sg^- cell would give an A colony (4) (9). The found velocity per cell and generation is $3 \cdot 10^{-2}$. The later mentioned authors have could show, this velocity can be quite nule as consequence of a strong agitation and could be negative at incubation with O. A. These subjects seemed to appoint: a) Transformation $sg^- \rightarrow sg^+$ is fundamentally conditioned by the transfer through delicate intracellular bridges. b) The probability that a sg^- cell can give an A colony is drastically diminished, when it is proceeding from O. A. incubated populations. The experiments of R. PARES and S. HERNÁNDEZ seem to constitutive an important support of episomal hipothesis for the genetic mechanism responsible of the colonial heterogenity in *C. intermedium* C3 in connection with the property of glutamate accumulation.

Paracolobactrum intermedium (ATCC 1166) is a bacterial strain able to growth on the same media used for *C. intermedium* C3. The colonial analysis with *Leuconostoc mesenteroides* P-60 shows up in this case, that round *P. intermedium* colonies never accumulates glutamate (fot. 1). By the other hand, a mixed culture with *P. intermedium*, and *C. intermedium* C3 can easily be separate, on the fact that the former attacks lactose very slowly. It is enough to sprade a sample from the mixed culture on McConkey's plate, to know easily colonies of both organisms, after 24 hr incubation at 30°C. Starting from these facts, about $0,5 \times 10^6$ *Citrobacter intermedium* C3 cell/ml, and $5,9 \times 10^6$ *P. intermedium* cells were mixed in the mentioned culture medium. Then aliquote portions from

this mixed population were inoculated on McConkey, after 24 hr incubation at 30°C *P. intermedium* ATCC 1166 colonies were remove on plates, and the colonial analysis for glutamate segregation was done with *L. mesenteroides* P-60. In this way it has been possible to obtain *P. intermedium* colonies, which accumulate glutamate, as did A type, *C. intermedium* C3 colonies (fig. 2). At present, it has been carried 6 experiments on S factor transfer from *C. intermedium* C3 to *P. intermedium*, as the preceding one. In five of them is was got *Paracolobactrum* colonies with *Leuconoctoc* growth (Table I).

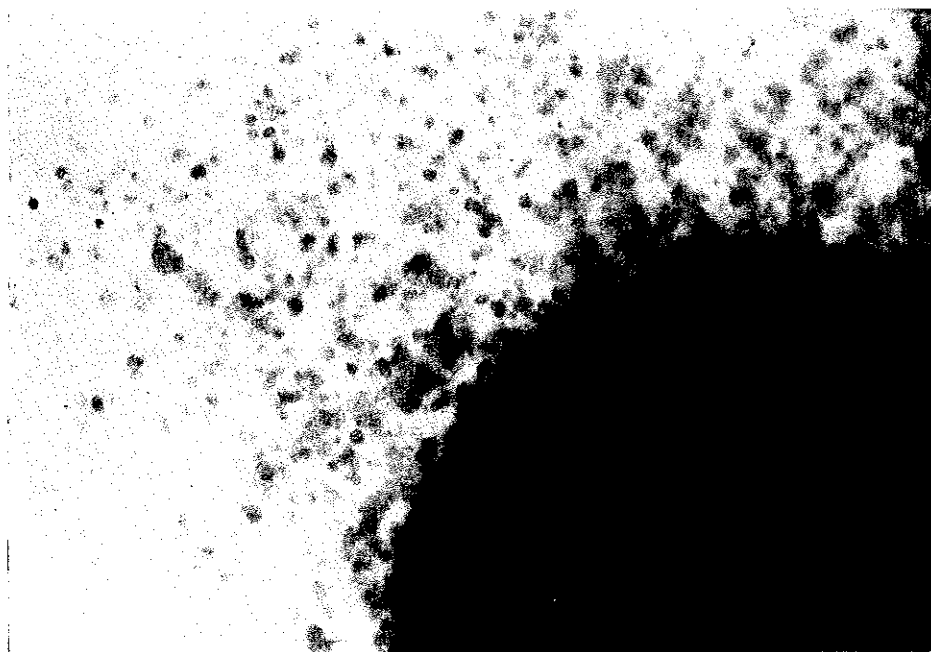


FIG. 2. — Desarrollo de *L. mesenteroides* P-60 alrededor de una colonia de *P. intermedium* ATCC 1166 segregadora de glutamato.

BIBLIOGRAFIA

1. CLOTET, R.
1968 Tesis Doctoral. Madrid.
2. GUINEA, J.
1966 Tesis Doctoral. Barcelona.
3. GUINEA, J. y PARES-FARRAS, R
1966 III Jornadas Luso-españolas de Genética. Madrid.

4. HERNÁNDEZ, S.
1968 Tesis Doctoral. Univ. de Barcelona.
5. JACOB, F. y WOLLMAN, E. L.
1961 Sexuality and the genetics of Bacteria. Academic Press, N. Y.
6. MEYNELL, S., MEYNELL, G. G. y DATTA, N.
1968 *Bacteriol. Rev.*, **32**, 55.
7. NOVICK, R. P.
1968 Staphylococcal Plasmids. 53rd. General Meeting, Soc. Gen. Microbiol., Edinburgh.
8. PARES, R., GUINEA, J. y CLOTET, R.
1965 Excreción de aminoácidos por un coliforme. III Reunión Bioquímicos Españoles. Oviedo.
9. PARES, R.; GUINEA, J. y HERNÁNDEZ, S.
1968 Inestabilidad genética de la producción de ácido glutámico en *Citrobacter intermedium* C₃. Conferencia en Centro Investigaciones Biológicas. Madrid.
10. STOCKER, B. A. D. y SMITH
1962 *J. Gen. Microbiol.*, **28**, 671.
11. WATANABE, T.
1963 *Bacteriol. Rev.*, **27**, 87-115.

Alterações cromosómicas em doentes injectados com dióxido de tório*

por A. A. TEIXEIRA-PINTO

Centro de Estudos de Histologia e Embriologia
«Celestino da Costa» do Instituto de Alta Cultura
Faculdade de Medicina de Lisboa, Universidade de Lisboa
(Dir.: Prof. M. J. Xavier Morato)

Como meio de contraste radiológico, principalmente com o objectivo de visualizar os vasos, o dióxido de tório, foi largamente utilizado com a designação comercial de “Thorotrast”.

Em todo o mundo o número de doentes injectados, foi superior a 50.000 (1, 2), não sendo de estranhar que em Portugal, berço da arteriografia, a percentagem seja elevada. Na realidade foram injectados mais de 2.000 indivíduos para uma população de cerca de oito milhões. Em 1966 ainda sobreviviam 387 (3). O período de maior utilização do “Thorotrast” foi de 1931 a 1945, ano em que vários autores chamaram a atenção para os perigos da sua toxicidade.

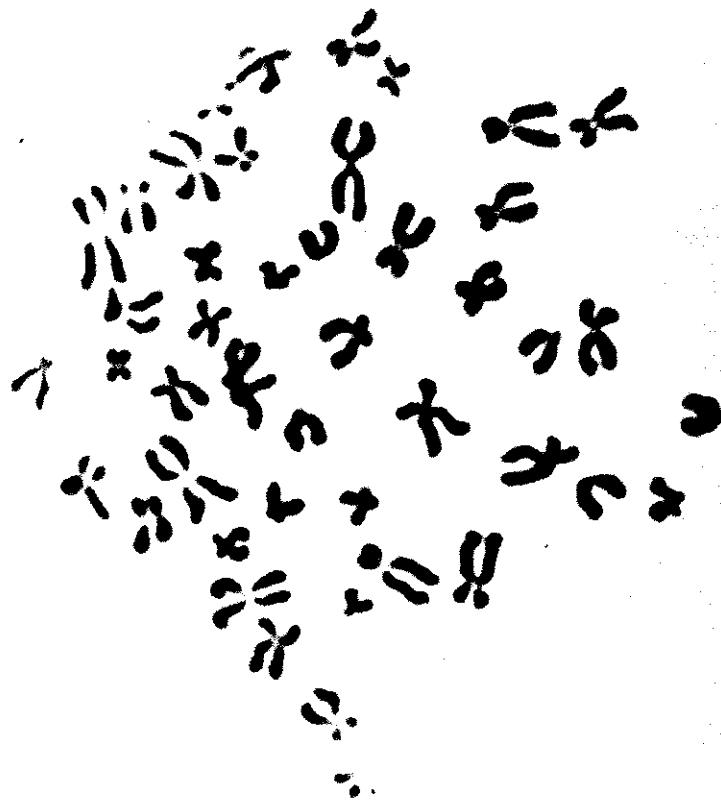
Os estudos dos cromosomas de doentes injectados, mostra-se de um extraordinário interesse sob o aspecto médico e radiobiológico.

São bem conhecidos e têm sido estudados os efeitos celulares das radiações ionizantes e das lesões cromosómicas que provocam “in vitro” e “in vivo”.

Os primeiros estudos foram feitos por BENDER em 1957 e depois por PUCK que iniciaram uma série de investigações em diversos mamíferos e no Homem (4, 5).

Recentemente e com a técnica da cultura de leucocitos de sangue

* Doentes do «Grupo Português para estudo dos efeitos colaterais do dióxido de tório». Director - Prof. Doutor Jorge da Silva Horta.



SL 98

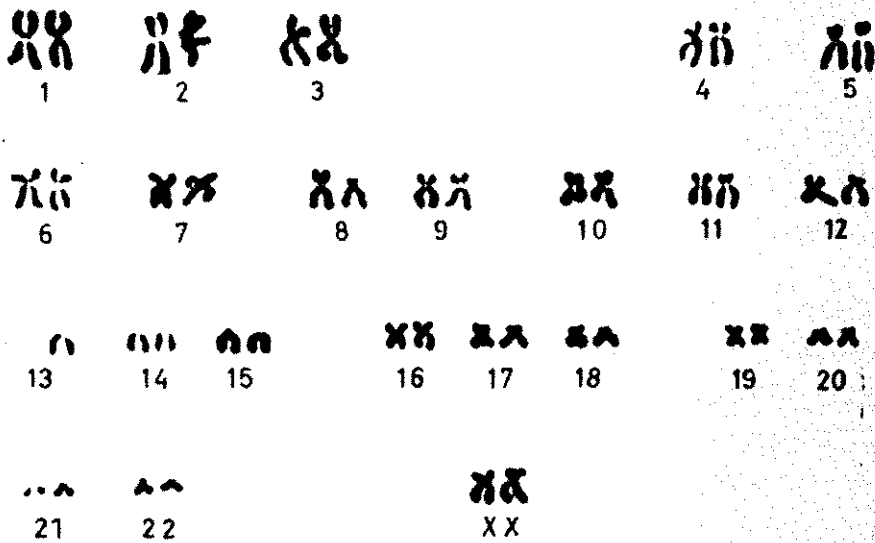


FIG. 1. Placa com 45 cromosomas, e respectivo cariotipo. Monosomia do par 13. Deficiência terminal de um dos elementos do par 8.

SL 85

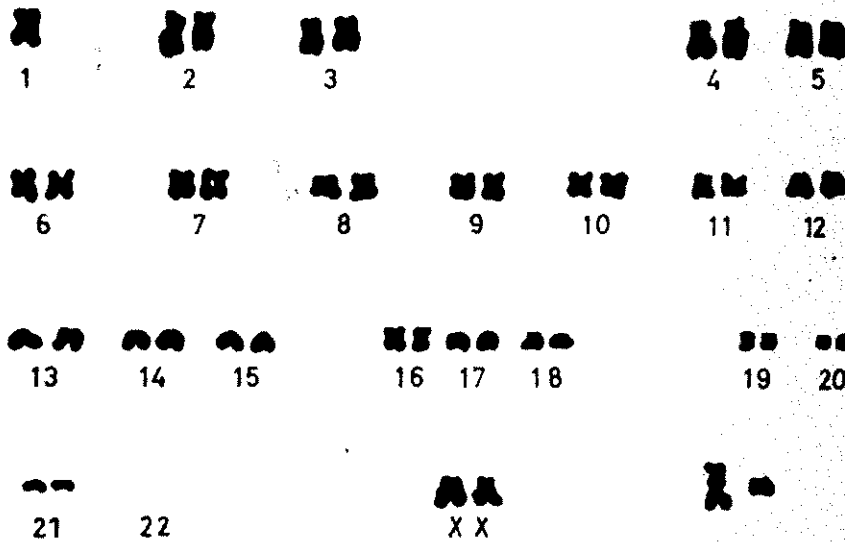


FIG. 2. Cariotipo com nulissomia 22, monossomia 1, dicêntrico e fragmento.

SL 98

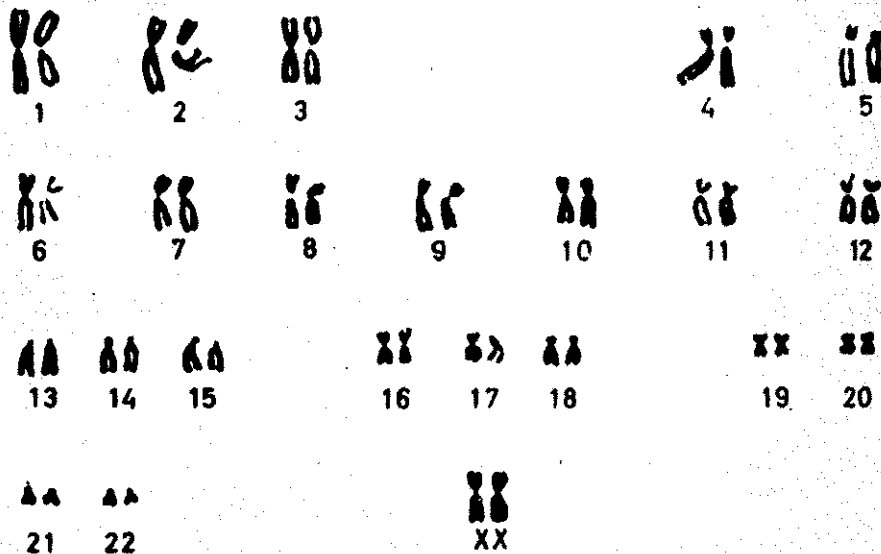


FIG. 3. Cariotipo com fractura cromatídica de um dos elementos do par 4.



SL-112/1

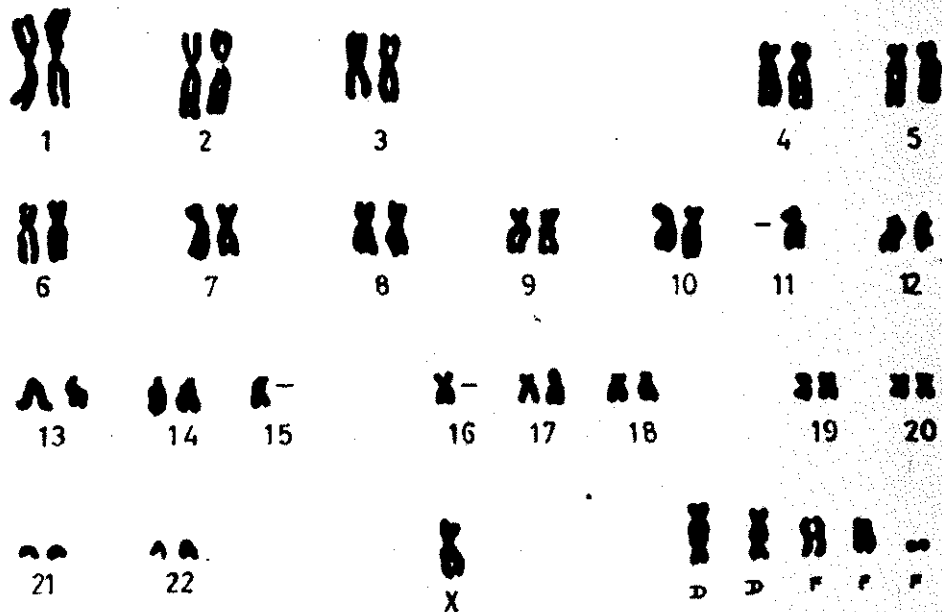


FIG. 4. Placa metafásica e respectivo cariotipo apresentando várias monossomias, dicêntricos (D) e vários fragmentos (F).

periférico têm sido observadas alterações cromosómicas em indivíduos radiografiados para fins de diagnóstico (6), pessoal técnico profissionalmente exposto a radiações (7), doentes sujeitos a radioterapia (8) e pessoas acidentalmente expostas a radiações (9). Em contraste com todas estas situações agudas, os doentes injectados com dióxido de tório apresentam-se com um quadro de irradiação crónica. Na maioria dos casos, com mais de 20 anos de injeção.

Tendo sido recentemente iniciados os estudos citogenéticos dos nossos casos, não podemos deixar de nos impressionar com o número e variedade de lesões cromosómicas encontradas. Sem caracter específico não se afastam das descritas pela maioria dos autores, relativamente às produzidas em cultura de leucocitos "in vitro" (10).

Para este estudo a técnica usada, foi a de MOORHEAD, ligeiramente modificada. Os esfregaços foram examinados, após coloração pela orceína a 1 %, em contraste de fase. As preparações foram tornadas permanentes depois de hidrólise e coloração com o azul de UNNA.

Dos sete casos em estudo só no último começamos a interromper as culturas às 48 horas. Com períodos de incubação de 72 horas ou mais parece correr-se o risco de se encontrar um menor número de anomalias (11).

Os fragmentos acêntricos, cromosomas dicêntricos, com ou sem fragmentos acompanhantes e as situações de hipoploidia, entre as culturas das 48 e das 72 horas, não nos parecem apresentar diferenças significativas.

Duma forma geral parece-nos haver, nos casos estudados, um número de células poliplóides superiores ao que é habitual nas nossas culturas de indivíduos normais. São frequentes as situações de aneuploidia, principalmente por hipoploidia. Muitos cariotipos mostram polisomias, monosomias e nulissomias. As lesões cromosómicas revelam-se por formas com deficiências terminais, vários centrómeros (di ou tricêntricos) e outras inclassificáveis.

Temos encontrado também cromosomas que se assemelham ao tipo K2 de DE GROUCHY.

Não nos parecem invulgares as lesões cromatídicas. Estas apresentam-se como zonas acromáticas ou fracturas, em percentagens que se nos afiguram superiores ao normal.

BIBLIOGRAFIA

FISCHER, P. e col.

1966 *Radiation Research*, **29**: 505.

1967 *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **145**: 759.

HORTA, J. DA S. e L. CAYOLLA DA MOTTA

1967 *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **145**: 830.

1964 *Radiation Res.*, **23**: 282.

BENDEK, M. A.

1957 *Science* **126**: 974.

PUCK, T. T.

1958 *Proc. nat. Acad. Sci.*, **44**: 772.

CONEN, P. E.

1961 *Lancet ii*, **47**.

NORMAN, A. e col.

1960 *Lancet ii*, 849.

TOUGH, I. M. e col.

BENDER, M. A. e P. C. GOOCH

1963 *Radiation Res.*, **18**.

MOURIQUAND, C. e col.

1966 *CEA-R 3007*.

ABBATT, J. D.

Comunicação pessoal.

Um caso de amenorreia primaria com provavel transloção Y/D

por M. C. FRIAS DÉ SÁ (1)

Instituto de Histologia e Embriologia
Centro de Estudos de Histologia e Embriologia
«Celestino da Costa» do Instituto de Alta Cultura
Faculdade de Medicina de Lisboa, Universidade de Lisboa
(Dir.: Prof. M. J. Xavier Morato)

Trata-se de um caso que não é inédito e já foi publicado em conjunto com o sr. Doutor Silveira Botelho, no número de Julho-Agosto da Revista Ibérica de Endocrinologia, mas cuja presença se justifica pela sua invulgaridade. Julgamos ser o segundo caso mundial de translocação Y/D. O primeiro foi publicado recentemente por FEDERMAN e col.

O síndrome XYY conhecido de todos, origina um quadro clínico bem definido, cuja característica principal é o comportamento de tipo anti-social. No entanto, se nem todas as células de um individuo forem XYY, isto é, se houver um mosaico de células anormais XYY e de células normais XY, provavelmente o quadro clínico será diferente. Aliás é o que sucede em outras situações de mosaico em que a intensidades da sintomatologia clínica depende da proporção de células com constituição cromosómica anormal.

Ao efectuar-se o estudo citogenético familiar de uma doente com anomalia cromosómica de difícil interpretação, encontrou-se num dos progenitores uma situação de mosaico XY/XYY. Tratava-se do pai da nossa doente, um individuo de 65 años de idade sem quaisquer queixas e foi perante este achado que se conseguiu interpretar um cromosoma anómalo existente na nossa doente como o resultado de uma translocação de um cromosoma Y, um dos cromosomas do grupo D (fig. 1).

(1) Bolseira do Instituto de Alta Cultura. Segundo Assistente de Biologia Médica.

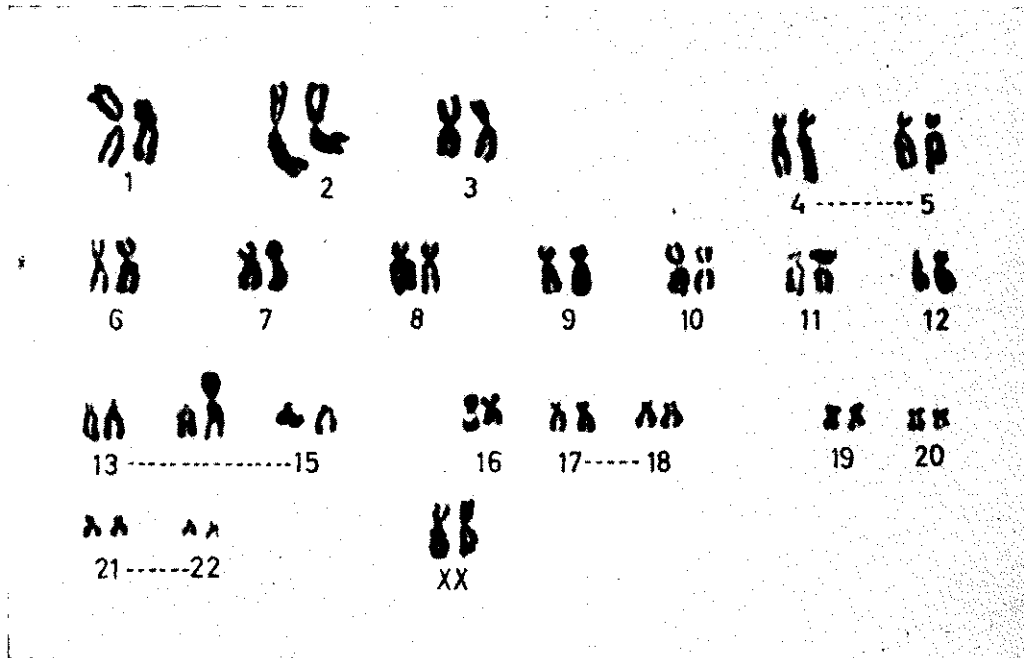


FIG. 1

A doente é um individuo fenotipicamente feminino de 27 anos de idade que se queixa de amenorreia primária. Ao exame objetivo tem proporções e características eunucoides, hipoplasia mamária muito acentuada, mamilos planificados e distribuição pilosa do tipo feminino. A laparotomia mostrou um útero hipoplásico, ovários pequenos do tamanho de avelãs com albuginea espessa e ligados ao útero por cordões fibrosos. A biópsia ovárica revelou um reduzido número de folículos primordiais e um pequeno quisto da granulosa. Os doseamentos hormonais mostraram hipoestrogenismo e título elevado de gonadotrofinas.

Perante este quadro clínico de difícil interpretação recorreu-se ao estudo citogenético.

O sexo cromatínico mostrou que somente 3,2 % das células possuíam cromatina de Barr. As contagens de cromosomas obtidas a partir de culturas de leucocitos de sangue periférico deram como moda 46.

Número de cromosomas	45	<	45		46		47	>	47
Número de células	—		2		48		—		—

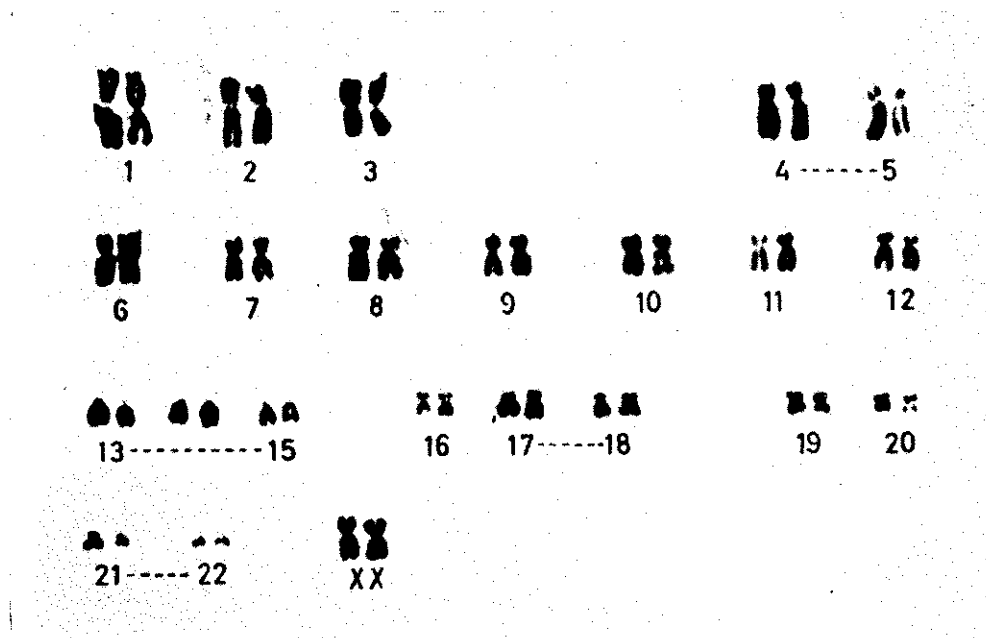


FIG. 2

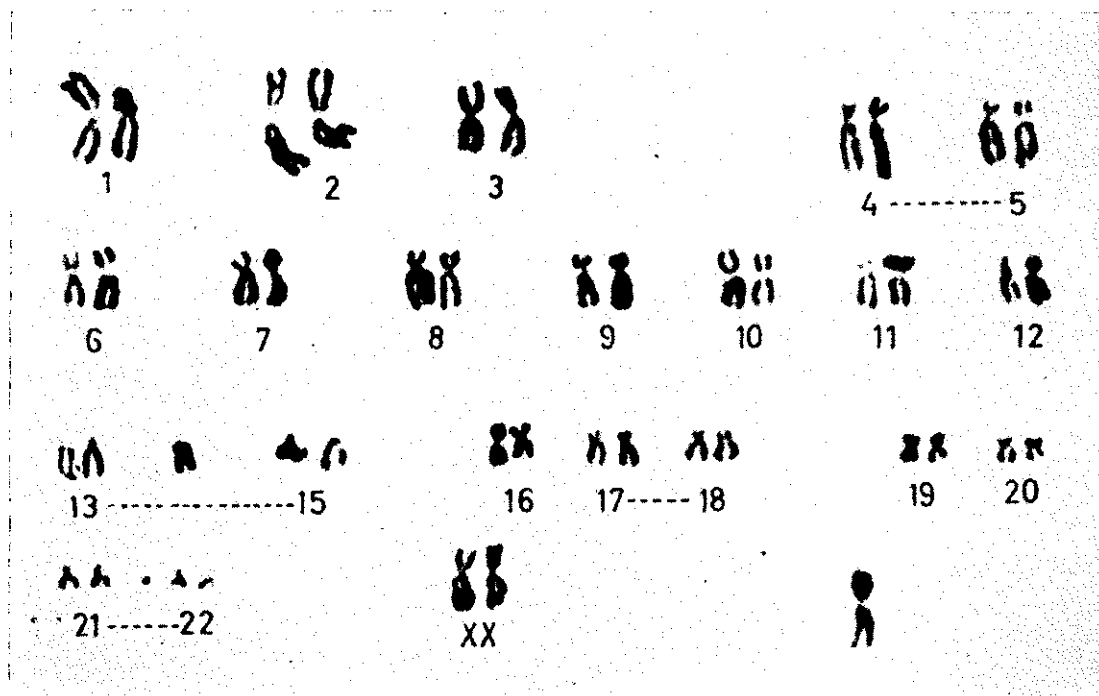


FIG. 3



FIG. 4

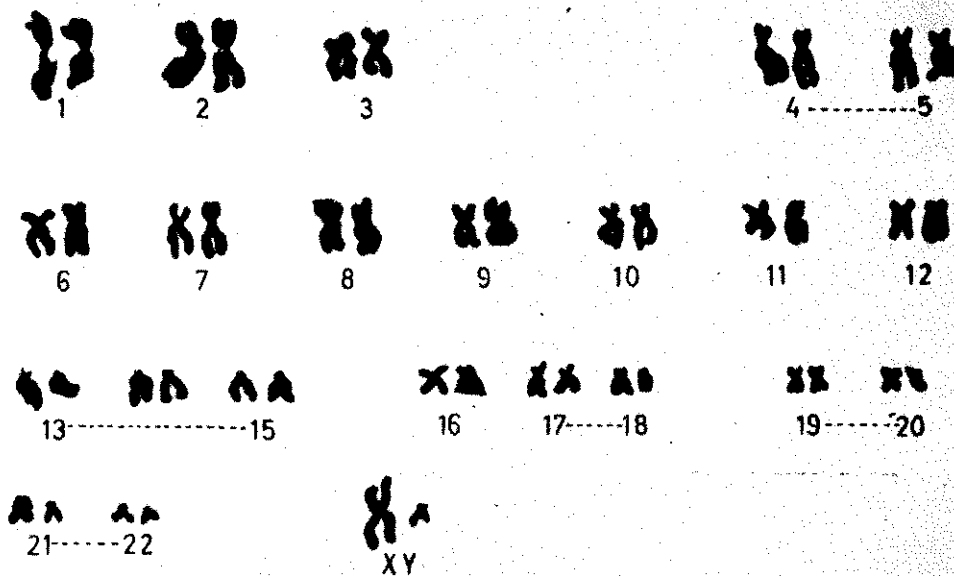


FIG. 5

Ao efectuarem-se os cariotipos verificou-se a presença de mosaico de cariotipos normais (fig. 2) e cariotipos anormais embora todos da fórmula 46/XX (fig. 3). Os cariotipos anormais caracterizaram-se pela existência de um cromosoma anómalo semelhante aos do grupo 6-12 e pela falta de um cromosoma do grupo D (figura 13-15).

Fez-se o estudo citogenético familiar e à excepção do pai da doente os restantes familiares apresentaram resultados completamente normais. O pai tinha sexo cromatínico negativo e como já se disse um mosaico XYY/XY (figs. 4 e 5).

As contagens deram os seguintes resultados:

Número de cromosomas	45 <	45	46	47	> 47
Número de células	—	—	34	8	—

Em face deste facto admite-se que a doente proviria de um zigoto 47/XXY em que o cromosoma Y se teria translocado para um autossoma em algumas células enquanto noutras teria havido atraso (lag) do mesmo cromosoma Y. Este zigoto de 47 cromosomas do tipo 47/XXY teria resultado da fecundação de um óvulo normal 23/X por um espermatozóide anormal 24/XY. Teòricamente pode admitir-se que o pai da doente XY/XYY teria originado quatro tipos de espermatozóides: 23/X, 23/Y, 24/XY e 24/YY. A favor desta hipótese cite-se o facto de este individuo ter filhos de ambos os sexos cariològicamente normais.

O fenotipo feminino deve estar relacionado com a perda de material cromosómico que geralmente sucede nas translocações e também com a presença de cariotipos normais.

BIBLIOGRAFIA

BOTELHO, L. S. e FERNANDES, M. F.
1958 *J. do Médico*, 36: 825.

FEDERMAN, D., DAVIDOFF, F. M., OVELLETE, C.
1967 *J. Med. Genet.*, 4: 36.

MOORHEAD, P. S. e col.
1960 *Exp. Cell Res.*, 20: 613.

Anomalia cromosómica em doente oligofrénica

por M. C. FRIAS DÉ SÁ (1)

Instituto de Histologia e Embriologia
Centro de Estudos de Histologia e Embriologia
«Celestino da Costa» do Instituto de Alta Cultura
Faculdade de Medicina de Lisboa, Universidade de Lisboa
(Dir.: Prof. M. J. Xavier Morato)

O atraso mental é um sinal clínico comum a muitas anomalias cromosómicas. Surge principalmente nos quadros clínicos que têm como fundamento uma anomalia dos autosomas; citem-se como exemplos os síndromas de Patau, de Edwards, do "cri du chat" e o síndrome de Down. Neste último caso, o atraso mental pode ser mais ou menos marcado, o que depende da percentagem de células com 47 cromosomas. Nas anomalias dos heterocromosomas também há alterações mentais; são bem conhecidas as anomalias do comportamento de tipo anti-social nos indivíduos com síndrome XYY e a debilidade mental das mulheres com síndrome triplo X.

Como é sabido, a interpretação de determinado tipo de anomalia cromosómica, sobretudo quando não se enquadra nos síndromas clássicos, só é possível em conjugação com o quadro clínico.

A amenorreia primária leva-nos sempre a procurar uma anomalia dos heterocromosomas, embora já estejam descritas aberrações dos autosomas em doentes com este sintoma.

As alterações bioquímicas que aparecem nestas situações têm sido recentemente objecto de muitos estudos. Os defeitos enzimáticos melhor pesquisados têm sido os do síndrome de Down: a fosfatase alcalina, a galactose-1-fosfato-uridil-transferase e o metabolismo da triptofana. Presume-se que o gene responsável pela síntese da glucose-6-fosfato desidrogenase se localiza no cromosoma X.

(1) Bolseira do Instituto de Alta Cultura. Segundo Assistente de Biologia Médica.

QUADRO CLINICO

Individuo do sexo feminino de 19 anos de idade, nascida de gravidez de termo, e parto eutócico. Não há referência a ingestão de medicamentos durante os três primeiros meses de gravidez. Não há malformações congénitas ou adquiridas na história familiar.

Na altura do nascimento o pai da doente tinha 39 anos e a mãe 26 anos de idade.

O desenvolvimento físico e psíquico cedo se revelou anormal. Os familiares notaram que a criança tinha pouca vivacidade com atraso estatural. Apresentava tendência para balancear continuamente o tronco numa oscilação transversal de grande amplitude. A partir dos sete anos começou a engordar; aos nove anos notava-se já uma desproporção entre o comprimento do tronco e dos membros. Nunca foi menstruada.

A observação nota-se um acentuado atraso mental (idade mental de 6 años avaliada pelo teste de Terman-Merril). Tem 130,5 cm. de estatura, 127 cm. de envergadura e 57,5 cm. de altura de membros inferiores. Pescoço curto, hipoplasia mamária. Distribuição pilosa do tipo feminino. Abdomen globoso. Panículo adiposo com 3-4 cm. de espessura. Na facies há hirsutismo acentuado com hipertricose patente nos supracílios e lábio superior, não há qualquer deformação da abóbada palatina.

No exame ginecológico observou-se uma vulva infantil sem quaisquer outras anomalias. De entre os exames complementares efectuados, o único que se revelou anormal foi o teor de excreção do cortisol urinário com valores de 586 μ .g/24 h (valor normal máximo 150 μ .g/24 h).

ESTUDIO CITOGENÉTICO

O sexo cromatínico efectuado nos esfregaços de células de mucosa bucal, mostrou 62 % das células com cromatina de Barr. Nunca se encontrou duplicação do corpusculo de Barr.

As contagens de cromosomas obtidas a partir de culturas de leucocitos de sangue periférico, segunda a técnica de Moorhead e col. com ligeiras modificações deram os seguintes resultados:

Número de cromosomas	45	<	45		46		47	>	47
Número de células	—		—		—		79		—

Encontrou-se portanto um cromosoma supranumerário. Este é sempre do mesmo tipo, com um aspecto morfológico semelhante a um grande acrocentrico (grupo D) mas desprovido de satélites (figs. 1 e 2).

DISCUSSAO E CONCLUSOES

Segundo os conhecimentos actuais a classificação dos cromosomas segue um critério exclusivamente morfológico e como tal surgem dificuldades inerentes a esse tipo de classificação, sobretudo quando os cromosomas são de morfologia anormal.

No caso que se descreve existe um cromosoma supranumerário de difícil classificação.

O aspecto morfológico deste cromosoma supranumerário poderia levar a pensar numa trisomia do grupo D (13-15) dado que nem todos os cromosomas deste grupo têm satélites.

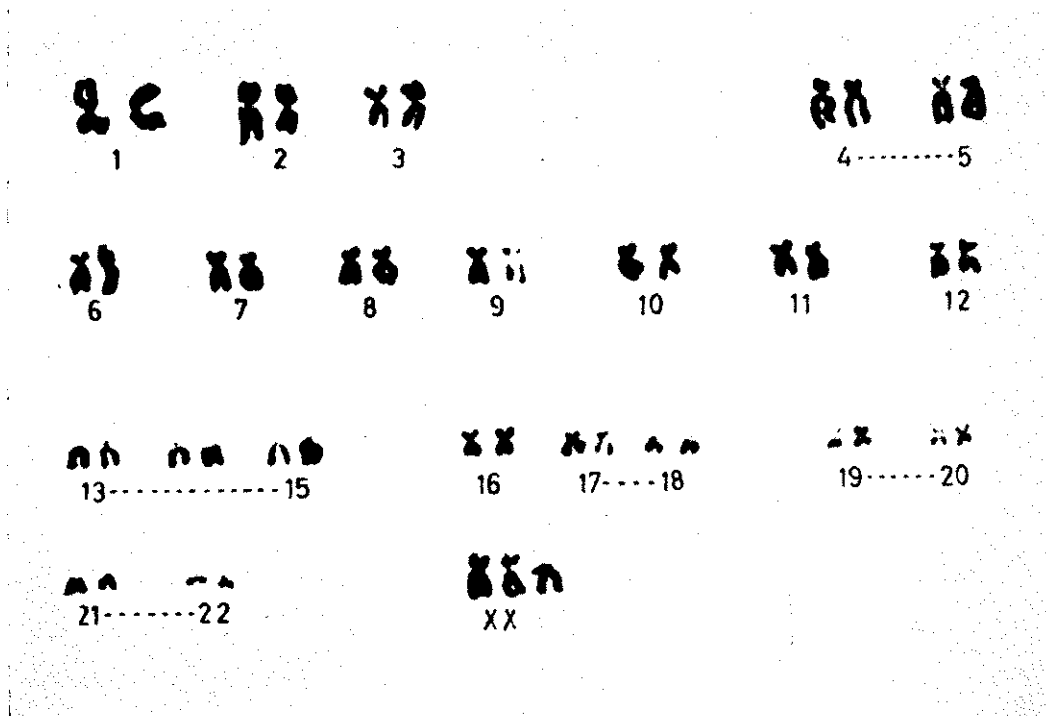
No entanto o síndrome Patau, característico deste tipo de trisomia é tão bem conhecido dos citogenetistas e dos pediatras, tem um quadro clínico muito bem definido, com múltiplas anomalias externas e internas, que não permitem grande sobrevivência e que de forma alguma corresponde à sintomatologia do caso que se acaba de descrever.

Como não existe meio seguro de distinção entre os cromosomas do grupo 13-15, poderia admitir-se que este cromosoma supranumerário resultasse de uma duplicação de um outro par do grupo D, distinto do que origina o síndrome de Patau. Sabe-se que quanto maior for o tamanho de um autossoma supranumerário, maiores serão as lesões orgânicas que não permitem grande longevidade.

É por isso que perante esta doente com debilidade mental e amenorreia primária se admitiu que a situação resultasse de uma triplicação dos grandes braços do cromossoma X.

Situação semelhante embora não sobreponível foi descrita por J. EDWARDS em 1961.

Para a maioria dos investigadores os grandes braços do cromossoma X, são os responsáveis pelo aparecimento do corpusculo cro-



matínico de Barr. Admite-se que o número de corpusculos que se encontra em cada célula é inferior em uma unidade ao número de cromosoma X. Portanto no síndrome de Turner (XO) o sexo cromatínico é negativo, na mulher normal (XX) só se encontra um corpusculo, no síndrome do triplo X surge uma duplicação do referido corpusculo, etc. Não se encontrou duplicação do corpusculo de Barr nas células observadas a partir de esfregaços de mucosa bucal da nossa doente, pelo que se admite que no material triplicado não exista a fracção responsável pelo seu aparecimento.

BIBLIOGRAFIA

- EDWARDS, J. H.
1961 *The lancet*, 1: 616.
- JACOBS, C. A. e col.
1961 *The Lancet*, 1: 1183.
- MANN, J. e col.
1965 *Amer. J. H. Gent.*, 17: 377.
- MOORHEAD, P. S. e col.
1960 *Exp. Cell Res.*, 20: 613.

Viabilidad dependiente de las frecuencias génicas en varios mutantes de *Drosophila melanogaster**

por G. RIBO y A. PREVOSTI

Centro de Genética Animal y Humana del C. S. I. C.
y Departamento de Genética, Facultad de Ciencias, Universidad de Barcelona.

WRIGHT y DOBZHANSKY (1946) sugirieron que una de las posibilidades para explicar el equilibrio alcanzado por las frecuencias de las ordenaciones del 3.^{er} cromosoma de *Drosophila pseudoobscura* en cajas de poblaciones fuese que los coeficientes de selección de dichas ordenaciones dependieran de las frecuencias de las mismas. No obstante, la hipótesis alternativa de la superioridad de los heterocigotos ha sido posteriormente no sólo la admitida para explicar este caso, sino que ha gozado de especial favor para explicar los casos de polimorfismo y, de una manera más general, la conservación de la variabilidad en las poblaciones.

Desde la publicación del anterior trabajo hasta fecha reciente, pocos han sido los datos experimentales publicados demostrativos de variación de los coeficientes de selección dependiente de las frecuencias génicas. Entre ellos, LEVENE, PAVLOVSKY y DOBZHANSKY (1954) encuentran que los valores adaptativos de los cariotipos para tres ordenaciones del 3.^{er} cromosoma de *D. pseudoobscura* no sólo dependen del ambiente físico y de las condiciones del alimento, sino también de los demás cariotipos presentes en la misma población. LEWONTIN (1955) analiza la viabilidad de diversas cepas normales de *Drosophila melanogaster*, la mayor parte de ellas homocigóticas para el 2.^o cromosoma, y una cepa *white*. Concluye que la

* Este trabajo se ha realizado durante el disfrute por el primer autor de una beca del P.I.O. y de una ayuda del F.I.U. por el segundo autor.

viabilidad del genotipo es función de los demás genotipos que coexisten con él, no pudiéndose predecir el resultado de una determinada combinación a partir de las viabilidades de los genotipos probados por separado. SPIESS (1957), al analizar los valores selectivos de tres ordenaciones del 3.^{er} cromosoma de *D. persimilis* y de sus combinaciones, deduce que el valor selectivo de los diferentes cariotipos varía con su frecuencia y la de los demás que existen en la población.

Entre los trabajos recientes que tienden a dar importancia a la posibilidad sugerida por WRIGHT y DOBZHANSKY está el de TOBARI y KOJIMA (1967), según el cual, cuando una ordenación de las analizadas por ellos en *D. ananassae* es muy frecuente está sujeta a fuerte selección adversa, mientras que la otra es favorecida, y si ésta es la más frecuente se invierten los términos. KOJIMA y YARBROUGH (1967) prueban una situación análoga para los alelos que regulan la síntesis de las variantes de la esterasa 6 en *D. melanogaster*.

Datos en el mismo sentido pero referidos a la selección sexual se han obtenido por PETIT (1958), por EHRMAN, SPASSKY, PAVLOVSKY y DOBZHANSKY (1965) y EHRMAN (1966).

Con el objeto de ver hasta qué punto es un fenómeno frecuente la dependencia de los coeficientes de selección de las frecuencias génicas, se ha planeado el siguiente trabajo en el que se prueban cinco mutantes diferentes de *D. melanogaster* escogidos al azar entre las cepas cultivadas en nuestro laboratorio. Con ello se pretende contribuir a esclarecer la cuestión planteada en los trabajos recientes, como los de KOJIMA y YARBROUGH, de si esta relación puede ser una alternativa importante para explicar la conservación del polimorfismo en las poblaciones, respecto de la explicación clásica de la superioridad de los heterocigotos. De ser así, en las poblaciones en equilibrio el lastre genético real se reduciría a un mínimo.

MATERIAL Y METODOS

Se han utilizado cinco cepas mutantes de *Drosophila melanogaster* y una cepa normal. Esta última procede de una muestra

recogida en Prat de Llobregat en 1964, así como los mutantes *white* (w), *sepia* (s), *quetas finas* (qf) y *caramel* (ca), que se encontraron en la descendencia de individuos de la misma muestra. El quinto mutante, *hairy wing* (hw), procede del Institute of Cancer Research, de Philadelphia.

De cada uno de los cinco mutantes en competencia con normal se estudian dos niveles de densidad de población y, dentro de estos niveles, tres proporciones distintas del mutante respecto a normal, haciéndose además cinco réplicas de cada combinación de densidad de población-proporción del mutante. Las dos densidades de población se obtuvieron sembrando en frascos de cultivo con 25 cm³, aproximadamente, del medio usual de maíz-agar para *Drosophila*, 100 o bien 800 huevos, respectivamente. Las proporciones de mutante y normal utilizadas han sido de 20 % y 80 %, 50 % y 50 %, y 80 % y 20 %, correspondientemente.

RESULTADOS

I) Efecto de las proporciones de los genotipos.

En el cuadro I se da el modelo de análisis de la varianza utilizado para estudiar los efectos de las diferencias en las propor-

CUADRO 1.—*Viabilidad relativa de la cepa mutante sepia en competencia con la normal, a distintas frecuencias.*

Réplicas	Frecuencias		
	80 +/20 se	50 +/50 se	20 +/80 se
1	1,3091	1,2500	0,4412
2	1,2143	1,0769	0,7895
3	0,7619	1,0000	0,5735
4	0,7547	1,8235	0,6111
5	1,7000	1,0000	0,8889

Análisis de la varianza			
	gl	sc	σ^2
Entre proporciones	2	0,9470	0,4735
Dentro proporciones	12	1,2477	0,1040

F = 4,5529

0,01 < P < 0,05

ciones de genotipos sobre la viabilidad relativa de los mismos. Se toma como modelo el caso correspondiente a *sepia*. Para dicho análisis se expresa la viabilidad relativa como el cociente entre el porcentaje de moscas mutantes desarrolladas respecto del de moscas normales. La varianza de dichos cocientes entre las distintas proporciones se prueba respecto de la varianza dentro de las mismas.

En el cuadro II se da la viabilidad relativa de los mutantes para cada proporción de genotipos. Con densidad de población baja se observa que en cuatro casos (*se*, *w*, *hw* y *qf*), la viabilidad re-

CUADRO 2. — Viabilidad relativa de las cepas mutantes respecto de la normal.

	80+/20 mut. 640+/60 mut.		50+/50 mut. 400+/400 mut.		20+/80 mut. 160+/640 mut.		Razón de las varianzas	
sepia	1,148	1,171	1,230	0,721	0,661	1,050	4,553 *	0,584
white	0,948	0,258	0,413	0,270	0,306	0,267	5,461 *	0,006
hairy-wing	1,002	0,484	0,555	0,638	0,471	0,397	3,140 -	0,850
quetas finas	1,061	0,720	0,939	0,843	0,695	0,909	0,999	0,518
caramel	0,862	0,962	0,984	0,646	1,167	1,172	0,307	0,589

0,05 > P > 0,01 *

0,1 > P > 0,05 -

lativa de los mutantes aumenta al disminuir su proporción. En dos de estos casos (*se* y *w*), estas diferencias de viabilidad son estadísticamente significativas, y en otro caso (*hw*), se aproximan al nivel de 0,05, mientras que en el cuarto (*qf*), no son significativas. En el mutante *ca*, de existir alguna relación entre su viabilidad y su frecuencia, sería la inversa que en los demás mutantes, pero las diferencias halladas no son, en absoluto, significativas.

Al nivel más alto de densidad de población, en cambio, no se observan tendencias regulares en la variación de las viabilidades relativas en relación con las proporciones de los genotipos y, además, en ningún caso las diferencias existentes son significativas.

II) *Efecto de la densidad de población sobre la viabilidad relativa de los genotipos mutantes.*

En el cuadro II, comparando las viabilidades relativas de los mutantes a baja y a alta densidad, se observa que en la mayor parte de los casos éstas disminuyen al aumentar la densidad de población. No obstante (véase cuadro III), sólo en tres casos esta disminución es significativa estadísticamente, si bien no lo es en ninguno de los casos en que la cifra de viabilidad relativa es más alta cuando la densidad es mayor.

CUADRO 3. — *Resultados del análisis de la varianza entre densidades de población para las diferentes proporciones de los genotipos en cada cepa mutante.*

	80+/20 mut. y 640+/160 mut	50+/50 mut. y 400+/400 mut.	20+/80 mut. y 160+/640 mut.
sepia	0,0061	5,1373	0,7162
white	8,4900 *	1,3643	0,1705
hairy wing	11,1347 *	0,1275	0,1537
quetts finas	2,5445	0,1320	1,0745
caramel	0,1583	0,6938	0,00006

0,05 > P > 0,01 *

CUADRO 4. — *Promedio de la viabilidad absoluta de la cepa normal según su proporción y densidad de población, considerando conjuntamente todos los mutantes.*

80+/20 mut.	50+/50 mut.	20+/80 mut.
58,88	67,87	68,40
640+/160 mut.	400+/400 mut.	160+/640 mut.
53,17	49,06	52,91

III) *Viabilidad de la cepa normal.*

A baja densidad de población, la viabilidad absoluta de la cepa normal, considerando en conjunto todas las pruebas realizadas con los diferentes mutantes para cada una de las proporciones de competencia, presenta tendencia a aumentar cuando la proporción de

la cepa normal en la población es más baja. Cuando la densidad de población es elevada disminuye la viabilidad general de la cepa normal en todas las proporciones de competencia. En este caso dicha viabilidad no parece afectada por la variación de las proporciones de los genotipos en competencia.

Otro punto analizado respecto a la viabilidad de la cepa normal es si está afectada distintamente por los diversos mutantes con que se ha puesto en competencia. Las razones de las varianzas de dicha viabilidad entre las pruebas con distintos mutantes y entre las réplicas de las pruebas con cada mutante se dan en el cuadro V. Indican que en tres de los seis casos investigados la viabilidad de la cepa normal presenta diferencias en función de las cepas mutantes con las que se ha establecido la competencia, que no es probable sean debidas al azar. Estas diferencias estadísticamente significativas se encuentran tanto con la densidad de población baja como con la alta.

CUADRO 5.— *Resultados del análisis de la varianza de la viabilidad de la cepa normal en competencia con los distintos mutantes.*

80+/20 mut.	50+/50 mut.	20+/80 mut.
0,1393	0,5265	5,1089 *
640+/160 mut.	400+/400 mut.	160+/640 mut.
5,8679 *	1,8476	6,3900 *
0,01 > P > 0,001 *		

DISCUSION

Los datos estudiados parecen indicar que la variación de la viabilidad en función de las frecuencias génicas y, por tanto, de los coeficientes de selección en cuanto éstos vienen afectados por la viabilidad, sea un fenómeno bastante general cuando la densidad de la población es baja. Además, la relación hallada indica aumento de la viabilidad de los genotipos cuando su frecuencia disminuye. Esta relación puede explicar que en las poblaciones se llegue a un equilibrio, con conservación de diferentes variantes genéticas.

Cien huevos sembrados en 25 cm³ del medio usual de *Drosophila* determinan poca competencia entre las larvas que se desarrollan, aunque ésta no es nula. Que en estas condiciones se dé la influencia de las proporciones de los genotipos sobre la viabilidad y no cuándo se siembran 800 huevos y la competencia es fuerte podría indicar que este efecto no debe ser tan importante en las poblaciones cuyo número de individuos está limitado por factores dependientes de la densidad. En cambio, en poblaciones cuyo número de individuos viene regulado por factores independientes de la densidad en el sentido de ANDREWARTA y BIRCH (1954), habría mayor probabilidad de que los coeficientes de selección estuviesen afectados por las frecuencias génicas.

El hecho de que, como también demuestran los datos del presente trabajo, la viabilidad relativa de los mutantes tienda a disminuir cuando se incrementa la densidad de población, indica que el efecto de la competencia sobre ellos es más fuerte en estas condiciones. Por esto, quizás incluso cuando hay sólo 20 % de individuos mutantes, éstos, cuyo número absoluto es de 160, son suficientes para "saturar" el ambiente que explotan, por lo que no encuentran ventaja respecto a números mayores de competidores. Esta posibilidad plantea el interés de estudiar qué ocurriría a densidades altas de población si la proporción de mutantes se redujera por debajo del 20 %.

Que la viabilidad absoluta de la cepa normal esté afectada por la proporción de los genotipos a poca densidad de población y que disminuya y se iguale para las diferentes proporciones genotípicas en la densidad alta, está de acuerdo con el comportamiento de la viabilidad relativa de los mutantes. Por otra parte, las variaciones estadísticamente significativas de la viabilidad absoluta de la cepa normal, cuando está en competencia con distintos mutantes, son una indicación de que la relación que se establece en cada caso, entre ambos genotipos, es diferente.

Por último, tiene interés señalar que el mutante *caramel*, cuya viabilidad no parece afectada por su frecuencia en la población, ha sido probado también en competencia con normal por un factor de la selección sexual, la probabilidad de apareamiento. Tampoco en este factor se encuentra variación al cambiar las proporciones de los genotipos en competencia. En cambio, *white*, cuya viabilidad depende de las proporciones de los genotipos, según los datos

de PETIT (1958), también presenta una relación semejante en la selección sexual. Se plantea, pues, el interés de analizar qué ocurre con la selección sexual en los demás mutantes estudiados en el presente trabajo, para ver si existe una correlación entre el comportamiento de la viabilidad y la selección sexual, o si los dos casos citados son casuales.

RESUMEN

Se intenta ver la importancia que pueda tener la selección dependiente de las frecuencias génicas como posible mecanismo responsable de la conservación de la variabilidad en las poblaciones naturales.

Se estudia la viabilidad relativa de cinco mutantes de *Drosophila melanogaster*, cada uno de ellos en competencia con normal, en tres proporciones genotípicas y a dos niveles de densidad de población. A densidad de población baja se encuentra que de los cinco casos estudiados, en cuatro de ellos la viabilidad del genotipo mutante tiende a aumentar cuando éste se encuentra en proporción baja y a disminuir cuando su proporción es elevada. Si la densidad de población es elevada no se observa esta relación.

Estos resultados sugieren que la selección dependiente de las frecuencias génicas puede ser importante en poblaciones cuyo número de individuos esté regulado por factores independientes de la densidad en el sentido de ANDREWARTHA y BIRCH.

PUBLICACIONES CITADAS

- ANDREWARTHA, H. G. y BIRCH, L. C.
1954 The distribution and Abundance of Animals. The University of Chicago Press, 782 pp.
- EHRMAN, L., SPASSKY, B., PAVLOVSKY, O. y DOBZHANSKY, Th.
1965 Sexual selection, geotaxis, and chromosomal polymorphism in experimental populations of *Drosophila pseudoobscura*. *Evolution*, 19: 337-346.
- EHRMAN, L.
1966 Mating success and genotype frequency in *Drosophila*. *Animal Behaviour*, 14: 332-339.

- KOJIMA, K. y YARBROUGH, K. M.
1967 Frequency-dependent selection at the esterase 6 locus in *Drosophila melanogaster*. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **57**: 645-649.
- LEVENE, H., PAVLOVSKY, O. y DOBZHANSKY, Th.
1954 Interaction of the adaptive values in polymorphic experimental populations of *Drosophila pseudoobscura*. *Evolution*, **8**: 335-349.
- LEWONTIN, R. C.
1955 The effect of population density and composition on viability in *Drosophila melanogaster*. *Evolution*, **9**: 27-41.
- PETIT, C.
1958 Le déterminisme génétique et psychophysiologique de la compétition sexuelle chez *Drosophila melanogaster*. *Bull. Biol. France Belgique*, **92**: 1-329.
- SPIESS, E. B.
1957 Relation between frequencies and adaptive values of chromosomal arrangements in *Drosophila persimilis*. *Evolution*, **11**: 84-93.
- TOBARI, Y. N. y KOJIMA, K.
1967 Selective modes associated with inversion karyotypes in *Drosophila ananassae*. I. Frequency-dependent selection. *Genetics*, **57**: 179-188.
- WRIGHT, S. y DOBZHANSKY, Th.
1946 The genetics of natural populations. XII. Experimental reproduction of some of the changes caused by natural selection in certain populations of *D. pseudoobscura*. *Genetics*, **31**: 125-156.

Acción citológica del Natulan (RO 4-6467) sobre un tumor ascítico de ratón

por C. RODRIGUEZ MURCIA y J. J. ARROYO NOMBELA

Instituto de Genética y Antropología, C. S. I. C.
Serrano, 113. Madrid - 6

A B S T R A C T

The Natulan has been tested on the hipertriploid ascites strain in the mouse, in order to know its cytological effect in a single dose.

The cromatids and chromosomic breaks in the metaphase are the principal alterations, which reach ever 100 %.

In the anaphase it produce even a 78 % of chromosomic bridges, followed by a great number of anaphase with three poles, reaching even the 35 %.

These action are proportional to the dose.

I N T R O D U C C I O N

Continuando el estudio de sustancias que actúan inhibiendo los tumores experimentales, desde hace años, tanto con productos de origen vegetal —colchicina, vincaleucoblastina, chelidonina, podofilina—, como de síntesis —genoxal, etc.—, y manteniendo el interés de estudio sobre las sustancias de aplicación oncolítica, hemos iniciado la experimentación con un nuevo producto de síntesis, lanzado por la casa Roche, que es el Natulan (RO 4 - 6467) derivado hidrazínico que inhibe el crecimiento de tumores animales trasplantados.

Este producto ha tenido ya algunos estudios citológicos como los de RUTISHAUSER y EOLLAG (1963) también con tumor ascítico

de ratón y que se complementan en parte con los realizados en nuestro laboratorio.

WEITZEL y colab. demuestran que el grupo metilo y formilo unido a las hidrazinas incrementan su acción citostática y su posible mecanismo de acción sea por inhibición de incorporación de timidina, leucina y sobre todo uridina.

MATERIAL Y METODOS

El estudio de la acción citológica del Natulan, lo hemos realizado sobre un tumor ascítico hipertriploide, procedente del Instituto Gustave Roussy y conservado por pases sucesivos realizados cada diez días, mediante inoculación aséptica intraperitoneal de 0,05 centímetros cúbicos de líquido ascítico, sobre ratones estirpes SWIS y NMR 1, con un peso aproximado de 20-22 gr.

El análisis citológico de este tumor que tiene una "stemline" de 68 cromosomas, fue realizado por nosotros en un trabajo anterior (J. J. ARROYO y C. R. MURCIA, 1964).

Los ratones inoculados con el Natulan se tratan a partir del tercer día, cuando es posible extraer líquido ascítico, por inyección intraperitoneal de una solución fisiológica de este producto, con una *dosis única*, comprendidos en lotes que van desde 50 mgr/kg. hasta 500 mgr/kg.

La obtención de las muestras para estudio, se inician al 4.º día del tumor, que se corresponde con las 21 h. del tratamiento, y se continúa la extracción cada 24 h. hasta el límite que permite el curso de la tumoración, alcanzando el máximo a las 381 h. después del tratamiento.

La sustancia usada ha sido el Natulan (RO 4 - 6467), un nuevo compuesto antitumoral de síntesis, que nos ha sido amablemente cedido por la casa Roche, con una dosis única de 50, 150, 250, 375 y 500 mgr/kg.

Las preparaciones citológicas de las células sometidas a observación fueron previamente tratadas con solución hipotónica y fijadas y teñidas con las técnicas en uso actualmente.

RESULTADOS

Los resultados obtenidos para estudiar las diferentes manifestaciones citológicas anómalas producidas por el Natulan las hemos seguido en el curso después del tratamiento y en función de las dosis, en el índice mitótico, alteraciones en la metafase y en las anafases.

CUADRO 1.— *Indice mitótico.*

HORAS	21	45	69	93	117	141	165	189	213	237	261	285	309	333	357	381
<i>Testigo</i>	1,5	1,7	2	1,7	2,7	—	1,8	—	1,7	—	—	—	—	—	—	—
50 mg/Kg.	1,8	2,3	2,1	1,8	2,1	—	1	1,8	0,5	—	—	—	—	—	—	—
150 mg/Kg.	2,5	1,8	3,1	1,9	1,5	—	1,3	0,7	1,4	—	2,2	—	—	—	—	—
250 mg/Kg.	1,7	1,4	1,9	2,2	2,7	—	1,6	1,7	3,3	—	2,2	1,8	—	1,3	1,1	0,6
375 mg/Kg.	2,9	1,1	1,8	3,8	4	3,4	1,9	3	2,8	2,7	—	—	0,3	—	—	—
500 mg/Kg.	3	1	3,4	3,7	2,6	—	1,7	1,5	—	—	—	—	—	—	—	—

El curso del índice mitótico queda reflejado claramente en el cuadro núm. 1 en el que el testigo tiene una variación de 1,5 % a 2,7 % que está de acuerdo con observaciones anteriores nuestras, y en los tratados tenemos una elevación con las dosis que alcanza el máximo de un 4 % a las 117 h. con 375 mgr/kg., incremento relativamente pequeño, para las dosis empleadas, puesto que con 500 mgr/kg. son subletales, no considerando mayor posibilidad de ampliación y siendo la de 250 mgr/kg. la más idónea en cuanto a su acción citológica y el logro de una supervivencia en los animales tratados.

Para el estudio de las alteraciones en metafase hemos realizado el recuento de las estructuralmente aberradas, siendo la aberración más frecuente las fracturas cromatídicas y en menor cuantía las divisiones centroméricas.

El cuadro núm. 2 refleja este % de normalidad y anormalidad, que se inicia con un grado de anormalidad ya alto en las dosis más bajas de 50 mgr/kg. en las primeras 45 h. después del tratamiento y alcanza un máximo de 90 % a partir de las 117 h. y se

CUADRO 2.—*Metafases %: normal, anormal.*

HORAS	21	45	69	93	117	141	165	189	213	237	261	285	309	333	357	381
50 mg/Kg.																
<i>Normal</i>	—	34	19	21	10	—	10	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>Anormal</i>	—	66	81	79	90	—	90	—	—	—	—	—	—	—	—	—
150 mg/Kg.																
<i>Normal</i>	37	9	4	5	13	6	12	0	3	—	0	—	—	—	—	—
<i>Anormal</i>	63	91	96	95	87	94	88	100	97	—	100	—	—	—	—	—
250 mg/Kg.																
<i>Normal</i>	0	4	3	1	1	—	0	0	7	—	16	6	—	11	12	17
<i>Anormal</i>	100	96	97	99	99	—	100	100	93	—	84	94	—	89	88	83
375 mg/Kg.																
<i>Normal</i>	0	13	2	3	0	6	3	23	9	12	—	—	20	—	—	—
<i>Anormal</i>	100	87	98	97	100	94	97	77	91	88	—	—	80	—	—	—
500 mg/Kg.																
<i>Normal</i>	—	12	4	2	11	—	—	6	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>Anormal</i>	—	88	96	98	89	—	—	94	—	—	—	—	—	—	—	—

mantiene. Una vez elevada la dosis a 150 mgr/kg. la anormalidad es tan alta que está en el 100 % o límites próximos y siguiendo el curso en la dosis más idónea de 250 mgr/kg. vemos que este total de metafases alteradas no cede en muchas horas después del tratamiento ya que se mantiene prácticamente total la anomalía y únicamente a partir de las 333 h. hasta las 381 h. se reduce a un 83 %. Con dosis superiores vemos que este porcentaje de anomalías se mantiene en los mismos límites, pero la viabilidad de los animales tratados disminuye con relación a la dosis 250 mgrs., aunque superiores con mucho a los de 50 mgr/kg. y no tratados.

Las alteraciones anafásicas las hemos resumido en el cuadro 3 que expone las normales y anormales totales sin diferenciación, observándose que la anormalidad en la dosis más pequeña empieza en 8 % y termina en un 51 %; según seguimos incrementando la dosis este porcentaje de anormalidad es de 71 % con 150 mgr/kg. y de 90 % con 250 y 375 mgr/kg., siendo la normalidad máxima a las 21 h. del tratamiento, y manteniéndose la anomalía ya a partir de las 45 h. en unos valores altamente significativos.

Para una mejor comprensión de este alto porcentaje de anomalías hemos realizado el cuadro núm. 4, en el cual reflejamos junto a las normales las anormales diferenciadas en anafases con puen-

tes, anafases tripolares, y otras, en el cual incluimos todas las polipolares a partir de 4 polos.

En este cuadro vemos que a las anafases con puentes corresponden el % mayor de anomalías seguidas de las tripolares. El máximo de anafases con puentes generalmente coincide con el máximo de anormalidad que se alcanza a partir de las 69 h. con algunas fluctuaciones, pero manteniéndose muy altas en el curso horario, posterior al tratamiento.

En las anafases con puentes nos ocurre algo semejante a lo observado en el cuadro general de anomalías anafásicas totales, que existe una proporcionalidad con el incremento de la dosis, hasta llegar a los 250 mgr/kg., con unos máximos de anafases con puentes de 40 % en 50 mgr/kg., 57 % en 150 mgr/kg. y hasta un 78 % en 250 mgr/kg. Esto nos demuestra que la alteración fundamental son las fracturas cromatídicas y que nos dan un % prácticamente total de anormales en la metafase, lógicamente sigue su curso en las siguientes fases divisionales y por ello este alto 78 % de anafases con puentes.

La otra alteración que exponemos en el cuadro que le sigue en cuantía a las anafases con puentes, es la tripolaridad que también alcanza una proporcionalidad hasta la dosis más adecuada. Los valores son también altamente significativos pues los máximos de un 14 % con 50 mgr., 24 % con 150 mgr. alcanzan un 35 % en 250 mgr/kg., cifra muy alta y difícil de lograr con otras sustancias.

Por último en el apartado otras anafases vemos que los valores no son significativos, salvo en la parte final del tratamiento con 250 mgr/kg. en el cual parece se incrementa la tetrapolaridad con disminución de la tripolaridad, por ello sólo aparece en estas dosis y no en las restantes.

DISCUSION

De los resultados expuestos podemos deducir que no afecta a la estabilización en metafase, porque elevarlo hasta un 4 % no se puede considerar como significativo, y los cromosomas, en su aspecto no son c-mitóticos.

La alteración más fundamental es la producción de fracturas,

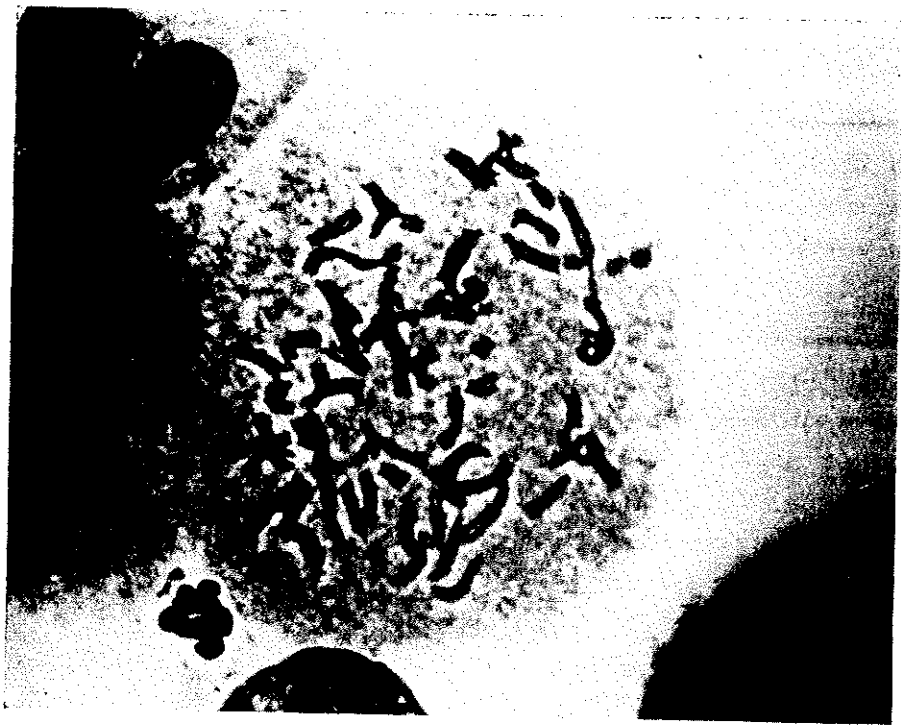


FIG. 1

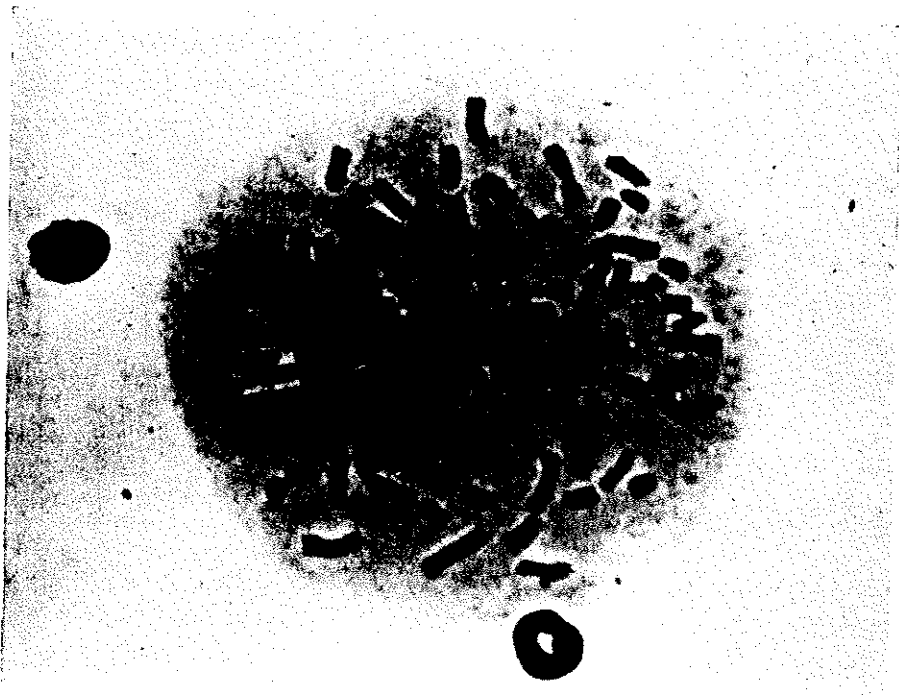


FIG. 2

siendo la mayoría cromatídicas (figs. 1 y 2) que van desde la pequeña fractura en una cromatida hasta multitud de ellas, y su posterior recombinación con otras, perpetuándose, en el curso de la mitosis, con la aparición de múltiples puentes anafásicos en todas sus manifestaciones (figs. 3, 4, 5, 6, 7 y 8). Esto podría obedecer a un bloqueo de los grupos fosfóricos de ADN con la consiguiente despolimerización y apertura de la cadena determinando la aparición de fracturas. Coincide esta apreciación con los trabajos de WEITZEL que confirma la inhibición del Natulan de la formación de los di y trifosfatos de los nucleósidos.

La otra alteración que sigue en importancia son las anafases anómalas, de las cuales la aparición de puentes cromosómicos es consecuencia de las fracturas, en el curso divisional. Sin embargo para explicar la aparición de esos altos porcentajes de multipolares creemos es debido a un estímulo de la división de los centros de atracción o centriolos, pero de una forma irregular, por la aparición de máximos tripolares, que luego se elevan a polipolares. Esto no podemos saber si es reversible o no porque perdura tanto el efecto que los animales tratados no regresan a la bipolaridad, sino al revés, hacia formas tetra- y pentapolares.

Otro aspecto de gran interés, en los tratamientos con Natulan es la persistencia de sus efectos citológicos. Nosotros hemos comprobado utilizando dosis únicas, que aquellos continúan manifestándose hasta 16 días después de iniciado el tratamiento. A efectos de posología, para determinar intervalos entre dosis sucesivas en tratamientos de neoplasias experimentales de animales e incluso en clínica humana, nosotros consideramos estos hechos, de gran interés.

RESUMEN

Se estudia la acción citológica del Natulan (RO 4 - 6467) en dosis única, sobre un tumor ascítico hipertriploide de ratón.

Las alteraciones principales son las fracturas cromatídicas y cromosómicas en la metafase, alcanzando hasta un 100 %.

En anafase produce hasta un 78 % de puentes cromosómicos,



FIG. 3

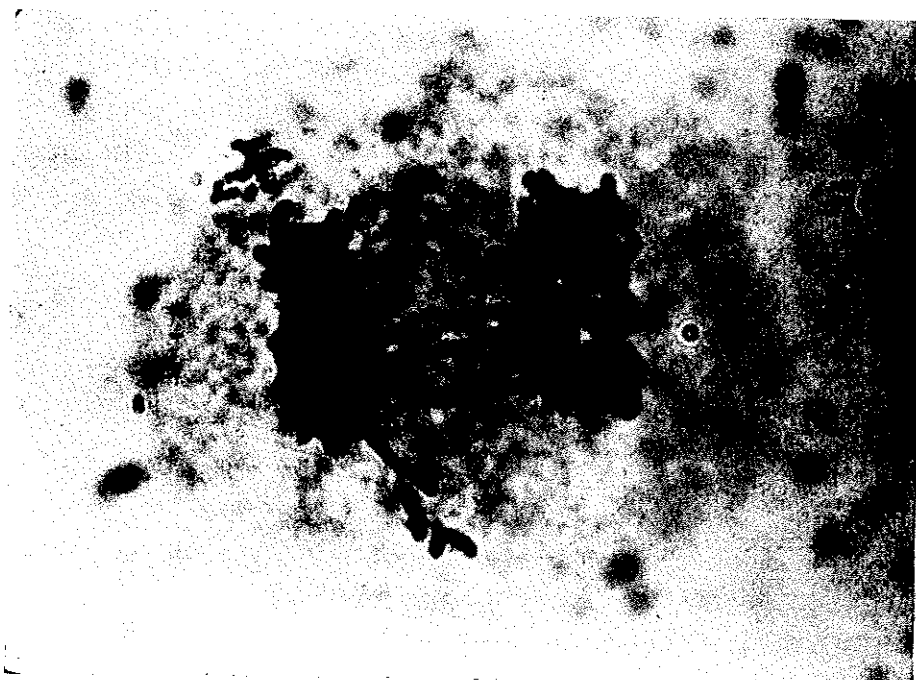


FIG. 4

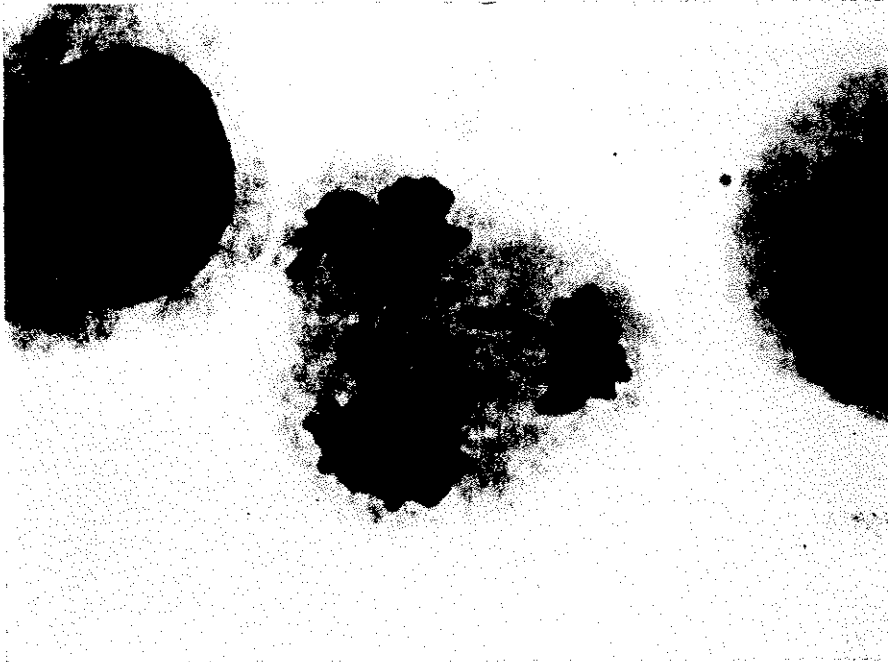


FIG. 5

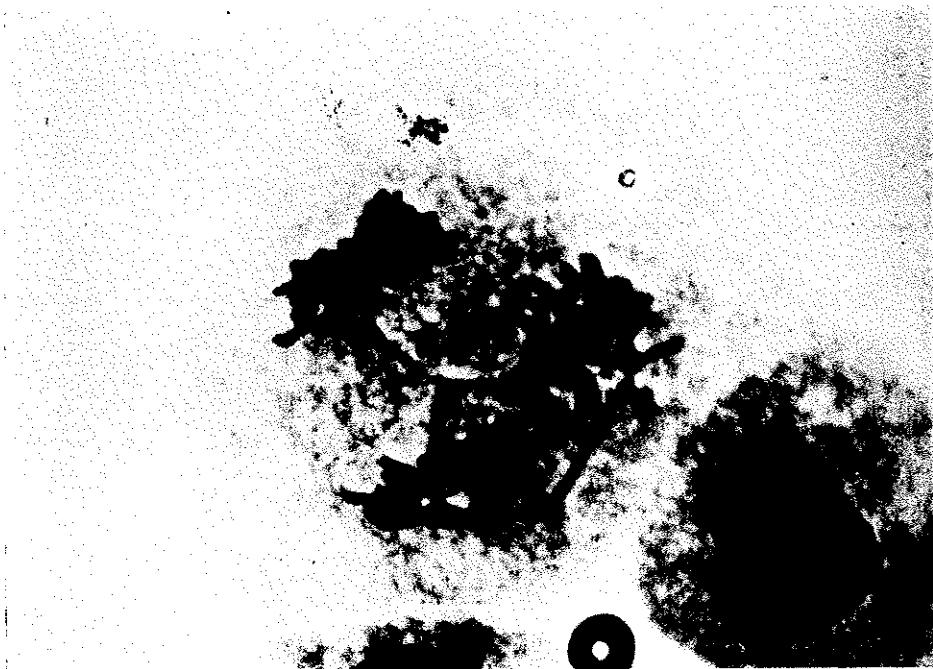


FIG. 6

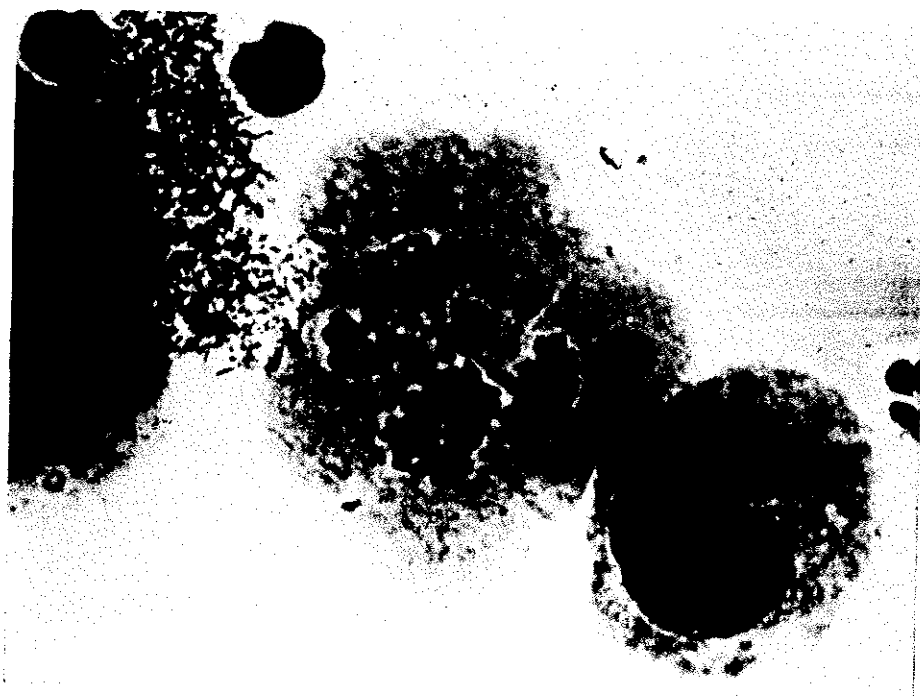


FIG 7



FIG. 8

seguido de una tripolaridad muy alta que tiene un máximo de 35 %. Estas acciones guardan proporcionalidad con la dosis.

REFERENCIAS

- ARROYO, J. J. y R. MURCIA, C.
1962 Efectos citológicos del genoxal sobre un tumor ascítico de Ehrlich. *Genética Ibérica*, XIV, 157.
- ARROYO, J. J. y R. MURCIA, C.
1964 Análisis citológico de un tumor ascítico hipertriploide de ratón. *Gen. Ibér.*, XVI, 59.
- R. MURCIA C. y ARROYO, J. J.
1966 Cambios estructurales por la acción de citostáticos. *Genética Ibérica*, XVII, 343.
1966 Investigación de los efectos estacmocinéticos en especies de origen vegetal. *Anales de la Real Academia de Farmacia*, núm. 3.
- RUTISHAUSER, A. y BOLLAG, W.
1963 Cytological Investigations with a New Class of Cytotoxic Agents: Methyl-hydrazine Derivates. *Experientia*, 19: 131-32.
- WEITZEL, G. *et al.*
1964 Cytostatischer Wirkungsmechanismus der Methylhydrazine. *Experientia*, 20: 38.
1967 Investigations on the cytostatic effective mechanism of methylhydrazines II (mouse). *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.*, 348 (4): 433-442.
Investigations on the cytostatic effective mechanism of methylhydrazines III. *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.*, 348 (4): 443-454.

Selección estabilizadora del número de quetas abdominales en *Drosophila*⁽¹⁾

por JULIAN RUBIO *

Estación Experimental de Aula Dei (C. S. I. C.) Zaragoza, España

A B S T R A C T

RUBIO J., 1969, Selección estabilizadora del número de quetas abdominales en *Drosophila*. *An. Aula Dei*. 9 (2-4).

The effects of stabilizing selection on the variability of abdominal chaetae were studied in two populations of *Drosophila*, namely a mutant strain (roughshaven, *r-sh*) of *D. suboscuro* and a freshly captured natural population of *D. melanogaster*.

Selection was generally effective in reducing phenotypic variance of the number of bristles on the two posterior sternites; but only the genetic component of variance was apparently affected. Asymmetry, as measured by the variance of the difference between segments remained unchanged by selection. No correlated responses on dorsocentral and scutellar bristles were observed in the mutant strain.

Present results are compared with those previously obtained in a similar selection experiment on dorsocentral and scutellar bristles in the same mutant strain of *D. suboscuro*. An explanation of their differences is put forward based on the differences between the characters themselves.

INTRODUCCION

Se ha repetido que en genética cuantitativa la base experimental es todavía reducida en comparación con los avances realizados

(1) Trabajo realizado con la ayuda de una Beca del P. I. O. de Iniciación a la Investigación.

(*) Dirección actual: Departamento de Genética, Facultad de Ciencias. Universidad de Madrid (3). Spain.

por la teoría. En concreto la selección es, por una parte, método insustituible en mejora animal y vegetal, y por otra, mecanismo básico para la comprensión de la evolución; de ahí la importancia de poseer datos experimentales sobre ella tan amplios y variados como sea posible, que aclaren los múltiples aspectos implicados en los procesos de selección cuantitativa.

Se acepta comúnmente que la selección *centrípeta* (SIMPSON) o *estabilizadora* (SCHMALHAUSEN) juega papel importante en la naturaleza como componente de la selección natural, en cuanto que ésta tiende a menudo a establecer los valores óptimos de los caracteres cuantitativos, suprimiendo la variabilidad fenotípica en cualquier dirección (SCHMALHAUSEN, 1949; SIMPSON, 1953; LERNER, 1954, 1958; WADDINGTON, 1957). Sirve como primera aproximación esta definición de la selección estabilizadora por su resultado a nivel del fenotipo, o su equivalente, por el criterio con que se seleccionan como padres aquellos individuos que presentan o se acercan más al valor óptimo (que se supone de ordinario que está representado por el valor cuantitativo intermedio, vgr., WRIGHT, 1952).

De hecho varios experimentos de selección estabilizadora artificial, realizados con ese criterio tanto en poblaciones naturales como en mutantes, han dado resultados positivos: WADDINGTON (1942, 1960), THODAY (1959), RENDEL (1959), RENDEL y SHELDON (1960), PROUT (1962), SCHARLOO (1964), RUBIO (1966). Hasta ahora los únicos casos en que no se ha obtenido clara respuesta estabilizadora han sido los de FALCONER y ROBERTSON (1956) usando el carácter peso corporal del ratón, y FALCONER (1957) en quetas abdominales de *Drosophila*. PROUT (1962) menciona su intento de reducir la variación de la longitud del ala en *Drosophila* sin resultado (no publicado).

Estos estudios al revelar la complejidad del fenómeno han mostrado la necesidad de ulteriores investigaciones y de precisar los mecanismos de reducción de la varianza fenotípica. Porque es evidente que el término "estabilizadora" y su efecto visible de reducir la variabilidad fenotípica cubren varios posibles fenómenos. Siendo el fenotipo y su variación en caracteres cuantitativos, resultado de variadas influencias relacionadas entre sí, parece conveniente distinguir, al menos como método, diferentes tipos de selección estabilizadora o diferentes aspectos de su acción. Solo la evidencia

experimental decidirá sobre la validez de tal distinción y de su amplitud. En este sentido nos parece adecuada y la más completa hasta ahora la siguiente distinción propuesta por WADDINGTON (1957): selección *normalizadora*, que reduce la frecuencia de los genes causantes de desviaciones fenotípicas extremas (reducción del componente aditivo genético de la variabilidad, mediante creciente homocigosis); *canalizadora*, que favorece genotipos capaces de regularizar la marcha del desarrollo hacia un fenotipo normal, haciéndolo menos susceptible a influencias perturbadoras, bien sean éstas ambientales, bien debidas a segregación de genes potencialmente determinantes de variaciones extremas; esta selección no elimina la variabilidad genética aditiva, que queda latente bajo una cierta uniformidad fenotípica como variabilidad potencial; sólo la controla y encauza. Finalmente, la selección para el *desarrollo armónico* de órganos o estructuras *repetidas* en un organismo ("selección para la *repetibilidad* de un carácter").

El presente experimento es parte de un estudio más general sobre los efectos específicos de la selección estabilizadora en diversos caracteres y poblaciones de *Drosophila*; en parte ya realizado con resultado positivo en una cepa mutante (*r-sh*) de *Drosophila suboscuro* atendiendo al carácter macroquetas de la zona dorso-central y escutelar en una cepa mutante (*rough-shaven*, *r-sh*) de *Drosophila suboscuro* (RUBIO, 1966). El resultado fue positivo: la selección estabilizadora en *r-sh* para macroquetas dorsocentrales y escutelares (que indicaremos en adelante como DC-E), mediante la selección de individuos de fenotipo normal, produce un efecto canalizador de la variabilidad genética, claramente distinguible del efecto normalizador, según la terminología de WADDINGTON. La novedad de este resultado, teniendo en cuenta los experimentos antes citados, nos hizo pensar en ampliar el estudio de la selección estabilizadora a otro carácter y a otras poblaciones. La comparación de resultados indicará si aquella respuesta se puede generalizar a toda selección por fenotipo intermedio o si es propia de un carácter determinado o de la condición mutante de la población en que se obtuvo.

MATERIAL Y METODOS

El carácter escogido fueron las microquetas abdominales, tan relacionadas con las macroquetas y objeto de bastantes estudios de genética cuantitativa por ser relativamente fáciles de contar. La selección se practicó en dos poblaciones diferentes: primero en la misma cepa mutante *r-sh* de *D. suboscuro* empleada en el citado experimento, ya que dicho mutante afecta también a las quetas abdominales; segundo, en una población natural de *D. melanogaster* derivada de 20 hembras recién capturadas de modo que se podía empezar la selección con una suficiente representación de la variabilidad natural del carácter.

En la cepa *r-sh* la selección se vio interrumpida por un accidente en la octava generación, sin que haya sido posible recuperar la cepa; se presentan estos resultados, a pesar de su limitado valor, por la información que suministran al compararlos con los de la selección practicada sobre macroquetas DC-E en esa cepa durante 25-30 generaciones (RUBIO, 1966) y con los resultados obtenidos después en la población de *D. melanogaster* en 15 generaciones de selección.

Este trabajo tiene, por tanto, dos partes correspondientes a las dos poblaciones, aunque en ambas se practican los mismos tipos de selección y sobre el mismo carácter.

Las quetas abdominales.

Los esternitos, situados en la superficie ventral del abdomen, son placas esclerotizadas y ordenadas segmentariamente, cada una con cierto número de microquetas. No interesa a nuestro estudio sino el número de microquetas presentes en cada segmento, prescindiendo de su ordenación —de por sí poco regular—, y de las diferencias en tamaño y grosor que pueden presentar, ya que es imposible fijar un límite entre queta normal o atrofiada sin un gran margen de error. Únicamente se descartan los ocasionales individuos en que el esternito aparece deformado, porque aunque repercute en el número de quetas, se trata de alteraciones del desarrollo que no se refieren directamente a la regulación genética de las mismas.

Este carácter tiene además otras ventajas como objeto de selección estabilizadora. Es bastante insensible a fluctuaciones ambien-

tales durante el desarrollo, por ejemplo, en la cantidad y calidad del alimento, humedad y cambios pequeños de temperatura (REEVE y ROBERTSON, 1953; CLAYTON *et alii*, 1957; KUROKAWA, 1962). Sólo hay que tener en cuenta que en determinadas condiciones ambientales, hay correlación entre éstas y el tamaño del cuerpo, y este último repercute en el número de quetas abdominales (REEVE y ROBERTSON, 1954; GIBSON, PARSONS y SPICKETT, 1961). Parece muy probable que los genes para este carácter actúan aditivamente (CLAYTON *et alii*, 1957) y se trata de poligenes localizados en varios cromosomas (MATHER, 1941; REEVE y ROBERTSON, 1954; RASMUSON, 1964). Además, a diferencia de otras quetas, como las DC-E, es un carácter poco sujeto a la acción de la selección natural, según puede deducirse de dos hechos: siempre presentan variación fenotípica incluso en las poblaciones naturales (es decir, no es un carácter completamente canalizado en la naturaleza) y diversas poblaciones naturales se mantienen de modo estable a diferentes niveles de número medio de microquetas abdominales. Todo ello indica que se trata de un carácter poco importante para el valor reproductivo y adaptativo del organismo y que muchos, al menos, de los genes que controlan el carácter deben ser casi neutrales respecto a ese valor adaptativo. Por otra parte existe en las poblaciones considerable variación genética para el carácter, como se deduce de su rápida respuesta a la selección direccional y su ulterior respuesta a retroselección (RASMUSON, 1955; SHELDON, 1963, y otros).

Otra utilidad del carácter en orden a establecer los mecanismos de la selección estabilizadora es la posibilidad de realizar medidas independientes en cada uno de los segmentos abdominales de un individuo. Esto permite calcular la varianza de cada segmento por separado, la de la suma de segmentos y la de la diferencia entre ellos, para analizar los componentes intra-individuales e inter-individuales de la varianza fenotípica; según REEVE y ROBERTSON (1954) estos dos componentes son representativos de la varianza no genética y genética respectivamente.

La población mutante r-sh de Drosophila suboscuro.

El mutante recesivo autosómico *r-sh* (rough-shaven), originado hace unos años en el laboratorio del University College de Londres, determina una marcada rugosidad en los ojos y amplias alteraciones en los grupos de quetas de diversas zonas del cuerpo de la mosca.

Las macroquetas DC-E, que en el fenotipo salvaje tienen un número y distribución espacial perfectamente definidos, se ven afectados por este mutante en ambos aspectos (número y localización). Se observan supresiones de quetas normales y formación de quetas supernumerarias localizadas en puntos desusados; ambas desviaciones se encuentran a menudo simultáneamente en el mismo individuo, independientemente de que su número total de quetas sea igual, inferior o superior al normal. Por ejemplo, en la población-base 19,49 % de individuos tienen el número normal (8) de macroquetas DC-E, pero sólo el 1,71 % del total de la población las tienen todas en su posición normal del fenotipo salvaje. Que yo conozca, éste es el primer caso de un mutante de *Drosophila* en que aparecen juntos ambos tipos de desviación y que produce una amplia distribución de frecuencias por encima y por debajo del número total de macroquetas DC-E. En las microquetas abdomi-

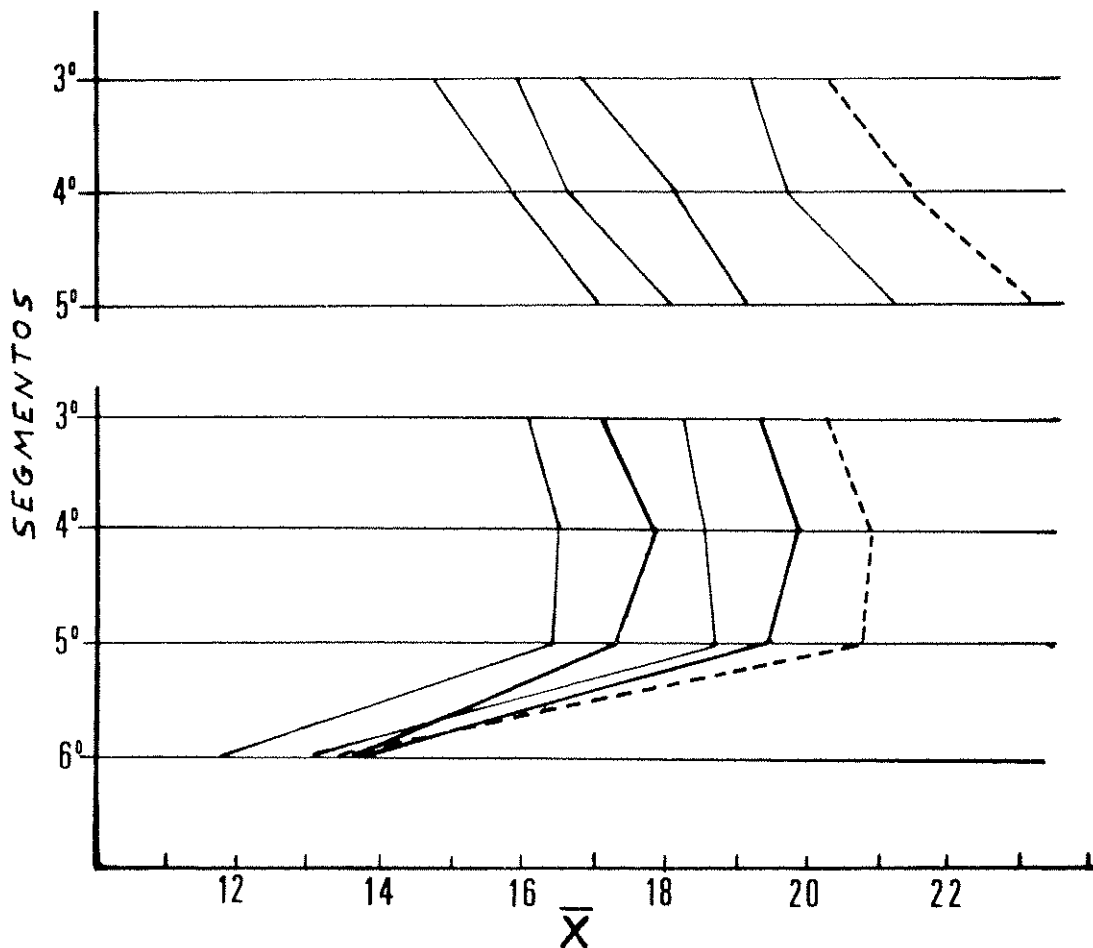


FIG. 1. Número medio de quetas abdominales en los diferentes segmentos de machos (parte superior) y hembras (parte inferior). Las líneas continuas corresponden a poblaciones naturales, la de trazos a la cepa mutante *r-sh*, todas de *D. suboscuro*.

nales es imposible distinguir estos aspectos quedando reducido el efecto fenotípico del mutante a una gran variabilidad en el número de las mismas y a una distribución generalmente más irregular, pero inmanejable por su difícil sistematización.

No habiéndose podido obtener información sobre la población en que se originó el mutante, pareció oportuno conocer la variabilidad y valores medios de este carácter en diversas poblaciones de *D. suboscuro*, antes de concretar los detalles del método de selección a seguir.

La figura 1 muestra los valores medios del número de quetas por segmentos en varias poblaciones, evidenciando sus diferencias. Es común a todas las poblaciones la tendencia ascendente en número medio en los segmentos de los machos (del más anterior al más posterior), y la escasa diferencia entre los segmentos 3,4 y 5 de las hembras, así como el notable descenso del número medio de quetas en el segmento 6 de éstas. También muestra el gráfico que los valores medios de *r-sh* son significativamente diferentes para casi todos los segmentos, con excepción del 6 de las hembras.

Por esas diferencias en los valores medios de los diferentes segmentos en las distintas poblaciones, en el cuadro 1 se presentan los coeficientes de variación del número de quetas (*V*) en lugar de la varianza fenotípica (σ^2). El coeficiente de variación es sensiblemente el mismo en todos los segmentos de cada población, excepto para el segmento 6 de las hembras en algunas de ellas; y tampoco hay diferencias significativas entre los dos sexos (dentro de una

CUADRO 1.—*Coefficientes de variación del número de quetas abdominales en cada segmento, en diferentes poblaciones de Drosophila suboscuro.*

Segmento	Poblaciones				
	<i>r-sh</i>	Barcelona	Bilbao	Peramola	Zaragoza
<i>Machos</i>					
3	16,43 ± 1,165	10,13 ± 0,718	12,24 ± 0,868	12,21 ± 0,865	14,94 ± 0,747
4	15,89 ± 1,126	9,14 ± 0,648	10,38 ± 0,736	10,79 ± 0,765	15,06 ± 0,753
5	15,75 ± 1,117	10,81 ± 0,766	11,81 ± 0,837	8,78 ± 0,622	13,02 ± 0,651
<i>Hembras</i>					
3	16,60 ± 1,177	9,43 ± 0,669	10,88 ± 0,771	10,52 ± 0,746	11,77 ± 0,588
4	17,46 ± 1,238	8,53 ± 0,605	10,56 ± 0,748	10,79 ± 0,765	12,31 ± 0,615
5	17,68 ± 1,254	7,31 ± 0,518	11,51 ± 0,816	10,18 ± 0,722	11,08 ± 0,551
6	20,96 ± 1,487	16,70 ± 1,184	13,10 ± 0,929	11,38 ± 0,807	12,31 ± 0,615

misma población) sino en casos muy concretos. En cambio son significativas las diferencias entre la población mutante y las naturales, y entre algunas de éstas, como era de esperar.

Con estos datos decidimos atender a los dos segmentos más posteriores de cada sexo (4 y 5 en machos, 5 y 6 en hembras), aunque otros investigadores han atendido a los segmentos 4 y 5 en ambos sexos. Si se tratara de un experimento de selección direccional, también hubiéramos seguido su criterio. Pero como base para el estudio de la estabilidad del desarrollo, mediante las diferencias entre segmentos contiguos, nos parece importante esa diferencia que se da entre los segmentos 5 y 6 de las hembras de modo constante en *D. suboscuro* y que no puede ser resultado del azar. Cabe pensar que mientras en los otros segmentos los valores semejantes en número medio de quetas y en coeficiente de variación reflejan una homogeneidad básica entre ellos, debe existir un factor causal de esa diferencia en el segmento 6 de las hembras. Esto nos lo sugiere el concepto entomológico general de que un esternito en que se reducen notablemente las quetas representa un paso en la diferenciación que supone el modificarse hasta constituir una parte de la zona genital diferenciada. Y también la constatación de que existen variaciones significativas, entre razas de *D. auraria* en el número de quetas en el último segmento (sexto en esa especie) de los machos, faltando del todo en algunas razas; diferencias que repercuten en el aislamiento sexual entre dichas razas (KUROKAWA, 1960, 1962, 1963). Empleando, pues, los datos de esos segmentos y estudiando su variación con la selección, cabe esperar una conclusión sobre el factor determinante de esa diferencia, por ejemplo, si en un sexo la respuesta fuera diferente que en el otro; la mera repetición de la situación de homogeneidad entre los segmentos que se cuentan en ambos sexos, sería multiplicar el trabajo sin aporte nuevo.

Aunque otros autores usan otros índices para calcular las diferencias entre estructuras repetidas (WADDINGTON, 1959; SCHARLOO, 1964), emplearemos con la mayoría de autores σ_n^2 , es decir, la varianza de la diferencia entre los segmentos. Teniendo en cuenta que en nuestro caso existe, tanto en la cepa *r-sh* como en las otras poblaciones, cierto gradiente entre los segmentos que medimos, de manera que $\bar{x}_{ant} - \bar{x}_{post} \neq 0$, calculamos la diferencia $\bar{D} = \frac{\sum(\bar{x}_{ant} - \bar{x}_{post})}{N}$

teniendo en cuenta el signo; el valor absoluto de la diferencia, prescindiendo del signo no daría idea real de la dispersión al calcular σ_D^2 .

En el siguiente cuadro se dan los valores hallados en la población base de *r-sh* y en las poblaciones naturales de *D. suboscuro*, para los dos segmentos elegidos. Se incluye también el coeficiente de variación de la suma de dichos segmentos, y la varianza fenotípica de dicha suma (σ_s^2).

CUADRO 2.

	<i>r-sh</i>	<i>Barcelona</i>	<i>Bilbao</i>	<i>Peramola</i>	<i>Zaragoza</i>
σ_s^2 ♂♂ ♀♀	34,76 ± 4,901	10,96 ± 1,534	12,15 ± 1,701	8,83 ± 1,237	17,64 ± 1,764
	25,66 ± 3,592	7,00 ± 0,980	14,88 ± 2,084	8,06 ± 1,129	7,12 ± 0,712
V_s ♂♂ ♀♀	13,15 ± 0,932	8,53 ± 0,605	9,54 ± 0,676	8,25 ± 0,585	12,76 ± 0,638
	14,78 ± 1,048	8,22 ± 0,583	12,19 ± 0,865	9,30 ± 0,659	9,44 ± 0,472
\bar{D} ♂♂ ♀♀	- 1,69	- 1,12	- 1,00	- 1,35	- 1,18
	+ 7,23	+ 5,42	+ 5,64	+ 3,67	+ 4,66
σ_D^2 ♂♂ ♀♀	15,79 ± 2,232	4,49 ± 0,628	4,72 ± 0,661	3,60 ± 0,504	3,69 ± 0,369
	16,41 ± 2,320	3,03 ± 0,424	3,28 ± 0,459	2,54 ± 0,356	3,95 ± 0,395

En la población mutante existe un aumento significativo del coeficiente de variación del número total de quetas entre los dos segmentos juntos (V_s), pero mucho mayor todavía en la varianza de la diferencia entre segmentos. Existe por tanto en la población *r-sh* una mayor variabilidad, tanto genética como no-genética sobre la cual pueda seleccionarse.

Para detectar si el valor de asimetría entre los segmentos está influido por el número medio de quetas, se ha calculado la correlación entre número de quetas presentes en cada individuo en los segmentos estudiados y diferencia las presentes en cada segmento. No existe correlación en ninguno de los sexos para los segmentos 3 y 4; tampoco para los segmentos 4 y 5; únicamente para los segmentos 5 y 6 en las hembras hay una correlación probablemente significativa, con una tendencia a aumentar la diferencia entre segmentos cuando aumenta el número total de quetas de los mismos. Lo mismo puede mostrarse de otro modo: relacionando los valores \bar{x}_{sum} y \bar{x}_{dif} de los dos segmentos más posteriores. En la figura 2 se presentan esas relaciones por separado para machos y hembras; la falta de correlación en los machos es evidente, así

como la tendencia antes indicada en las hembras. Y como se ve en la explicación del gráfico, se han reunido datos también de diversas líneas *r-sh* sometidas a selección centripeta y direccional, que confirman lo dicho.

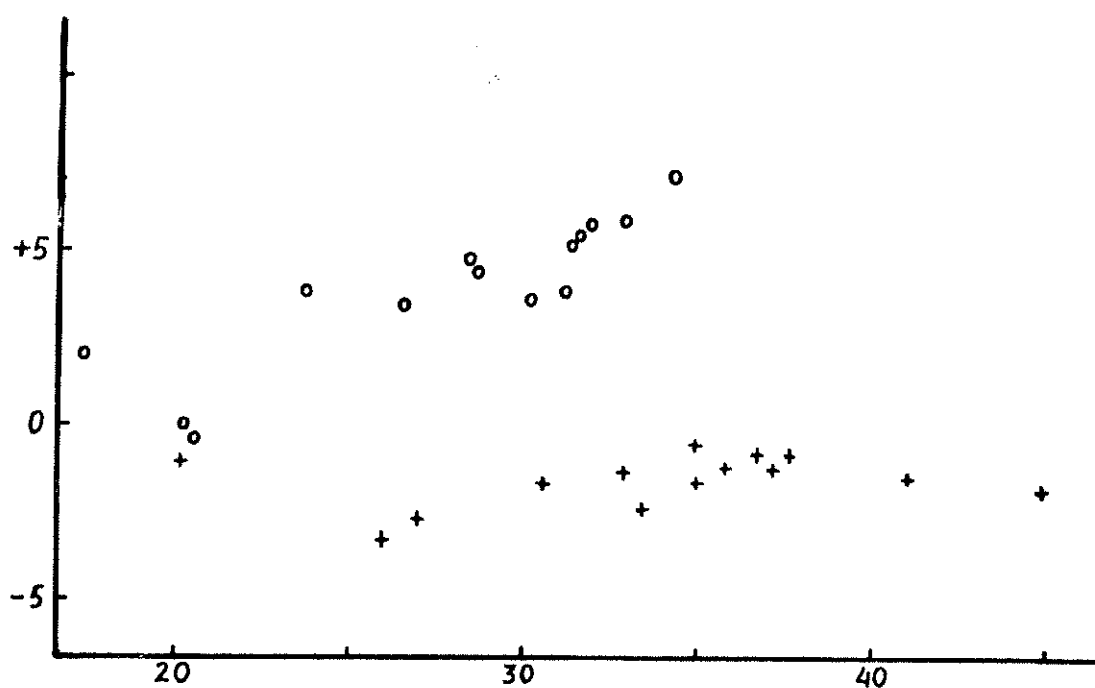


FIG. 2. Relación entre el valor medio del número total de quetas, sumando ambos segmentos de un individuo (en abscisas) y valor medio de la diferencia en número de quetas entre ambos segmentos (en ordenadas). Círculos: hembras; cruces: machos. Cada punto de la figura corresponde a una población o línea de selección.

La población natural de D. melanogaster.

A partir de las 20 hembras fecundadas capturadas en la Estación Experimental de Aula Dei, se estableció la población base, mediante tres generaciones de reproducción masiva entre sus descendientes. De esa población se seleccionaron cuarenta individuos de cada sexo con número de quetas igual o próximo al medio de la población; su descendencia, obtenida en 20 cultivos (dos machos y dos hembras en cada uno), constituyó la generación 1 de selección, de la cual derivan las líneas que se indican más adelante.

Por paralelismo con el experimento en la cepa *r-sh*, se atiende a los mismos segmentos, los dos más posteriores, de cada sexo; aunque en *D. melanogaster* no hay diferencia significativa en el

número de quetas de los segmentos 5 y 6 de las hembras. A continuación se dan los parámetros de esta población base, expresados por los valores medios de los cinco conteos de la misma que se han hecho entre el principio y el fin del experimento de selección (Cuadro 3).

CUADRO 3.

	Machos			Hembras		
	segm. 4	seg. 5	Total	segm. 4	seg. 5	Total
\bar{X}	16,33	17,41	34,21	20,44	19,39	40,33
σ^2	3,17	3,40	9,38	5,11	3,93	13,51
V	10,06	10,57	8,94	11,06	9,25	9,10
D	—	—	-0,60	—	—	+0,54
σ^2_{11}	—	—	3,78	—	—	4,55

Método experimental.

Todos los cultivos se mantienen en un cuarto con temperatura regulada a $20 \pm 0,5^\circ$ C. El medio de cultivo es el propuesto por LEWIS (1960) que, entre otras ventajas, tiene la de proteger eficazmente contra la infección; únicamente hemos sustituido la levadura específica que él recomienda por la levadura industrial de uso más generalizado.

Las poblaciones base se mantienen mediante doce botellas, cada una con 3-4 parejas de moscas no seleccionadas; las líneas de selección constan, cada una, de diez cultivos (y sus reservas) con cruzamientos de dos individuos de cada sexo procedentes de cultivos diferentes de la generación anterior, en sistema rotatorio para reducir al mínimo el incremento del coeficiente de endogamia. En todos los casos las hembras empleadas eran vírgenes. De su descendencia se cuentan 5 machos y 5 hembras, aunque la selección se practica sobre un número mayor de individuos (unos 50 de cada sexo).

Como última determinación metodológica había que concretar si era o no decisivo el que los conteos se hicieran de modo sistemático el primer día de emergencia de adultos. Se hicieron dobles conteos en una generación de las poblaciones naturales de *D. suboscura*; uno, de las primeras moscas que emergieron, el otro cinco días más tarde. Puede verse en el cuadro 4 que las diferencias

entre los valores medios de quetas de cada conteo son a menudo significativas. WATTIAUX (1962) encontró también una fuerte correlación entre velocidad de desarrollo y número de quetas abdominales. Sin embargo hemos indicado ya que otros investigadores afirman que este carácter es relativamente insensible a las modificaciones ambientales que ocurren en las condiciones normales de cultivo; en particular NEEL (1940) ha mostrado, para los mutantes *Dichaete* y *polychaetoide* de *D. melanogaster*, que las diferencias en nutrición no repercuten en el número de quetas. De todos modos, y cualquiera que sea la explicación de las diferencias reflejadas en el cuadro 4 y en los datos de WATTIAUX (podrían, por ejemplo, deberse a influjo de la edad de la madre), todos los con-

CUADRO 4.— *Diferencias en el número medio de quetas abdominales en poblaciones naturales de D. suboscuro, entre los individuos que emergieron el primer día y los que lo hicieron cinco días después. Los valores correspondientes al segundo conteo se indican debajo de los del primero.*

	Poblaciones		
	Barcelona	Bilbao	Peramola
<i>Machos</i>			
segm. 3	19,20 ± 0,240 17,30 ± 0,209	16,92 ± 0,288 16,24 ± 0,280	17,18 ± 0,295 15,92 ± 0,247
segm. 4	19,72 ± 0,231 17,88 ± 0,179	18,22 ± 0,263 17,20 ± 0,239	17,92 ± 0,286 16,72 ± 0,213
segm. 5	21,22 ± 0,266 18,74 ± 0,237	19,16 ± 0,681 18,42 ± 0,338	19,10 ± 0,232 18,24 ± 0,216
total	60,14 ± 0,562 53,92 ± 0,436	54,30 ± 0,681 51,86 ± 0,661	54,20 ± 0,634 50,88 ± 0,573
<i>Hembras</i>			
segm. 3	19,38 ± 0,231 17,70 ± 0,206	18,22 ± 0,259 17,62 ± 0,289	17,18 ± 0,254 16,64 ± 0,232
segm. 4	19,86 ± 0,219 18,34 ± 0,181	18,42 ± 0,272 18,22 ± 0,267	17,86 ± 0,264 16,60 ± 0,253
segm. 5	19,28 ± 0,252 18,20 ± 0,193	18,76 ± 0,282 18,42 ± 0,323	17,34 ± 0,240 16,84 ± 0,246
segm. 6	13,72 ± 0,215 13,00 ± 0,195	13,02 ± 0,239 12,92 ± 0,245	13,68 ± 0,210 13,20 ± 0,219
total	72,24 ± 0,634 67,24 ± 0,430	68,42 ± 0,780 67,28 ± 0,936	66,06 ± 0,678 63,28 ± 0,753

teos se realizaron en los primeros adultos que aparecían en cada cultivo.

En cada población se establecen dos líneas de selección estabilizadora, según los siguientes criterios:

1. Líneas *M* (en *r-sh* de *D. suboscura*) y *T* (en *D. melanogaster*) en que se escogen como padres para la generación siguiente los individuos que tienen como número total de quetas, en los dos segmentos sumados, el más próximo posible al número normal o medio de cada población; teniendo en cuenta al mismo tiempo que ese número total suma de ambos segmentos no equivalga a dos sumandos iguales respectivamente al número normal de quetas en cada segmento particular. Es decir, se selecciona para una diferencia entre segmentos mayor o menor que la normal.

2. Líneas *R* (en *r-sh*) y *S* (en *D. melanogaster*): los individuos seleccionados tienen el número normal de quetas en cada uno de los segmentos por separado, resultando naturalmente también un número total o suma normal. Se trata, por tanto, de selección estabilizadora para la diferencia entre segmentos.

De este modo se espera aclarar si la respuesta implica modificaciones en el proceso regulador de la simetría o repetibilidad de las estructuras, y consiguientemente si la determinación genética recae sobre el número total de quetas abdominales o sobre el número de quetas en cada segmento. En los individuos seleccionados como padres de ambos grupos de líneas es muy semejante la varianza del número total de quetas, mientras que es muy diferente la varianza de la diferencia entre segmentos (casi nula en las líneas *R* y *S*, y superior a la de las poblaciones de origen en las líneas *M* y *T*).

El número concreto de quetas correspondiente a cada una de las líneas se indica en el cuadro 5.

CUADRO 5.

	<i>r-sh, D. suboscura</i>		<i>D. melanogaster</i>			
	<i>machos</i>	<i>hembras</i>	<i>machos</i>	<i>hembras</i>		
segm. ant.	<i>Línea M</i>	—	—	—	<i>Línea T</i>	
segm. post.		—	—	—		
suma de segm.		44-45	34-35	33-34		39-40
segm. ant.	<i>Línea R</i>	21-22	20-21	16-17	<i>Línea S</i>	
segm. post.		23-24	13-14	17		19-20
suma de segm.		44-45	34-35	33-34		39-40

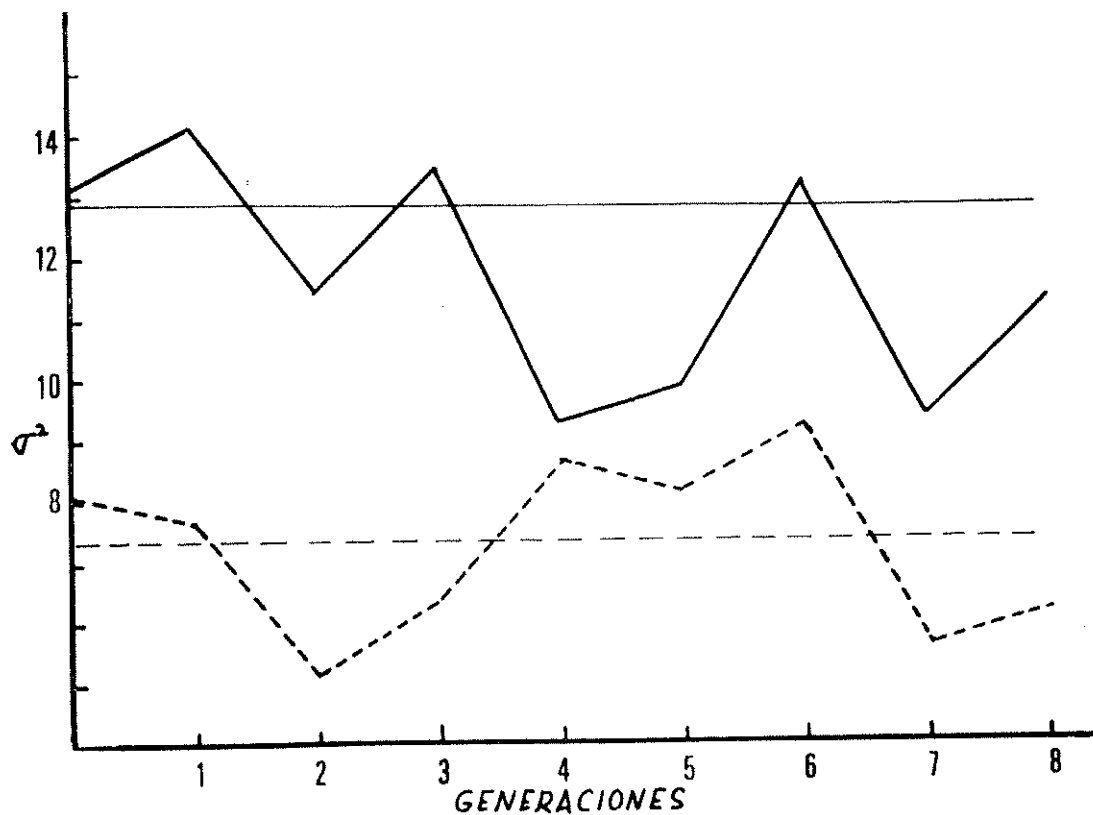


FIG. 3. Varianza fenotípica del número de quetas en cada segmento por separado, en las hembras de la línea R. Líneas continuas: segmento 5; líneas de trazos: segmento 6. Las líneas horizontales representan el valor correspondiente de la población no seleccionada (media de tres conteos durante el experimento).

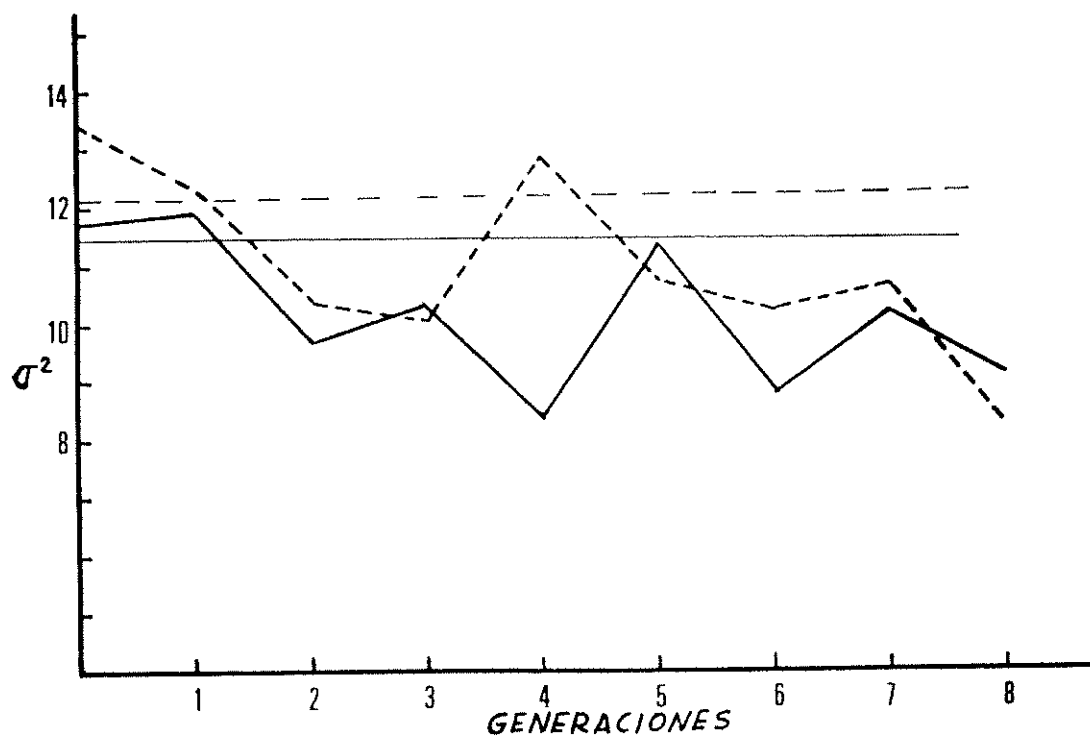


FIG. 4. Varianza fenotípica del número de quetas en cada segmento por separado, en los machos de la línea R. Representación convencional como en la fig. 3.

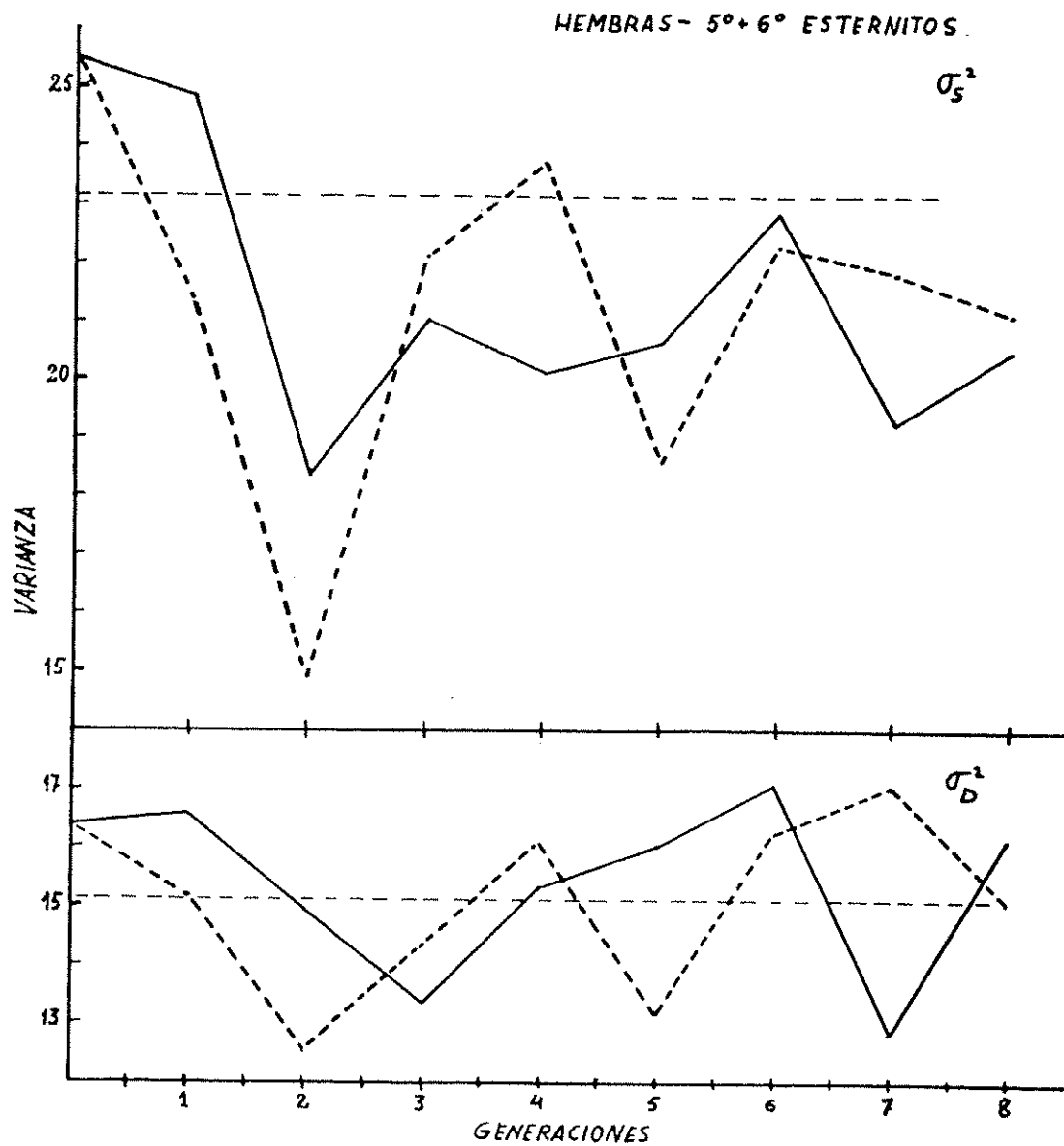


FIG. 5. Cambios en la varianza fenotípica del número total de quetas por individuo (parte superior) y en la varianza de la diferencia en número de quetas entre los dos segmentos posteriores (parte inferior) en las hembras de la cepa *r-sh*. Línea continua: línea de selección *R*; líneas de trazos: línea de selección *M*. Las líneas horizontales representan el valor correspondiente de la población no seleccionada (media de tres conteos durante el experimento).

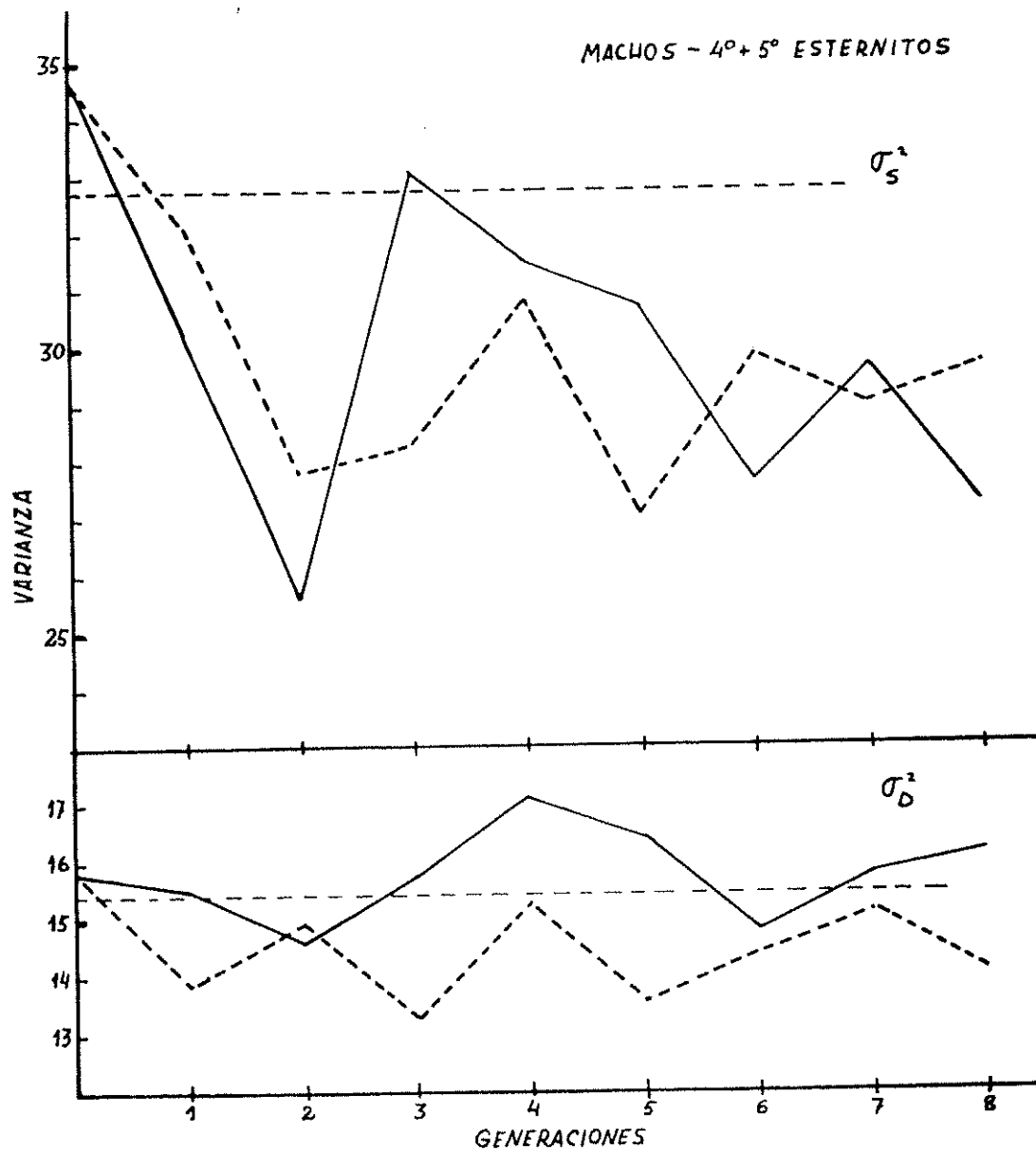


FIG. 6. Cambios en la varianza fenotípica del número total de quetas y en la de la diferencia entre los segmentos posteriores de los machos de la cepa *r-sh*. Representación convencional como en la fig. 5.

RESULTADOS

1. Población mutante r-sh de *D. suboscura*.

Selección estabilizadora.

El parámetro importante para valorar la respuesta a la selección estabilizadora es la varianza y sus componentes. Por otra parte los valores medios de quetas no han mostrado ninguna tendencia significativa en sus oscilaciones en diferentes generaciones.

En las figuras 3 y 4 se dan los valores de σ^2 para cada segmento, por separado para cada sexo, en la línea *R*; se omiten los de la línea *M*, porque son paralelos y dan lugar a idénticas observaciones. Dentro de cada sexo, en los machos no hay diferencias importantes entre los valores de los dos segmentos, descendiendo en ambos la varianza. En las hembras es fácil comprender que los valores para el segmento 6 son menores que los del segmento 5, simplemente como efecto de las correspondientes diferencias de los valores medios del número de quetas; pero, más importante, hay ciertas diferencia en la respuesta a la selección: prácticamente nula en el segmento 6, mientras la del segmento 5 es comparable a la observada en los machos. Esta discrepancia podría ser efecto de la relativa heterogeneidad entre los segmentos 5 y 6 de las hembras (por la proximidad del último a la región genital) y de la reconocida mayor variabilidad de muchos caracteres cuantitativos, en particular las quetas, en las hembras de *Drosophila*.

En la figura 5 (parte superior) llama la atención, por la diferencia entre sexos y entre los segmentos de las hembras que acabamos de comentar, la clara tendencia decreciente del valor σ^2 en el número total de quetas de las hembras, aun siendo menor que en los machos (figura 6). Esto podría ser un primer indicio, que habrá de confirmarse, de que al estudiar el carácter quetas abdominales no se puede considerar a cada segmento como una unidad independiente, sino al conjunto de segmentos como un todo. También se advierte en estas figuras la ausencia de diferencias significativas entre las líneas *M* y *R*.

Para saber qué componentes de la varianza han sido afectados por la selección podemos adoptar el criterio, seguido por varios autores, de relacionar σ^2 (varianza fenotípica del número total de

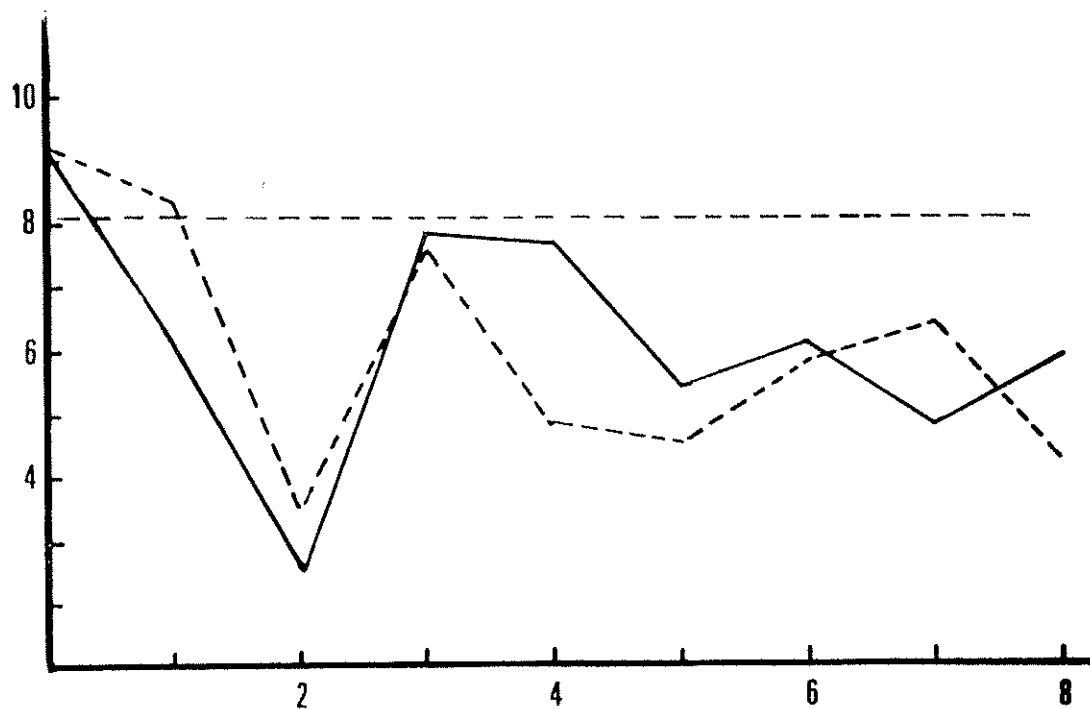


FIG. 7. Cambios del componente interindividual de la varianza ($\sigma_s^2 - \sigma_D^2$) en las hembras de la cepa *r-sh*. En abscisas, generaciones de selección; en ordenadas, valores de $\sigma_s^2 - \sigma_D^2$. Representación convencional como en las figuras anteriores.

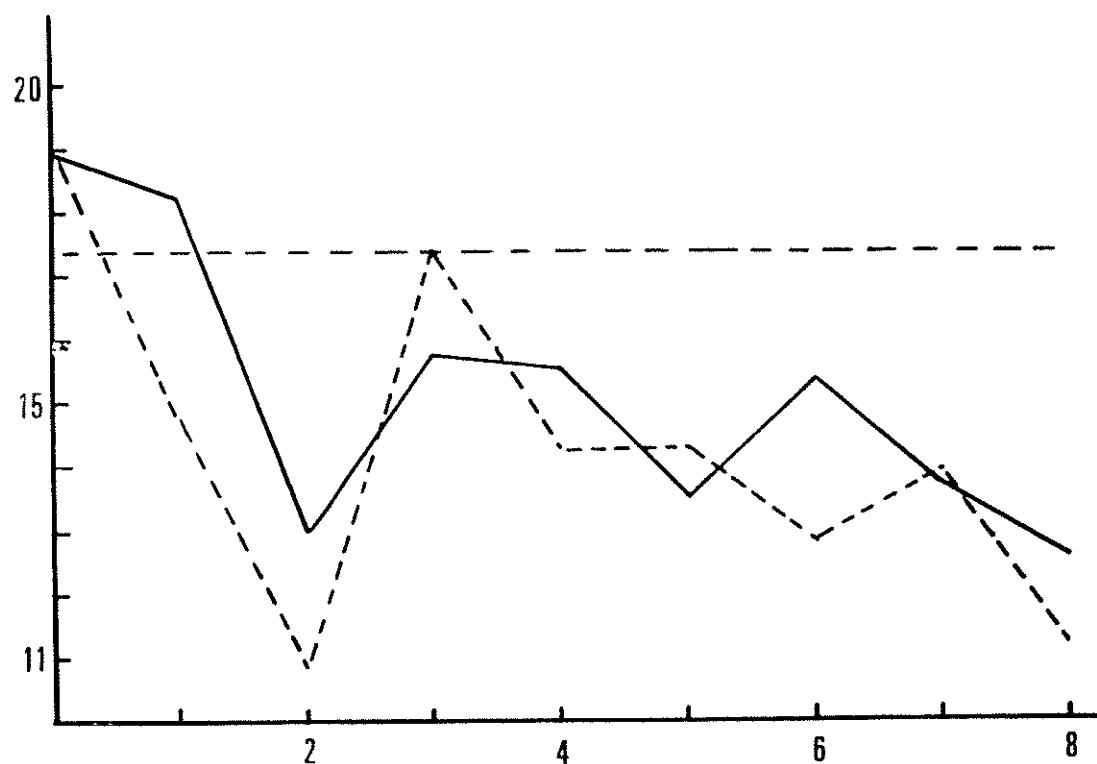


FIG. 8. Cambios del componente interindividual de la varianza ($\sigma_s^2 - \sigma_D^2$) en los machos de la cepa *r-sh*. Representación convencional como en la fig 7.

quetas de ambos segmentos sumados) y σ^2_D (varianza de la diferencia en número de quetas entre ambos segmentos). Entonces $\sigma^2_s - \sigma^2_D$ nos da la varianza entre individuos y σ^2_D la varianza intraindividual.

Según los resultados expresados en las figuras 5 y 6 (gráficos inferiores) y en las 7 y 8 parece inequívoco que la selección no ha modificado el componente intraindividual, y la respuesta positiva se refiere exclusivamente al componente interindividual, es decir, el que abarca conjuntamente la varianza genética y la ambiental común a ambos segmentos. Tampoco en este aspecto de los resultados se advierte diferencia significativa entre las líneas *R* y *M*.

Respuestas correlacionadas en quetas DC-E y abdominales.

Los cuadros que siguen servirán para apreciar qué repercusión ha tenido en las quetas abdominales la selección estabilizadora aplicada a las quetas DC-E durante 25-30 generaciones (RUBIO, 1966). Los datos reflejan el estado de las diferentes líneas, *A*, *B*, *V* y *W*, al comenzar el presente trabajo, es decir, cuando habían mediado unas 10-12 generaciones más sin selección. No obstante este lapso importante de tiempo, ninguna de las líneas había perdido las características de la respuesta positiva en quetas DC-E: reducción de la varianza fenotípica total y de la varianza de la diferencia entre lado derecho e izquierdo del individuo.

CUADRO 6a. — *Efecto de la selección estabilizadora en quetas DC-E.*

	<i>Poblac. base</i>	<i>A</i>	<i>B</i>	<i>V</i>	<i>W</i>
σ^2 ♂ ♂ ♀ ♀	3,52 ± 0,493	1,11 ± 0,155	1,50 ± 0,210	1,09 ± 0,142	0,99 ± 0,139
	4,21 ± 0,590	0,80 ± 0,113	1,85 ± 0,261	0,96 ± 0,125	1,09 ± 0,153
σ^2_D	1,92 ± 0,113	0,52 ± 0,058	0,67 ± 0,093	0,40 ± 0,052	0,37 ± 0,052

Un resultado sorprendente es la disminución del número medio de quetas abdominales en todas las líneas *A*, *B*, *V*, *W*; las diferencias respecto a la población no seleccionada y entre algunas de las líneas (seleccionadas todas ellas para número normal de quetas DC-E) son significativas. Además esa reducción significativa en

el número medio se ha dado incluso en otra línea (*H*) que ha respondido positivamente a la selección direccional para alto número de quetas DC-E (número medio de quetas abdominales, $34,83 \pm 0,459$ en los machos y $28,36 \pm 0,452$ en las hembras); mientras que en la línea (*L*) seleccionada para menor número de quetas DC-E los valores son significativamente los más bajos ($20,10 \pm 0,391$ en los machos, $17,23 \pm 0,471$ en las hembras). Estos resultados no son los normalmente esperados y otras veces comprobados (RENDEL, 1963;

CUADRO 6b. — *Respuesta en quetas abdominales de la selección estabilizadora para quetas DC-E. Todos los valores se refieren al número de quetas en los dos segmentos posteriores: \bar{x} , número medio de quetas en ambos segmentos sumados; \bar{D} , valor medio de la diferencia entre ambos segmentos; empleamos el coeficiente de variación (*V*) en lugar de la varianza fenotípica, por las diferencias existentes en \bar{x} ; en realidad los valores de σ^2 son menores en las líneas seleccionadas que en la población base, pero el cálculo de *V* demuestra que esa diferencia no es significativa reducción de la varianza, sino efecto de la disminución del valor medio.*

		Poblac. base	A	B	V	W
\bar{X}	♂ ♂	44,81 ± 0,589	30,47 ± 0,475	25,89 ± 0,533	26,90 ± 0,369	33,35 ± 0,467
	♀ ♀	34,24 ± 0,506	23,52 ± 0,453	20,29 ± 0,567	20,10 ± 0,388	26,33 ± 0,531
<i>V</i>	♂ ♂	13,15 ± 0,932	15,59 ± 1,105	20,62 ± 1,462	14,98 ± 0,972	13,34 ± 0,995
	♀ ♀	14,79 ± 1,048	19,27 ± 1,366	27,97 ± 1,983	21,04 ± 1,366	19,12 ± 1,441
\bar{D}	♂ ♂	— 1,69	— 1,77	— 3,19	— 2,54	— 2,22
	♀ ♀	+ 7,23	+ 3,92	+ 1,49	+ 1,90	+ 3,48
σ^2_D	♂ ♂	15,79 ± 2,232	12,40 ± 1,753	10,56 ± 1,493	14,53 ± 1,860	12,78 ± 1,891
	♀ ♀	16,41 ± 2,320	13,55 ± 1,915	14,78 ± 2,089	14,97 ± 1,916	13,59 ± 2,010

RASMUSON, 1964). MENSUA (comunicación personal), seleccionando dos líneas para mayor número de macroquetas DC-E, encuentra en una de ellas respuesta correlativa positiva en las abdominales desde las primeras generaciones de selección; mientras que en la otra hay inicialmente una disminución de quetas abdominales durante las primeras generaciones de selección, hasta un determinado momento en que también en esta línea comienzan a aumentar las quetas abdominales. Interpreta esa primera fase por ligamiento de los factores para quetas extra DC-E con diferentes factores para quetas abdominales en cada una de las líneas, y posterior altera-

ción de uno de esos grupos de ligamiento. En nuestro caso han transcurrido muchas generaciones de selección y de relajación de la misma para que sea posible dar esa interpretación.

Tampoco es posible explicarlo por deriva genética, pues no podría esperarse esa coincidente tendencia de todas las líneas en un sentido único. Ni puede relacionarse con los resultados e interpretación de RENDEL (1963) y YOUNG y SHELDON (1965) sobre variación en cantidad total disponible de "determinante de formación de quetas" ("make") y su variable repartición entre dos regiones que compiten por su utilización. Primero, porque en la mayoría de nuestras líneas no existe presión selectiva para aumento o disminución del número de quetas DC-E, que pudiera revelar disminución del *make* total o fenómenos de competencia en el reparto del mismo entre las dos zonas, dorsocentral-escutelar y abdominal; segundo, porque cada una de las líneas seleccionadas direccionalmente requerirán una interpretación opuesta para sus resultados (por ejemplo, cambios por selección en el *make* total en la línea L, y cambios en la distribución competitiva del mismo en la línea H).

Por otra parte, aunque es claro que en estas líneas seleccionadas y mantenidas durante tanto tiempo por cruces individuales en unas 8-10 botellas, ha aumentado en ellas el coeficiente de endogamia (si bien las generaciones de no-selección mantenidas con cruces de 3 parejas habrán reducido algo ese coeficiente), hay pruebas de que el carácter quetas abdominales no muestra depresión endogámica (KIDWELL y KIDWELL, 1957; CLAYTON *et al.*, 1957). En cambio, KUROKAWA (1962) encuentra también diferencias significativas entre los conteos de quetas abdominales que cubren varios años; al no encontrarlas entre cultivos en diferentes condiciones de alimentación, deduce que, en las condiciones habituales de cultivo en laboratorio, deben existir otros factores no genéticos de variación incluso dentro de una misma cepa. Descartadas las otras explicaciones, no nos queda sino reconocer nuestra ignorancia de posibles efectos de las condiciones de cultivo artificial.

Hay que recordar que el efecto fenotípico del mutante *r-sh*, manejado en nuestro trabajo, es una alteración muy profunda de la expresión del carácter quetas en que se pone de manifestación una mayor variabilidad tanto genética como no genética y una notable falta de regulación de la morfogénesis de dicho carácter. En tal

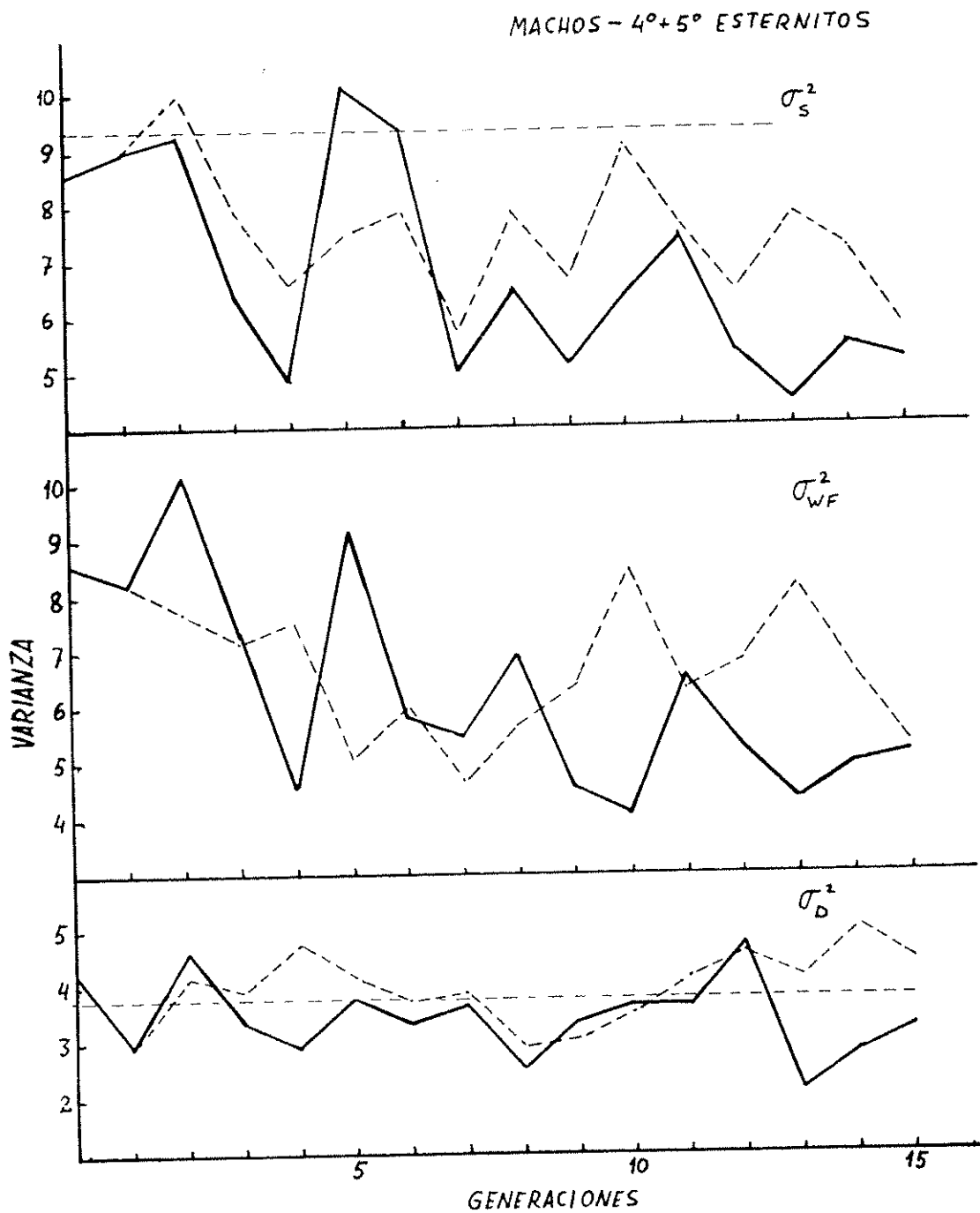


FIG. 9. Cambios en la varianza total, intrafamiliar y de la diferencia entre segmentos en los machos. Líneas continuas; línea de selección; líneas de trazos; línea T.

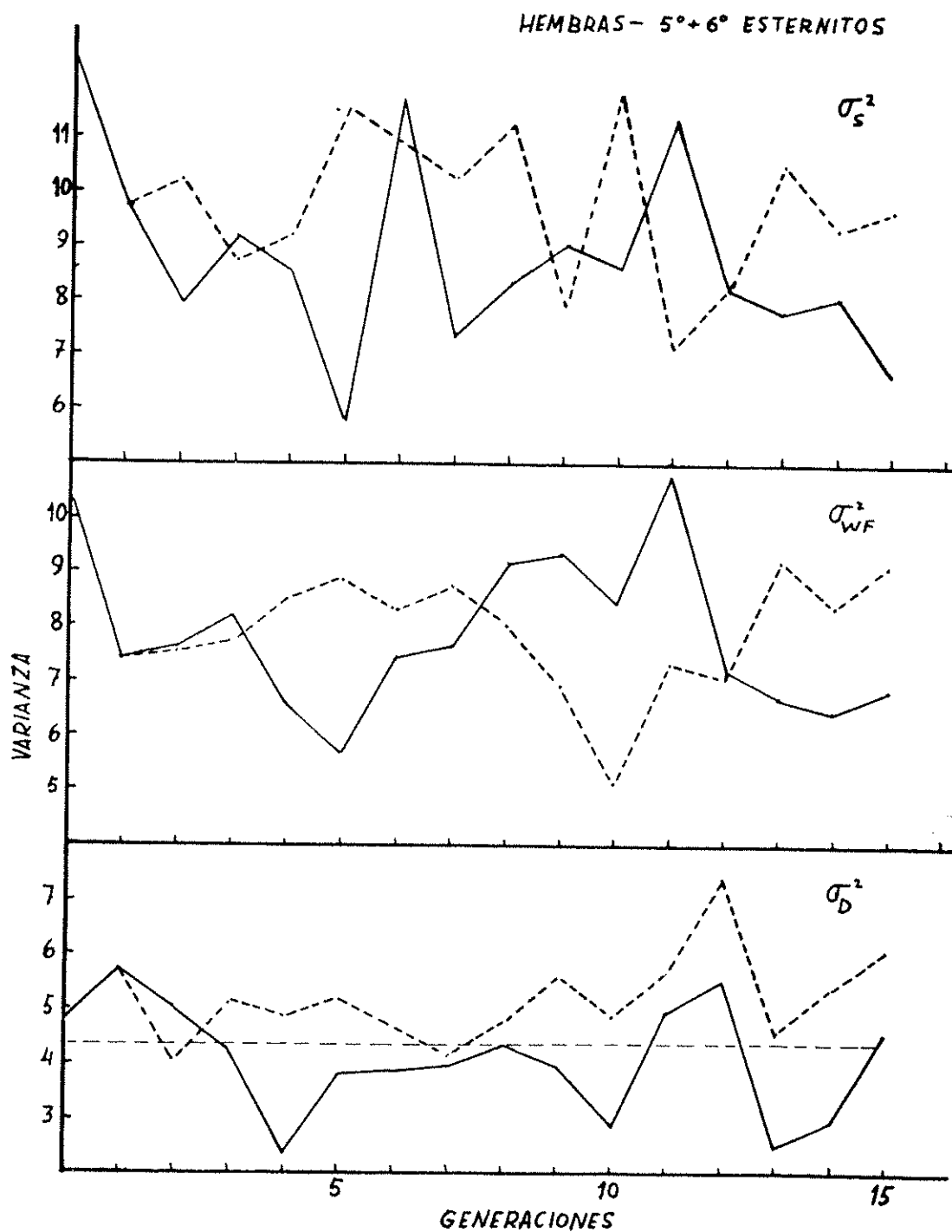


FIG. 10. Cambios en los valores de varianza en las hembras. Representación como en la fig. 9.

situación no es fácil hacer predicciones sobre cómo evolucionará el carácter no sometido a selección; y se puede suponer que aparezcan resultados debidos a complejas interacciones de unas u otras de las diferentes causas antes mencionadas. También se ha de recordar lo indicado en la introducción: que la repetida observación de las diferencias entre poblaciones naturales y de los resultados de selección en quetas abdominales, indica que por el escaso valor adaptativo de este carácter la selección natural no ha promovido el establecimiento de mecanismos que tiendan a mantener un determinado valor medio del número de quetas abdominales como óptimo.

El cuadro 6 b no deja lugar a dudas de que las quetas abdominales no han respondido a la selección estabilizadora practicada con resultado positivo sobre las quetas DC-E tanto en su variabilidad inter-individual como en la intra-individual.

En el presente experimento, en que la selección estabilizadora se ha practicado sobre las quetas abdominales, tampoco se observa una respuesta correlacionada en las quetas DC-E, cuyos valores (reuniendo los de las dos últimas generaciones) se dan en el cuadro siguiente (cuadro 7).

CUADRO 7.— *Varianza total y varianza de la diferencia entre lado derecho e izquierdo en quetas DC-E, en las líneas de selección M y R.*

		Línea M	Línea R
σ_s^2	$\begin{matrix} \text{♂} \\ \text{♀} \end{matrix}$	4,03 ± 0,565	3,43 ± 0,480
	$\begin{matrix} \text{♂} \\ \text{♀} \end{matrix}$	3,69 ± 0,516	4,53 ± 0,634
σ_D^2		1,21 ± 0,169	0,87 ± 0,122

2. Población natural de *D. melanogaster*.

En las dos líneas seleccionadas, *S* y *T*, se observa una notable regularidad de los valores medios del número de quetas, tanto si se considera cada segmento por separado como si se atiende al número total de quetas por individuo. Las varianzas de los valores medios de las 15 generaciones son algo mayores en las hembras que en los machos, y en la línea *T* que en la *S*, lo cual era de esperar; pero dichas varianzas siempre son menores de 1,00 ex-

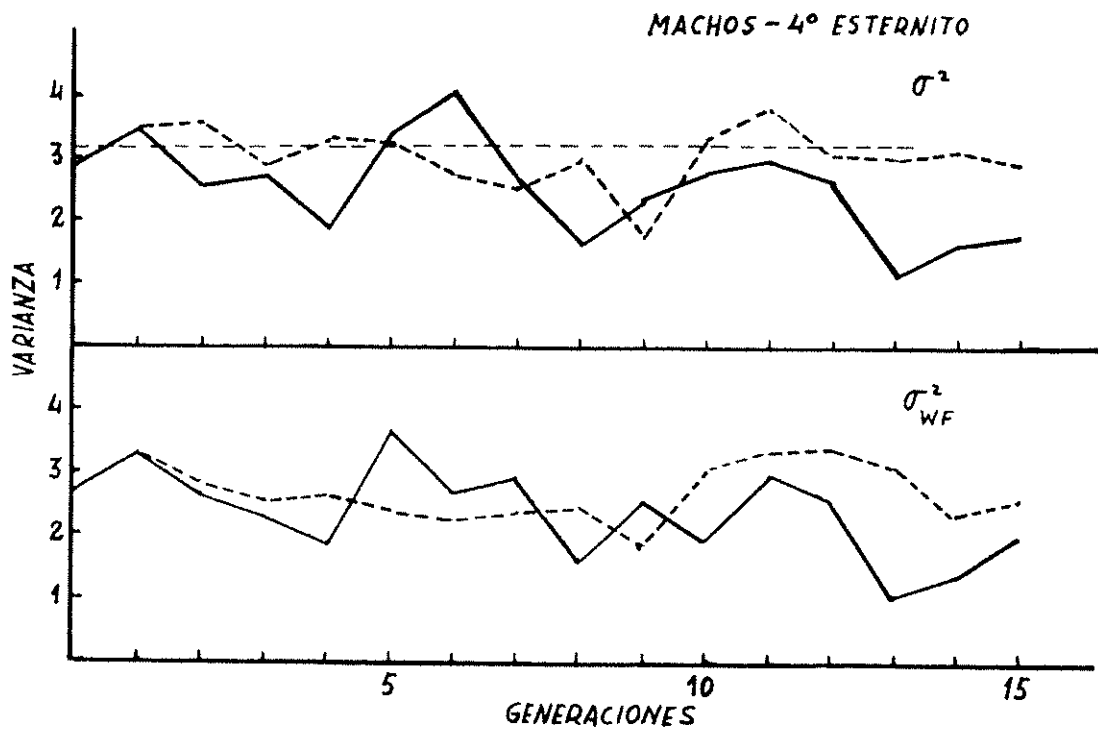


FIG. 11a. Cambios en la varianza total y la intrafamiliar del número de quetas en el cuarto esternito de los machos. Representación como en figuras anteriores.

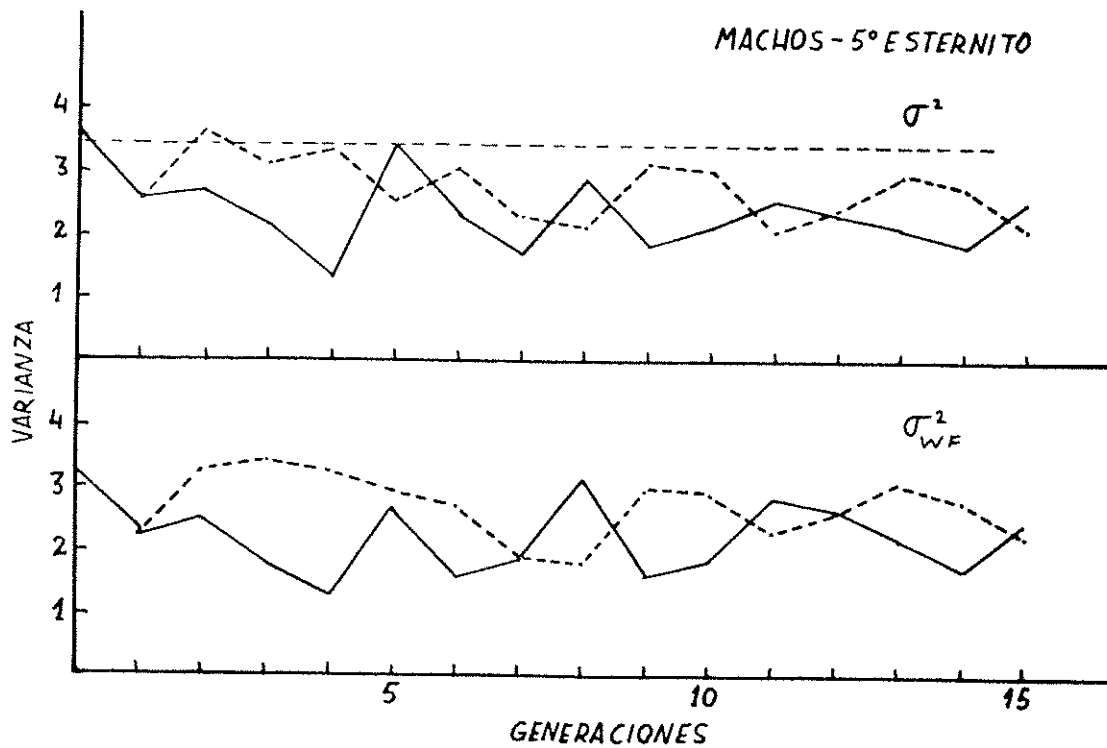


FIG. 11b. Cambios en la varianza total y la intrafamiliar del número de quetas en el quinto esternito de los machos.

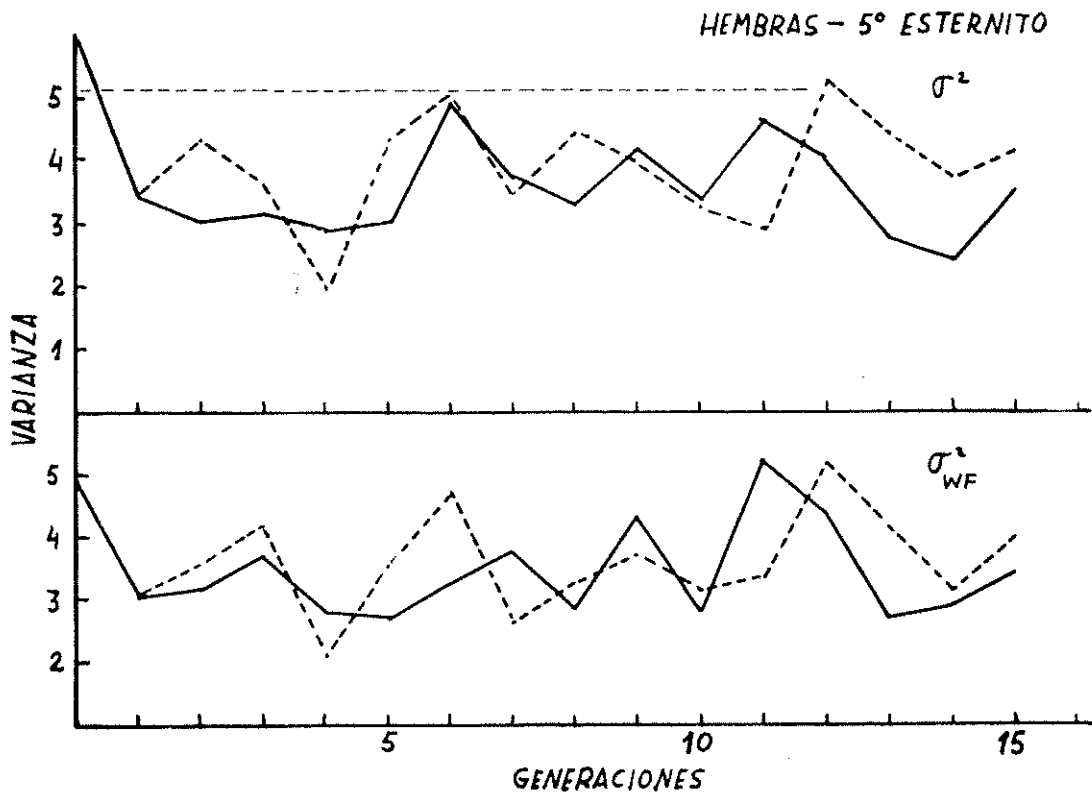


FIG. 12a. Cambios en la varianza total y en la intrafamiliar del número de quetas en el quinto esternito de las hembras.

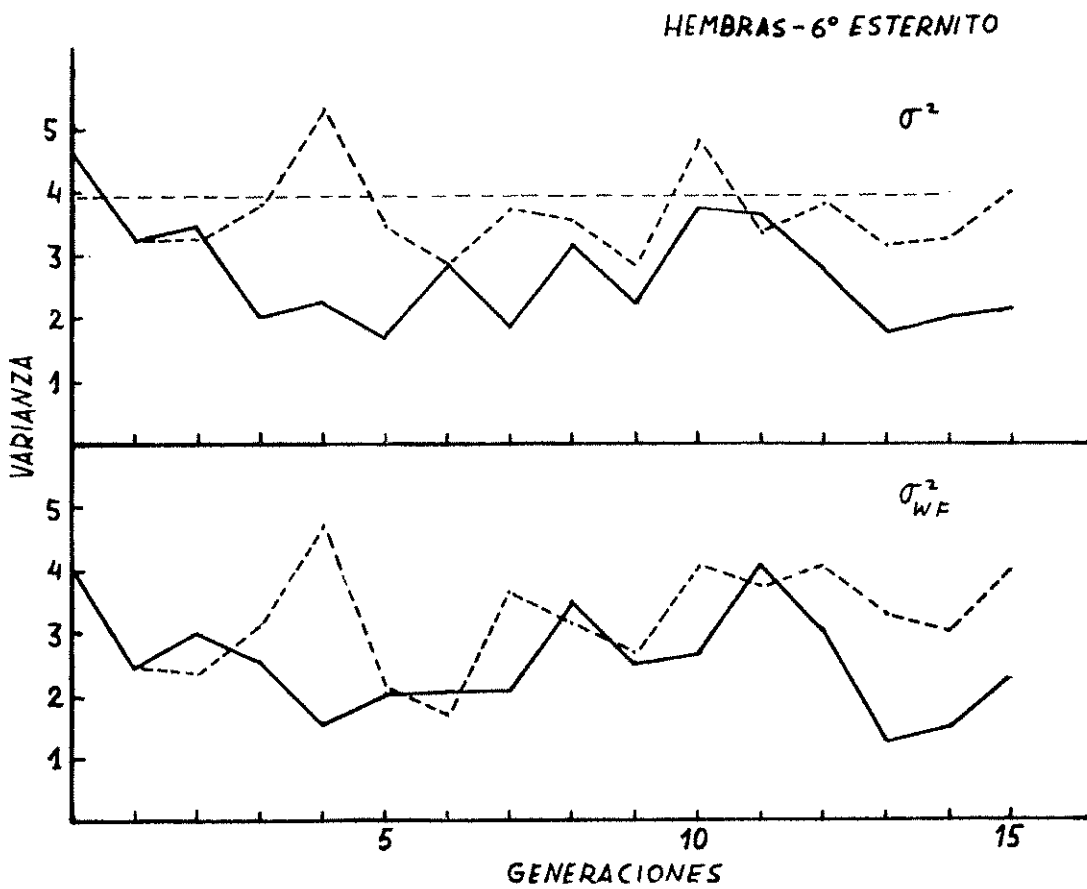


FIG. 12b. Cambios en la varianza total y en la intrafamiliar del número de quetas en el sexto esternito de las hembras.

cepto en el caso del número total de quetas en hembras de la línea *T* ($\sigma^2 = 1,399$).

La respuesta a la selección estabilizadora se refleja en las figuras 9 y siguientes. Junto a la varianza fenotípica total se representa su componente intrafamiliar, para mostrar el paralelismo entre ambos parámetros; es decir, que no existen variaciones importantes entre familias (debidas a diferencias incontrolables en los cultivos) que desvirtúen el significado de los cambios en la σ^2 .

La reducción más clara de la varianza fenotípica del número total de quetas por individuo (σ^2_s) y de la correspondiente varianza intrafamiliar (σ^2_{wf}) se constata en los machos (figura 9); es algo más pronunciada en la línea *S*, pero sin que la diferencia entre *S* y *T* sea significativa. En cambio, las hembras muestran escaso progreso con la selección, después de la reducción de las primeras generaciones; no se indica en la figura por simplificarla, que el valor medio de la varianza correspondiente (σ^2_s) en la población base es 13,51 (cuadro 3).

En cuanto a la varianza de la diferencia entre segmentos (σ^2_d , parte inferior de figuras 9 y 10) no encontramos cambios sistemáticos a medida que progresa la selección, excepto la aparición de una ligera tendencia a aumentar en la línea *T*, durante las últimas generaciones. Pero, en conjunto, tampoco encontramos aquí una divergencia significativa entre las líneas *S* y *T*, a pesar de ser éste el parámetro en que específicamente se diferencian los individuos seleccionados como genitores en cada línea.

La consideración de los cambios en la varianza atendiendo a cada segmento por separado (figuras 11 y 12) confirma lo insinuado en la primera parte de estos resultados: que la selección no actúa sobre cada uno de los segmentos en particular como unidades independientes, sino sobre el número total de quetas del individuo. En efecto, hemos encontrado casos en que a una reducción de la varianza del número total corresponde reducción de la varianza de ambos segmentos (machos de la cepa *r-sh*), y casos en que corresponde reducción en uno solo o en ninguno de los segmentos; y en ningún caso las variaciones de segmentos y las totales son paralelas. Se comprende que los valores de la varianza del número total de quetas por individuo puedan variar de modo diferente a los de la varianza del número de quetas por segmento, si suponemos que la distribución de ese número total entre los seg-

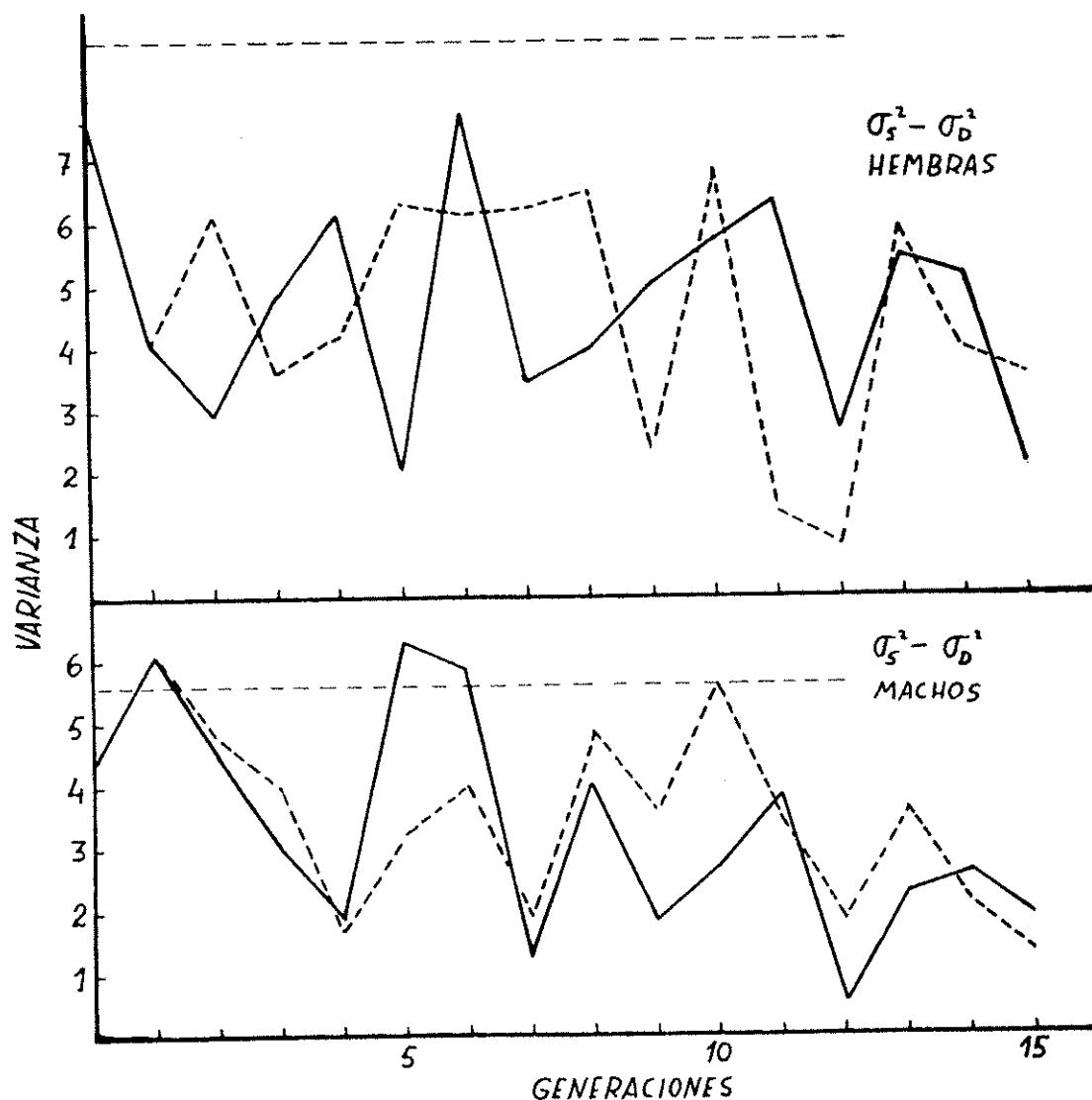


FIG. 13. Cambios del componente interindividual de la varianza ($\sigma_s^2 - \sigma_D^2$) en las líneas S (gráfica continua) y T (gráfica de trazos).

mentos es relativamente secundario o accidental en comparación con la determinación genética fundamental que se refiere a ese número total por individuo. Esta consideración se ve confirmada por el hecho antes notado de la no correspondencia entre variaciones de σ_s^2 y σ_D^2 . En concreto este hecho implica que en la población han disminuido los individuos extremos en número total de quetas sin haber disminuido los que presentan una diferencia extrema entre sus segmentos, o sea, valores extremos para uno o los dos segmentos considerados por separado.

Los datos correspondientes a la variación en el componente interindividual $\sigma_s^2 - \sigma_n^2$ (figura 13) por una parte muestran más claramente la diferente respuesta en machos y hembras y la ausencia de diferencias entre las líneas *S* y *T*; y por otra parte, confirmando lo dicho en los resultados de la selección en la cepa *r-sh*, reflejan que allí donde se ha producido reducción de la varianza, siempre el componente afectado ha sido el interindividual.

DISCUSION

La intención del presente trabajo era investigar si la selección por fenotipos intermedios produce estabilización del fenotipo variable que presentan las quetas abdominales en las poblaciones naturales y mucho más en cepas mutantes. Desde el primer momento existía una referencia a los resultados positivos obtenidos en la variación fenotípica de las macroquetas DC-E de la misma cepa mutante.

Los datos básicos obtenidos pueden resumirse así: hay respuesta positiva con reducción de varianza fenotípica, pero no la hay en la varianza de la diferencia entre segmentos σ_n^2 ; no aparece diferencia de respuesta en líneas seleccionadas con criterios distintos; finalmente no existe correlación de respuestas en quetas abdominales y quetas DC-E.

La respuesta positiva corresponde al componente interindividual de la varianza, expresado por $\sigma_s^2 - \sigma_n^2$. Este componente incluye el genético y el ambiental común a ambos segmentos, mientras que σ_n^2 es una medida del componente específico de cada segmento (la "varianza independiente" de REEVE y ROBERTSON, 1954; "error de desarrollo" de CLAYTON *et alii*, 1957; "developmental noise" de WADDINGTON, 1957; "varianza ambiental especial" de FALCONER, 1960, etc.).

A pesar de no haber tenido oportunidad de separar los componentes genético y ambiental de $\sigma_s^2 - \sigma_n^2$, parece convincente el razonar así: por una parte la heredabilidad del carácter quetas abdominales es bastante alta, pues CLAYTON *et alii* (1957) determinan en *D. melanogaster* una $h^2 = 0,52$, y nosotros en *r-sh* la hemos valorado en $h^2 = 0,42$ mediante una generación de selección bidirec-

cional; por otra parte la variación ambiental de este carácter en las condiciones controladas de laboratorio suele ser pequeña (REEVE y ROBERTSON, 1954, estiman por diferentes métodos que es sólo el 2 % de la varianza total y aproximadamente el 5 % del componente interindividual). Ciertamente que no podemos excluir definitivamente que en la disminución de $\sigma_s^2 - \sigma_n^2$ vaya incluida una cierta reducción de la varianza ambiental, al menos en la cepa *r-sh*, dado que las poblaciones mutantes tienen de ordinario una mayor variabilidad ambiental. Sin embargo parece más razonable interpretar ese cambio como referido primordialmente al componente genético. Lo confirma el que se haya manifestado con la mayor intensidad en las primeras generaciones de selección.

Diversos autores coinciden en sus cálculos de que la correlación genética entre segmentos es muy próxima a la unidad y que no existe correlación no-genética entre ellos (CLAYTON *et alii*, 1957; REEVE y ROBERTSON, 1953), es decir, que las diferencias genotípicas afectan primaria, si no exclusivamente, al nivel general de producción de quetas en el conjunto de los segmentos abdominales, siendo las diferencias entre ellos de origen no-genético. Ahora bien, en nuestro caso la respuesta positiva se da precisamente en la varianza de la suma de segmentos de modo mucho más claro que en la de los segmentos por separado.

FALCONER (1957) no encuentra reducción de σ_s^2 en su línea de selección estabilizadora. Lo interpreta como comprobación experimental de la conclusión teórica de ROBERTSON (1956), de que este tipo de selección produce disminución de la varianza genética, pero a un ritmo tan lento que no podría ser detectada en un experimento de laboratorio. Sin embargo, se conocen resultados positivos de reducción de la varianza genética de diferentes caracteres mediante selección por fenotipos intermedios (THODAY, 1959; PROUT, 1962; SCHARLOO, 1964).

En cuanto a la respuesta negativa de σ_n^2 , ya hemos indicado que no existe correlación entre los valores S (suma de quetas en ambos segmentos) y D (diferencia entre ambos); de manera que al seleccionar por S no hay garantía de que se estén seleccionando mecanismos o factores de una mejor regulación del desarrollo, aun suponiendo que existan. Esto basta para explicar la respuesta negativa observada por FALCONER (1957), como él mismo indica, porque él selecciona sólo por los valores S.

Pero la diferencia entre nuestras líneas, *M* y *T* por una parte y *R*, *S* por otra, consiste precisamente en seleccionar por menor y más constante diferencia intersegmental en *R* y *S*, y por mayor y más variable diferencia en *M* y *T*, manteniendo en todas un valor suma lo más parecido al valor medio de la población. Teniendo en cuenta los altos valores iniciales de σ^2_{D} en las dos poblaciones, sorprende que la presión selectiva aplicada en las líneas *R* y *S* no haya operado sobre esa variabilidad existente; tanto más que en la selección estabilizadora para quetas DC-E en la cepa *r-sh* (RUBIO, 1966) incluso la presión selectiva sobre el número total de quetas reducía σ^2_{D} además de σ^2_{S} , prueba de que existe una relación entre ambas. Ahora bien, HARRISON (en D.I.S., citado por FALCONER, 1957) no logró respuesta seleccionando para mayor y menor diferencia en número de quetas entre dos segmentos. FALCONER elabora sus datos y muestra que tampoco hubo reducción de σ^2_{D} en la línea seleccionada para menor diferencia intersegmental. En el mismo sentido habla el hecho de que los valores de σ^2_{D} sean semejantes en líneas endogámicas y en los cruces entre ellas. Por tanto nuestros resultados están de acuerdo y confirman su conclusión de que en las quetas abdominales la capacidad de regulación de esas diferencias no debe estar controlada genéticamente de un modo aditivo, o al menos no en un grado tal que pueda responder a un número corto de generaciones de selección (PROUT, 1962). Las variaciones en las diferencias entre segmentos, según REEVE y ROBERTSON (1953) y REEVE (1960) son casi únicamente resultado del azar ("chance effects"), de modo que en este carácter, por ser tal carácter, la σ^2_{D} se debe entender que refleja variabilidad casual o estocástica más bien que ambiental o genética específica intraindividual. Concluyen que esa variabilidad entre segmentos —que repercute en la variabilidad fenotípica total y en su irreducibilidad en poblaciones naturales— se debe principalmente a "eventos del desarrollo que son inmanejables". Otro dato observado en el presente experimento tiene ahí también su explicación: en las líneas *R* y *S* no aumenta la frecuencia de la clase de individuos semejantes a los genitores, es decir, con un número total medio de quetas distribuidas de modo regular entre los segmentos.

Una explicación basada en las características biológicas del carácter se expondrá enseguida, al comentar la falta de respuestas

correlacionadas en quetas abdominales y DC-E. En este momento la conclusión importante es que la ausencia de diferencias en las respuestas de las líneas seleccionadas por criterios diferentes (*R* y *S* por un lado, *M* y *T* por otro) se debe en su raíz a la misma causa que la falta de respuesta en ambas respecto al parámetro σ_b^2 .

Llama la atención esa falta de respuestas correlacionadas, si recordamos que se trata de dos caracteres semejantes y que hay razones para admitir elementos comunes en la determinación genética de ambos (RENDEL, 1963; SPICKETT, 1963). Incluso en la cepa *r-sh* hay una cierta correlación fenotípica entre ambos caracteres, aunque claramente significativa, según nuestros datos, sólo en los machos ($r = + 0,370$, con $P < 0,001$, en la cepa no seleccionada; $r = + 0,269$, con $P < 0,01$ en la línea seleccionada para bajo número de quetas DC-E; $r = + 0,120$ con $P > 0,1$, no significativa, en la línea seleccionada para número alto de quetas DC-E; en las demás líneas de selección, *A*, *B*, *V*, *W*, no tiene sentido calcularla porque mientras las quetas DC-E se encuentran, como resultado de la selección, en la zona de canalización del fenotipo normal, las abdominales se hallan en una zona no canalizada; por tanto cualquier posible correlación puede estar oscurecida por la canalización). Por otra parte, SPICKETT (1963) localiza tres factores para alto número de quetas en los cromosomas II y III; uno de ellos tiene efecto más general en diferentes tipos de quetas y sobre varias zonas del organismo provistas de quetas (incluidas las abdominales); los otros son de efecto más limitado a ciertas zonas y a microquetas. No es sino un caso más del entrecruzamiento y conexiones de los varios sistemas poligénicos que intervienen en la formación de las quetas de las diferentes regiones (BREESE y MATHER, 1957; JOHNSTON, 1966). Entre esos sistemas poligénicos puede haber genes pleiotrópicos, grupos en ligamento o complejos de genes adaptados en genotipos determinados. La selección, sobre todo si se hace para un solo carácter (por ejemplo, un grupo de quetas muy limitados), puede suponerse que cambia fundamentalmente la situación. Puede, por ejemplo, aumentar la frecuencia de genes particulares con influencia en un solo carácter, más bien que los pleiotrópicos; o puede deshacer bloques de ligamiento; además el nuevo genotipo puede tener una respuesta diferente a las condiciones ambientales. Esto podría explicar la falta de respuestas correlativas en el pre-

sente experimento, donde la reducción de la varianza ha afectado al parecer sólo al componente genético.

Pero no parece suficiente para la falta de respuesta correlacionada en la selección estabilizadora sobre quetas DC-E, donde además de cierta reducción de la varianza genética aditiva se obtuvo una mayor canalización del desarrollo (en el sentido de WADDINGTON) y una mayor simetría entre los dos lados del organismo. Sería suficiente si fuera cierto que la canalización depende sólo del mismo sistema poligénico determinante del carácter cuantitativo; pero hay datos para pensar que puede depender, al menos parcialmente, de un sistema específico de modificadores que regulan el desarrollo y expresión de ese carácter (RUBIO, 1966). En tal caso la falta de respuesta correlacionada indicaría que el mecanismo canalizador no es necesariamente el mismo para macroquetas DC-E y para microquetas abdominales. Por razón de economía se debería preferir no multiplicar esos mecanismos; creemos, sin embargo, que un análisis más detallado ofrece las bases para esa distinción.

Los resultados obtenidos en la variabilidad de las quetas DC-E, cuando la selección ha operado directamente sobre ellas, significan una restauración de la capacidad de control y canalización que, por acción de la selección natural existe en las poblaciones naturales para ese carácter. Cosa que no ocurre con las quetas abdominales, carácter no bien canalizado en las poblaciones naturales. Comprendemos esta diferencia al advertir que la estabilidad de desarrollo que σ^2_b mide se refiere a la simetría bilateral en las quetas DC-E y a simetría antero-posterior en las quetas abdominales. Es obvio que la simetría bilateral en muchos organismos es un carácter con claro significado biológico e importancia adaptativa; aunque no queramos atribuir a las macroquetas DC-E por sí mismas un valor adaptativo superior al de las microquetas abdominales, su canalización sería efecto de la canalización de la simetría general del organismo. Cabría pensar que en el abdomen tuviera también su sentido adaptativo, por ejemplo, la existencia de un número de segmentos dotados de microquetas; pero no alcanzamos a ver que pequeñas diferencias en la distribución de esas quetas por segmento pueda tenerlo, ni indirectamente.

Desde otro punto de vista, es indudable que el mecanismo de canalización, cualquiera que sea, debe hallarse en íntima conexión

con la peculiar morfogénesis de cada carácter, y con otros procesos concurrentes a la configuración anatómica de la región donde el carácter se manifiesta. Es válido en términos generales que las microquetas y las macroquetas no muestran diferencias cualitativas sino sólo cuantitativas en su estructura interna individual (BODENSTEIN, 1950). Pero al estudiarlas como carácter cuantitativo las consideramos en realidad de modo muy diferente, aunque no sea más que por el hecho de tomarlas como conjuntos organizados. El número de macroquetas DC-E es constante y cada una de ellas ocupa una posición definida con notable precisión, dentro de un modelo o esquema regular constituido por el conjunto de quetas y que es característico de la especie; en ese modelo tiene valor, además del número, la posición de las quetas, y en este sentido las quetas no son rigurosamente homólogas. Esto no es sólo una posibilidad teórica a tener en cuenta, como sugiere ROBERTSON (1965); el mutante *r-sh*, como se ha indicado ya, ofrece la posibilidad de selección estabilizadora de dos tipos: uno atendiendo sólo al número total normal de macroquetas DC-E, prescindiendo de su posición normal o anormal; otro atendiendo a que todas las quetas que componen ese número normal se hallan situadas según el modelo o patrón normal. La respuesta es significativamente más eficaz en el segundo tipo que en el primero, mostrando que la determinación genética y la canalización del fenotipo normal en las quetas DC-E se refieren primariamente a las localizaciones de cada una de las quetas, y como consecuencia al conjunto, y no al revés (RUBIO, 1966).

En cambio, las microquetas abdominales en cada especie no se presentan en número constante ni formando un esquema o patrón regular exacto; simplemente "ocupan" o "llenan" el espacio definido por cada esternito, con densidad más o menos regularmente espaciada. MAYNARD SMITH y SONDHI (1961) han mostrado, basándose en ideas de TURING, que la distribución y densidad de las microquetas abdominales en cada esternito se acerca a la esperada en la hipótesis de que el factor determinante sea el tamaño y forma general del esternito como unidad. Es obvio entonces que la fenogénesis del carácter microquetas debe estar influida por el desarrollo total de la región de los esternitos.

Estas diferencias son patentes con sólo haber observado detenidamente ambos tipos de quetas. Sin embargo se insiste a veces

en que no siempre es fácil decidir, cuando aparecen quetas extra, si se trata de una macroqueta o sólo de una microqueta algo más desarrollada. Esto es cierto en aquellas regiones en que de modo normal aparecen macroquetas y microquetas (región dorsocentral, región esternopleural); pero en los esternitos nunca aparecen macroquetas; tampoco aparecen microquetas en la región escutelar si no es por acción de mutantes específicos; y las microquetas de la región dorsocentral, a diferencial de las abdominales, se hallan ordenadas en filas anteroposteriores de modo muy regular (y en dos de dichas filas se insertan las localizaciones de las macroquetas DC); de manera que para la comparación entre macroquetas DC-E y microquetas abdominales sigue siendo perfectamente válido el razonamiento anterior, basado en sus diferencias fundamentales, como explicación de su falta de correlación en lo referente al mecanismo de canalización del desarrollo.

Finalmente hay que notar que la realidad biológica representada por los valores de σ^2 , tampoco es la misma en las quetas DC-E y en las abdominales; lo cual explica suficientemente la falta de respuesta correlacionada en este parámetro. REEVE (1960), estudiando el diferente comportamiento de quetas esternopleurales y abdominales indica la diferencia que, por su origen embriológico y su desarrollo, existe entre grupos de quetas situadas en regiones bilateralmente simétricas del organismo (como es el caso de las DC-E) y las quetas abdominales en que la repetición de estructuras tiene lugar en una serie anteroposterior única y localizada en el eje de simetría del organismo. Cada grupo de quetas situado a un lado del organismo deriva de un disco imaginal distinto, que se separa tempranamente; y dentro de él se van multiplicando y diferenciando líneas de células no sólo según el genotipo sino también bajo la influencia de condiciones ambientales internas que pueden diversificarse suficientemente en cada uno de los lados para originar variaciones intraindividuales de la simetría. En cambio cada esternito abdominal resulta de la fusión, en la zona central, de dos grupos de células (histoblastos hipodérmicos) originados cada uno a un lado, de modo que cada esternito es de hecho de origen bilateral. Esto elimina de los esternitos el tipo de asimetría que puede darse en líneas de células desarrolladas en diferente lado del organismo. Por otra parte los varios histoblastos de cada lado que contribuyen a la formación de los varios esternitos o segmentos abdominales,

parece que se separan en una fase relativamente tardía del desarrollo, lo cual limitaría la influencia de los diferentes genotipos en el grado de estabilización o armonía entre los esternitos adyacentes.

Para terminar hay que recalcar que, teniendo en cuenta la complejidad de las relaciones, conexiones y discrepancias que existen entre los dos caracteres y los diferentes modos en que puede actuar la selección cuando opera sobre uno solo de ellos, la falta de respuestas correlacionadas limita (aunque no la niega en absoluto) la afirmación de una correlación genética básica entre ambos. Esta sigue admitiéndose para todas las quetas de *Drosophila*, y lo que necesitamos son ulteriores observaciones que vayan precisando el grado y modalidades de esa correlación.

RESUMEN

Dentro de un plan de análisis de los efectos de la selección estabilizadora en varios caracteres y cepas de *Drosophila*, se estudian aquí las respuestas en una cepa mutante y en una población natural recién capturada, seleccionadas ambas para fenotipo intermedio del carácter quetas abdominales. Se escogió este carácter por presentar variabilidad aun en poblaciones naturales y por poderse calcular en él por un lado el número total de quetas por individuo y por otro su distribución entre segmentos adyacentes. Esto permite estudiar por separado los efectos de la selección sobre la varianza total y sobre la varianza de la diferencia entre segmentos (expresión esta última de la repetibilidad del carácter).

Se observa respuesta positiva con reducción de la varianza fenotípica total, que al parecer hay que referir a su componente genético únicamente; no la hay en la varianza de la diferencia entre segmentos, ni siquiera cuando esta diferencia es objeto directo de la selección; finalmente no existe correlación de respuestas en quetas abdominales y dorsocentrales-escutelares.

Se comparan estos resultados con los obtenidos seleccionando de modo similar para un carácter bien canalizado en poblaciones naturales. Se observa que la selección por fenotipo intermedio puede operar sobre unos u otros componentes de la varianza fenotípica, según el carácter elegido.

Se analiza la diversa significación del parámetro σ^2_b , en función del carácter a que se aplica y consiguientemente su utilidad para detectar el fenómeno de canalización.

AGRADECIMIENTOS

El autor desea agradecer al Prof. Antonio Prevosti las orientaciones y sugerencias recibidas en diversas ocasiones durante la elaboración del presente trabajo. Y a la Srta. Josefina Pagán su eficaz ayuda técnica.

REFERENCIAS

- BODENSTEIN, D.
1950 The postembryonic development of *Drosophila*. En: *Biology of Drosophila*, ch. IV. Ed. M. DEMEREC. New York. J. Wiley and Sons.
- BRESE, E. L. y MATHER, K.
1957 The organisation of polygenic activity within a chromosome in *Drosophila*. I. Hair characters. *Heredity*, **11**: 373-395.
- CLAYTON, G. A., MORRIS, J. A. y ROBERTSON, A.
1957 An experimental check on quantitative genetical theory. I y III. *J. Genet.*, **55**: 131-151; 171-180.
- FALCONER, D. S.
1957 Selection for phenotypic intermediates in *Drosophila*. *J. Genet.*, **55**: 551-561.
- FALCONER, D. S.
1960 Introduction to quantitative genetics. Oliver and Boyd. Edinburgh-London.
- FALCONER, D. S. y ROBERTSON, A.
1956 Selection for environmental variability of body size in mice. *Z. indukt. Abstamm.-u. Vererb. Lehre*, **87**: 385, 391.
- GIBSON, J. B., PARSONS, P. A. y SPICKETT, S. G.
1961 Correlations between chaeta number and fly size in *Drosophila melanogaster*. *Heredity*, **16**: 349-353.
- JOHNSTON, N. V.
1966 Pattern of abdominal microchaetae in *Drosophila*. *Aust. J. Biol. Sci.*, **19**: 155-166.
- KUROKAWA, H.
1960 Sexual isolation among the three races A, B and C of *Drosophila auraria* Peng. *Jap. J. Genet.*, **35**: 161-166.
- KUROKAWA, H.
1962 Population genetics on three races of *D. auraria* Peng. I. Bristle number of sixth sternite in male. *Jap. J. Genet.*, **37**: 510-517.

- KUROKAWA, H.
1963 Population genetics on three races of *D. auraria* Peng. II. Sexual isolation among strains within a race C. *Jap. J. Genet.*, **38**: 1-5.
- LERNER, J. M.
1954 Genetic homeostasis. Oliver and Boyd, Edinburgh.
- LERNER, J. M.
1958 The genetical basis of selection. J. Wiley and Sons, New York.
- LEWIS, E. B.
1960 A new standard medium. *D. I. S.*, **34**: 117.
- MATHER, K.
1941 Variation and selection of polygenic characters. *J. Genet.*, 159-193.
- MAYNARD SMITH, J. y SONDIH, K. C.
1961 The arrangement of bristles in *Drosophila*. *J. Embryol. exp. Morph.*, **9**: 661-672.
- NEEL, J. V.
1940 The interrelations of temperature, body size and character expression in *D. melanogaster*. *Genetics.*, **25**: 225-250.
- PROUT, T.
1962 The effects of stabilizing selection on the time of development in *D. melanogaster*. *Genet. Res.*, **3**: 364-382.
- RASMUSON, M.
1955 Selection for bristle number in some unrelated strains of *D. melanogaster*. *Acta Zool. Stokh.*, **36**: 1-49.
- RASMUSON, M.
1964 Combined selection for two bristle characters in *Drosophila*. *Hereditas*, **51**: 231-256.
- REEVE, E. C. R.
1960 Some genetic tests on asymmetry of sternopleural chaeta number in *Drosophila*. *Genet. Res.*, **1**: 151-172.
- REEVE, E. C. R. y ROBERTSON, F. W.
1953 Analysis of environmental variability in quantitative inheritance. *Nature* (London), **171**: 874-875.
- REEVE, E. C. R. y ROBERTSON, F. W.
1954 Studies in quantitative inheritance. VI. Sternite chaeta in *Drosophila*: a metameric quantitative character. *Z. indukt. Abstamm.-u. Vererb. Lehre*, **86**: 269-288.
- RENDEL, J. M.
1959 Canalization of the scute phenotype in *Drosophila*. *Evolution*, **13**: 425-439.
- RENDEL, J. M.
1963 Correlation between the number of scutellar and abdominal bristles in *D. melanogaster*. *Genetics*, **48**: 391-408.
- RENDEL, J. M.
1967 Canalisation and gene control. Academic Press, New York-London.
- RENDEL, J. M. y SHELDON, B. L.
1960 Selection for canalisation of the scute phenotype in *D. melanogaster*. *Aust. J. Biol. Sci.*, **13**: 36-47.
- ROBERTSON, A.
1956 The effect of selection against extreme deviants based on deviation or on homozygosity. *J. Genet.*, **54**: 236-248.

- ROBERTSON, A.
1965 Variation in scutellar bristles number. An alternative hypothesis. *Amer. Nat.*, **99**: 19-24.
- RUBIO, J.
1966 A study of stabilizing selection in a mutant character of *D. suboscuro*. Ph. D. Thesis, London University.
- SCHARLOO, W.
1964 The effect of disruptive and stabilizing selection on the expression of a cubitus interruptus mutant in *Drosophila*. *Genetics*, **50**: 553-562.
- SCHMALHAUSEN, I. I.
1949 Factors of evolution. The Blakiston Company. Philadelphia-Toronto.
- SIMPSON, G. G.
1953 The major features of evolution. Columbia Univ. Press. New York.
- SPICKETT, S. G.
1963 Genetic and developmental studies of a quantitative character. *Nature (London)*, **199**: 870-873.
- THODAY, J. M.
1959 Effects of disruptive selection. I. Genetic flexibility. *Heredity*, **13**: 187-203.
- WADDINGTON, C. H.
1942 Canalisation of development and the inheritance of acquired characters. *Nature (London)*, **150**: 563-565.
- WADDINGTON, C. H.
1957 The strategy of the genes. G. Allen and Unwin, London.
- WADDINGTON, C. H.
1959 Canalization of development and genetic assimilation of acquired characters. *Nature (London)*, **183**: 1654-1655.
- WADDINGTON, C. H.
1960 Experiments on canalizing selection. *Genet. Res.*, **1**: 140-150.
- WATTIAUX, J. M.
1962 Variation in bristle number in relation to speed of development in *D. melanogaster*. *Nature (London)*, **194**: 706-707.
- WRIGHT, S.
1952 The genetics of quantitative variability. En: Quantitative Inheritance. Ed. C. H. WADDINGTON y E. C. R. REEVE. London.
- YOUNG, S. S. Y y SHELDON, B. L.
1965 Correlated response in scutellar bristles to selection for abdominal bristles in *D. melanogaster*. *Genetics*, **52**: 287-295.

Resultados del "Cruce Industrial" en ganado ovino de raza Rasa aragonesa

por ISIDRO SIERRA

Centro de Investigación y Desarrollo Agrario del Ebro, Zaragoza

A B S T R A C T

FIRST GENERATION CROSSES OF RASA ARAGONESA SHEEP FOR MEET PRODUCTION

From first generation crosses, performed in the Ebro Valley, between Fleischschaff, Landschaff and Texel rams and Rasa Aragonesa ewes were obtained offspring (F₁) with higher birth weights and growth rates, reaching weights 3,5-5,9 kgs. greater than those of the pure-bred Rasa controls at 90 days of age.

Fleischschaff × Rasa hybrids were the best of all, having average daily gains of 239 gs. against 189 grs. of the pure-bred Rasa.

To obtain the best results from first generation crossing, it is desirable that carcass weights be increased from 10-12 kgs. to 14-16 kgs.

INTRODUCCION

Por un lado los excesivos gastos y por otro el exiguo producto bruto (P. B.) obtenido, conducen actualmente a una rentabilidad muy baja en las explotaciones ovinas del Valle del Ebro.

La débil intensidad reproductiva (poco número de corderos por oveja y año) y el deficiente crecimiento de los mismos, son factores que influyen de manera notable en el escaso P. B. ovino.

Haciendo abstracción de los problemas reproductivos y con el fin de aumentar la productividad del rebaño, se ha utilizado un sistema simple y de rápidos resultados: el CRUCE INDUSTRIAL.

Efectivamente, el cruzamiento en 1.ª generación de ovejas del país (en especial raza rasa aragonesa) con sementales pertenecientes a diversas razas de aptitud cárnica, ha permitido obtener, debido al fenómeno de la heterosis, resultados muy notables.

Han sido numerosas las razas empleadas en estos cruzamientos. Fundamentalmente se pueden citar: Fleischschaff, Landschaff, Merino Precoz Francés, Texel, Ile de France, Suffolk y Lincoln.

Ello ha dado lugar a resultados sumamente variables por lo que parece interesante llevar a cabo un estudio de los diversos cruces a fin de fijar conclusiones.

MATERIAL Y METODOS

Por desgracia no se ha podido abarcar todas las razas citadas, quedando reducido el estudio a tres de ellas: Landschaff, Fleischschaff y Texel.

A continuación se indican de manera sucinta las normas generales de desarrollo de los ensayos:

1) *Elección de los lotes*

Ovejas: Se eligieron de 40 a 50 ovejas (según casos) de raza rasa aragonesa (variedad monegrina) con un peso medio de unos 38 kg. y edad entre 3 y 5 años.

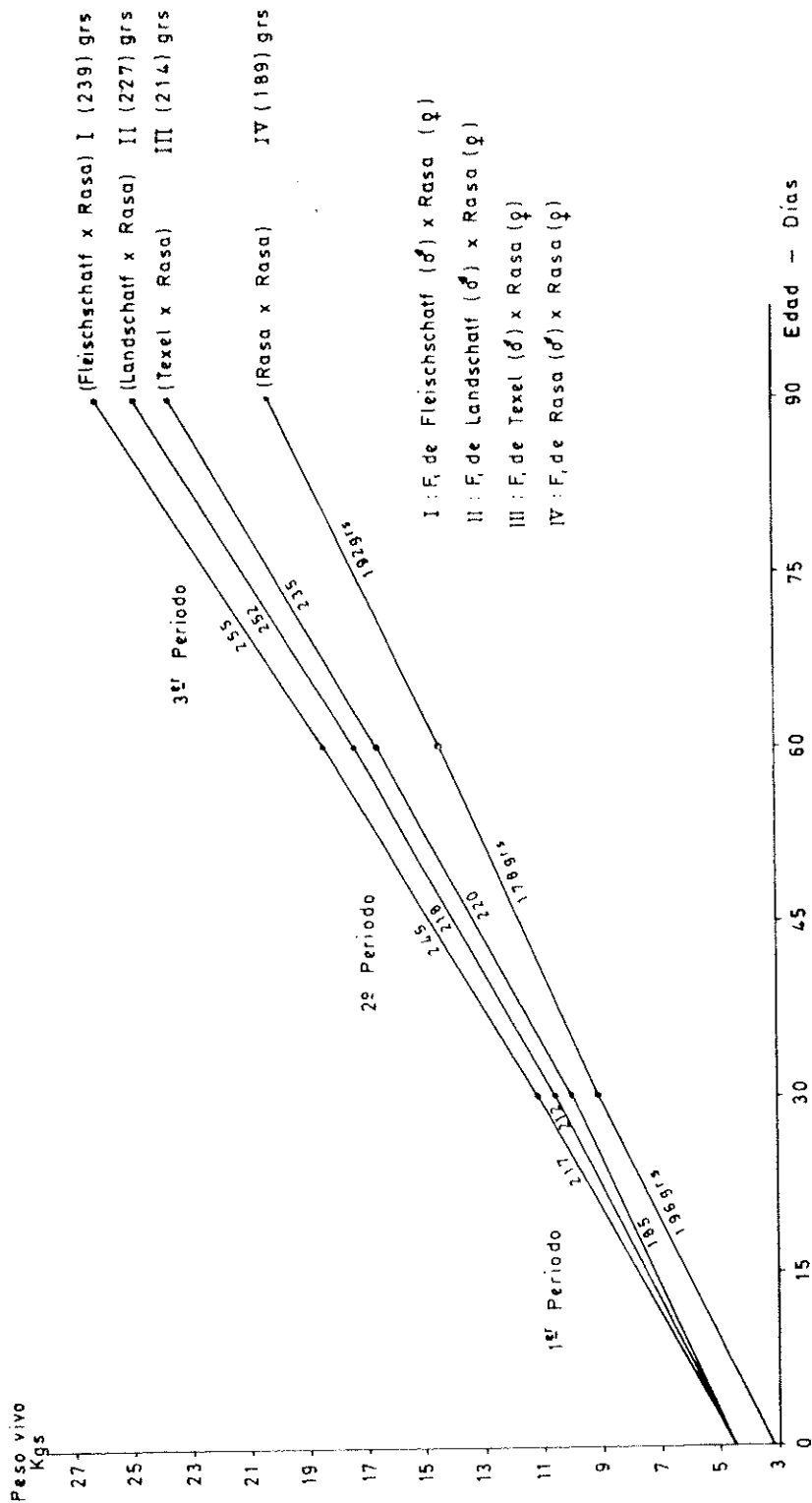
Sementales: Fueron empleados en cada ensayo 3 ó 4 sementales de cada una de las razas a estudiar.

Corderos: Únicamente se han tenido en cuenta en los ensayos los corderos simples nacidos de las ovejas elegidas, habiendo eliminado los gemelos.

2) *Metodología*

a) Control del peso: Los corderos fueron pesados al nacimiento y posteriormente se realizaron controles periódicos globales cada 14 días.

Gráfico nº 1



RESULTADOS CRUCE INDUSTRIAL SOBRE RAZA RASA ARAGONESA
VALLE del EBRO

b) Datos de interés: Entre los datos de mayor importancia recogidos figuran los pesos y ganancias obtenidos a los 30, 60 y 90 días, como fechas más interesantes, en especial la primera (capacidad lechera de las madres) y última (capacidad genética individual).

c) Alimentación: Todos los corderos permanecieron en el aprisco recibiendo heno de alfalfa y pienso concentrado "ad libitum".

Igualmente las ovejas durante la lactancia permanecieron estabuladas, recibiendo alimentación suficiente.

d) Edad a la venta: Los animales fueron vendidos alrededor de los 100 días de edad, siendo destinados al sacrificio.

RESULTADOS

Seguidamente y en el cuadro núm. 1 y gráfico núm. 1 se exponen los resultados conseguidos en los diversos ensayos.

DISCUSION

1) *Pesos al nacimiento*

No existe diferencia entre los pesos de los lotes de animales cruzados, siendo sin embargo muy significativa con respecto al lote testigo de raza pura. Dicha diferencia oscila entre 1,275 a 1,350 kg.

Esto es lógico teniendo en cuenta la gran influencia del causal genético aportado por el padre.

2) *Peso a los 30 días*

Este control constituye un buen síntoma para conocer la capacidad lechera de las madres (índice de correlación de 0,70 a 0,90).

El cuadro nos muestra que las diferencias no son notables (no significativas) ya que la raza de las madres es la misma.

CUADRO 1. — Resultados del cruce entre ovejas de raza Rasa aragonesa y semimentales Fleischschaff, Landschaff, Texel y Raso.

Raza del padre	N.º de corderos hembras	N.º de corderos machos	Peso promedio al nacimiento Kg.	Peso a los 30 días Kg.	Ganancia diaria media 0-30 días	Peso a los 60 días Kg.	Ganancia diaria media 30-60 días	Peso a los 90 días Kg.	Ganancia diaria media 60-90 días	Ganancia media diaria general
Fleischschaff	18	18	4,525	11,050	217 g.	18,400	245 g.	26,050	255 g.	239 g.
Landschaff	20	20	4,450	10,800	212 g.	17,350	218 g.	24,900	252 g.	227 g.
Texel	20	23	4,460	10,010	185 g.	16,600	220 g.	23,650	235 g.	214 g.
Raza Aragonesa	23	23	3,175	9,050	196 g.	14,390	178 g.	20,150	192 g.	189 g.

3) *Peso a los 90 días*

El peso a los 90 días refleja la capacidad genética del individuo en cuanto al crecimiento.

Efectivamente el cordero se ve ya menos influido por la cantidad de leche recibida de su madre y puede mostrar todas sus posibilidades de crecimiento al disponer de otros alimentos "ad libitum".

Se observa una clara diferencia entre los pesos de los animales cruzados con respecto al testigo (de 3,500 a 5,900 kg.). En estas cifras va incluida la diferencia del peso al nacimiento.

En este sentido los híbridos de Fleischschaff × Raso consiguen ganancias medias de 239 gr. por día, mientras los rasos puros sólo alcanzan 189 gr.

Los procedentes del cruce con sementales Texel (214 gr. diarios) se hallan por bajo de los híbridos Landschaff × Raso que ocupan el segundo lugar con 227 gr. de ganancia diaria.

Como resumen diremos que las diferencias son significativas entre los corderos cruzados y los testigos. Por otro lado, entre los cruzados Landschaff y Fleischschaff no hay diferencia significativa, mientras que sí existe entre éstos y los cruzados Texel.

4) *Curvas de crecimiento*

Es interesante destacar la gran precocidad del ganado raso. Sus crecimientos comienzan a disminuir a partir de los 3 meses, lo cual indica claramente la conveniencia de no mantener por más tiempo a estos animales en engorde (índices de transformación poco económicos y acúmulos de grasa notables en la canal).

Por el contrario los híbridos mantienen crecimientos elevados a los 90 días, con los consiguientes índices de transformación favorables y canales no excesivamente grasas.

Esto podría permitir alcanzar económicamente pesos superiores vendiendo los animales con 100 a 120 días (peso vivo de 28 a 32 kg. y canales de 14 a 16 kg.). Sin embargo por el momento no son interesantes en nuestra nación por circunstancias comerciales, que incluso afectan a pesos inferiores (paso de categoría por aumento de peso, sin tener en cuenta edad, ni calidad, con el consiguiente descenso de precio).

5) *Calidad de la canal*

Las canales del lote testigo son más estrechas y de menor peso, presentando en general un mayor porcentaje de grasa.

Los híbridos Fleischschaff × Raso presentan canales más compactas, anchas y pesadas, con una mejor conformación y un estado de engrasamiento correcto.

Los corderos Texel × Raso también tienen canales compactas, pero no tan bien conformadas, presentando un grado de engrase parecido al anterior.

Las canales de los individuos Landschaff × Raso son más alargadas y menos grasas, signo claro de su menor precocidad (por lo que es posible fuese interesante la raza Landschaff para la producción de corderos de 30-33 kg. peso vivo).

6) *Posibilidades del cruce industrial*

Se destacan las siguientes:

- a) Aumento claro del P. B. O. con gastos casi idénticos.
- b) Canales de más rendimiento, de producción económica y de mejor conformación.
- c) Posibilidades de exportación (canales de tamaño internacional).
- d) Mayor beneficio para el ganadero, carnicero y consumidor.

7) *Problemas derivados del cruce industrial*

Todos los corderos producidos en dicho cruce, tanto machos como hembras, son destinados al sacrificio. Así, pues, es preciso arbitrar una fórmula para realizar correctamente la reposición del rebaño. Entre otras posibles se indican:

- a) Mantener un lote selecto de raza rasa aragonesa reproducido en pureza que servirá de vivero para realizar la reposición.
- b) No llevar a cabo el cruce industrial en todas las cubriciones, destinando alguna de ellas, de tiempo en tiempo, a la reposición utilizando sementales rasos.
- c) Complementariedad entre explotaciones. En regiones pobres se reproduce la raza rústica en pureza siendo vendidas las hembras a otras explotaciones de zonas ricas que realizarán el cruce industrial.

CONCLUSIONES

- 1.º) Interesa practicar el cruce industrial en el ganado ovino raso aragonés con sementales de razas de aptitud cárnica.
- 2.º) Para llevar a cabo dicho cruce la raza alemana Merino-Fleischschaff se muestra la más interesante de entre las estudiadas, por lo menos hasta peso vivo de 25 a 26 Kgs.
- 3.º) Es de gran importancia promocionar comercialmente canales más pesadas (14-16 Kgs.) de cordero joven (100-120 días) con lo que se conseguiría, a base de un aprovechamiento total de las posibilidades del cruce industrial, mejorar los resultados económicos de la explotación, aumentar la producción cárnica del país e incluso elevar las posibilidades de exportación, ya que con las actuales de 10-12 Kgs. esto no es factible.

RESUMEN

Resultados del "Cruce industrial" en ganado ovino de raza raso aragonesa

En cruzamientos de primera generación realizados en el Valle del Ebro con sementales de raza Fleischschaff, Landschaff y Texel sobre ovejas "rasa aragonesa" se ha conseguido en los corderos así obtenidos (F₁) una notable mejoría de los pesos al nacimiento y de los índices de crecimiento, alcanzando a los 90 días de edad pesos que superaban de 3,500 a 5,900 Kgs. a los del lote testigo.

Los híbridos Fleischschaff × Raso han destacado sobre los demás obteniendo ganancias medias diarias de 239 grs. frente a 189 gramos en los rasos puros.

Con el fin de conseguir un mayor rendimiento del "cruce industrial" y a la vez por diversas razones de orden general, se indica la conveniencia de promocionar canales de más peso (14-16 Kgs.).

REFERENCIAS

SIERRA, I

«Posibilidades de industrialización de las empresas de ganado ovino de aptitud cárnica en el Valle del Ebro». Tesis doctoral. 1968. Zaragoza.

Tipos florais da videira - revisão crítica; proposta de classificação

por LUIS DE O. M. DA COSTA E SOUSA

Instituto Superior de Agronomia, Lisboa

INTRODUÇÃO

Em 1938, OBERLE emitia a opinião de que não era satisfatória a terminologia adoptada para as formas sexuais da videira.

Paradoxalmente, a ambiguidade tem aumentado de então para cá.

A apreciação da sexualidade é feita, umas vezes em função da morfologia e da fisiologia, outras vezes apenas em função da morfologia ou apenas em função da fisiologia. Daqui resulta que os conceitos básicos de hermafroditismo, feminilidade e masculinidade aparecem com frequência completamente alterados.

Bastará recordar, por agora, que em classificação publicada em local de responsabilidade, se consideram 3 grupos de “flores femininas, hermafroditas” e nenhum de flores efectivamente femininas (11), o que, evidentemente, constitui um absurdo.

A diversidade de terminologia e de critérios é tal que, por vezes, impede a interpretação da literatura da especialidade. A mais recente prova, tive-a eu na altura da revisão da bibliografia sobre esta matéria. A consulta dos “Horticultural Abstracts” deu-me conhecimento da existência de várias publicações que referem videiras com “flores morfològicamente hermafroditas, mas funcionalmente femininas”.

Como era natural, até porque tinha já utilizado esta mesma expressão nesse sentido, imaginei que se trataria de videiras com

flores que parecendo ser hermafroditas perfeitas são, na verdade, funcionalmente femininas. Porém, a leitura directa do texto de uma das publicações (6), levou-me à conclusão de que aquela expressão era utilizada para significar flores pistiladas, de estames retroflectidos. Este facto obrigou-me a pôr de lado os resumos bibliográficos de trabalhos que, usando esta mesma expressão, não pude consultar directamente.

Confirma-se, assim, a necessidade de proceder à actualização da terminologia e de procurar uma nova classificação de tipos florais.

I. TIPOS FLORAIS ATÉ HOJE CONSIDERADOS

O estudo da sexualidade da videira (referimo-nos apenas ao género *Vitis*), tem mostrado que há, fundamentalmente, três tipos florais. Na terminologia mais antiga e mais generalizada na Europa, e sistematizada pela primeira vez por RATHAY (23), esses três tipos correspondem a:

- 1 — Flores hermafroditas, caracterizadas por apresentarem pistilo e estames perfeitos, exteriorizada a perfeição destes por filetes rectos, erectos e compridos à floração.
- 2 — Flores femininas, caracterizadas por apresentarem pistilo morfológica e funcionalmente perfeito e estames curtos e débéis, curvando à floração, infuncionais por total ou parcial esterilidade do pólen (desprovido de poros e incapaz de germinar nos meios de cultura).
- 3 — Flores masculinas, caracterizadas por apresentarem pistilo rudimentar e abortivo e estames rectos, erectos e bastante compridos.

Outra classificação que por assim dizer completa a anterior e é sobretudo usada pelos autores americanos, considera, respectivamente: 1) Flores hermafroditas; 2) Flores pistiladas ou pistilíferas; 3) Flores estaminadas ou estaminíferas.

Baseado em critério meramente fisiológico, STEINGRUBER (27), chamou “androdinâmicas férteis” às flores hermafroditas, “ginodinâmicas férteis” às flores femininas e “androdinâmicas estéreis” às flores masculinas. E OBERLE (19), considerou: 1) Flor funcionalmen-

te hermafrodita; 2) flor funcionalmente pistilada ou, de preferência, andro-estéril (“male sterile”), e 3) flor funcionalmente estaminada ou, de preferência, gino-estéril (“female sterile”).

Qualquer destas classificações, têm sido, directa ou indirectamente, objecto de críticas, que à luz dos actuais conhecimentos, podem resumir-se do seguinte modo:

Não é correcto chamar femininas ou mesmo pistiladas a flores que apresentam estames, embora deformados. Daqui, as flores “femininas” ou “pistiladas” serem também designadas, conforme os critérios, por “hermafroditas imperfeitas”, “pseudo-hermafroditas”, “funcionalmente pistiladas” ou “andro-estéreis” (23, 28, 27, 16, 19) e até “morfologicamente hermafroditas mas funcionalmente femininas” (6).

Como já fizemos notar, esta última expressão é de todo inconveniente, na medida em que faz lembrar que se trata de flores que aparentando ser hermafroditas, pelo aspecto morfológico, se comportam, de facto, como femininas do ponto de vista fisiológico. O inconveniente da expressão é agravado pela circunstância de, embora pouco frequentes, existirem castas cujas flores apresentam o comportamento sugerido pela aludida expressão (28, 26).

A ocorrência de videiras com “verdadeiras flores femininas” (2, 3), ainda que ocasional e considerada como um exemplo de paraginodioicismo em que as anteras abortadas foram incluídas dentro dos carpelos e gradualmente transformadas em óvulos (7), digamos uma anomalia teratológica (15), não pode deixar de comprometer as classificações que só preveem feminilidade no caso das flores pistiladas. Uma vez que, como vimos, a feminilidade fisiológica pode ocorrer em três tipos morfológicos (verdadeiras flores femininas, flores pistiladas, com os estames retro-flectidos a até em flores aparentemente hermafroditas), é evidente que estão ultrapassadas as designações de “flores femininas”, “flores pistiladas”, “hermafroditas imperfeitas” e “andro-estéreis” naquele sentido particular de flores com estames retro-flectidos.

Por outro lado, a consideração de um único tipo de flores hermafroditas, no sentido de flores funcionalmente hermafroditas, exclui completamente de classificação as flores que parecendo realmente hermafroditas pelo aspecto morfológico, são fisiologicamente femininas. E poderá, por outro lado, constituir porventura motivo de crítica o facto de em estudo recente sobre hereditariedade do tipo

floral na videira se fazer a apreciação do tipo floral apenas pelo aspecto morfológico de desenvolvimento do pistilo e dos estames (1).

É, então, evidente que, independentemente da ambiguidade de terminologia adoptada, a consideração de três únicos tipos florais, não permite a inclusão de todos os aspectos que se deparam na prática e, portanto, não satisfaz do ponto de vista ampelográfico.

Embora vários autores afirmem só terem encontrado, perfeitamente definidos, os três tipos de flores, hermafrodita, pistilado e estaminado (5, 19, 15) e basearem nessa circunstância os seus critérios de terminologia, o que é verdade é que esses casos existem. E quer eles sejam normais ou anormais, frequentes ou raros, correspondam a mera variação fenotípica ou a variação genotípica, têm de encontrar uma porta de classificação.

É aliciente a hipótese de trabalho que continuando a aceitar fundamentalmente apenas a existência de três tipos florais, admite gradações dentro de cada um deles, consoante o grau de desenvolvimento do pistilo (caso da flor fundamentalmente masculina); do comprimento e grau de inclinação dos estames (caso da flor fundamentalmente hermafrodita); e do comprimento e grau de curvatura (caso da flor fundamentalmente feminina) (15).

Desta forma foi possível materializar uma série de termos de transição da flor masculina típica para a flor tipicamente hermafrodita e desta para a típica flor feminina.

Simplesmente, a existência de flores perfeitamente hermafroditas do ponto de vista morfológico, mas funcionando como femininas, tão femininas como as flores pistiladas, de estames retro-flectidos (o pólen apresenta precisamente as mesmas características de feminilidade (26)), tira, porém, toda a validade à ideia de apreciar o grau de hermafroditismo pelo aspecto de inclinação dos filetes, e o grau de feminilidade pelo aspecto da sua curvatura (15, 11).

Há, pois, que procurar um novo critério de arrumação.

Teòricamente, poderiam manter-se ainda os três únicos tipos florais, recorrendo à classificação de OBERLE (19) —1) flor funcionalmente hermafrodita; 2) flor funcionalmente pistilada; 3) flor funcionalmente estaminada— desde que os seus termos deixassem de estar ligados a qualquer compromisso de morfologia. Tal critério não seria, porém, prático, porquanto equivalia a pôr de lado as observações respeitantes à morfologia floral que, naturalmente, ocorre fazer em primeiro lugar e que muitas vezes, até mesmo em estudos

de natureza genética chegam a constituir base única de apreciação da sexualidade (1).

Em resumo, pretendemos acentuar que o estudo da sexualidade da videira tem de prever, para cada caso, referência à forma e à função da flor.

Deve-se a STOUT (28), a primeira e a mais completa classificação neste sentido. No seu clássico trabalho, este autor considera seis tipos de flores:

- 1 — Flores estaminadas (ou estaminíferas) sem pistilo ou com pistilo mais ou menos abortado; estames uniformes, com filetes erectos o compridos; pólen com elevada porcentagem de germinação.
- 2 — Flores hermafroditas perfeitas com filetes mais ou menos compridos e erectos; pólen com 75 % de germinações, raramente defeituoso.
- 3 — Flores hermafroditas com estames erectos mas os filetes mais ou menos ondulados em hélice; pólen mais ou menos deformados e incapaz de germinar; geneceu normal, que polinizado com outro pólen (entenda-se fértil) produz regularmente fruto.
- 4 — Flores hermafroditas imperfeitas, com estames recurvados para fora ou semi-reflexos; anteras normais, mas o pólen é estéril e incapaz de germinar (tal como no tipo anterior).
- 5 — Flores hermafroditas imperfeitas, com estames recurvados para fora ou completamente encrespados, com todas as disposições intermédias; pólen estéril e inviável (como em 3 e 4).
- 6 — Flores com pistilos defeituosos (de fraca feminilidade) que desenvolvendo-se dão bagos privados ou quase privados de gráinha.

STOUT notou toda uma série de graus de desenvolvimento dos estames e dos pistilos, desde a completa perda de feminilidade, nas flores estaminadas, até à completa perda de masculinidade nas flores pistiladas; e considerou essas variações como intersexos.

Não seria de desejar que decorrido quase meio século, esta classificação estivesse isenta de críticas. Entre outras, podem fazer-se-lhe as seguintes objecções:

- a) Não individualiza o tipo floral, referido pela primeira vez pelo próprio autor, constituído por flores morfológicamente hermafroditas, mas funcionalmente femininas. Parece incluí-lo, como excepção, no grupo de flores hermafroditas perfeitas, o que dá para estas flores um conceito erróneo quanto à função.
- b) Não menciona, nem podia mencionar, as verdadeiras flores femininas posteriormente descobertas (2, 3).
- c) É duvidoso que devam continuar a classificar-se como possuidoras de pistilo defeituoso, as flores de todas as castas de bagos desprovidos ou quase desprovidos de grainha (6.º grupo). Com efeito, provou-se posteriormente, em estudos alguns dos quais feitos pelo próprio autor, que só as cultivares "Corinto" têm pistilo verdadeiramente defeituoso por abortamento do saco embrionário, sendo partenocárpica estimulativa a sua frutificação. Todas as restantes castas sem grainha (Sultanina, Monukka, Perlette, etc.), têm óvulos bem constituídos e a fecundação faz-se normalmente; a ausência de grainhas e a fraca feminilidade nestas castas, deve-se ao abortamento do embrião depois da fecundação ou seja ao fenómeno da estenospermocarpia (21, 29, 30, 20).
- d) Vários autores têm contestado a existência de intersexos na videira (5, 19, 15). Esta linha de pensamento, postula que todas as flores da videira são fundamentalmente hermafroditas; que o grau de desenvolvimento do pistilo e dos estames correspondem, não a intersexos, mas sim a estados de regressão; que a morfologia da flor é notavelmente constante e que normalmente cada indivíduo contém um único tipo floral; que os desvios ocorridos são simples variações fenotípicas.

No entanto, muitos outros autores, têm mencionado ou confirmado a existência de intersexos na videira (12, 16, 18, 13, 14).

É natural que dois estudos recentes venham contribuir para uma plataforma de concordância entre as duas doutrinas em confronto, na medida em que vem abrir uma via nova ao estudo do determinismo fisiológico do sexo. Um deles diz respeito ao aparecimento de flores hermafroditas (transformando-se por auto-fecun-

dação em bagos com grainhas férteis), em inflorescências de uma cultivar normalmente masculina de *V. riparia*, e ao estudo da determinação do sexo daquela progenitura (4). O outro comunica que o tratamento de inflorescências de uma videira de flores masculinas por uma cinetina, podia fazer evoluir o tipo floral (masculino) para o tipo hermafrodita, a ponto de se obterem bagos com grainhas capazes de germinar (17).

Não obstante as possíveis objecções, não conhecemos nenhuma classificação que, entretanto, tenha superado a de STOUT.

Assim, PONCE & ZULUAGA (22), propõem uma classificação que é, em essência, uma adaptação nem sempre feliz da classificação de STOUT. De notar que, como STOUT (28), estes autores consideram um grupo (o 6.º grupo), constituído por “flores hermafroditas, com pistilo e óvulos defeituosos, dando origem a frutos partenocárpicos e stenospermocárpicos”, no qual incluem a “Sultanina”, que, como vimos atrás, apresenta óvulos normais. O facto de terem observado correlação entre as percentagens de auto-fecundação e as características morfológicas, não pode ser generalizado, uma vez que há flores morfológicamente hermafroditas que são funcionalmente femininas.

GALLET (10), estabelece 4 grupos: 1) flor hermafrodita (no sentido morfológico e fisiológico); 2) flor fisiologicamente feminina (no sentido de flor pistilada, com os estames retroflectidos); 3) flor masculina (no sentido de flor estaminada); 4) flor masculina-hermafrodita, unissexuada por abortamento (no sentido de flor com estames normais e pistilo mais ou menos atrofiado, podendo dar frutos acidentalmente). Mantém-se, portanto, o princípio erróneo de que o hermafroditismo morfológico corresponde sempre a hermafroditismo fisiológico. Por outro lado, parece que à flor “unissexuada masculina por abortamento”, melhor caberia, do ponto de vista prático, a designação de “flor hermafrodita, masculina por abortamento”.

Mais recentemente e como resumo do estudo da sexualidade de cerca de uma centena de “variedades”, apresentou-se uma classificação em 8 tipos florais (11).

É, porém, fácil de ver que são inconclusivos os meios que utiliza e absurdos os resultados a que chega o autor. Efectivamente, tendo-se proposto recorrer ao sistema de classificação de LEVADOUX (15) que prevê gradações dentro dos 3 tipos fundamentais de flores—chega a resultados, que, se por um lado, levam à confirmação da

ineficiência prática do sistema, por outro lado, levam à conclusão de que o mesmo não foi respeitado, na sua essência. Assim, a “Uva de Almeria” e a “Ohanez” aparecem classificadas, neste trabalho, como variedades diferentes e de diversos tipos de feminilidade. Ora, se, como é geralmente aceite, estas duas designações correspondem, não a duas, mas a uma única variedade, tem de se concluir pela falta de significado da classificação. No entanto, e aqui começa o absurdo em relação ao conceito básico de feminilidade em que assenta o critério de LAVADOUX —todas as castas que no artigo são identificadas como femininas pelo aspecto morfológico dos filetes estaminais, acabam por merecer a paradoxal classificação de “flores femininas, funcionalmente hermafroditas” (3 grupos).

O ineditismo e o paradoxo da classificação resultam do facto de o autor ter pretendido avaliar o grau de fertilidade do pólen pela intensidade de coloração em solução de carmin.

Ora sabe-se, desde o clássico trabalho de DORSEY (8), que a coloração pelos corantes vitais permite distinguir o pólen “abortado”, do pólen fértil, mas não permite distinguir este, do pólen “estéril” (das castas femininas). Por outro lado, a fotografia destinada a materializar a germinação do pólen de “Bicane” (uma das castas classificadas como possuidoras de “flores femininas, funcionalmente hermafroditas”), deve reproduzir apenas uma formação fungoide, o que aliás se confirma nas restantes fotografias.

Daqui resultam graves contradições, quer do ponto de vista científico quer do ponto de vista prático, como sejam as produzidas a propósito da Ohanez: “La uva “Ohanez” de Almeria, tiene granos de polen com alto grado de fertilidad (97 por 100), aunque sus flores son femininas com estambres débiles, cortos y espirilados, por lo qual, para assegurar una normal fecundación, es necesario proceder al engarpe”.

Também se não afiguram fundamentados:

- a) Quatro grupos de flores hermafroditas, particularmente o grupo 8, em que se incluem as castas com flores de pistilos morfológicamente normais e pólen de alta fertilidade, dando porém frutos partenocárpicos ou estenospermocárpicos. E tanto assim que este grupo coincide com outro grupo de flores hermafroditas (o grupo 3).
- b) O grupo de “flores que parecem masculinas, mas são funcionalmente hermafroditas”, não só por motivo das carac-

terísticas descritas (ausência de estilete e estigma directamente implantado sobre o ovário — “muito desenvolvido”) mas porque costuma acontecer precisamente o contrário: serem masculinas, flores que parecem hermafroditas.

**Conceitos de «flor perfeita» e «flor imperfeita»,
de «vícios de conformação floral» e de «anomalias florais»**

Antes de tentar uma actualização da terminologia dos tipos florais, importa ainda procurar entendimento quanto a “flor perfeita” e a “flor imperfeita”, “vícios de conformação floral” e “anomalias florais”.

É habitual aplicar-se a designação de “flor perfeita” à flor hermafrodita, com órgãos masculinos e femininos bem desenvolvidos; e a de “flores imperfeitas” à flor estaminada e à flor pistilada (31). E as expressões “vícios de conformação floral” e “anomalias florais” são ainda empregadas naquele mesmo sentido de “flores imperfeitas”.

Por outro lado, também se afirma que as variedades comerciais mais importantes de *V. vinifera* tem flores hermafroditas, mas que, pelo contrário, nas videiras de origem americana, são comuns e tem interesse as variedades possuindo flores imperfeitas (31); que as variedades de *V. vinifera* tem usualmente flores hermafroditas, somente um pequeno número tem flores funcionalmente femininas e nenhuma variedade comercial tem apenas flores masculinas (1).

Mas sabe-se que esta diferença quanto à proporção de variedades com “flores imperfeitas”, no caso da videira europeia e no caso das videiras de origem americana, é sem dúvida resultado da selecção pelo homem: A antiguidade da cultura da *V. vinifera* e o seu elevado número de formas, tem permitido, ao longo do tempo, eliminar a maior parte daquelas, em que por “defeito” das flores, a frutificação é seriamente limitada. Pelo contrário, as videiras americanas são de cultura relativamente recente e, portanto, a eliminação não tem sido possível (31).

Estamos, portanto, perante expressões e conceitos de significado meramente vitícola, que não traduzem o comportamento natural da espécie quanto à sexualidade. Na verdade, o gen. *Vitis* é poligamo-dioico, para a *V. vinifera* e dioico para as espécies americanas (19).

Em face desta realidade da Natureza, parecem impróprias as designações acima mencionadas. Por outro lado, o velho princípio da tendência evolutiva das espécies concretizado na célebre frase de Darwin, "Nature abhors self-fertilisation" e segundo o qual os indivíduos têm evoluído do hermafroditismo para o unissexualismo (monoicismo-dioicismo), encontra cada vez mais apoio científico (24).

Pelo que respeita particularmente à videira admite-se que as suas flores são morfológica e potencialmente hermafroditas (19); que o dioicismo é um carácter relativamente recente, e que a planta hermafrodita tem evoluído para uma forma "superior" e "aperfeiçoada", que é o tipo unissexuado, passando por múltiplas formas e tipos intermédios, com flores morfológicamente hermafroditas, mas funcionalmente unissexuais, femininas e masculinas (6).

Embora haja provas em contrário (27), é absolutamente natural que o grau de feminilidades nas formas femininas e o grau de masculinidade nas formas masculinas sejam maiores do que nas castas hermafroditas.

Neste sentido de evolução filogenética, *as flores femininas e as flores masculinas são, portanto, mais perfeitas que as flores hermafroditas...* embora de certo modo este aperfeiçoamento não venha ao viticultor.

Concretizarei o meu pensamento afirmando que sendo aceitável falar em "flores hermafroditas imperfeitas", não é aceitável falar em "flor imperfeita". E neste mesmo sentido, é ainda menos desejável a expressão "vício de conformação floral" e "anomalias florais".

Penso que qualquer destas locuções e sobretudo a de "anomalias florais" deverão ser utilizadas para a caracterização de flores efectivamente anormais e que, inclusivamente, impedem o exame dos tipos de flores quanto à sexualidade, como sejam as flores "encapuzadas" e as "flores estreladas", que caracterizarei no próximo capítulo.

II. SUGESTÃO DE NORMA DE CLASSIFICAÇÃO DE TIPOS FLORAIS

No cap. I, vimos que as classificações até hoje propostas não permitem considerar, nem sugerem, todos os fenótipos florais que se podem apresentar ao observador.

A existência de cultivares de videira com flores morfológicamente hermafroditas mas funcionalmente femininas, ainda que em pequena proporção, torna impossível, para os casos das formas hermafroditas e das femininas, caracterizar a sexualidade recorrendo, como frequentemente se tem feito, apenas ao exame morfológico. E por outro lado, abre um ramo de investigação na recente linha bioquímica de trabalho que procura relacionar o sexo com a composição da planta, com vista ao estudo da influência dessa composição na expressão do sexo e, até, da determinação e previsão deste, linha a que, entre nós, já fizeram referência FREITAS & PATO (9).

Apresento seguidamente uma classificação ou antes um guia de classificação que juro prever a inclusão de todos os aspectos possíveis, procurando considerar em primeiro lugar as características morfológicas e depois o comportamento fisiológico. Penso ser este o processo mais prático, embora a arrumação inversa tivesse a vantagem de evitar repetição de tipos florais.

1 — *Flores morfológica e funcionalmente masculinas.*

- a) Flores estaminadas ou estaminíferas. Estames erectos e compridos e pólen em barrilete, dotado geralmente de faculdade germinativa muito elevada; pistilo sub-nulo, reduzido a um disco ou botão. Totalmente improdutivas. Correspondem às flores estaminadas de STOUT (28), às flores androdinâmicas estéreis de STEINGRUBER (27) e às funcionalmente masculinas ou gino-estéreis de OBERLE (19).
- b) Estames como em a). Pistilo papiloso, com as folhas carpelares não soldadas na parte superior, sem estilete nem estigma. Flores totalmente improdutivas. Observadas até hoje na cultivar “Negra mole improdutiva” de *V. vinifera* (25).

2 — *Flores morfológicamente hermafrodito-masculinas, funcionalmente masculino-hermafroditas:* Flores aparentemente hermafroditas, com estames normais, mas pistilo de ordinário mais ou menos atrofiado, podendo dar acidentalmente fruto, conforme os indivíduos, os anos e as regiões. Parecendo, morfológicamente, mais hermafroditas do que masculinas comportam-se do ponto de vista fisiológico, mais como masculinas do que hermafroditas. As diversas gra-

dações podem ocorrer e geralmente ocorrem num mesmo indivíduo ou numa mesma inflorescência.

Revestem, assim, do ponto de vista prático o aspecto de intersexos. Correspondem à flores "masculinas-hermafroditas" ou "unissexuadas masculinas por abortamento" de GALLET (10). Flores frequentes em híbridos de videiras americanas (31 R, 99 R, 110 R, 3309 C).

Tenho-as encontrado também em cultivares de *V. vinifera*, recentemente enxertadas.

Trata-se de um fenotipo muito influenciado pelas condições nutritivas e pelo meio ambiental e que testemunha a labilidade da flor masculina no sentido do hermafroditismo dentro do grupo androide.

- 3 — *Flores morfológica e funcionalmente hermafroditas*. Pistilo perfeito; estames rectos, sub-erectos e de comprimento mediano, com as anteras acima ou ao nível do estigma; pólen de forma predominantemente em barrilete e fértil, por vezes em alto grau, nas cultivares diploides, mas de forma irregular e irregular faculdade germinativa, nas poliploides (25). Flores características das cultivares sui-férteis e sui-produtivas. Correspondem sensivelmente à flores "hermafroditas perfeitas" de STOUT, às "androdinâmicas férteis" de STEINGRUBER, às "funcionalmente hermafroditas" de OBERLE e às "hermafroditas" de GALLET.

Deve, porém, prever-se grande diversidade no grau de hermafroditismo consoante a natureza diploide ou poliploide das cultivares, sua complexidade híbrida e sensibilidade da flor em face dos factores externos.

- 4 — *Flores morfológica e funcionalmente hermafroditas, mas de fraca feminilidade*. Flores com estames normais, mas os pistilos, externamente perfeitos, ou têm óvulos abortados ou óvulos que abortam depois da fecundação, resultando daí frutos sem grão, partenocárpicos (Corinto) ou estenospermocárpicos (Sultanina, Monukka, Perlette, etc.).
- 5 — *Flores morfológicamente hermafroditas, mas funcionalmente femininas*. Flores aparentemente normais, mas o pólen é abortado com as características do "pólen feminino" das flores pistiladas (grupo 7).

- 6 — *Flores morfològicamente hermafroditas imperfeitas, funcionalmente femininas*. Flores com pistilo normal e estames erectos, mas enrolados em hélice, pólen deformado e estéril. Tipo raro, só mencionado por STOUT (28).
- 7 — *Flores morfològicamente pistiladas, funcionalmente femininas*. Flores com pistilo bastante desenvolvido e estames rectoflectidos; pólen total ou parcialmente estéril (irregularmenet arredondado, arredondado-tetraedrico ou fusoides, sem poros de germinação e, portanto, inviável). A total ou parcial esterilidade do pólen deste tipo de flor tem sido matéria de controvérsia.
- 8 — *Verdadeiras flores femininas*. Tipo floral raríssimo, correspondendo possivelmente a um caso teratológico. Flores completamente desprovidas de estames e constituídas apenas por pistilo (2, 3).
- 9 — *Intersexos* (grupo em relação com os tipos anteriores). Como vimos atrás, a existência de intersexos na videira é assunto de controvérsia.

Como, porém, é incontestável que, do ponto de vista morfológico e fisiológico, existem aspectos florais intermédios (caso, por exemplo, das flores masculinas-hermafroditas) e como, por outro lado, me não convenci de que não possam chamar-se-lhes intersexos, mantenho o vocábulo para prever a possível ocorrência de aspectos florais intermédios não mencionados atrás — e sobretudo o aparecimento simultâneo, raro mas incontestável, de tipos florais diferentes — numa mesma inflorescência, num mesmo indivíduo ou num mesmo clone.

10 — *Anomalias florais*.

- a) Flores “encapuzadas”. Flores em que a caliptra se mantém aderente após o período normal da antese. Esta anomalia implica acentuada improdutividade (desavinho ou bagoinha), pois muito embora a deiscência se possa fazer ao abrigo da caliptra, é evidente que as condições que dificultam a sua expulsão dificultam também a antese.
- b) Flores “estreladas”. Contrariamente ao que acontece normalmente na videira (gen. *Vitis*), a corola abre

pela parte superior, geralmente muito antes da maturidade das peças florais. O resultado é a total perda das flores.

c) Casos de metamorfose: clorantia, flores dobradas, etc.

BIBLIOGRAFIA

1. AVRAMOV, L., *et al*
1967 Inheritance of flower type in some grapes varieties (*V. vinifera* L.). *Vit's*, 6 (2): 129-35
2. BARANOV, P.
1927 The true female flower of the grape. *Trans. Irrig. Exp. Sta. Ak-Kavale*, 4: 119-37 (Sumario em inglês).
3. 1927 Zur Morphologie und Embryologie der Weinrebe. I - Zwitterige und typische weibliche Blüte. *Ber der deut. bot Ges.*, 45: 97-114.
4. BARRETT, H. C.
1966 Sex determination in a progeny of a selfpollinated staminate clone of *Vitis*. *Proc. Amer. Soc. hort. Sci.*, 88: 338-340.
5. BREIDER, H., und SCHEU, H.
1938 Die Bestimmung und Vererbung des Geschlechts innerhalb des Gattung *Vitis*. *Gartenbauwiss*, 11: (5): 627-74.
6. CONSTANTINESCU, G., & NEGREANU, E.
1967 L'influence des geniteurs sur la variation fonctionnelle des fleurs de la vigne. *Bull. Off. int. Vin*, 40 (440): 661-85.
7. CORRENS, C.
1928 Bestimmung, Vererbung und Verteilung des Geschlechts bei der Höheren Pflanzen. *Berlin: Gebruder Borntraeger*.
8. DORSEY, M. J.
1914 Pollen development in the grape with special reference to sterility. *Minnesota. Agr. Exp. Sta. Bul.* 144.
9. FREITAS, A. G. BARJONA DE & PATO, M. A. DA SILVA
1965 Influência das condições ecológicas e das cultivares na produção vinícola (Ensaio no concelho de Torrts Vedras). *Vin. Port. Doc.* [1], 2, pág. 76.
10. GALLET, P.
1952 *Precis d'Ampelographie Pratique*. Montpellier (Imprimerie P. Déhan).
11. KAMEL, A.
1959 Estudio sobre la sexualidad de las uvas de mesa en España. *Bol. Inst. Nac. Invest. Agronomicas, Madrid*, 19 (41): 331-347.
12. KOBEL, F.
1929 Zytologische Untersuchungen als Grundlage für die Immunitätszüchtung:n bei der Rebe. *Landw. Jahrb. der Schweiz*, 43: 231-272.
13. KOZMA, P.
1954 The flower types of the variety Kadarka; the variety of flower types and their fertility. *Acad. Hort. and Vitic. (Hungaricae)*, 2: 31-111.

14. KOZMA
1955 The variability and fruitfulness of the flower types of the variety Kadarka. *Acta Agron. Acad. Sci. (Hungaricae)*, **5**: 301-391.
15. LEVADOUX, L.
1946 Etude de la fleur et de la sexualité chez la vigne. *Ann. Ec. nation. agron. Montpellier*, **27**: 1-89.
16. MOOG, H.
1930 Beiträge zur Ampelographie. Mit. preus. *Rebenveredlungskomm*, **6** Geizenheim.
17. NEGI, S. S., and OLMO, H. P.
1966 Sex conversión in a male *Vitis vinifera* L. by a kinin. *Science*, **152** (1624). 215-231.
18. NEGRUL, A. M.
1936 Variabilität und Vererbung des Geschlechts bei der Rebe. *Gartenbanwiss.* **10**: (2): 215-31.
19. OBERLE, G. D.
1938 A genetic study of variations in floral morphology and function in cultivated forms of *Vitis*. *New York State Agr. Exp. Sta. Tech. Bul.* **250**: 1-63.
20. OLMO, H. P.
1936 Pollination and the setting of fruit in the Black Corinth grape. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.*, **34**: 304-404.
21. PEARSON, H. M.
1932 Parthenocarpy and seed abortion in *Vitis vinifera*. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.*, **29**: 169-75.
22. PONCE, J. R., & ZULUAGA, P. A.
1950 Contribución al estudio de la biología floral de la vid en Mendonza. *Rev. Faculd. Cienc. Agrarias, Mendonza*, **2** (1): 37-51.
23. RATHAY, E.
1988-89 *Die Gerchlechtsver-hältnisse der Reben und ihre Bedeutung für den Weinbau*. Wien, Wilhelm Frick.
24. RESENDE, F.
1951 A determinação do sexo: Monoícia e dioícia e subdioícia nos animais e plantas. *Bol. Soa. Portug. Cienc. Nat.* **3**: 270-72.
25. SOUSA, L. O. M. COSTA, E.
1952 *Aspectos da produtividade na videira*. D. G. S. A. Serviço Editorial da R. E. I. P.
26. — Cultivares de videira com flores morfológicamente hermafroditas, mas funcionalmente femininas (não publicado).
27. STEINGRUBER, P.
1927 *Blütenbiologische Untersuchungen an der Rebe*. Sonderdruck aus der Babo Festschrift, Klosterneuburg.
28. STOUT, A. B.
1921 Types of flower and intersexes in grapes with reference to fruit development. *New York State. Agr. Exp. Sta. Tech. But.* **82**: 1-6.
1936 Seedlessness in grapes. *New York State Agr. Exp. Sta. Tech. Bul.* 238.
1937 Breeding hardy seedless grapes. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* **34**: 416-20.
31. WINKLER, A. J.
1962 *General Viticulture*. University of California Press, Berkeley and Los Angeles.

Antropogenética de una población aislada de los Pirineos

por A. VALLS

Instituto de Genética y Antropología
Centro de Investigaciones Biológicas
C. S. I. C., Madrid

INTRODUCCION

Se estudian en este trabajo algunos caracteres de interés antropogenético en la población del valle de Bielsa (Huesca). Ciertos de los caracteres analizados, por ejemplo, los grupos sanguíneos, tienen una herencia bien conocida; otros son de herencia menos sencilla, como la pilosidad en la segunda falange de los dedos de las manos; todos ellos, sin embargo, muestran un polimorfismo interesante en las poblaciones estudiadas hasta ahora con relación a los mismos. En España estos caracteres son relativamente bien conocidos a escala nacional, pero a escala regional o provincial sus frecuencias están por determinar, salvo en el caso de los grupos sanguíneos del sistema ABO (VALLS, 1962).

La zona pirenaica se ha estudiado de forma discontinua hasta ahora. En la vertiente francesa se han investigado los grupos ABO (VALLOIS, 1951), y en la española se han investigado intensamente, en particular por lo que se refiere a los datos antropométricos, varios valles aragoneses y catalanes (ALCOBÉ, 1946; ALCOBÉ y cols., 1960). La antropología de la región aragonesa se conoce bien por trabajos recientes (FUSTÉ y PONS, 1962). Siendo los Pirineos una intensa barrera para el flujo génico dado su doble carácter de frontera natural y política, y en función de su orografía, cabe esperar

que las poblaciones pirenaicas se encuentren sometidas a un fuerte aislamiento genético y que dicho aislamiento repercuta sobre las frecuencias de los genes determinantes de los polimorfismos indicados.

Durante los meses de julio de 1967 y 1968, y en el marco de una campaña organizada por la Escuela de Antropología del Centro Iberoamericano de Estudios Antropológicos de Madrid, como parte del estudio antropológico y etnológico que se llevó a cabo en el valle de Bielsa, se recogieron datos para estudiar esa repercusión. Los datos fueron posteriormente analizados en el laboratorio con el objeto de determinar los caracteres antropogenéticos de la población belsetana, compararlos con los datos previos de las otras zonas pirenaicas españolas y determinar si el gradiente Este-Oeste que se ha demostrado existir en otras vertientes para los grupos sanguíneos ABO (VALLOIS, 1951; VALLS, 1962) podría generalizarse para los otros caracteres, serológicos y de otro tipo.

MATERIAL Y METODOS

El valle de Bielsa, al Sudeste del Monte Perdido, comprende las aglomeraciones de Bielsa, Javierre, Espierba, Parzán y Chisagüés. Bielsa es el pueblo más importante, y Espierba es la salida del valle de Pineta por donde corre el alto Cinca antes de llegar a Bielsa (Fig. 1). El escaso tamaño de la población estudiada no ha permitido desglosar datos para cada una de las comunidades estudiadas. Todos los individuos fenotipados carecían de parentesco próximo entre sí y, además, eran originarios del valle desde varias generaciones antes. Ambas condiciones restringieron el tamaño de la muestra estudiada.

Los datos demográficos del censo de 1965 se emplearon para el estudio cuantitativo de la población. En los archivos parroquiales de las tres parroquias del valle (Bielsa-Javierre, Parzán-Chisagüés y Espierba) se obtuvieron los datos referentes a la consanguinidad de los últimos treinta años.

Los grupos sanguíneos se determinaron mediante los sueros anti-A, anti-B, anti-D (anti-Rh₀), anti-M, anti-N y anti-Kell, todos ellos de Ortho Diagnostics, Raritan, New Jersey, U.S.A.; el empleo

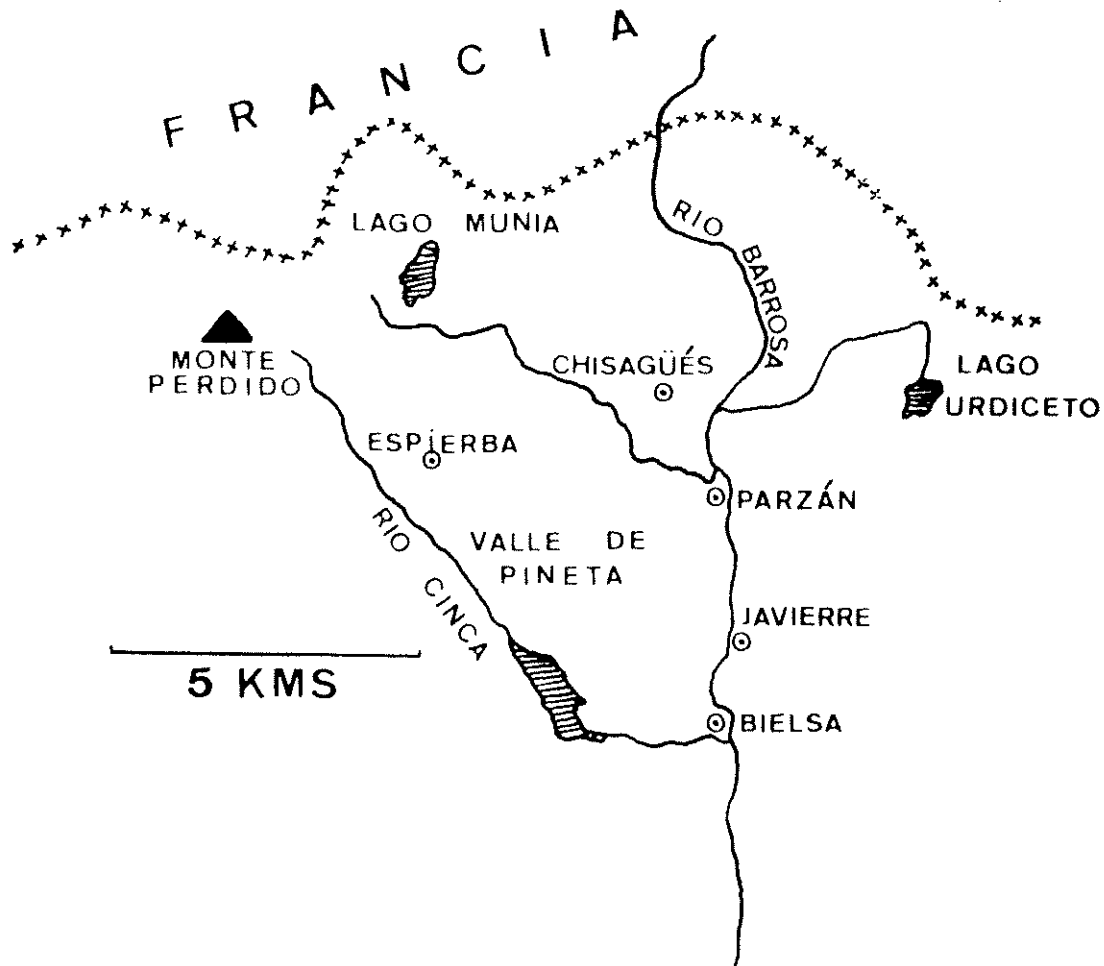


FIG. 1. El valle de Bielsa

del suero anti-Kell en porta es muy sencillo, la lectura de la reacción es definitiva a los dos minutos, no necesita ni incubación ni test de Coombs ni tratamiento enzimático previo de los eritrocitos.

El diagnóstico del sabor o ageusia a la feniltiocarbamida (PTC) se realizó mediante diluciones progresivas de la PTC (B.D.H. Ltd., Poole, England) en agua destilada según la técnica de HARRIS y KALMUS (1949). Se obtuvieron las huellas dermopapilares palmares y digitales, que están en curso de análisis. Para la determinación de la presencia o ausencia de pilosidad en la segunda falange de los dedos de las manos ("mid-digital hair") se empleó una lupa en los casos que resultaban dudosos o negativos a primera vista. Cada individuo fue invitado a cruzar sus dedos y sus brazos para obtener datos sobre el "hand clasping" y "arm folding", y a plegar la lengua en forma de "U".

En 41 individuos, de uno y otro sexo, se estudiaron los grupos ABO, MN, Rh y Kell, la capacidad gustativa a la PTC, la pilosidad digital, el "arm folding", el "hand clasping" y el plegamiento de la lengua, y en 35 más (total = 76) los grupos ABO y Rh.

RESULTADOS

1. Demografía.

La población del valle de Bielsa es, en cuanto a su tamaño, relativamente estacionaria. Los censos de 1940, -45, -55, -60 y -65 consultados no muestran grandes variaciones cuantitativas. El fenómeno emigratorio aparecido en la década 1950-1960 en otras regiones españolas y que las ha modificado profundamente en su estructura demográfica (VALLS, 1966), no ha afectado a la población belsetana. El valle estaba formado en 1965 por 604 personas. La pirámide de población local (fig. 2) es más bien de tipo "rectangular". La proporción de sexos resultó ser de 115 varones por cada 100 mujeres.

La *endogamia*, medida por la frecuencia de consanguinidad, no resultó elevada en exceso si se compara con otras regiones aisladas del sur de España (VALLS, 1967). El porcentaje medio de matrimonios consanguíneos para el período 1939-1966 fue de 5,29 %. Sin embargo, las distintas localidades presentan porcentajes muy variados (tabla 1). Los matrimonios consanguíneos fueron de los siguientes

TABLA 1. — *Consanguinidad en el valle de Bielsa (período 1939-1966).*

Matrimonios				
Localidad	Habitantes ¹	Total	Consanguíneos	% de consanguinidad
Bielsa	427	76	0	00
Javierre	? ²	10	1	10,00
Bielsa-Javierre	? ²	80	1	1,16
Espierba	75	33	3	9,09
Parzán	75	25	0	00
Chisagiés	27	7	4	57,14
Parzán-Chisagiés	102	32	4	12,50
TOTAL		151	8	5,29

(1) Según el censo de 1965.

(2) Número desconocido.

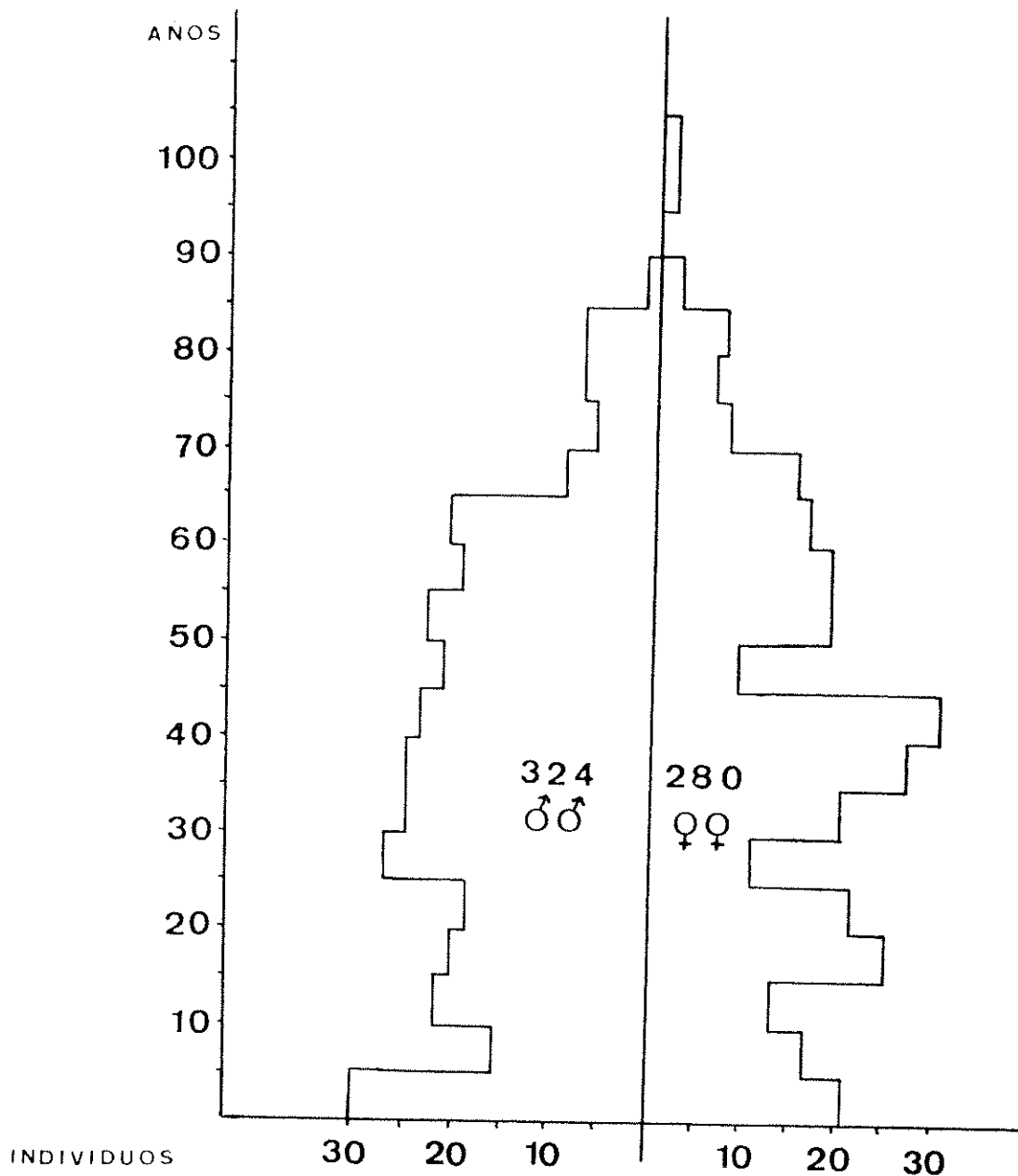


FIG. 2. Pirámide de población.

tipos: cinco entre primos de tercer grado (primos segundos), dos entre primos de segundo grado doble (dobles primos hermanos) y uno entre primos de segundo grado (primos hermanos). Como cabría esperar, la consanguinidad y el tamaño de la población están inversamente relacionados, pero factores especiales se superponen al fenómeno algunas veces. Así, por ejemplo, los pueblos de Es-

pierba y Parzán, con tamaños de población remarcablemente parecidos, muestran porcentajes de matrimonios consanguíneos muy diferentes.

2. Grupos sanguíneos.

Para el sistema ABO, 76 individuos fenotipados, existen algunos datos comparativos (tabla 3); tanto para la provincia de Huesca en conjunto como para otra valle de los Pirineos catalanes. En la tabla 2 figuran las frecuencias de este sistema entre los belsetanos.

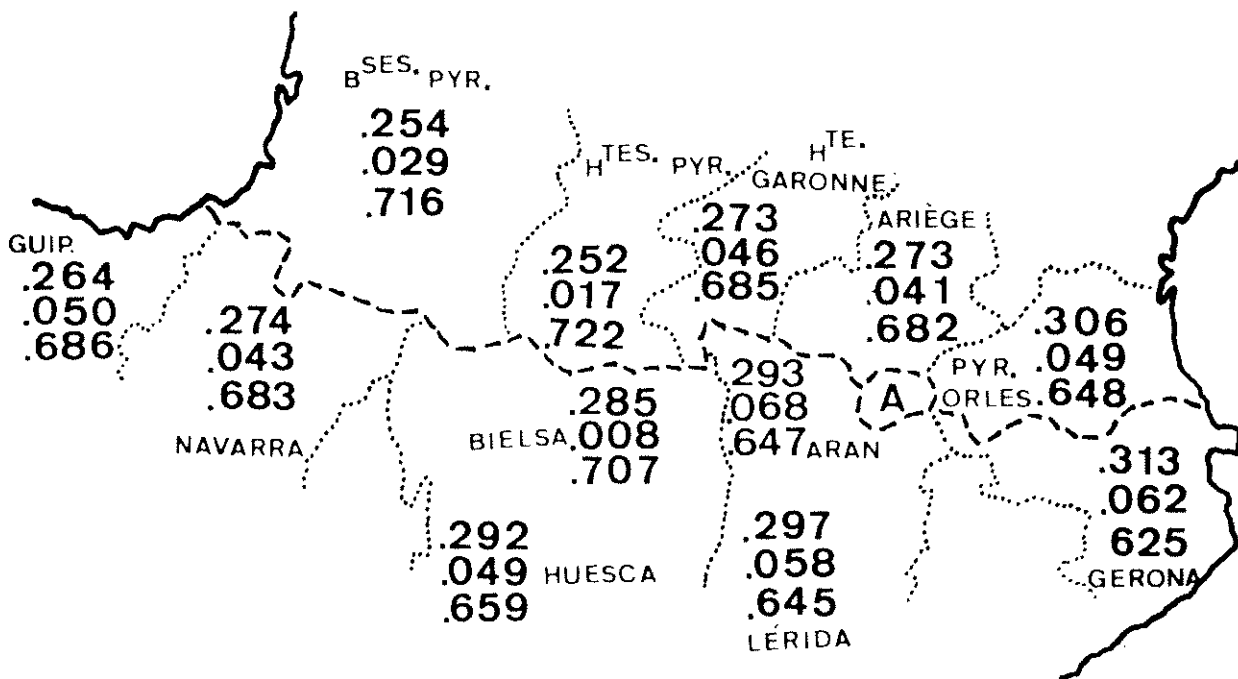


FIG. 3. Grupos sanguíneos ABO en los Pirineos

El bajo valor del grupo B y la ausencia del AB podrían explicarse de dos maneras: o como consecuencia del pequeño tamaño de la muestra estudiada o como efecto de una posible deriva genética. Calculando por el método de Fisher el número esperado de individuos de fenotipo AB en la muestra estudiada, resulta ser de .387, lo cual está de acuerdo con el número hallado. Los valores de p , q y r se ajustan bien a la distribución de tipo gradiente de dichas frecuencias en ambas vertientes del Pirineo y a las frecuencias encontradas en Huesca por otros autores. Su significado se discutirá más adelante.

TABLA 2.—Frecuencias de grupos sanguíneos en la población del valle de Bielsa.

Grupo sanguíneo	Frecuencia fenotípica	Porcentaje fenotípico	Frecuencias génicas
O	38	50,00	p = 285
A	37	48,68	q = 007
B	1	1,31	r = 708
AB	0	—	
MM	2	4,87	m = 414
MN	30	73,16	n = 586
NN	9	21,97	
Rh +	57	75,00	Rh = 500
Rh —	19	25,00	rh = 500
Kell +	13	31,70	K = 173
Kell —	28	68,30	k = 827

El sistema MN (tabla 2) se estudió en 41 individuos. La muestra es demasiado pequeña para que los resultados sean interpretables, pero de todas formas choca la exagerada proporción de heterocigóticos en detrimento de ambos homocigóticos. Si bien es conocido el hecho de un exceso de los primeros en casi todas las poblaciones estudiadas cuando se comparan con las proporciones esperadas en un equilibrio de tipo Hardy-Weinberg, el del valle de Bielsa es probablemente atribuible a la pequeñez de la muestra analizada. En efecto, calculando la eficiencia de las frecuencias génicas, el valor resultante fue de 72,50 %, de forma que se hubieran necesitado $41 \cdot 0,725 = 29,72$ individuos más (71 en total) para que dichas frecuencias se ajustaran al citado tipo de equilibrio.

Respecto al sistema Rh (tablas 2 y 3) se fenotiparon 76 individuos con el suero anti-D (anti-Rh₀). Es notablemente elevada la

TABLA 3.—Frecuencias de grupos sanguíneos ABO y Rh en Huesca y valles pirenaicos.

Región		N	p	q	r	Rh	rh
Huesca	Carrión y Hernández (1946)	100	338	015	647		
»	Hoyos Sainz (1947)	366	309	057	634		
»	Valls (1962)	3.881	292	048	659		
Arán	Alcobé y cols. (1960)	105	293	068	647	645	355
Bielsa	Valls (1968)	76	285	007	708	500	500

proporción de individuos Rh negativos, pero no disconforme con los resultados previos de que se dispone. Es muy probable, como más adelante se discutirá, que también exista un gradiente pirenaico para este sistema de grupos.

TABLA 4.—*Gradiente de las frecuencias génicas del sistema ABO en ambas vertientes pirenaicas, francesa (F) y española (E).*

	<i>p</i>		<i>q</i>		<i>r</i>	
	<i>F</i>	<i>E</i>	<i>F</i>	<i>E</i>	<i>F</i>	<i>E</i>
Atlántico	254	264	029	050	716	686
	252	273	017	043	722	684
	273	292	046	048	685	659
	273	297	041	058	682	645
Mediterráneo	306	313	049	062	648	625

El sistema *Kell* (tabla 2) no se ha estudiado a escala regional en España. El porcentaje de individuos *Kell* positivos parece ser un poco elevado en relación a la media de la raza Caucasoide.

3. Otras características.

Los resultados obtenidos para el umbral a la *capacidad gustativa a la feniltiocarbamida* se representan en la fig. 5. Se conocen los datos estudiados previamente en la población del valle de Arán (PONS, 1961).

El 68,7 % de 41 personas fueron capaces de plegar la *lengua en forma de "U"*, lo cual se ajusta bien a la frecuencia general (68,64 %) para la raza Caucasoide (URBANOWSKI y WILSON, 1947), pero se conoce mal su distribución en Europa, y en España faltan datos.

Los caracteres "*hand clasping*" y "*arm folding*" se estudiaron también en 41 individuos (tabla 5). Hay datos comparables para España (PONS, 1961 *a*). Puede decirse que en la población belsestana, de cada 4 personas una monta el brazo izquierdo sobre el derecho al cruzarlos espontáneamente (proporción de brazo derecho a brazo izquierdo 3 : 1). El ji-cuadrado para dicha proporción vale 1.194, que para 1 g.l. da un valor de P comprendido entre 0,2 y 0,3. Entre un total de 1.566 caucasoides (FREIRE-MAIA y cols., 1958) el

55,17 % de los individuos eran del tipo "derecho" (*R*), cifra acorde para la encontrada por nosotros (58,54 %) en Bielsa, y para la población española en general (PONS, 1961 *a*) que es de 52,1 % para 486 personas. Estas cifras, referentes al carácter "hand clasping". El ji-cuadrado para la proporción 1 : 1 de personas que al cruzar espontáneamente las manos montan el pulgar derecho sobre el izquierdo o viceversa (tipos *R* y *L*), fue en nuestros datos de .198, que para 1 g.l. da una probabilidad *P* comprendida entre el 0,7 y el 0,6.

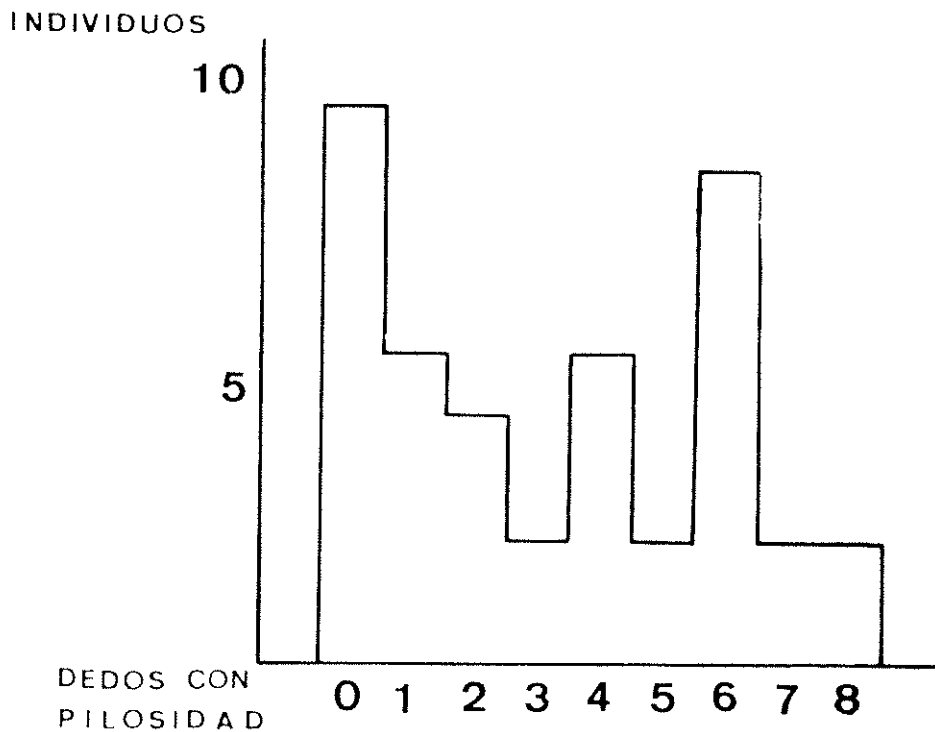


FIG. 4. «Mid-digital hair»

En otro grupo aislado de raza Caucasoide (BONNÉ, 1966) presentaban el carácter "arm folding" de tipo *R* sólo el 44 % de los individuos. Como en nuestra población de Bielsa, es posible que un pequeño tamaño de población o un efecto de deriva genética expliquen las pequeñas variaciones con relación a la población general.

Respecto a las combinaciones de ambos caracteres, que figuran también en la tabla 5, en una muestra de 3.156 individuos de raza

caucasoides (QUELCE-SALGADO y cols., 1961), la repartición fue la siguiente, que comparamos con nuestros datos:

<i>Tipo</i>	<i>Caucasoides en general (%)</i>	<i>Belsetanos (%)</i>
RR	21,00	41,46
RL	34,19	17,07
LR	18,88	12,20
LL	25,93	29,27

donde la primera letra representa "hand clasping" y la segunda "arm folding". Estos datos muestran que nuestra población se separa claramente de la media de la raza Caucasoide.

TABLA 5.— *Caracteres «Hand clasping» y «Arm folding» en el valle de Bielsa.*

<i>Simbolo</i>	<i>Combinación</i>	<i>Frecuencia</i>	<i>Porcentaje</i>
R R'	Mano derecha y brazo derecho	17	41,46
R L'	Mano derecha y brazo izquierdo	7	17,07
L L'	Mano izquierda y brazo izquierdo	5	12,20
L R'	Mano izquierda y brazo derecho	12	29,27
R	Mano derecha	24	58,54
L	Mano izquierda	17	41,46
R'	Brazo derecho	29	70,73
L'	Brazo izquierdo	12	29,27

El carácter "*mid-digital hair*" se estudió entre 41 personas. En la fig. 4 se representa la distribución de las mismas según presentaran 0, 1, 2, ...7, 8 dedos afectados de pilosidad, sin discriminar el tipo de dedo afectado. Los 164 dedos izquierdos y los otros tantos dedos derechos, y según estén o no provistos de pelos, se representan en la tabla 6 clasificados según el tipo de dedo de que se trate. Comparando los datos actuales con los datos previos de la población española en general (sólo varones) hechos en 601 individuos (VALLS, 1960), se observa un perfecto acuerdo.

Datos más detallados sobre este carácter polimórfico en relación con la edad, el sexo y su frecuencia en otra población española (vascos) serán publicados en otra parte.

La simetría del carácter es remarcable. Sólo 9 personas presentaban todos sus ocho dedos con segunda falange desprovistos de pi-

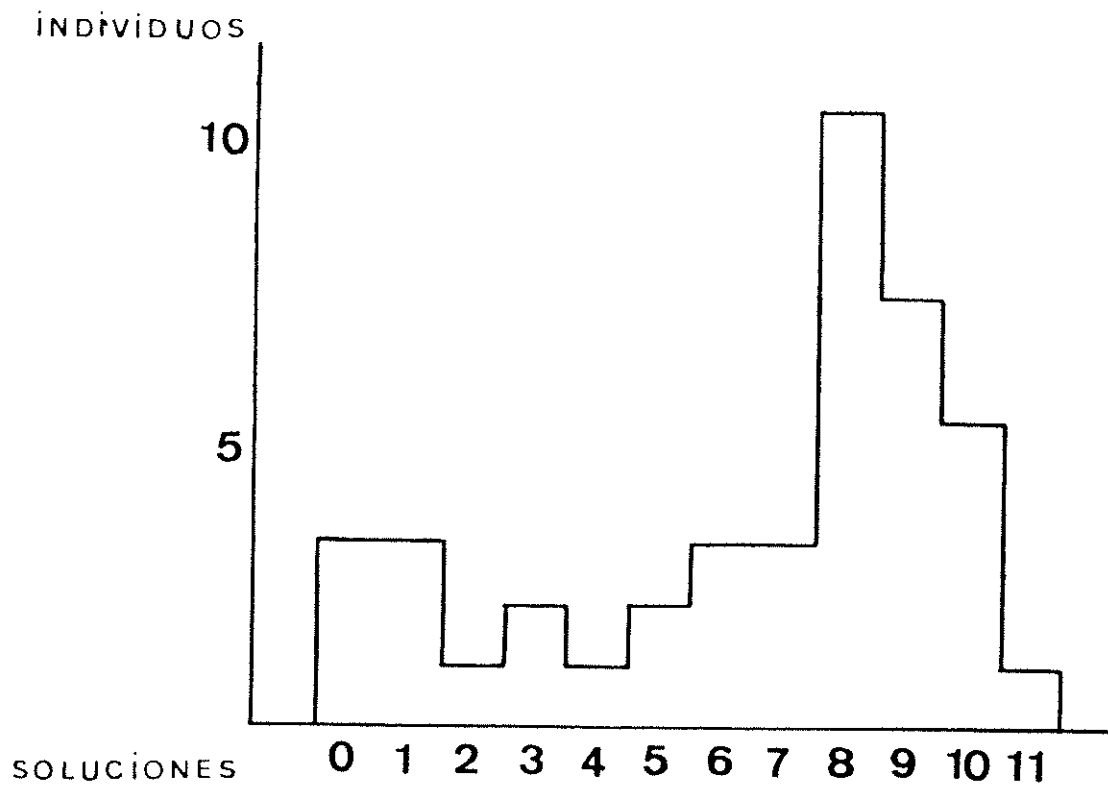


FIG. 5. Capacidad gustativa de la PTC.

losidad (21,95 %). En las restantes, los principales tipos de simetría encontrados fueron:

Con pilosidad en meñique, anular y medio de ambas manos = 8, con pilosidad sólo en el anular de ambas manos = 3; con pilosidad en todos los dedos de ambas manos, salvo en el dedo índice = 3; con pilosidad en anular y medio de las dos manos = 2, y con pilosi-

TABLA 6.—Carácter «Mid-digital hair» en la población del valle de Bielsa.

Dedos	Con pilosidad				Sin pilosidad			
	Españoles en general		Belsetanos		Españoles en general		Belsetanos	
	N	%	N	%	N	%	N	%
Índice	154	6,79	9	6,35	1.048	41,27	73	39,26
Medio	716	31,55	42	29,57	486	19,14	40	21,50
Anular	874	38,53	57	40,14	328	12,91	25	13,44
Meñique	525	23,14	34	23,94	677	26,68	48	25,80

dad sólo en el meñique y anular de las dos manos = 1. La simetría del carácter se pone más de manifiesto aun cuando se comparan directamente, en las dos manos, el tipo de dedos afectados o no:

<i>Dedos</i>	<i>Con pilosidad</i>		<i>Sin pilosidad</i>	
	<i>Mano izquierda</i>	<i>Mano derecha</i>	<i>Mano izquierda</i>	<i>Mano derecha</i>
Meñique	17	17	24	24
Anular	27	30	14	11
Medio	21	4	20	20
Indice	5	72	36	37
TOTAL	70	21	94	92

DISCUSION

La población del valle de Bielsa, formada por unas 600 personas en la actualidad, es bastante estacionaria, y lo ha sido al menos durante los últimos treinta años. Es de admitir que lo fuera aún más en épocas anteriores. La consanguinidad media de los cinco pueblos no es demasiado elevada (5 % aproximadamente) y quizá no influya demasiado sobre las frecuencias génicas de los caracteres estudiados. El pequeño tamaño de la muestra analizada no permite conclusiones tajantes sobre la distribución de las mismas, pero sin embargo pueden deducirse algunos fenómenos interesantes sobre su polimorfismo.

El gradiente Atlántico-Mediterráneo señalado por VALLOIS (1951) tanto para el índice cefálico como para los grupos sanguíneos del sistema ABO muestran la importancia de los Pirineos centrales como zona antropológica. Del lado español presentan la máxima influencia de la dolicocefalia ibérica, y en la vertiente francesa la máxima influencia de la braquicefalia alpina; a partir de este núcleo central, los índices cefálicos varían gradativamente hacia uno y otro extremo siguiendo la longitud geográfica. Además, otros caracteres antropométricos indican cómo los Pirineos han sido una barrera eficiente para el flujo génico, quizá durante los últimos pocos milenios. A pesar de ello, las frecuencias génicas de los grupos sanguí-

neos del sistema ABO y probablemente de otros sistemas, representan una situación mantenida desde hace mucho tiempo, precisamente gracias a su parcial aislamiento de las zonas menos montañosas contiguas.

En la tabla 4 se ve con claridad cómo afecta el gradiente de las frecuencias p , q y r a ambas vertientes pirenaicas. La distribución por provincias (VALLS, 1962) y departamentos (VALLOIS, 1951) se representa en la fig. 3. Los dos valles pirenaicos, el aragonés de Bielsa (VALLS, 1968) y el catalán de Arán (ALCOBÉ y cols., 1960) no se apartan sensiblemente de los valores de sus correspondientes provincias, salvo para el caso ya citado del grupo B en Bielsa. Dicha variación, y el valor quizás un poco alto de r , pueden explicarse en principio por varios factores: el pequeño tamaño de la muestra analizada, un posible efecto de la deriva genética o, en menor grado, la consanguinidad. Faltan datos comparativos para los otros sistemas y rasgos estudiados, pero puede admitirse que cuando se disponga de dichos datos muestren un gradiente semejante. La alta frecuencia de individuos Rh negativos en la población belsetana es también explicable admitiendo que en el pasado hubiera existido un flujo génico desde el país vasco hacia el Pirineo central.

La distribución de los tipos RR, RL, LR y LL en las combinaciones de los rasgos "arm folding" y "hand clasping" en frecuencias variables, y la de los tipos de dedos afectados de pilosidad en la segunda falange se están estudiando actualmente en la zona vasco-navarra y quizás ayuden a comprender la distribución gradativa de estos caracteres en el Pirineo.

Puede decirse en resumen que los rasgos antropogenéticos de la población del valle de Bielsa son los correspondientes a lo que cabría esperar en la zona del Pirineo central con arreglo al citado gradiente de las frecuencias génicas. Las desviaciones encontradas en relación con el modelo gradiente tienen posibles explicaciones por muestreo o bien por deriva genética o bien por el aislamiento parcial de esa población.

AGRADECIMIENTO

Agradecemos profundamente al Dr. Antonio Palacín, alcalde y médico de Bielsa, la ayuda que nos prestó en la fenotipación de los

individuos, y a D. José Luis Méliz su colaboración en la recogida de datos.

REFERENCIAS

- ALCOBÉ, S.
1946 Estudios antropológicos en tres altos valles de los Pirineos (valle de Arán, Andorra, Cerdaña). *Trab. Inst. Bern. Sahag. Antrop. y Etnol.*, vol. V: 219-338.
- ALCOBÉ, S., PREVOSTI, A., PONS, J., FUSTÉ, M. y SITGES, L.
1960 Etudes sur la biologie de la population d'une haute vallée pyrénéenne (Val d'Arán, Espagne). *VI Congr. Internat. Anthrop. Ethnol.*, vol 1: 287-296. Paris.
- BONNÉ, B.
1966 Genes and phenotypes in the Samaritan isolate. *Am. J. Phys. Anthrop.*, 24/1: 1-20.
- CARRIÓN, J. y HERNÁNDEZ, J.
1946 Contribución al estudio de los grupos sanguíneos en España. *Trab. Inst. Ber. Sahag. Antrop. y Etnol.*, vol. 2: 303-309.
- FREIRE-MAIA, N., QUELCE-SALGADO, A. and FREIRE-MAIA, A.
1958 Hand clasping ind different ethnic groups. *Human Biol.*, 30/4: 281-291.
- FUSTÉ, M. y PONS, J.
1962 La población aragonesa. Estudio antropológico. *Inst. «Fernando el Católico», Zaragoza*. 89 pp.
- GUASCH, J.
1952 Los factores hemáticos en España, excepto el país vasco. *Med. clin.*, 18: 268-271.
- HARRIS, H. and KALMUS, H.
1949 The measurement of taste sensitivity to phenylthiourea. *Ann. Eugen.*, 15: 24-31.
- HOYOS-SAINZ, L.
1947 Distribución de los grupos sanguíneos en España. Ensayo de Seroantropología. *Inst. J. Sebastián Elcano, C. S. I. C, Madrid*. 286 p.
- PONS, J.
1961 Capacidad gustativa a la feniltiocarbamida en araneses. *Trab. Inst. Ber. Sahag. Antrop. y Etnol.*, vol. XV/3: 143-151.
- PONS, J.
1961 Hand clasping (Spanish data). *Ann. Hum. Genet.* 25: 141-144.
- QUELCE-SALGADO, A. FREIRE-MAIA, A. and FREIRE-MAIA, N.
1961 Arm folding; a genetic trait? *Jap. Journ. Hum. Genet.*, 6/1: 21-26.
- URBANOWSKI, A. and WILSON, J.
1947 Tongue curling. *J. Hered.*, 38: 365-366.
- VALLOIS, H. V.
1951 Les groupes sanguins de part et d'autre des Pyrénées. *I. Congr. Intern. Pirinco, Zaragoza*. C. S. I. C. 32 pp.

-
- VALLS, A.
1960 La pilosidad en el segundo segmento digital de las manos. *Antrop. y Etnol.*, 13: 177-190.
- VALLS, A.
1962 Distribución de los grupos sanguíneos del sistema ABO en España. *XXIV Congr. Luso-esp: Asoc. Progr. Ciencias*. Oporto (datos no publicados).
- VALLS, A.
1966 Quelques données nouvelles sur la consanguinité en Espagne. *J. Génét. Hum.*, 15: 121-132.
- VALLS, A.
1967 Consanguineous marriages in a Spanish population. *Acta Genet.*, Basel, 17: 112-119.

Un caso de mosaicismo XO/Xx

por A. VALLS¹, A. HAUSMAN-HAGEMEIJER² y J. FREDERIC²

¹ Instituto de Genética y Antropología C. S. I. C., Madrid

² Laboratoire de Cytogénétique, Université de Liège, Bélgica

Entre las numerosas anomalías cromosómicas descritas hasta ahora en el cromosoma X, el mosaicismo de tipo XO/Xx —implicando asociación de un cariotipo con un solo cromosoma X y otro con un X normal y un fragmento del mismo— ha sido citado sólo unas cuantas veces en la literatura (HARTEMAN y cols., 1965; MIROUZE y cols., 1966; PIERSON y cols., 1966; WALBAUM y cols., 1966; ZARA y cols., 1966). Además, la naturaleza del fragmento del X era discutible en la mayoría de los casos, sin que su estructura permitiera afirmar qué zonas del mismo eran las perdidas. En ningún caso encontrado hasta ahora la morfología del fragmento era del tipo metacéntrico o submetacéntrico, de forma que la doble delección sufrida fuera manifiesta.

En esta nota previa se presenta un caso de mosaicismo del tipo indicado, con fragmento del X del tipo submetacéntrico.

Se trata de una joven de 17 años, con una talla de 137 centímetros y con un Q.I. normal. La paciente presenta una displasia genital con amenorrea primaria y ausencia de desarrollo de los caracteres sexuales secundarios. La laparoscopia demostró ausencia de útero y de ovarios y presencia de dos trompas rudimentarias. La

tasa de estrógenos era prácticamente nula y las gonadoestimulinas estaban aumentadas. Presentaba un cuello corto, pero no un verdadero pterygium colli. Ligero cubitus valgus. No presentaba daltonismo y sus dermatoglifos no eran los característicos del síndrome de Turner.

El árbol genealógico de la paciente no muestra antecedentes de aberraciones cromosómicas. La madre de la paciente se encuentra internada afectada de esquizofrenia y no ha sido por ello accesible al estudio, y dos de sus hermanos, los menores, murieron de corta edad (fig. 1).

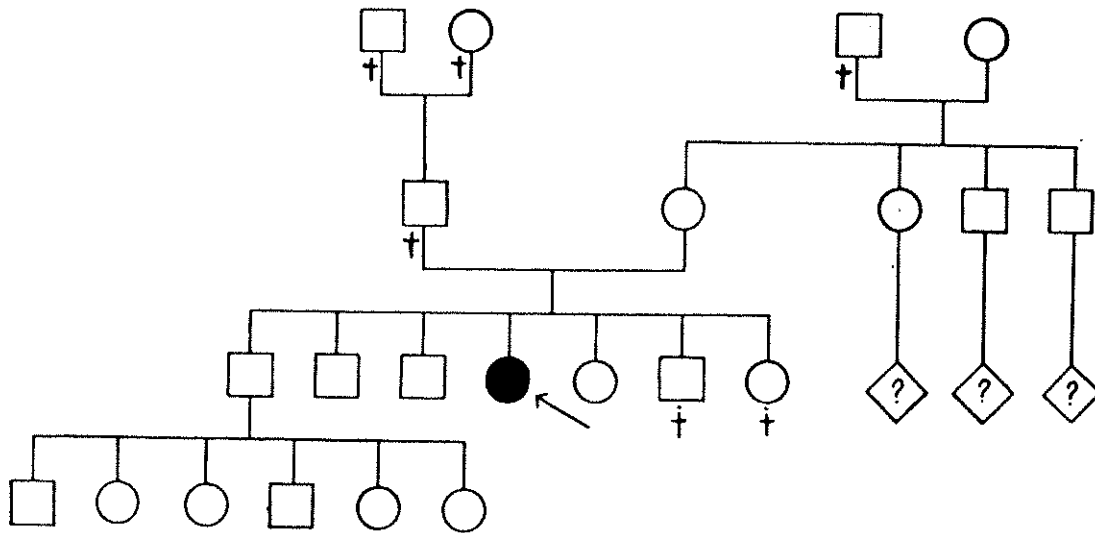


FIG. 1. Árbol genealógico de la paciente.

Los grupos sanguíneos de la paciente fueron:

B; MM; Ss; Cc D ee C^w—; K—; P₁; Le (a—); Xg (a+)

Sus grupos séricos son éstos:

Gm (1, —2); Inv (—1); Hp (2 — 2)

Según el Dr. P. BECQUEVOORT, que hizo las determinaciones grupales excepto el sistema Xg, "Pour aucun des systèmes érythrocytaires étudiés nous n'avons observé de double population cellulaire". Una muestra de sangre de la paciente fue enviada a Londres y fue estudiada por la Dra. R. SANGER, según la cual, "We have never

succeeded in showing two populations of cells" para el sistema Xg. El estudio de la G-6-PD está en curso de análisis.

La cromatina sexual de la paciente se estudió en frotis bucales y en polimorfonucleares en extensiones de sangre. La frecuencia de corpúsculos de Barr fue totalmente negativa en varios centenares de células de la mucosa bucal. En un total de 768 polimorfonucleares, 6 presentaban drumsticks (0,78 %).

Durante el examen laparoscópico se obtuvo una muestra de músculo abdominal de la paciente y se estableció un cultivo de fibroblastos que está actualmente en estudio.

También se establecieron varios cultivos a corto término de leucocitos de sangre periférica y es en ellos donde se hicieron los análisis cromosómicos. El estudio citogenético de dichos cultivos demostró la presencia de dos números modales de cromosomas, 45 y 46, con una frecuencia aproximada del 50 % cada uno. En total se analizaron 185 células en metafase, con los siguientes resultados:

metafases con 44 cromosomas	=	2	(1,08 %)
" " 45	"	=	88	(47,56 %)
" " 46	"	=	92	(49,74 %)
" " 47	"	=	3	(1,62 %)

El cariotipo de las 88 células con 45 cromosomas dio una fórmula 44 + XO, y el de las 92 con 46 cromosomas una 44 + X + un pequeño fragmento submetacéntrico (figs. 2 y 3). Antes de establecer los cariotipos, estas 92 células fueron cuidadosamente analizadas mediante TV en circuito cerrado adaptado al microscopio. Las medidas del fragmento, comparadas a las del cromosoma X, están en curso de análisis, pero la inspección morfológica de dicho fragmento permite afirmar que se trata de un cromosoma X que ha sufrido una doble delección, una a nivel del brazo corto y otra a nivel del brazo largo, si bien a distancias diferentes del centrómero. La naturaleza supuesta del fragmento (cromosoma X con doble delección) viene además apoyada por la circunstancia de que si ese fragmento perteneciera a un autosoma, y no a un cromosoma X como suponemos, acarrearía al portador una trisomía parcial y, por consiguiente, malformaciones somáticas graves y un seguro retraso mental de los que está libre la paciente.

Los estudios con timidina tritiada no pueden ayudar a esclarecer la naturaleza de este fragmento. Los estudios autoradiográficos

no han aportado ningún esclarecimiento sobre la naturaleza de los diferentes fragmentos semejantes estudiados por los otros autores. Dadas sus pequeñas dimensiones, sea que los fragmentos dupliquen su DNA al final del período G ("hot fragment"), sea que lo dupliquen antes ("cold fragment"), no es posible excluir ni afirmar que se trate de una porción del cromosoma X. En efecto, un cromosoma X de la mujer es "hot" en conjunto, pero no lo es uniformemente en toda su longitud y, por otra parte, hay porciones de autosomas en que la duplicación del DNA es muy tardía en el período S (FRACCARO y cols., 1966).

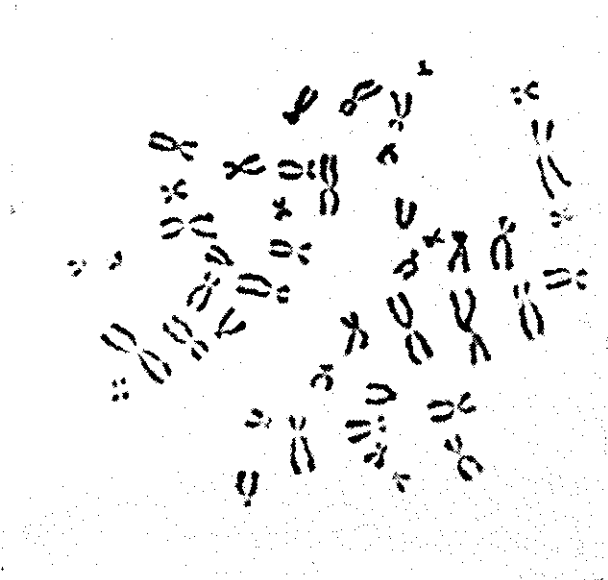


FIG. 2. Célula 45, XO.



FIG. 3. Célula 46, X + x.

La paciente estudiada muestra un síndrome de Turner muy incompleto, lo cual corresponde a su mosaicismo. El origen del fragmento puede ser o bien un accidente mitótico precoz durante el desarrollo embrionario o bien un accidente meiótico con una pérdida progresiva del X que dio lugar a XO. El estudio que se lleva a cabo actualmente en fibroblastos de la paciente quizá pueda ayudar a comprender si ha sido este último el mecanismo determinante del origen del fragmento y si en el cultivo se establece una proliferación diferencial entre los dos tipos de células, el portador de un cromosoma X y el portador del fragmento. Es también difícil de-

terminar el origen paterno o materno de dicho fragmento, ya que gran parte de la familia de la paciente es totalmente inaccesible al estudio. El análisis de la G-6-PD quizás pueda arrojar un poco de luz sobre dicho origen.

Los casos citados anteriormente en la literatura sobre mosaicismo del mismo tipo que el presente se encuentran ante los mismos problemas interpretativos.

ZARA y cols. (1966) describen una joven de 17 años con talla de 138,5 centímetros y corpúsculos de Barr y drumsticks negativos. Las 80 metafases de un cultivo de leucocitos fueron de cariotipo 44+XO, pero un cultivo de fibroblastos mostró 20 células también XO y 4 células con X + un fragmento céntrico de un tamaño que oscilaba entre 1/2 y un 1/3 de los cromosomas del grupo G. Según los autores, la formación del fragmento pudo haber ocurrido durante la gametogénesis de uno de los progenitores, y en el cigoto resultante el fragmento puede haberse perdido, dadas sus pequeñas dimensiones, durante alguna división ulterior, dando así origen a la línea celular XO. Si se ha realizado una rotura en cada uno de los brazos del cromosoma X, este cromosoma puede adoptar forma de anillo, como se ha citado en algunos casos, y los fragmentos céntricos formados a consecuencia de las roturas pueden haberse perdido en las divisiones celulares sucesivas.

PIERSON y cols. (1966) encuentran entre 30 metafases en cultivo de leucocitos, 22 con un fragmento en forma de cruz de San Andrés y 8 desprovistas de este fragmento y con cariotipo 45 + XO. Los autores afirman que se trata de un mosaicismo XO/X + fragmento, con predominio de la línea portadora del fragmento. El aspecto de éste evoca muy probablemente la región centromérica del cromosoma X, en donde la delección habría dejado subsistir una parte del brazo corto igual aproximadamente a la del brazo largo.

La ausencia de cromatina sexual es explicable, como lo hacen MIROUZE y cols. (1966) en su caso de mosaicismo con fragmento del X, por una parte por el pequeño tamaño de ese fragmento y por otra por el predominio de la línea celular con cariotipo XO. Sin embargo, en el primer caso de este tipo de mosaicismo, descrito por DE LA CHAPELLE (1962), se manifestaba la cromatina sexual.

Los otros casos citados en la literatura (ENGEL y FORBES, 1961; LINDSTEN, 1961; QUINODOZ y cols., 1964) se prestan a la misma dis-

cusión. HARTEMANN y cols. (1965) atribuyen también al fragmento encontrado por ellos en 33 de 46 mitosis una naturaleza de fragmento centromérico del cromosoma X y admiten que el fragmento es el responsable de los síntomas que se añaden en su caso a los rasgos de síndrome de Turner. El caso de DESTINE y MONTELEONE (1965) es más problemático, ya que la morfología del fragmento se presta a una interpretación ambigua: X con doble delección o porción de un cromosoma Y.

Aparte del interés intrínseco de este tipo de mosaicismo, es importante aumentar la casuística sobre el mismo, ya que con los datos acumulados quizá se pueda en el futuro esclarecer alguno de los aspectos de los síndromes pseudo-Turner, como por ejemplo la variación en la estatura, ya que se sabe que algunos de los genes implicados en el crecimiento en longitud están al parecer localizados en el brazo corto del X. Además, este tipo de mosaicismo puede ayudar a completar el mapa general genético de dicho cromosoma.

REFERENCIAS

- DE LA CHAPELLE, A.
1962 Cytogenetical and clinical observation in female gonadal dysgenesis. *Acta Endrocr.*, 40: 1-222 (suppl. 65).
- DESTINE, M. L. and MONTELEONE, P. L.
1965 XO/X plus fragment mosaicism. *Lancet*, 2: 746.
- ENGEL, E. and FORBES, A. P.
1961 An abnormal medium sized metacentric chromosome in woman with primary gonadal failure. *Lancet*, 4: 1.004-1.005.
- FRACCARO, M.; LINDSTEN, J.; KLINGER, H. P.; TIEPOLO, L.; BERGSTRAND, C. G.; HERRLIN, K. M.; LIVADITIS, A.; PEHRSON, M. and TILLINGER, K. G.
1966 Cytogenetical and clinical investigations in four subjects with anomalies of sexual development. *Ann. Hum. Genet.*, 29: 281-304.
- HARTEMANN, P.; DEBRY, G.; GILGENKRANTZ, S. et LAURENT, M.
1965 Syndrome de Turner avec mosaïque XO/X et fragment centromérique. *Ann. Genet.*, 8: 50-54.
- LINDSTEN, J.
1961 New type of chromosomal mosaicism in ovarian dysgenesis. *Lancet*, 1: 1.226.
- MIROUZE, J.; PAGES, A.; JAFFIOL, C.; EMBERGER, J. M.; SAADE, F. et NGHIA, N. T.
1966 Agénésie gonadique bilatérale turnérienne: absence unilatérale de néphrons avec formations wolffiennes bien individualisées, malformations carpiennes rares et caryotype XO/X. *Sem. Hôp. Paris*, 42: 739-746.
- PIERSON, M.; GILGENKRANTZ, S.; OLIVE, D.; DALAUT, J. J. et SCHAACK, J. C.
1966 Anomalies de structure d'un chromosome sexual dan sept cas de dysgénésie gonadique de type Turner. *Arch. Franç. Pédiat.*, 23: 1.135-1.153.

-
- QUINODOZ, J. M.; FERRIER, P.; FERRIER, S.; ZALURD, G. et PROD'HOMM, S.
1964 Le syndrome de Turner; à propos de observations. *Helv. Med. Acta*, 31: 1-28.
- WALBAUM, R.; DESBONNETS, P.; BONTE, C.; GAUDIER, C. et FONTAINE, G.
1966 Mosaïque chromosomique XO/Xf et endoreduplication dans un cas de syndrome de Turner. *Lille Med.*, 11: 885-891.
- ZARA, C.; MANNINI, A.; MAGRINI, U.
1966 Su di un caso di sindrome di Turner con raro reperto cromosomico (mosaico parriale). *Acta Genet. Med.*, 15: 371-385.

