

BRAGANTIA

Boletim Técnico da Divisão de Experimentação e Pesquisas
INSTITUTO AGRONÔMICO

Vol. 5

Campinas, Novembro de 1945

Nº. 11

ESTUDOS SÔBRE A INFLORESCÊNCIA DE MILHO COM REFERÊNCIA ESPECIAL AOS PROBLEMAS FILOGENÉTICOS

F. G. Brieger (*)

INTRODUÇÃO

1. O problema

O objetivo inicial dos nossos estudos sôbre as inflorescências nas *Maydeae americanae* era bem limitado. Fazendo um detalhado estudo botânico e genético, esperávamos compreender perfeitamente a estrutura, para depois tirar conclusões sôbre a natureza mais provável das inflorescências do milho selvagem e sôbre sua evolução para aquelas do milho cultivado. Mas, durante o trabalho, se tornou claro que as conclusões tinham um alcance bem maior, permitindo generalizações sôbre o processo de evolução.

Estudos sôbre o mecanismo da evolução em geral e sôbre a filogenia de determinados gêneros ou espécies, são realmente aspectos de um mesmo fenômeno sendo, porém, bastante diferentes os métodos científicos, necessários para a solução desses problemas.

No primeiro caso temos que enfrentar um problema bem geral, e podemos juntar resultados obtidos em experimentos diferentes, com material bastante diverso, como demonstramos, por exemplo, numa publicação anterior Brieger (5). Experimentos de genética fundamental e estudos genético-estatísticos sôbre populações, muito contribuíram, recentemente, para tornar mais concisas as nossas idéias gerais sôbre os mecanismos da evolução.

(*) Catedrático da Cadeira de Cito-Genética da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

Por outro lado, quando queremos estudar um problema limitado — a origem de um determinado gênero ou de uma espécie — temos, em grande parte, que aplicar os métodos científicos antigos, descritivos e comparativos, porém em combinação com os métodos modernos da genética experimental, como ficou demonstrado no caso do milho pelos trabalhos de Mangelsdorf e Reeves (15) e Brieger (4, 5, 6).

A situação torna-se ainda mais complicada quando tentamos analisar e compreender a evolução filogenética de um grande conjunto de gêneros, uma família ou uma ordem sistemática. Aqui se aplicam quase sempre, apenas os métodos antigos, descrevendo todos os gêneros e comparando-os com o fim de arranjá-los em séries filogenéticas. Esta é, em parte, uma das finalidades do livro de Agnes Arber (1) sobre as *Gramineae* que citamos como exemplo. As séries filogenéticas assim organizadas são, porém, uma abstração que serve apenas para ilustrar como a filogenia podia ter-se dado, sem ter real valor, pois os gêneros e as espécies, hoje existentes, não são meros descendentes um dos outros, mas, ao contrário, são descendentes que se desenvolveram filogeneticamente de ancestrais que não mais existem. Esta situação se torna muito clara quando tentamos uma seriação das mesmas espécies ou gêneros com referência a diferentes caracteres, observando-se, então, que a sequência não é a mesma em toda as séries. Concluímos que existem certas tendências filogenéticas, as quais determinam a variação da evolução e as divergências dos gêneros e espécies do mesmo grupo sistemático.

No presente trabalho aplicaremos um outro processo para chegar a uma compreensão da filogenia da inflorescência das *Maydeae*, analisando, do ponto de vista botânico, um número de formas que apareceram nos últimos nove anos, em nossos estudos genéticos com milho. Tentaremos, assim, chegar a compreender as possibilidades filogenéticas ainda inerentes a esta espécie.

Um estudo detalhado da filogenia das *Gramineae*, pelo método clássico, mostra que dois fenômenos acompanharam a sua evolução: uma redução muito pronunciada dos órgãos florais e um paralelismo da evolução em diferentes grupos sistemáticos. Mostraremos que a variação em milho oferece material que ajuda esclarecer ambos êstes problemas. O milho constitui um material especialmente favorável em vista da sua grande variabilidade, a qual, no início, nos parecia desordenada. Um estudo mais detalhado provou que certas formas continuamente aparecem de modo que não poderiam ser consideradas como raras e isoladas exceções, mas como uma documentação das tendências filogenéticas inerentes.

Além destas conclusões mais gerais, aproveitaremos o material apresentado para aprofundar os nossos conhecimentos sobre a filogenia do próprio milho.

2. Material

Iniciamos os estudos com o milho **tunicata paulista**. O efeito múltiplo do gen **Tu** sobre o fenótipo de vários órgãos foi descrito em detalhe por

Brieger (4, 5 e 6). Obtivemos, por seleção, linhagens nas quais a transformação da flecha, isto é, da inflorescência terminal masculina, num órgão intermediário entre a flecha e a espiga chegou a um extremo que, provavelmente, constitui o máximo que se pode obter. O eixo central então se transformou em uma espiga com muitas fileiras e com ráquis flexível, sendo as flores ou femininas ou hermafroditas. As ramificações continuam a ter quatro fileiras de espiguetas com flores masculinas, femininas ou hermafroditas. Um estudo mais detalhado dessas flechas, apresentado nesta publicação, revelou alterações na estrutura dos pares de espiguetas, as quais se transformaram em inflorescências complexas, mas perfeitamente normais.

Outra alteração observada refere-se à estrutura das próprias espiguetas. Normalmente, encontramos nas espiguetas masculinas duas flores férteis e nas femininas uma flor feminina e outra abortiva. Nas flechas transformadas aparecem flores hermafroditas, cujo número por espigueta pode ser grandemente aumentado.

Estas observações feitas em milho *tunicata paulista* nos levaram a fazer um estudo mais geral sobre a estrutura das inflorescências e das flores em milho. Usamos especialmente material sul-americano, que até hoje foi pouco aproveitado. As observações mostram que as particularidades observadas no milho *tunicata* se enquadram num esquema bem geral.

Finalmente, usamos também os descendentes de híbridos entre variedades de *Zea mays* e *Euchlaena mexicana*. O aproveitamento deste material, em estudos sobre filogenia das *Maydeae*, é perfeitamente justificado, uma vez que ambas as espécies pertencem a este grupo. O valor destes híbridos, para os estudos sobre a origem do milho, reside no seguinte: Torna-se indispensável substituir os muitos gens acumulados em milho durante a domesticação, por outros de uma espécie selvagem, e o único caminho, no momento, é a sua substituição por gens de teosinto, como já explicamos em detalhe em outro lugar, Brieger (4 e 6).

3. A estrutura da flor e das espiguetas em milho

A estrutura, que muitas vezes é chamada "flor" de uma graminéa, é, de fato, uma pequena inflorescência, protegida por um certo número de brácteas. Este conjunto chamamos de espigueta e a sua estrutura está esquematicamente representada na fig. 1, d. Do eixo principal **E** sai uma ramificação lateral, que devia estar na axila de uma folha, a qual, às vezes, ainda é representada por uma pequena elevação na base dessa ramificação. A ramificação tem, em primeiro lugar, duas ou mais brácteas, chamadas **glumas** estéreis, e que são, em geral, os principais órgãos protetores (**Ge** e **Gi** nas figuras). Depois segue um número, variável nas diferentes sub-famílias das *Gramineae*, de brácteas férteis chamadas glumas floríferas ou **Lema (L)**, também designadas como "pálea inferior", estando as flores nas suas axilas. Representamos, na fig. 1,d, apenas duas lemas com as duas flores nas suas axilas. Assim, as glumas estéreis pro-

tegem tôda a espigueta, sendo as lemas os órgãos especiais para cada flor. Além disso, cada flor tem mais um órgão protetor, a *pálea* superior ou simplesmente *pálea* (**P**), e que já faz parte da própria flor. Em alguns gêneros, o eixo da espigueta ou ráquila (**Et**) produz, finalmente, mais algumas brácteas sem flores, em cima da zona florífera.

A estrutura de uma espigueta com uma só flor é também ilustrada pelo diagrama na fig. 1,b e 1,c, onde foram usadas as mesmas letras para o eixo principal (**E**), o eixo da espigueta (**Et**), as glumas estéreis (**Ge** e **Gi**), a lema (**L**) e pálea (**P**).

A flor das gramíneas (fig. 1,b e 1,c) pode ser melhor compreendida quando a comparamos com uma flor completa de uma *Liliacea* (Fig. 1,a). Para tornar os diagramas comparáveis representamos uma flor que está num ramo lateral (**Et**) protegido por três brácteas (**B1, B2, B3**), colocada na axila da última bráctea. Na flor das *Liliaceas* temos dois círculos de 3 pétalas cada um, dois círculos de três estames cada um e um círculo de três carpelos reunidos num ovário, sendo a posição nos círculos adjacentes sempre alternada. Nas *Gramineae* (Fig. 1,b), o primeiro círculo contém desenvolvidas apenas duas das três pétalas, unidas na formação da pálea (**P**), sendo a terceira pétala completamente ausente. Do círculo interno de fôlhas sobram dois pequenos órgãos bractóides, as **lodículas** (**I**), que, pela variação do seu volume, forçam durante a antesis a abertura dos órgãos protetores, permitindo a saída das anteras e estigmas. Apenas o círculo externo de anteras é geralmente desenvolvido. Do círculo dos carpelos, aparecem, em geral, apenas dois carpelos bem desenvolvidos, terminando num estigma dividido mais ou menos profundamente em duas pontas. O ovário contém uma cavidade única com um só óvulo. É interessante notar que, no grupo das *Bambusaceae* (Fig. 1,c), encontramos um tipo um pouco mais simples, sendo desenvolvidos todos os três membros do círculo interno de pétalas e dois círculos completos de estames. Em arroz, encontramos também dois círculos de estames.

A redução dos órgãos florais de cada flor na *Gramineae* é contrabalançada pela reunião de mais de uma flor dentro de cada espigueta, sendo assim esta última a unidade básica das inflorescências.

As reduções especiais encontradas nas *Maydeae* são as seguintes: tôdas as espiguetas contêm apenas duas flores, em vez de muitas, e ainda há uma separação dos sexos. Nas espiguetas femininas sòmente a flor superior é desenvolvida, sendo suprimidos todos os órgãos da flor inferior exceto a pálea e a lema (fig. 2,a e fig. 3,a), estando, porém, no diagrama (fig. 2,a) ainda representadas as anteras na flor superior. Nas espiguetas masculinas temos duas flores férteis, cada uma com três estames, (fig. 2,b e fig. 3,b), estando no diagrama (fig. 2,b) ainda representados os ovários.

Esta redução, nas espiguetas, a uma flor feminina ou a duas masculinas é compensada em parte pela formação de duas espiguetas conjugadas em cada nó do eixo, incluídas numa pequena cavidade chamada *alvéolo* (fig. 3,e), limitada, em milho, na base e nos lados por uma pequena

elevação bractóide. A mesma estrutura bractóide forma, em *Tripsacum* e *Euchlaena*, as "tapas" ou órgãos protetores externos. É interessante notar que as *Maydeae* contêm, nos alvéolos da parte masculina das inflorescências, duas espiguetas, sendo freqüentemente uma espiguetas sésil e outra pedunculada. Na parte feminina, porém, existe uma diferença entre os gêneros americanos. Em *Zea* temos também na espiga duas espiguetas e, conseqüentemente, dois grãos por alvéolo, o que é a causa do aparecimento de fileiras conjugadas. Em *Euchlaena* e *Tripsacum* uma das espiguetas é suprimida: encontramos em *T. australe* apenas, como rara anomalia, o desenvolvimento de duas espiguetas na base da inflorescência, podendo ser ambas fêmeas ou também de sexo diferente.

O aparecimento de duas espiguetas por alvéolo em milho deu origem a muitas discussões, apesar de que em outras *Gramineae* situações análogas não são raras. Assim, temos, em cevada (*Hordeum*), como unidade da espiga, grupos de três espiguetas conjugadas, e Arber (1) explica, em detalhe, tipos ainda mais complicados, como o gênero sul-americano **Pariana** (1 pg. 170). Podemos citar também as "contas" de Coix, nas quais estão reunidas duas espiguetas estéreis e uma terceira fértil e feminina.

Para explicar o aparecimento das duas espiguetas conjugadas em milho, Collins (9) formulou a hipótese de que se trata dos restos de um ramo lateral reduzido apenas a duas espiguetas. Esta hipótese foi depois aceita por Weatherwax (20, 21) e Mangelsdorf and Reeves (15), (pg. 59). Adotamos também esta hipótese, e, para ilustrá-la, referimo-nos ao desenho na fig. 3,f, na qual é representado, no alvéolo, um ramo com três espiguetas.

Assim, constatamos nas *Maydeae americanae*, além da redução dos órgãos florais, típica para as *Gramineae* em geral, mais duas peculiaridades, adquiridas durante a evolução filogenética regressiva: a) redução das flores por espiguetas a duas, das quais apenas a superior é fértil na parte feminina das inflorescências, e b) a redução de ramos secundários, a duas espiguetas, tanto na espiga do milho como nas partes masculinas das inflorescências de tôdas as *Maydeae americanae*, sobrando apenas uma das espiguetas nas partes femininas das inflorescências de *Tripsacum* e *Euchlaena*.

Além da diferença no desenvolvimento das tapas protetoras e das fileiras duplas nos três gêneros mencionados, temos outra diferença entre eles no desenvolvimento da ráquis. Na parte feminina da inflorescência de *Tripsacum* a ráquis é quase reta com concavidades alternadas nos dois lados, correspondendo às espiguetas. Em *Euchlaena* temos na espiga uma ráquis que forma um zigue-zague, sendo as espiguetas colocadas nos espaços triangulares formados pelo eixo. No milho cultivado, finalmente, a ráquis é reta, sem concavidade e as espiguetas são colocadas na sua superfície, formando um ângulo quase reto com a ráquis. Às vezes, nas flechas transformadas do milho tunicata, encontramos nos ramos laterais um eixo em ziguezague, como também nas pontas às vezes muito finas das espigas

do milho **Pipoca Pontudo Paulista** onde os órgãos estão incluídos em concavidades da ráquis.

Devemos ainda mencionar uma peculiaridade em milho que é, provavelmente, um resultado da domesticação: a multiplicação das fileiras. Nas inflorescências de *Euchlaena* e *Tripsacum* e nos ramos das flechas do milho encontramos os alvéolos numa filotaxia em espiral $\frac{1}{2}$, quando no eixo central da flecha e na espiga do milho temos um número variável de fileiras longitudinais de alvéolos. Esta substituição da filotaxia em espiral pela organização de fileiras longitudinais será assunto para um estudo detalhado, mas se trata realmente de um fenômeno bastante comum. Basta lembrar que um fenômeno idêntico é encontrado em muitas outras plantas, por exemplo, nas *Cactaceae*, em que a espiral de fôlhas é suplantada por uma organização longitudinal com 2, 3, 4 fileiras, conforme o gênero ou a espécie Brieger (6).

Em resumo, aceitando as várias sugestões contidas na literatura (veja-se o ótimo resumo em Mangelsdorf and Reeves (15) e ampliando os numerosos pontos, podemos caracterizar a filogenia da inflorescência das *Maydeae americanae* da forma seguinte:

a) Redução dos órgãos florais, comum para a maioria das *Gramineae*, de uma flor simétrica com 5 círculos completos para 4 círculos incompletos.

b) Redução das espiguetas a duas flores, sendo apenas uma fértil quando feminina, ou as duas, quando masculinas.

c) Redução de um ramo lateral no máximo a duas espiguetas, ambas sésseis ou uma sésseis e outra pedunculada.

d) Substituição, em milho apenas, na espiga e no eixo central da flecha de uma filotaxia dos alvéolos em espiral de $\frac{1}{2}$, por uma simetria longitudinal com um número variável de fileiras.

Nos capítulos seguintes relataremos um certo número de casos em que estas reduções filogenéticas foram anuladas em milho.

A VARIABILIDADE NAS INFLORESCÊNCIAS

I. Flores hermafroditas

Flores hermafroditas são tão comuns em milho, que uma descrição detalhada nos parece supérflua. Elas são encontradas nas flechas de indivíduos **tunicata** ou das várias formas denominadas "tassel seed" e também nas espigas de vários tipos anões, hereditários. Uma vez que nas flores masculinas existem quase sempre rudimentos do ovário e nas flores femininas rudimentos dos estames, as flores hermafroditas não mostram qualquer alteração profunda da estrutura floral. São freqüentemente encontradas transições de flores monossesuais para flores hermafroditas. Assim, encontramos em flores ainda masculinas, no lugar do ovário muito rudimentar, um filamento grosso de alguns milímetros de comprimento. Em flores ainda femininas encontramos filamentos ou mesmo estames quase completos, os quais, porém, não são capazes de se abrir e deixar sair o pólen.

Nos diagramas florais, que constam dêste trabalho, está representada, para simplificação, a estrutura de flores hermafroditas. Os esquemas de flores unissexuais podem, fãcilmente, ser derivados pela omissão dos símbolos representando os estames ou os ovários.

2. A estrutura das espiguetas

a) Espiguetas biflorais

Como já ficou acima explicado, consideramos a espiguetas como um ramo reduzido a apenas duas flores. Como estão localizadas nas faces opostas do eixo da espiguetas (fig. 2,a e 2,b), a estrutura das flores é inversamente simétrica. As páleas das duas flores estão encostadas uma a outra, e as lemas exteriormente estão opostas, formando um envólucro dentro das duas glumas. O embrião, também indicado nos esquemas por um espaço em branco, está ao lado do ovário, oposto à pálea e por isso virado para fora em relação ao eixo (Et) da espiguetas.

Nas espiguetas normais femininas de *Maydeae*, encontramos desenvolvida apenas a flor superior, isto é, a segunda flor da espiguetas. Uma vez que em milho a espiguetas forma um ângulo quase reto com a ráquis o embrião acha-se virado para a ponta da espiga. Em *Tripsacum* e em *Euchlaena*, nas quais as espiguetas são encostadas ou embutidas dentro do eixo da espiga, o embrião encontra-se encostado a êste, no lado interno da espiguetas, e assim muito melhor protegido do que em milho.

O desenvolvimento de ambas as flores femininas ocorre em algumas variedades de milho, como no milho doce "Country Gentleman", e Cutler (10) descreveu recentemente tais formas sul-americanas, fazendo também um resumo de literatura. Nestes casos, temos então pares de grãos, um dêles com o embrião virado para a ponta e outro para a base da espiga. O mesmo autor observou, em milho Boliviano denominado "cuti sara", um caso interessante: o desenvolvimento seja da segunda flor ou seja da primeira flor na espiguetas. Dêste modo, o grão tem o embrião virado para a ponta da espiga, quando originado da flor superior, ou virado para a base da espiga, quando formado pela flor inferior, que é a primeira flor da espiguetas.

Encontram-se comumente nas flechas normais masculinas, espiguetas biflorais (fig. 3,b), mas quando há transformação em flores femininas, como em algumas plantas *Tunicata* ou "Tassel seed", a primeira flor em geral aborta e somente a segunda se torna feminina (fig. 3,a). Não observamos ainda exceções a esta regra nos tipos de "Tassel seed", porém em algumas plantas de *Tunicata*, que pertenciam a linhagens selecionadas para um maior número de grãos maduros na espiga, encontramos, com bastante frequência, espiguetas biflorais férteis, sendo ambas as flores femininas ou hermafroditas (fig. 3,c, fig. 4,d, fig. 5,c, 5,g, fig. 6,d).

b) Espiguetas triflorais

Observamos nas flechas de várias plantas **Tunicata**, espiguetas triflorais, e pode-se entender facilmente a sua morfologia pelos diagramas nas fig. 2,c e fig. 3,d. A terceira flor da espiguetta deve estar sempre no lado externo do eixo e, por isso, em cima da primeira flor, mostrando a mesma posição e simetria desta. Assim, quando tôdas as três sementes forem bem desenvolvidas, devemos esperar que dois embriões estejam virados para a base da espiga, e apenas o embrião da segunda flor, cujo desenvolvimento é normal, esteja virado para a ponta da espiga.

Reproduzimos nas fig. 5, i, j, l alguns dos casos observados, nos quais podemos verificar o número de sementes duma espiguetta, incluídas entre o par das glumas e separadas entre si pelas lemas e páleas. A posição dos embriões não é bem visível nas reproduções fotográficas.

Inspecionando grande número das flores destas flechas encontramos, freqüentemente, espiguetas com apenas duas sementes, nas quais, porém, a posição dos embriões parecia anormal. Estes casos se explicam como o das espiguetas triflorais, sendo, porém, uma das flores abortiva. Quando a primeira flor é abortiva, os embriões da segunda e terceira flor se encontram em posições opostas, um virado para cima e outro virado para baixo (fig. 2,d). Quando, ao contrário, a segunda flor se torna estéril, ambos os embriões das flores restantes são virados para a base da espiga (fig. 2,e). Em ambos os casos encontramos, entre uma das sementes e as glumas, um número excessivo de brácteas, — a lema e, às vezes, a pálea da flor estéril — além dos órgãos das flores férteis.

c) Espiguetas multiflorais

Apesar de, na maioria dos casos, ser três o máximo de flores femininas ou hermafroditas férteis que temos observado até agora, o número total pode ser ainda maior, pois já tivemos oportunidade de encontrar cinco flores. Não são raros os casos em que se fundem órgãos vizinhos destas flores, sendo, além disso, a quarta e a quinta flor sempre incompletas. Considerando que as espiguetas triflorais aparecem apenas depois de cinco anos de seleção, será talvez possível obter, no futuro, espiguetas de um número ainda maior de flores férteis.

Os óvulos de ovários fundidos podiam dar sementes dentro do mesmo pericárpio, nascendo assim grãos "*conatos*". Tais grãos "*conatos*" foram descritos por Kempton (13) em milho indígena norte-americano ("Hopi") e num híbrido entre milho "chinês" e central americano. Eles também foram observados por Blaringhem (3) e Stratton (18) na variedade "*polysperma*" (citações segundo Randolph, (17),

d) Protoginia

Na descrição anterior não levamos em consideração uma das diferenças entre flores femininas e masculinas. Nas flores da flecha, com ovários bem desenvolvidos, encontramos, de fato, uma variação muito grande.

tanto de número de estames formados, que varia de zero até três, como do grau de desenvolvimento dos mesmos, desde filamentos estaminóides com anteras incapazes de se abrirem até estames completamente normais.

As nossas observações foram bastante dificultadas pela acentuada protoginia das flores. As anteras saem das glumas e deixam escapar o pólen no mínimo 8 até 10 dias depois da saída das barbas nas mesmas inflorescências, isto é, quando as barbas em parte já começam a secar. A mesma protoginia também pode ser observada na forma "tassel seed". Assim, as flechas destes tipos de milho, com as flores masculinas e femininas respectivamente hermafroditas, na mesma inflorescência, voltam ao estado encontrado em *Tripsacum*, em que em cada inflorescência, também mista, a protoginia é igualmente muito acentuada. Devemos assinalar que esta protoginia extrema é encontrada apenas com referência a flores dentro da mesma inflorescência ou a órgãos florais da mesma flor. As referências na literatura à protandria em milho dizem respeito às flores em inflorescências separadas: as flores masculinas na flecha e as flores femininas da espiga lateral. Parece que esta diferença botânica, muito importante, entre a protoginia das flores femininas e basais da inflorescência de *Tripsacum* de um lado, e a protandria do outro, das flores na flecha terminal sobre aquelas das espigas laterais em *Zea* e *Euchlaena*, não foi notada pelos autores que compararam estes três gêneros (Mangelsdorf and Reeves (15), pg. 205).

e) Conclusão

Para finalizar, encontramos nas espiguetas mistas das flechas do milho **tunicata paulista**, selecionado para obtenção de um extremo grau de diferenciação em relação à flecha comum do milho, uma reversão filogenética regressiva em dois sentidos:

a) As flores voltam em grande parte à fase hermafrodita e os promórdios de todos os órgãos masculinos (estames) e femininos (ovários uni-ovulares) se desenvolvem ambos normalmente, observando-se ainda uma protoginia muito pronunciada.

b) Apesar de as espiguetas femininas em milho serem em geral providas de uma flor fértil e outra estéril, encontramos espiguetas com um máximo de três grãos perfeitos, quando maduros. Foram observadas até agora espiguetas com quatro ou cinco flores, ficando, porém, algumas das flores rudimentares e imperfeitamente desenvolvidas.

3. Substituição de pares de espiguetas por racemos

a) Reversão das flechas em milho **tunicata**

Mencionamos acima a hipótese de Collins (8), a qual é aceita posteriormente por outros autores, de que cada par de espiguetas nas *Mydcae americanae* corresponde a uma ramo reduzido que antigamente tinha numerosas espiguetas, arranjadas num racemo com a filotaxia de $\frac{1}{2}$. Foram encontrados vários casos de uma reversão a esta fase filogeneticamente primitiva, nas flechas transformadas do milho **tunicata paulista**, e estão reproduzidos alguns casos nas fig. 4 e 6.

Antes de entrar em detalhes, explicaremos a situação esquemáticamente com a ajuda das fig. 3,e e 3,f. Na fig. 3,f temos um pequeno ramo com três espiguetas: a primeira normal feminina com uma flor estéril; a segunda com duas flores hermafroditas e a terceira, com duas flores masculinas. Na base de cada espigueta encontramos uma pequena articulação que corresponde ao lugar onde havia antigamente uma bráctea. Dêste tipo podemos fãcilmente derivar, tanto a forma normal, como as anormalidades encontradas em **tunicata**. Por exemplo, se supusermos que o ramo tenha apenas duas espiguetas e que o primeiro internódio ficou tão reduzido em tamanho de modo que a segunda espigueta se tornou praticamente sésxil, chegaremos à situação do alvéolo normal, representado pela fig. 3,e.

A variação das estruturas observadas em flechas de plantas **tunicata** depende de três fatôres: a) do comprimento dos internódios; b) do comprimento dos pedúnculos de cada espigueta, e, finalmente, c) do número de espiguetas por ramo.

Na forma mais aproximada ao normal, temos duas espiguetas por alvéolo, sendo ambas sésseis ou uma sésxil e outra pedunculada. Encontramos esta situação nas fig. 4, e, h e fig. 5, a, b, c, g, h, k, l. Nas duas figuras 5,i e j encontramos duas espiguetas sésseis por alvéolo, uma com três e outra com duas flores férteis, contendo grãos maduros. As últimas figuras, **k** e **l**, mostram dois alvéolos cada um com espiguetas sésseis ou pedunculadas, biflorais ou triflorais.

O extremo oposto, o maior desvio do normal, encontramos nas fig. 4, d e f. A figura 4, f, da planta 2-706-43, corresponde quase perfeitamente ao nosso esquema da fig. 3,f, exceto que o racemo contém quatro espiguetas. A fig. 4, a até e, da planta 121-595-44, contém três espiguetas, tôdas com internódios curtos e os pedúnculos desenvolvidos. Muito interessantes são ainda as três espiguetas da planta 54-14-42, ilustradas na fig. 4,g,h,i. Na fig. 4,g temos uma espigueta grande sésxil, seguida de dois internódios, o primeiro muito longo e o segundo curto, ambos terminados por espiguetas pequenas. Na fig. 4, i também notamos três espiguetas, das quais a maior é sésxil; as outras têm pedúnculos longos, sendo, por outro lado, os internódios reduzidíssimos. A fig. 4, h, finalmente, tem um aspecto normal com duas espiguetas, uma sésxil e outra pedunculada.

Não temos dúvida de que as interpretações dadas são corretas e que temos vários estágios da formação, mais ou menos completa, de um racemo lateral. É interessante notar que nestes exemplos escolhidos não aparece qualquer constância referente à distribuição das espiguetas femininas ou masculinas, que tanto podem ser colocadas na base, como nos internódios superiores do racemo. Daí resulta o aspecto bastante irregular que as ramificações da flecha apresentam (fig. 6). Os alvéolos isolados nas fig. 4 e 5 correspondem sempre a uma das duas fileiras formadas normalmente em lados opostos das ramificações da flecha. Apenas a fig. 5, k e l, reproduz dois alvéolos opostos.

b) Aumento do número de espiguetas por alvéolo nas espigas

Depois de verificado que o número de espiguetas por alvéolo nas flechas pode ser maior do que 2, resolvemos procurar indícios de um tal aumento também nas espigas.

Os descendentes do cruzamento milho x teosinto oferecem, para isso, material excelente. Não são raros os casos em que o número de fileiras de alvéolos é reduzido a apenas dois, o que facilita muito a análise. Além disso, encontramos, no desenvolvimento das tapas, uma outra ajuda para identificação dos alvéolos.

Reproduzimos na fig. 7 vários aspectos da mesma espiga de uma planta (7-486-44). As duas apresentações dorsal e ventral, na fig. 7, d e 7, e, mostram que temos duas fileiras de alvéolos, nos lados da ráquis. A estrutura talvez não seja muito fácil de se compreender nas fotografias, mas a fig. 7, a mostra um grão em detalhe aumentado. Notamos sempre muito bem a "tapa", o órgão protetor formado pela ráquis, que é acentuadamente desenvolvido em consequência da ação de gens do teosinto. Na fig. 7, a, d, e e, as tapas são bem distintas pelas suas manchas pretas. Parcialmente cobertas pelas tapas, temos as glumas, especialmente a gluma externa, que é também muito dura e que forma um funil assimétrico (fig. 7a e c). Finalmente, os grãos grandes são deformados, pois a sua base tem que se adaptar à forma das glumas córneas (fig. 7, b).

Estão reproduzidas na fig. 7, f e g os dois aspectos laterais da mesma espiga. O normal, nestes descendentes do cruzamento milho x teosinto, é a presença de duas fileiras de grãos por alvéolo (tipo milho) ou de apenas uma fileira de grãos (tipo teosinto). As fotografias, porém, mostram claramente que a planta 7-486-44 tinha três fileiras de grãos por fileira de alvéolo. A espiga tinha, assim, um total de $2 \times 3 = 6$ fileiras!

Um caso semelhante reproduzimos no fig. 8, c e d, da planta 10-488-44. Aqui também é claro que a espiga tinha apenas duas fileiras de alvéolos, nos lados opostos da ráquis, posta em destaque pelas tapas, em preto (fig. 8 c). A vista lateral prova que muitos dos alvéolos contêm três espiguetas (fig. 8, d).

Para explicar êste fenômeno se oferecem duas possibilidades: pode-se tratar ou de três ou de duas espiguetas, tendo uma delas mais de um grão desenvolvido. A segunda hipótese pode, porém, ser excluída imediatamente pela presença de glumas individuais para cada grão e pela orientação dos embriões que são sempre virados para a ponta da espiga. Assim, resta apenas a outra alternativa: a formação de três espiguetas por alvéolo.

Estas observações sôbre a possibilidade do aumento do número de espiguetas, por alvéolo, oferecem uma explicação para um fenômeno não raro em milho. É muito comum encontrar-se espigas que têm os grãos arranjados em fileiras bem regulares, exceto na base. Nesta zona podemos constatar uma ausência da regularidade das fileiras e, ao mesmo tempo, um aumento do número de grãos colocados à mesma altura na espiga. As espigas do milho **pipoca pontudo paulista** nos deram ótimo material

para o estudo dêste fenômeno, pela seguinte razão: nos dois ou três quartos superiores da espiga temos, em geral, fileiras que além de serem muito regulares são bastante salientes, ficando assim fácil identificar os pares de fileiras de espiguetas correspondendo a uma fileira de alvéolos. Além disso, é fácil identificar as espiguetas individualmente, pois as glumas são bem desenvolvidas, mesmo em grãos maduros. Por outro lado, ao contrário dos descendentes do cruzamento milho x teosinto, as tapas são pequenas, como é a regra no milho brasileiro. Na base da espiga não há regularidade das fileiras.

As fotografias (fig. 9,a e 9,b) da planta 8-571-42, tomadas de ângulos diferentes, demonstram a profunda separação das fileiras de alvéolos. Na fig. 9,a destaca-se, no centro da espiga, uma linha preta que corresponde à profunda separação de duas fileiras de alvéolos, à direita e à esquerda. Esta linha divisória pode ser vista desde a ponta até a base da espiga. Na fig. 9,b acentuamos estas linhas de separação dos alvéolos, pela inserção de duas tiras de papel preto. Nessa figura está no centro uma fileira de alvéolos flanqueada assim pelas duas tiras pretas, sendo o número de fileiras de grãos igual a dois na metade superior da espiga, aumentando para três ou quatro, na metade basal da mesma. Não aparece nenhum indício que possa ser tomado como sinal do aumento do número de alvéolos, de modo que fica claro tratar-se, de alto a baixo, de uma só fileira de alvéolos. A presença de glumas individuais, a forma dos grãos e a posição dos embriões provam que cada grão corresponde a uma espiguetas. Basta para isso comparar a fig. 9,b, com a fotografia de Cutler (10), que representa uma espiga da mesma variedade do milho com grãos duplos por espiguetas, colocados em direções diferentes. Assim, fica demonstrado que se trata do aumento do número de espiguetas por alvéolo.

A situação é, até certo ponto, mais clara ainda nas fotografias da espiga 33-591-42 (fig. 9,e até f). Para facilitar a explicação, quebramos a espiga em três partes. A vista lateral dos dois terços superiores (fig. 9,f) mostra claramente a regularidade e a saliência das fileiras. A linha preta no centro acentua a separação das fileiras de alvéolos. A vista transversal (fig. 9,e e 9,d) mostra a forma pentagonal da ráquis e os triângulos brancos indicam a separação dos cinco pares de fileiras de grãos cada um correspondendo a um alvéolo.

Na parte basal (fig. 9,f) perde-se a regularidade das fileiras, e na vista transversal (fig. 9,e) nota-se claramente que a ráquis continua pentagonal. Também é relativamente fácil identificar os cinco alvéolos indicados, como anteriormente, com pequenos triângulos brancos. Começando no lado direito, onde a flecha indicadora está colocada, e contando no sentido do movimento do ponteiro do relógio, temos os seguintes números de grãos por alvéolos neste corte transversal: 4-2-2-4-2, ou um total de 14, em vez de 10, como na parte superior da espiga (fig. 9,e e 9,d). As glumas individuais, a forma e posição dos grãos, não deixam dúvida alguma de que cada grão corresponde a uma espiguetas.

Repetimos, mais uma vez, que constatamos na parte basal destas duas espigas um aumento do número de fileiras de grãos, os quais se tornam irregulares, sem haver aumento do número de fileiras de alvéolos que continuam a ser regulares.

Em ambas as espigas, é claro que os grãos adicionais na base correspondem a espiguetas normais, cada uma com um só grão. Cada grão tem as suas glumas bem destacadas, e os embriões ocupam a posição normal, virados para a ponta da espiga. Não se pode tratar assim de um desenvolvimento da flor estéril de cada espigueta, como nos casos descritos por Cutler (10), para a mesma variedade de milho, onde os embriões estão em parte virados para a base da espiga. Resta, dêste modo, como única outra explicação, a hipótese de que o número de espiguetas foi aumentado para três ou quatro por alvéolos do mesmo modo como foi descrito na pág. 669 para as espigas com duas fileiras de alvéolos e com três espiguetas por alvéolo, nos descendentes do cruzamento milho x teosinto.

c) Conclusão

Desmonstramos, que: 1) em espigas pode haver um aumento do número normal (duas) para três ou quatro espiguetas por alvéolo, tanto em descendentes dos híbridos milho x teosinto como em espigas do milho **pipoca pontudo paulista**; 2) nas flechas do milho **tunicata paulista** podem ser encontrados freqüentemente nos alvéolos, pequenos racemos, com até, no máximo, cinco espiguetas, sendo a sua forma variável de acôrdo com o tamanho dos internódios e dos pedúnculos individuais de cada espigueta.

Não pudemos provar que o aumento de espiguetas por alvéolo nas espigas deva também ser interpretado como consequência do fato de que o par normal de grãos seja o resultado da redução de um pequeno racemo a apenas duas espiguetas sésseis. Mas, as diferentes observações feitas nas flechas do milho **tunitaca**, são bastante sugestivas, pois encontramos tôdas as fases intermediárias, entre duas ou três espiguetas sésseis até racemos com três até cinco espiguetas (fig. 4 e fig. 5).

4. O aumento do número de fileiras de alvéolos

Explicamos acima (pg. 664) que os antepassados do milho tinham nas suas inflorescências apenas duas fileiras de alvéolos, do mesmo modo como encontramos ainda hoje nos outros dois gêneros das *Maydeae americanae*, *Tripsacum* e *Euchlaena*, e que o aumento de fileiras no milho cultivado é devido à intercalação de outras fileiras de alvéolos.

Uma reversão ao tipo hipotético primitivo foi já descrita por Tavear (19) e Langham (14) e ela apareceu também numa família de nosso material de milho precoce brasileiro descendente de cruzamentos entre milho precoce do Canadá, milho europeu e milho brasileiro.

Nesta forma, a ráquis, nos dois lados expostos, tem uma superfície lisa e córnea, de côr branca, existindo, em geral, uma assimetria que será descrita mais tarde. Os pares de grãos são colocados nos dois lados opostos e pela sua posição alternante dão uma indicação da existência de uma filotaxia em espiral $\frac{1}{2}$.

Porém estas espigas com apenas quatro fileiras de grãos ou duas de alvéolos nada nos revelam sobre a modalidade da interpolação de outras fileiras. Material interessante neste sentido, oferecem as espigas de um outro tipo de milho que contém muitas fileiras de grãos na base, mas apenas quatro fileiras na ponta. Tavcar (19) e Mangelsdorf and Reeves (15), (pg. 26) as descreveram, e tivemos ocasião de estudar um número bem grande de espigas desta natureza que apareceram em três tipos de milho: precoce brasileiro, doce brasileiro, obtido do cruzamento entre milho doce norte-americano e milho duro brasileiro, e, finalmente, em descendentes do cruzamento entre milho brasileiro e teosinto.

Podia-se esperar que houvesse intercalação de novas fileiras de alvéolos em qualquer lugar da espiga; que simplesmente aparecessem novas fileiras nos lados da ráquis entre as duas já existentes, de modo que estas continuassem em linha reta desde a parte basal com muitas fileiras, até a ponta, com apenas duas fileiras. Este não é, porém, o caso, e em tôdas estas espigas pode ser constatada uma torção das fileiras. Não é sempre fácil analisar as torções, mas parece que, em geral, duas fileiras de alvéolos, adjacentes na parte basal da espiga, se separam até que ocupem os lados opostos da ráquis. As outras fileiras não ficam contínuas. Estas torções são bem visíveis na fig. 10. Também a fotografia reproduzida na fig. 93,c de Mangelsdorf and Reeves (15) mostra o mesmo fenômeno, sem que os autores tenham feito menção a êste fato.

Podemos assim ver a transformação de uma espiga, com duas fileiras de alvéolos, para uma outra com três, quatro ou mais fileiras.

Discutiremos, em primeiro lugar, a transformação de duas para quatro fileiras de alvéolos (fig. 10.a até d). A explicação torna-se mais fácil quando empregamos os desenhos esquemáticos da fig. 11.

O esquema da fig. 11.a mostra a situação inicial com a presença de dois alvéolos opostos. As duas novas fileiras são intercaladas num só lado da espiga, entre as fileiras originais A e B, o que provoca um desequilíbrio e, conseqüentemente, uma torção das fileiras indicada pelas flechas (fig. 11.b). Em consequência disso, as fileiras originais A e B saem da sua posição inicial e se aproximam uma da outra. No fim resulta uma espiga simétrica com quatro fileiras equidistantes (fig. 11,d).

Numa outra série demonstramos esquematicamente a passagem de duas para três fileiras de alvéolos (fig. 11, a, c, e). Partindo de novo de uma espiga com duas fileiras opostas (fig. 11,a) constatamos a intercalação de uma nova fileira (fig. 11,c), o que provoca torções até que os alvéolos ficam de novo equidistantes (fig. 11,e).

Notamos sempre uma diferença entre as espigas de três e de quatro fileiras de alvéolos. Nestas últimas, as torções das fileiras se limitam à

região da transição, mas nas primeiras atingem tôda a espiga. É isso, aliás, um fato geral, e, sempre, quando encontramos espigas com 3 ou 6 fileiras de grãos, correspondentes a três fileiras de alvéolos, a espiga inteira é torcida, para a direita ou para a esquerda, em todo o seu comprimento. Esta diferença de extensão da zona torcida é bem visível nas três espigas reproduzidas na fig. 10. Ela é também indicada nos diagramas da fig. 11,c e fig. 11,e. Não poderemos, porém, oferecer qualquer explicação para esta diferença, nem sôbre o desequilíbrio geral nas espigas com três fileiras de alvéolos.

As três espigas escolhidas, reproduzidas na fig. 10, são tôdas descendentes do cruzamento *Zea x Euchlaena*, e nelas se torna ainda mais fácil identificar os alvéolos pelo desenvolvimento das tapas com as suas manchas pretas.

As fig. 10,a e 10,b representam dois aspectos da espiga 16-407-44 com quatro fileiras de alvéolos na base e duas no último têrço. A fig. 10,b prova que quatro fileiras de grãos, isto é, duas de alvéolos, continuam da base até a ponta, com apenas ligeiras torções entre o primeiro e segundo têrço da espiga. A fig. 10,a, por outro lado, mostra as outras quatro fileiras que terminam justamente na mesma altura em que notamos as torções. Estas são fracas e as fileiras na ponta da espiga estão localizadas não nos lados, mas numa metade da ráquis, a qual é assimétrica.

As duas figuras seguintes, da planta 27-372-44, têm quatro fileiras de alvéolos no têrço basal da espiga e duas nos lados da ráquis na parte restante (fig. 10,c). As torções na zona de transição de um para outro arranjo são bem visíveis no aspecto lateral, fig. 10, d.

A última espiga, 13-448-44, tinha três fileiras de alvéolos na metade basal e duas apenas na parte superior. Só nesta última parte, a qual corresponde apenas ao quarto apical, a ráquis é reta; quanto ao resto, isto é, tanto na zona da transição, como na metade basal da espiga a torção é nítida. A situação é um pouco complicada pelo fato de que os alvéolos, bem delimitados pelas tapas, contêm, em grande parte, espiguetas ou três grãos maduros. Assim, o número de fileiras de grãos no quarto apical é de $2 \times 2 = 4$ até $2 \times 3 = 6$, e na metade basal varia entre $3 \times 2 = 6$ e $3 \times 3 = 9$ fileiras.

As fotografias das três espigas na fig. 10 ilustram também um outro ponto importante. Já acentuamos, repetidamente, a nossa convicção de que na espiga de milho, uma antiga filotaxia em espiral $\frac{1}{2}$ foi alterada pela intercalação de mais alvéolos, tomando disposição em fileiras longitudinais. Esta hipótese está apresentada esquematicamente na fig. 12,d e fig. 12,e. Ela está, por exemplo, em contradição com uma hipótese proposta por Collins (9), que pensou que a intercalação se daria pela forma ilustrada na fig. 12,f.

Na parte apical das espigas na fig. 10,a,c,f, com duas fileiras, podemos facilmente ver a filotaxia dos alvéolos, muito destacada pelas tapas coloridas. A espiral com $\frac{1}{2}$ está no sentido do movimento dos ponteiros do

relógio na espiga 13-488-44 e em sentido contrário nas espigas 16-407-44 e 27-372-44. Na zona de transição, na qual aparecem as novas fileiras, a espiral da filotaxia torna-se obscura, mas permanece a simetria das fileiras longitudinais, mais ou menos torcidas.

Conclusão

O estudo de espigas com um número variável de fileiras de alvéolos que aparecem raramente em milho e com mais frequência nos descendentes de híbridos *Zea* x *Euchlaena* prova que o aumento do número de fileiras de alvéolos além do primitivo (dois), é devido à intercalação de novas fileiras e que, simultaneamente, a filotaxia em espiral $\frac{1}{2}$ desaparece, ficando apenas a simetria das fileiras longitudinais, mais ou menos torcidas.

A intercalação acontece sempre num lado só da ráquis, de modo que as fileiras, inicialmente nos flancos da ráquis, ficam deslocadas para um lado da mesma, tornando-as assim vizinhas. Por isso observa-se sempre uma torção das fileiras na zona de transição do número menor para o número maior das fileiras.

Além desta torção, pode ser constatada uma outra em toda a espiga ou em parte de espigas com 3 fileiras de alvéolos.

5. Assimetria na espiga

Em todas as inflorescências masculinas das *Maydeae americanae* encontramos uma assimetria muito pronunciada, pois as quatro fileiras de espiguetas não estão localizadas nos lados da ráquis, mas na sua superfície inferior ou ventral. A face superior ou dorsal, oposta ao eixo principal da flecha, não tem espiguetas. Nas partes femininas das inflorescências de *Tripsacum* e *Euchlaena*, por outro lado, temos perfeita simetria e as espiguetas estão localizadas nos lados opostos da ráquis.

Em milho, quando há apenas duas fileiras de alvéolos, encontramos a mesma assimetria entre a face dorsal e ventral, semelhante à observada nos ramos laterais da flecha (fig. 10,a e b, fig. 13,a e b). É interessante notar que nestes casos a superfície da ráquis é lisa e brilhante. Os grãos, com suas glumas, estão no fim de um pequeno pedúnculo, que forma um ângulo reto, ou pouco agudo, com a ráquis da espiga. Assim, a situação é muito diferente daquela encontrada em *Tripsacum* ou *Euchlaena*, em que as espiguetas maduras estão encostadas à ráquis.

É também interessante notar que esta assimetria não é consequência do aparecimento de apenas quatro fileiras de grãos, distribuídos em duas fileiras de alvéolos. Nos descendentes do cruzamento milho x teosinto encontramos, em diferentes plantas, ambas as formas de organização: espigas simétricas com duas fileiras nos flancos da ráquis, como em *Tripsacum* e *Euchlaena* (fig. 8,c e d), e outras assimétricas, com as fileiras no lado ventral da ráquis, como em *Zea* (fig. 7, d e e, fig. 8, a e b). Assim, podemos considerar esta assimetria como um característico deste último gênero.

Uma outra peculiaridade temos observado freqüentemente em milho tunicata, nas formas "tassel seed" e em descendentes do cruzamento *Zea* x *Euchlaena*: o aparecimento de espiguetas femininas ou hermafroditas, combinadas com espiguetas masculinas, dentro do mesmo alvéolo. A posição das espiguetas neste caso não é ao acaso. Freqüentemente, as espiguetas femininas ou hermafroditas formam uma fileira, e as espiguetas masculinas uma outra. Nas flechas de *tunicata* (fig. 13,a) e de "tassel seed" (fig. 13,a e b) como também nas espigas do híbrido da primeira geração do cruzamento *tunicata* x teosinto, descrito por Brieger (6), (fig. 13) nota-se uma acentuada assimetria: as fileiras internas são femininas ou hermafroditas, originando depois grãos maduros, e as duas fileiras externas são formadas pelas espiguetas masculinas.

O fator **Tu** é o único que permite o aparecimento de fileiras de espiguetas masculinas nas espigas dos híbridos da primeira geração, mas nas gerações posteriores a mesma peculiaridade aparece também em plantas não-tunicata, e isto em qualquer dos cruzamentos feitos entre diferentes variedades de milho e o teosinto do México ou da Guatemala. Encontramos, assim, espigas com fileiras em número maior do que 4, sendo algumas delas formadas por espiguetas masculinas e outras femininas. A fig. 13,c e d mostra uma espiga desta natureza, vista de dois ângulos diferentes, proveniente da planta 8-375-44, que pertencia a um "back cross" para o milho. Nesta espiga com oito fileiras, as fileiras femininas de dois alvéolos, são adjacentes (fig. 13,d) e igualmente as fileiras masculinas (fig. 13,e).

A combinação de espiguetas masculinas e femininas no mesmo alvéolo é encontrada em *Euchlaena*, raramente na zona da transição da parte feminina para a parte masculina que, às vèzes, é formada na ponta da espiga. Ela é mais rara ainda em *Tripsacum australe* em alvéolos na base ou na ponta da parte feminina das inflorescências.

Assim, parece que o aparecimento de fileiras regulares de espiguetas masculinas, ao lado das femininas, deve ser considerado como um característico específico do gênero *Zea*, do mesmo modo como também a assimetria da posição dos alvéolos atrás mencionada.

6. A ramificação da espiga e a teoria de fusão

Ascherson (2) formulou uma hipótese de acôrdo com a qual a espiga de milho, com oito ou mais fileiras, é o produto da fusão de várias espigas do tipo de *Euchlaena* com apenas duas fileiras de grãos. Um argumento decisivo contra esta idéia foi levantado por Weatherwax (20) que explicou, pela primeira vez, que se deve distinguir o número de fileiras de grãos e dos alvéolos, e que por isso, a teoria de fusão, exigiria que encontrássemos nas espigas sempre um múltiplo de duas fileiras de alvéolos ou quatro fileiras de grãos quando, na realidade, o número de fileiras de grãos é apenas um múltiplo de 2. Langham (14) tentou reviver a teoria da fusão, sem fazer referência ao argumento contrário aqui mencionado, baseando-se em observações por êle realizadas nos descendentes do cruzamento milho x teosinto. Esse autor declarou ter encontrado

em plantas de segunda geração espigas que pareciam parcialmente fundidas. O amplo material que estudamos, porém, mostrou que nêles não existe tal fusão.

Para poder melhor compreender a situação, parece-nos necessário explicar, em primeiro lugar, a morfologia das flechas e dos galhos femininos em geral. Como explicamos, não existe diferença, em princípio, entre *Zea* e *Euchlaena*, sendo em *Tripsacum* (6) a organização mais primitiva.

Em *Tripsacum australe* tôdas as inflorescências, terminais e laterais, têm a mesma estrutura [fotografias em Brieger (6)]. O eixo principal forma, na filotaxia $\frac{1}{2}$, alvéolos com espiguetas femininas na parte basal e masculinas na parte apical. Na base encontram-se, no lugar de alguns alvéolos, ramos secundários com a mesma organização. Nunca apareceram ramos terciários. Os primeiros internódios abaixo destas inflorescências, são, em geral, curtos durante a antesis, mas se tornam depois longos sem, contudo, produzir galhos.

Pelo menos durante a fase feminina da abertura das flores temos as bases das inflorescências parcialmente cobertas pelas fôlhas dos nós. Isto pode ser considerado a primeira fase da transformação dessas fôlhas em palhas.

Em *Euchlaena* e *Zea* devemos distinguir as inflorescências terminais e laterais que, à primeira vista, parecem muito diferentes.

Nas flechas, temos um eixo principal que pode ter duas filas de alvéolos com filotaxia $\frac{1}{2}$ (*Euchlaena*) ou numerosas fileiras (*Zea*), ambos formando na sua base numerosos ramos em verticilos com apenas duas fileiras de alvéolos.

Abaixo dêste conjunto segue um número variável de fôlhas que não produzem galhos laterais. Em flechas de **milho tunicata** observamos a sua transformação parcial em palhas, sendo a bainha bem desenvolvida e a lâmina foliar reduzida (Brieger 5, fig. 3).

Assim, temos que notar uma só diferença entre êstes dois gêneros e *Tripsacum*: a organização de ramos em verticilos ou em posição alternada na base do eixo principal, o qual existe, a nosso ver, nos três gêneros, apesar de que Mangelsdorf and Reeves (15, pg. 205) acham que o eixo central falta sempre em *Tripsacum* e em *Euchlaena*. Em todos três gêneros notamos o aparecimento de nós estéreis abaixo da inflorescência masculina como um passo de transformação das fôlhas correspondentes em palhas.

A estrutura dos galhos laterais parece bastante diferente em *Zea* e em *Euchlaena*, porém estas diferenças desaparecem completamente numa inspeção detalhada (6). Nas figuras 14 e 15 reproduzimos quatro galhos, desfolhados, de descendentes do cruzamento milho x teosinto. Temos uma inflorescência terminal que pode ser uma simples espiga (fig. 15, b) ou, às vêzes, ainda uma espiga ramificada (fig. 14) ou uma flecha normal (fig. 15, a). Esta inflorescência que chamamos: terminal-lateral de 1.^o ordem, é seguida por alguns nós que não produzem galhos laterais e,

finalmente, na base dêste ramo de 1.^a ordem, temos outros nós que produzem ramos de 2.^a ordem. Nestas pode-se repetir o mesmo processo de ramificação: uma inflorescência terminal-lateral da 2.^a ordem, seguida por nós estéreis e, na base, ramos da 3.^a ordem. Nas fotografias (fig. 14.a e b), êstes últimos, por sua vez, repetem o processo de ramificação em inflorescências terminais-laterais da 3.^a ordem e ramos, na base, da 4.^a ordem.

Assim, temos uma série de ramificações terminando cada vez em uma inflorescência, podendo apresentar, na sua base, número variável de novos ramos. Cada inflorescência assim, é terminal em relação a um ramo, digamos de ordem $(n+1)$, e ao mesmo tempo lateral de outro ramo, de ordem (n) . Denominaremos, então, a inflorescência terminal de um galho da ordem $n + 1$ que seja bem desenvolvido com laterais de ordem $(n + 2)$ na sua base: inflorescência terminal-lateral da ordem $n + 1$. Quando, porém, o galho é reduzido praticamente à sua inflorescência terminal e mais alguns nós com fôlhas apenas, a denominação será apenas: lateral em relação ao ramo da ordem anterior (n) .

É muito importante distinguir os dois grupos de palhas em cada galho: a) palhas imediatamente abaixo de cada inflorescência terminal, as quais sempre são estéreis, sem outra inflorescência na sua axila, servindo apenas como envólucro da inflorescência terminal; b) palhas nas bases do galho que apresentam nas suas axilas ramos de ordem superior, as quais assim são órgãos protetores de tôdas as inflorescências.

Todos êstes pontos são bem visíveis nas fig. 15, a e 15, b. Em baixo da inflorescência terminal-lateral da ordem $n + 1$, que é uma flecha na fig. 15, a e uma espiga na fig. 15, b, temos, respectivamente, 3 e 4 nós sem ramificações, portadoras de palhas individuais. Os dois nós basais têm ramos da ordem $(n + 2)$ nas axilas de suas palhas. Nos nós basais temos um ramo $(n + 2)$ como uma espiga terminal, seguida por 3 nós sem novos ramos axilares, isto é, com palhas individuais, e depois um (fig. 15, a) ou dois (fig. 15, b) nós com um galho axilar da ordem $(n+3)$ formado por uma espiga e alguns nós estéreis com as suas palhas individuais. O segundo nó da base do galho principal tem o seu galho da ordem $(n + 2)$ na axila da palha e êle repete o mesmo processo: espiga terminal, nós estéreis com palhas individuais, e dois nós basais (fig. 15, a) ou um nó (fig. 15, b) com ramos da ordem $(n+3)$. O galho $(n+3)$ tem a sua espiga terminal, os nós estéreis e, às vêzes, mais uma espiga lateral no nó basal, a qual corresponde a um galho de ordem $(n+4)$.

A diferença entre milho e teosinto consiste apenas no desenvolvimento das inflorescências de ordem superior.

Em *Zea* desenvolve-se, em geral, apenas a inflorescência terminal-lateral da primeira ordem, ficando tôdas as palhas estéreis. Em galhos ramificados (compare a fotografia em Brieger (6, fig. 3A) se desenvolvem também as inflorescências terminais-laterais da segunda ordem, e temos, então, dois tipos de palhas: as palhas internas e estéreis, que protegem cada uma das espigas individualmente, e as palhas externas e férteis, que

protegem o conjunto das espigas. Uma vez que os galhos da segunda ordem produzem apenas uma espiga terminal-lateral da segunda ordem, falamos em geral apenas da espiga terminal e das espigas laterais, referindo-se estas denominações à sua posição no ramo de primeira ordem.

Em *Euchlaena*, por outro lado, as inflorescências laterais de ordem superior são, em geral, muito bem desenvolvidas, formando grupos ou "clusters" de espigas individuais, com as palhas individuais de cada espiga, ou internas, e as palhas externas do conjunto. Frequentemente, o ramo da primeira ordem é bastante longo e as fôlhas que correspondem às palhas externas e férteis têm desenvolvimento quase normal, sendo apenas as bainhas mais largas e as lâminas foliares um pouco menores do que nas fôlhas normais, protegendo um sistema de galhos de ordem superior, representado por um conjunto de espigas.

Apresentamos as principais diferenças no esquema abaixo:

<i>Ramo da 1.^a ordem</i>	<i>Zea</i>	<i>Euchlaena</i>	<i>Tripsacum</i>
Inflorescência terminal	espiga	geralmente flecha	mistas
Internódios estéreis	curtos	frequentemente longos	longos
Fôlhas desenvolvidas como:	palhas	fôlhas	fôlhas
<i>Ramos de ordem superior</i>			
Da 2. ^a ordem	espigas secundárias laterais	formando conjunto de espigas com internódios individuais bastante curtos ("clusters")	tôdas iguais ao ramo da 1. ^a ordem.
De ordem superior	ausentes		

Assim, está bastante claro que o plano básico da ramificação nos dois primeiros gêneros é idêntico, sendo as diferenças apenas de ordem secundária e quantitativa e que a diferença entre êstes e o terceiro, apesar de mais pronunciada, é também essencialmente de natureza quantitativa.

Para completar a descrição, devemos ainda mencionar uma correlação fisiológica muito interessante. Nas inflorescências laterais dos descendentes do híbrido milho x teosinto nota-se, com frequência, uma diferença entre o número de fileiras. As inflorescências terminais-laterais da primeira e, às vezes, da segunda ordem têm um número de fileiras maior do que 2, quando as espigas de ordem superior têm apenas 2 fileiras de alvéolos.

Parece que existem, nestas relações, diferenças genéticas entre as descendentes do cruzamento citado e encontramos três tipos de plantas: indivíduos nos quais tôdas as inflorescências, de qualquer ordem, têm mais do que duas fileiras de alvéolos (fig. 15, b), tipo *Zea*; indivíduos com tôdas as espigas de qualquer ordem com apenas duas fileiras, tipo *Euchlaena*; indivíduos com a espiga terminal-lateral e a espiga terminal do galho "prophyllary" contendo mais do que duas fileiras e tôdas as demais com apenas duas fileiras (fig. 15, a) tipo intermediário.

Estas variações do número de fileiras de espigas de ordem diferente complicam freqüentemente a comprovação da regra, descoberta por Langhan (14) sôbre a correlação do número de fileiras no eixo central da flecha e nas espigas laterais em descendentes do cruzamento *Zea* x *Euchlaena*.

Existe nos três gêneros uma profunda diferença botânica entre a ramificação dos galhos e das suas inflorescências terminais. Na primeira, todos os ramos de ordem superior estão nas axilas das fôlhas, geralmente transformadas em palhas, as quais seguem mais ou menos uma filotaxia em espiral $\frac{1}{2}$. De outro lado, dentro das inflorescências, nunca encontramos fôlhas desenvolvidas; os ramos de ordem superior estão em verticilos ou em espiral, sendo o conjunto, às vêzes, protegido por palhas estéreis, localizadas na base da inflorescência. A ramificação da inflorescência é muito nítida nas flechas, mas podemos encontrar entre a flecha (fig. 15, a) e a espiga normal (fig. 15, b), todos os estágios intermediários de espigas ramificadas.

Reproduzimos nas figs. 14 e 16 três inflorescências terminais-laterais da primeira ordem, tôdas ramificadas, e notamos que o esquema da ramificação é o mesmo que o da flecha de *Zea* e de *Euchlaena*. O eixo central se destaca por sua posição, além de ter um número mais elevado de fileiras de grãos (8 nos três casos). Na sua base encontramos um verticilo de ramos em número de 2 na fig. 14 e 6 na fig. 16. A estrutura destas inflorescências é a mesma das espigas ramificadas, encontradas em milho brasileiro e boliviano Brieger (6) ou das linhagens recessivas para o gen **ramosa**, as quais estudamos também em detalhe.

As fotos reproduzidas nas figuras representam, de fato, uma série contínua: espigas simples (fig. 14, b); espigas pouco ramificadas (fig. 14, a e b); espigas muito ramificadas Brieger (6), fig. 11; estruturas intermediárias (fig. 16) e flechas (fig. 14, a).

Todos êstes casos são inflorescências terminais-laterais da primeira ordem, com verticilos de ramos que nunca possuem mais do que quatro fileiras de espiguetas arranjadas assimetricamente. A face dorsal dos ramos, encostada ao eixo principal, é livre, e as quatro fileiras estão colocadas na face ventral.

Existe uma diferença entre o ângulo formado pelos ramos e o eixo central nas inflorescências ramificadas. Na flecha que termina o seu desenvolvimento fora de fôlhas protetoras, êste ângulo é, em geral, de 90° em

milho, e um pouco mais fechado em teosinto. Nas espigas ramificadas, porém, os ramos estão encostados ao eixo central e paralelos a êle em consequência da pressão exercida pelas palhas protetoras.

Estamos preparados agora para voltar à teoria da fusão pela qual se tentou explicar o aumento do número de fileiras nas espigas de milho. A hipótese original de Ascherson (2) de uma fusão de espigas laterais de teosinto implica no desaparecimento das palhas que individualmente protegem cada espiga, fato êste nunca observado. Seria possível admitir-se fusão de ramos de inflorescências ramificadas, pois não existem fôlhas que constituam impeçilho. Mas nunca observamos uma tal fusão, no material bastante extenso de inflorescências ramificadas que examinamos. A impressão de uma "fusão", às vêzes, é causada quando, pela pressão das palhas, os ramos são comprimidos contra o eixo central, provocando uma certa deslocação das fileiras. Esta impressão é mais forte ainda em alguns descendentes do cruzamento *Zea x Euchlaena*, cujas inflorescências apresentam sempre duas fileiras de alvéolos e nas quais apenas existem dois ramos colocados justamente nos lados do eixo central que não contêm grãos. Pensamos que casos desta natureza levaram Langham (14) a reavivar a hipótese de Ascherson (2), desprezando, porém, o argumento decisivo de Weatherwax, já citado, de acôrdo com o qual o número de fileiras devia ser um múltiplo de 4 em consequência da fusão de ramos individuais, com 4 fileiras de espiguetas cada um.

Conclusão

Devemos distinguir a ramificação das inflorescências e aquela do conjunto dos ramos portadores das inflorescências, o qual podemos denominar um antocládio, segundo Goebel (11).

A ramificação da inflorescência é limitada em *Tripsacum australe* a poucos ramos que seguem a filotaxia em espiral $\frac{1}{2}$. Os ramos formam verticilos nas flechas de *Zea x Euchlaena*, como também nas espigas ramificadas do milho. Os ramos nunca têm mais do que duas fileiras de alvéolos, independente do número de fileiras do eixo central.

Em todos os três gêneros devemos incluir ainda, como parte das inflorescências, os primeiros nós imediatamente abaixo da mesma, os quais não apresentam ramos axilares. Muito raramente não é tão completa esta supressão dos ramos axilares em baixo da inflorescência terminal. Por exemplo, encontramos, como rara exceção, em milho, uma espiga lateral na axila da primeira fôlha, abaixo da flecha.

As diferenças entre os três gêneros são apenas quantitativas. Em *Tripsacum* tôdas as inflorescências são iguais, sendo apenas menor a ramificação nas inflorescências de ordem superior. Em *Zea* e em *Euchlaena* encontramos uma relativa diferença entre a inflorescência terminal, — a flecha exclusivamente masculina — e as inflorescências laterais que formam um conjunto ou antocládio, com a mesma organização básica: em baixo da inflorescência terminal-lateral temos algumas fôlhas ou palhas

estéreis e outras mais para a base, com novos ramos e inflorescências nas suas axilas.

A diferença entre milho e teosinto é também qualitativa. Em milho se desenvolve geralmente apenas uma espiga, terminal para os ramos da primeira ordem e lateral em relação à haste principal, ficando tôdas as palhas estéreis. Em teosinto, encontramos bem desenvolvidas e com internódios bastante curtos, os ramos de ordem superior, que formam os conjuntos ou "cluters" de espigas.

Com relação ao número de fileiras nas espigas de um antocládio, existem três tipos nos descendentes do cruzamento *Zea* x *Euchlaena*: 1) tipo *Zea*, com numerosas fileiras em tôdas as espigas; 2) tipo *Euchlaena*, com duas fileiras de alvéolos em tôdas as espigas; 3) tipo intermediário com numerosas fileiras da espiga terminal-lateral da primeira ordem e, às vêzes, também em algumas da segunda ordem, mas com duas fileiras apenas nas demais espigas.

Não existe, assim, uma diferença fundamental entre a estrutura da flecha e da espiga, e foram descritos estágios intermediários em espigas ramificadas. Apenas o ângulo dos ramos, nas últimas, é diferente do ângulo nas flechas, devido à pressão das palhas.

A hipótese de Ascherson, que tentou explicar a espiga do milho com muitas fileiras pela fusão do conjunto de espigas em teosinto, exige que desapareçam no antocládio, tôdas as palhas individuais. Langham, que tentou reviver a hipótese, provavelmente, interpretou erradamente a estrutura de inflorescências ramificadas, que se apresentavam muito comprimidas pelas palhas. Não observamos indicações de existência de uma fusão, mesmo parcial, em descendentes do cruzamento *Zea* x *Euchlaena*.

Fica ainda como forte objeção, o argumento de Weatherwax, de acôrdo com o qual a hipótese da fusão exige que o número de fileiras de alvéolos seja um múltiplo de 2 e aquêle dos grãos um múltiplo de 4.

DISCUSSÃO

I. Recapitulação dos principais resultados

Antes de entrarmos numa discussão mais geral, achamos conveniente reunir os resultados das nossas observações relatadas nos capítulos anteriores.

a) **Flores** — Normalmente unissexuais, mas encontramos flores hermafroditas perfeitas.

b) **Espiguetas** — Normalmente biflorais, sendo ambas as flores férteis quando masculinas, ou apenas uma fértil. — a superior, feminina — e a outra, inferior, abortiva. Encontramos espiguetas bem desenvolvidas com 1 até 3 flores, femininas ou hermafroditas num total de até 5 flores, tôdas sempre incluídas num único par de glumas.

c) **Alvéolos** — São cavidades onde se alojam as espiguetas na ráquis, cujos bordos são salientes, constituindo as “tapas”, fortemente desenvolvidas em *Tripsacum* e *Euchlaena* e pequenas em *Zea*. Cada alvéolo tem normalmente nestes três gêneros, 2 espiguetas, exceto nas partes femininas das inflorescências dos dois primeiros gêneros que apresentam uma só espiguetas. Ahamos material suficiente provando a hipótese de Collins (9), de acôrdo com a qual havia, originalmente, em cada alvéolo um pequeno ramo com um número variável de espiguetas em filotaxia de $\frac{1}{2}$. Encontramos, nos alvéolos de flechas, pequenos ramos com até 5 espiguetas biflorais ou multiflorais, às vêzes com pedúnculos individuais e com internódios irregularmente encurtados. O número de espiguetas, o comprimento dos seus pedúnculos e dos internódios determinam os arranjos mais variados. Em espigas observamos o aparecimento de três ou até de quatro espiguetas sésseis por alvéolo.

d) **Número de fileiras de alvéolos** — O número básico de alvéolos é de dois, com uma filotaxia em espiral $\frac{1}{2}$, nas inflorescências de *Tripsacum* e *Euchlaena* e nos ramos da flecha do milho. Explicamos o aumento das fileiras, nas espigas e no eixo central da flecha do milho, pela intercalação de novas fileiras havendo substituição simultânea da filotaxia em espiral por uma disposição em fileiras longitudinais (Brieger 4 e 6).

Apresentamos a prova desta hipótese com espigas de duas fileiras na ponta e três ou quatro fileiras na base. Na zona de transição elas apresentam torções e as duas fileiras originais se aproximam num lado da ráquis, aparecendo ao mesmo tempo, no lado oposto, as novas fileiras.

Em espigas que possuem três fileiras constatamos sempre forte torção destas e da ráquis.

e) **Assimetria na inflorescência** — Nas partes masculinas, com duas fileiras de alvéolos, pôde ser constatada assimetria. Os alvéolos não estão colocados nos flancos, e sim na face ventral da ráquis. Nas partes femininas de *Euchlaena* e *Tripsacum* os alvéolos estão nos flancos da ráquis. Apresentamos provas de que, em *Zea*, há forte assimetria com a tendência de formar espiguetas masculinas nas fileiras externas e espiguetas femininas ou hermafroditas nas fileiras internas dos alvéolos.

f) **Ramificação** — Um estudo detalhado e comparativo prova que é essencialmente a mesma nos três gêneros das *Mydeae americanae*, devendo-se distinguir a ramificação das próprias inflorescências e a dos antocládios, isto é, do conjunto de ramos portadores de inflorescências.

A ramificação consiste na formação de ramos na parte basal da inflorescência sem a formação das respectivas fôlhas: em *Tripsacum* numa filotaxia em espiral $\frac{1}{2}$; nos gêneros *Euchlaena* e *Zea*, em verticilos.

A ramificação do antocládio nos dois últimos gêneros obedece, em linhas gerais, ao seguinte esquema: a inflorescência terminal, ramificada ou não, masculina, feminina ou ainda mista, apresenta em continuação alguns nós estéreis, com fôlhas ou palhas sem galhos axilares desenvolvidos, e depois, nós com fôlhas ou palhas, portadores de galhos laterais

de ordem superior que repetem, por sua vez, o mesmo esquema de ramificação. Em *Zea* desenvolve-se apenas uma inflorescência terminal-lateral como simples espiga lateral, ou ainda se desenvolvem, às vezes, também espigas terminais-laterais da segunda ordem. Em *Euchlaena* são, ao contrário, as espigas da segunda, terceira e quarta ordem que formam os conjuntos de espigas, cujos internódios são todos muito encurtados.

Devemos distinguir dois tipos de palhas: estéreis, logo em baixo de cada inflorescência, protegendo-as individualmente; e palhas férteis, tendo os antocládios de ordem superior em suas axilas, protegendo ao mesmo tempo todo o conjunto.

Discutiremos agora êstes resultados sob três aspectos diferentes: em relação à genética; a importância para o problema de origem do milho. e, finalmente, encarando os problemas gerais da teoria de evolução.

2. A base genética das variações observadas

Grande número das variações descritas foram observadas em plantas heterozigotas para o gen *tunicata* **Tu**. No material com o qual iniciamos êstes estudos, em 1937, raramente apareceram flores femininas ou hermafroditas nas flechas dos heterozigotos **Tutu**. Porém, depois de selecionar para um maior número de grãos na flecha, a partir de 1938, elas não só se tornaram mais freqüentes, mas, também, mais regulares, perdendo assim o aspecto de uma anormalidade. Nas formas mais extremas até hoje alcançadas, as peculiaridades descritas dependem, em primeiro lugar, da presença do gen dominante **Tu**, e, em segundo lugar, de um número não determinado de gens modificadores.

A procedência dêstes modificadores não pode ser indicada; êles não existiam nas linhagens iniciais de **Tunicata**. Para a manutenção dessas linhagens, foi necessário cruzá-las visando eliminar o efeito muito forte do "inbreeding", introduzindo-se muitos modificadores de milho indígena sul-americano. Cruzando depois os descendentes, já selecionados para a intensificação da fertilidade nas flechas, com linhagens do nosso milho doce brasileiro, observou-se ainda maior intensificação dos referidos característicos. Êste milho doce é um produto selecionado do cruzamento de linhagens norte-americanas e canadenses ("Golden Bantan" e derivados), linhagem européia ("Tirol") e milhos brasileiros ("Catêto fino"), executado para o estudo da ligação genética entre os gens **Tu** (*tunicata*) e **su** (doce) Brieger, (7). Assim demonstramos que os gens modificadores provieram de variedades de milho onde estavam inativos, e nos quais não existia o gen determinador **Tu**.

Neste material, as particularidades descritas foram observadas apenas nas flechas. As espigas, quando desenvolvidas, eram perfeitamente normais, com fileiras bem regulares e sem flores masculinas. Quando as flechas eram muito cheias de grãos, as espigas tinham seu desenvolvimento apenas paralisado, sem alteração alguma da sua estrutura. É muito interessante notar que foi necessária a introdução de outros gens modifica-

dores, desta vez derivados de *Euchlaena mexicana*, para fazer aparecer idênticas variações nas espigas.

Os híbridos da primeira geração dos cruzamentos *Zea* x *Euchlaena* possuíam, assim, além do gen **Tu**, tanto os modificadores acumulados na seleção anterior em milho, como também aquêles da espécie selvagem *Euchlaena mexicana*. As suas flechas eram completamente normais nos cruzamentos com o teosinto de Guatemala, não mostrando efeito algum do gen **Tu**. Elas tinham nos cruzamentos com teosinto do México, as glumas aumentadas em tamanho e sem outras transformações. Nas espigas de todos os híbridos era notável o aparecimento de flores hermafroditas e o arranjo assimétrico das espiguetas femininas ou hermafroditas em fileiras internas e das espiguetas masculinas em fileiras externas.

Assim, parecia-nos que muitas das particularidades, para se manifestarem, precisavam da presença do gen dominante **Tu**, e de um conjunto de modificadores, provenientes de outras linhagens de milho ou de teosinto, os quais antes nunca foram capazes de determinar caraterísticos fenotípicos, por serem as linhagens de constituição homozigota **tutu**.

É interessante notar, por outro lado, que também o gen determinante **Tu** nem sempre é indispensável, e pode ser substituído, ou por outros determinadores, ou, simplesmente, por certos conjuntos de modificadores.

São bem conhecidos, em milho, outros gens que provocam também anormalidades semelhantes, tais como: flores hermafroditas; assimetria das fileiras nos alvéolos, com uma espigueta masculina e outra feminina ou hermafroditas; aumento do número de espiguetas por alvéolo ou a sua substituição por pequenos ramos e desenvolvimento de ambas as flores femininas da espigueta. Citaremos, em seguida, alguns casos por nós estudados.

O gen **Tassel-seed** (**Ts5**), um fator dominante no cromossômio IV, causa, na flecha, o aparecimento de flores femininas ou hermafroditas, além de espiguetas masculinas com assimetria no arranjo das fileiras (fig. 13,b).

Cutler (10) descreveu em milho sul-americano vários casos de desenvolvimento de ambas as flores das espiguetas femininas, particularidade também conhecida do milho doce "Country Gentleman" e que, neste caso, é causado principalmente pelos dois gens recessivos **pi1** e **pi2** (Huelsen and Gillis, 12).

É bem conhecido que muitas das formas recessivas anãs (existem no mínimo sete gens **d1**, **d2**, etc, localizadas em diferentes cromossômios) possuem flores hermafroditas nas espigas.

O gen recessivo **ramosa** (**ra 1**) causa freqüentemente na espiga a substituição de espiguetas por pequenos racemos. Observa-se comumente assimetria nos ramos da espiga com a formação de fileiras ventrais de espiguetas femininas sésseis, e de fileiras laterais de espiguetas pedunculadas, mas completamente estéreis.

Não nos referimos ainda aos efeitos citados no início desta discussão nos itens d e f (pg. 682). Parece que o gen **Tu** tem apenas um efeito muito fraco neste sentido, ou nenhum efeito. Espigas ramificadas típicas não raramente aparecem nos homozigotos para o gen **ramosa** (ra 1).

Fica, assim, demonstrado que muitas mutações de gens do milho doméstico provocam, em parte e sem contudo ter ação tão ampla e variada, alterações semelhantes àquelas determinadas pelo gen **tunicata**, que deve ser considerado, não um novo mutante, mas um gen selvagem remanescente.

A análise detalhada dos híbridos de milho não tunicata, de constituição **tutu**, com teosinto, provou que em parte o gen **Tu** é até dispensável. As mesmas peculiaridades aparecem parcialmente com a segregação dos gens modificadores e com a substituição dos gens de milho, acumulados durante a domesticação, pelos modificadores selvagens do teosinto, gens que isoladamente não têm efeito decisivo, mas que agindo agora em novas combinações provocam efeitos semelhantes aos do gen **Tu**.

Assim não pode haver dúvida de que o reajustamento dos modificadores no cruzamento *Zea* x *Euchlaena* pode também ser responsável em grande escala, pelo aparecimento das peculiaridades enumeradas no início do capítulo. Este efeito de introdução de gens de *Euchlaena* pode ser explicado por dois modos. Podemos supor que se trata simplesmente da substituição de gens de domesticação de milho, por gens selvagens, os quais podíamos chamar: "wild type modifiers". Também é, "a priori", possível que se trate de introdução de caracteres do próprio teosinto. Mas esta possibilidade deve ser excluída desde logo, visto que não existe a mínima indicação da presença dos caracteres descritos nas inflorescências do teosinto puro. Evidentemente se trata de caracteres do milho que aparecem pela ação de vários mecanismos genéticos ou combinações de gens.

Conclusão

A situação parece assim talvez um pouco confusa, especialmente para técnicos sem experiência na análise genética experimental de caracteres complexos e quantitativos. Constatamos que os mesmos efeitos fenotípicos podem ser provocados: a) por gens mutados do milho; b) pelo gen **Tunicata** — todos êles em combinação com conjuntos especialmente selecionados de modificadores — ou, ainda, c) por complexos muito especiais e escolhidos de gens modificadores, e sem a presença de gens mutados especiais.

3. A natureza do milho selvagem

A nossa hipótese (Brieger, 6) sôbre a origem do milho pode ser resumida da forma seguinte:

O milho cultivado descende de um capim selvagem com espiga muito simples, tendo 2 fileiras de alvéolos, cada um com dois pares de espiguetas. Os grãos, como em milho tunicata, seriam protegidos por suas glumas longas, mais ou menos córneas e pontudas. Quando maduras, as espiguetas caem, separando-se pela base da ráquis, que por sua vez fica intacta.

O primeiro passo, anterior à domesticação, devia ter sido um cruzamento com uma espécie de *Tripsacum*. Este gênero, como aliás também *Euchlaena*, tem os gens **tutu**, e, porisso, glumas menores; possui ainda os grãos protegidos pelas "tapas", crescimentos laterais da ráquis. Quando madura, a ráquis se parte, separando-se assim cada nó contendo um só grão. Em todos os gêneros, inclusive o milho selvagem, temos uma filotaxia em espiral $\frac{1}{2}$ nas inflorescências. Nos descendentes do híbrido deviam ter aparecido várias recombinações dos gens de ambos os pais. A combinação de gens do milho que determinam a formação de tapas muito pequenas com a do gen **tu** de *Tripsacum*, causa o aparecimento de grãos quase nus. A supressão da fragilidade da ráquis, pelos gens de milho, e da formação da camada de separação na base das espiguetas, pelos gens de *Tripsacum*, resultou no aparecimento de espigas que permaneceram inteiras quando maduras. Estas combinações forneciam o material inicial, com o qual os índios começaram o seu trabalho de melhoramento.

Neste cruzamento havia, como acontece com frequência em cruzamentos interespecíficos ou intergenéricos, uma heterósis, isto é, um aumento do vigor, e os índios, que, sabemos, eram ótimos "melhoristas", dirigiam os seus esforços no sentido de manter êste aumento de vigor. Em consequência disso, ficaram conservados muitos gens de ambas as espécies, incompatíveis uns com os outros quando homozigotos, constituindo um sistema semelhante ao de gens letais e semi-letais balanceados. Êles são responsáveis pela redução do vigor no "inbreeding" do milho cultivado, pois é difícil imaginar qualquer outro processo de evolução que permita acumular um tal sistema de gens balanceados, como já explicamos (Brieger, 6).

De acôrdo com esta hipótese, alguns dos caraterísticos hereditários do milho selvagem foram substituídos pelos gens introduzidos no cruzamento inicial de *Tripsacum* e outros pelos gens mutados que foram acumulados durante o trabalho de melhoramento executado pelos índios. Devemos agora fazer esforços para descobrir quais eram êstes caraterísticos perdidos na evolução do milho doméstico.

Descrevemos acima várias particularidades observadas nos descendentes do híbrido *Zea* x *Euchlaena*, como: espiguetas hermafroditas e multiflorais; assimetria dos ramos da inflorescência; combinação regular de uma espiguetta masculina pedunculada e outra feminina ou hermafrodita sésstil em cada alvéolo; aumento do número de espiguetas, por alvéolo; intercalação de fileiras adicionais na estrutura básica de duas fileiras de alvéolos, além de estabelecer a completa homologia da estrutura morfológica das inflorescências e antocládios terminais (flecha) e laterais (espiga). A base genética de tôdas estas variações foi discutida e chegamos à conclusão de que se trata de diferentes conjuntos de modificadores que determinam o aparecimento dos respectivos fenótipos isoladamente, ou em combinação com certos gens determinadores, destacando-se entre êstes últimos o gen **Tu**.

Temos agora ainda que explicar o reaparecimento destas peculiaridades de outro ponto de vista. Pode tratar-se: a) de segregados "estrava-

gantes" no sentido do termo introduzido por Heribert-Nilson (16); b) de caracteres hipostáticos de *Euchlaena* ou c) de *Zea* selvagem.

A primeira explicação pode ser excluída, considerando a relativa frequência do aparecimento dos referidos fenótipos. A segunda hipótese também é pouco provável, como já foi acima explicado, pois não existe razão para se supor que uma espécie selvagem, como *Euchlaena*, possuía tais e tantos caracteres latentes, sem que tenham sido descritos ocasionalmente como variedades ou formas sistemáticas. Podemos, porém, acreditar que uma espécie cultivada mantivesse latentes, isto é na forma hipostática, caracteres da espécie original selvagem, encobertos pelos gens mutados selecionados e acumulados durante a domesticação. Assim, consideramos, como mais provável, a terceira das hipóteses mencionadas.

Podemos agora constatar como prováveis caracteres de milho selvagem os seguintes:

As inflorescências eram assimétricas e tinham duas fileiras de alvéolos, uma com espiguetas pedunculadas masculinas e outra sésbil hermafrodita, ou, talvez, em certas partes da planta, ambas eram masculinas. Havia sempre apenas duas fileiras de alvéolos, as quais seguiam uma filotaxia em espiral $\frac{1}{2}$.

A forte protoginia dentro de cada inflorescência permitiu que as barbas saíssem fora das bainhas das folhas protetoras na fase feminina da antésis; os órgãos masculinos só mais tarde entraram em funcionamento quando toda a inflorescência já havia saído para fora dos órgãos protetores, pelo alongamento da parte não ramificada do galho, logo abaixo da inflorescência, da mesma forma como até certo ponto acontece ainda hoje em *Tripsacum*. Neste momento os grãos passaram mais ou menos à fase leitosa e os órgãos protetores já estavam endurecidos.

As inflorescências terminais tinham eixo central e verticilos de ramo na sua base, do mesmo modo como em muitas *Gramíneae*. Em analogia com *Tripsacum* e *Euchlaena* podemos supor que o número destes ramos diminuiu com a ordem dos antocládios. Dêste modo, por certo, os antocládios de ordem superior foram reduzidos a conjuntos de inflorescências. Talvez já havia um início de uma separação paralela dos sexos com um aumento de número de espiguetas masculinas nas inflorescências terminais.

As espiguetas eram possivelmente multiflorais, e, neste caso, o milho selvagem nem pertencia mais ao grupo dos *Andropogoneae*.

A isto devemos acrescentar ainda mais dois caracteres, já mencionados anteriormente, Brieger (6): a) proteção dos grãos maduros pelas glumas, devido à ação do gen **Tu**, e b) camada de separação na base dos grãos de espiguetas quando maduras.

Todos estes caracteres foram observados em nosso material, isoladamente ou em conjunto, de modo que já se podia até desenhar um esquema da estrutura hipotética do milho selvagem. Temos, porém, ainda a esperança de encontrar um indivíduo que tenha todos os caracteres essenciais em conjunto de modo que seja possível fotografá-lo.

4. O problema geral filogenético

Mencionamos, na introdução, o problema geral filogenético das *Gramineae* que consiste na explicação do acúmulo de processos de redução. Sobre as causas destas reduções, a famosa especialista Agnes Arber (1) chegou a conclusões, que seguem, em tradução:

“Um resumo do que está exposto neste e nos capítulos precedentes nos conduz à conclusão de que particularidades especiais, tanto da flor típica das *Gramineae* como de formas mais divergentes, parecem causadas essencialmente por processos de reduções, as quais modificam um tipo que pode ser visto numa forma menos restrita nas *Bambusaceae*. Esta redução pode ser posta freqüentemente em relação aos efeitos de ajuntamento e pressão durante a ontogenia. Porém, além de perdas e fusões que obviamente são correlacionadas com a pressão, nós podemos reconhecer um número de formas de esterilidade de espiguetas e de unissexualidade ou de abortos das flores pelos quais a pressão podia ser, no máximo, responsável apenas em parte. Parece claro que as *Gramineae* sofrem de uma tendência, definidamente inerente, para algum grau de esterilidade do galho reprodutivo” (pg. 206).

Destas duas causas das reduções, a primeira, a pressão sobre os órgãos, exercida especialmente por fôlhas protetoras que não deixam espaço livre às flores ou partes por elas envolvidas, parece-nos de pouca importância. Pressão é uma fôrça que tem o efeito sempre em dois sentidos. As fôlhas protetoras exercem pressão sobre os órgãos internos e estes, por sua vez, sobre as fôlhas. Além disso, a redução é um fenômeno generalizado, de forma que, a sua causa deve ser igualmente generalizada. Não se podendo aceitar, para explicá-la, “ajuntamento” ou pressão, temos de admitir a influência de fatores de ordem mais ampla. Finalmente, a pressão de órgãos pode provocar efeitos fenotípicos, mas não pode ser responsável por alterações genotípicas, não tendo assim ação sobre a evolução.

Outro fato citado por Agnes Arber, e evidentemente mais importante, é o chamado por esta autora “the definite inherent trend”. É neste mesmo sentido que usamos, às vêzes, o termo “ortogênese” ou linha contínua de evolução. Mas não devemos esperar ser possível arranjar todos os gêneros em sub-famílias, numa única série contínua de reduções progressivas. Como Arber explica, com muitos exemplos, existe, nas estruturas normais ou patológicas, um paralelismo e uma repetição muito pronunciada (pg. 398). Essa autora pensa que nas *Gramineae* aparecem tôdas as tendências “which can be developed within the definite through elastic frame work of the ordinal type” (pg. 4) fazendo referência à ordem sistemática “*Gramineae*” no termo “ordinal”.

O termo “ortogênese” acima usado, não deve ser tomado assim muito literalmente. Não podemos arranjar os diferentes grupos ou gêneros em uma ou algumas séries que apresentam uma única tendência constante, numa só direção, pelo acúmulo sistemático de processos de redução dos órgãos florais. Tomando em consideração os detalhes, encontramos para-

lelismos, repetições e reversões nas tendências. As séries "ortogenéticas" são sempre abstrações que servem apenas para ilustrar qual a tendência inerente a um grupo de gêneros, não representando exatamente o curso da evolução destes gêneros. Mesmo as séries paleontológicas, como aquela do cavalo ou do elefante, Brieger (5, fig. 7 e 8), são apenas abstrações que indicam como se processou a evolução.

Devemos agora averiguar qual o mecanismo filogenético que explica a existência destas **tendências inerentes** na evolução. O lamarckismo naturalmente oferece, à primeira vista, a explicação, mais compreensível, mas tôdas as experiências até hoje registradas são unânimes em provar que não existe hereditariedade de caracteres adquiridos. Por outro lado, os pontos básicos da teoria de Darwin estão confirmados experimentalmente: existem variações hereditárias, mutações gênicas, que aparecem sem direção e que afetam o fenótipo, existindo também uma seleção natural que elimina tôdas as mutações desfavoráveis. Mas é muito difícil imaginar alguma coisa tão coordenada, como uma tendência filogenética inerente.

Explicamos em outra publicação (5), qual o mecanismo genético que permite o aparecimento de tendências filogenéticas, e o denominamos "modifier shift" ou "mudança do conjunto de modificadores". Assim, um dos fatores mais importantes na evolução, não nos parece ser a mutação gênica inicial, mas a mudança do conjunto de modificadores, preexistentes, os quais, em combinação com o novo gen mutado, acham então um novo campo de ação fenotípica. A seleção natural age, na evolução, do mesmo modo como que a seleção dirigida nos experimentos. A seleção dos modificadores pode produzir novos fenótipos, sem mutação, apenas pela recombinação de gens nos cruzamentos. A existência e o funcionamento dos "modifier shift" foram demonstrados em vários experimentos de seleção, dirigidos em vários sentidos.

Por simples seleção sem aparecimento de mutações, conseguimos, em poucas gerações, em milho indígena dos "chavantes" de grãos brancos (devido à presença de um inibidor C^1 no cromossômio IX) obter plantas com grãos inteiramente coloridos, intensificando-se, gradativamente, a coloração, de geração a geração. Por outro lado, transformamos o milho "red brittle" — uma linhagem que serve para a análise da ligação genética no V cromossômio — em um milho com grãos incolores. Nestes dois exemplos conseguimos apenas uma modificação da dominância ou epístase, sem causar o aparecimento de qualquer caráter novo.

Em milho **tunicata paulista** executamos duas séries de seleção, uma para aumentar ao máximo os efeitos do gen **Tu** e outra para fazer desaparecer, tanto quanto possível, todo o seu efeito fenotípico Brieger (5 e 6). Referimo-nos, várias vezes, nos capítulos anteriores deste trabalho, a estes experimentos, e explicamos o aparecimento de efeitos completamente novos devido à combinação do gen **Tu** com outros modificadores. Nestes experimentos introduzimos, por cruzamento, o gen **Tu**, em material que era homozigoto **tutu**, e o mesmo aconteceria se houvesse uma mutação de **tu**

para **Tu**. O essencial é que nós combinamos modificadores com novos aleles de gens determinadores.

Assim, parece-nos estar perfeitamente demonstrado que a seleção, artificial ou natural, dos modificadores, depois de uma mutação ou de um cruzamento, pode ser a causa do aparecimento e da intensificação de novos caracteres hereditários.

Aplicando este princípio aos processos da evolução, podemos concluir que o desaparecimento dos caracteres não implica no desaparecimento também de gens responsáveis e a sua substituição por novos aleles, por mutação. Os gens apenas mudam de função ou ficam mais ou menos inativos, pela alteração provocada no conjunto de modificadores. Alterando-se a direção da seleção natural estes gens podem assim reaparecer com sua antiga função fenotípica, causando uma reversão filogenética, ou entrando em novas combinações ou por cruzamentos ou depois de uma mutação gênica, provocando o aparecimento de novos caracteres. Queremos salientar, porém, que o novo ajuste dos modificadores é um processo não muito lento, dirigido pela seleção, seja natural ou artificial.

As formas descritas neste trabalho oferecem mais material em apoio a esta nossa hipótese da importância dos modificadores na evolução. Aproveitamos a hipótese acima para tirar, retrospectivamente, conclusões sobre uma futura evolução. Ficou evidente que são inerentes ao milho as mais variadas possibilidades para uma futura evolução, sem a intervenção de novas mutações. Em milho heterozigoto ou em híbrido milho x teosinto, a seleção experimental em novo sentido, provocando um "modifier shift", permitiu o aparecimento de formas muito variadas, entre elas: espiguetas multiflorais, característico de outro grupo das *Gramineae*, ou três espiguetas por alvéolo, característico de cevada (*Hordeum*). O tempo e o número de gerações submetidas a esta seleção não foram ainda suficientes para fixar e homogenizar linhagens portadoras dos novos caracteres. Mas existem boas indicações de que esta fixação seja viável.

O característico principal do método aplicado foi a mudança radical da direção da seleção. Numa espécie como o milho, que durante milhares de gerações vem sendo submetida a uma seleção visando transformar uma planta selvagem em uma planta doméstica, executamos seleção contrária aos caracteres de domesticação e em favor de caracteres que deverão dar de novo uma planta selvagem.

A seleção natural não tem direção fixa; uma mutação pode abrir novas possibilidades e a transferência de uma espécie para um novo ambiente ecológico pode acarretar novas exigências.

No esquema da evolução acima explicado, existe um ponto de grande importância. Temos que aceitar a hipótese de que os gêneros de um grande grupo, como as *Gramineae*, contêm um grande número de gens, os quais, sem ser idênticos, provocam ações fenotípicas semelhantes. A sua presença explica geneticamente o que nós chamamos: a tendência comum inerente ("the common and inherent trend"). Como prova, basta lembrar

mais uma vez que obtivemos em milho, geralmente incluído na família de *Andropogoneae*, formas com espiguetas multiflorais, característicos de *Panicaceae*. Assim, o "modifier shift" explica até as reversões e o paralelismo da evolução num grupo grande como as *Gramineae*.

CONCLUSÕES GERAIS

Descrevemos neste trabalho um certo número de variações da estrutura das inflorescências e das flores do milho. Como apresentamos em cada capítulo um resumo das observações efetuadas além das conclusões muito concisas no início do capítulo anterior, podemos dispensar aqui repetições desnecessárias.

Destacamos as seguintes conclusões gerais:

1) — A estrutura básica das inflorescências e antocládios, como chamamos os conjuntos de ramos portadores das inflorescências, é idêntica nos três gêneros das *Mydeae americanae*, sendo as diferenças essencialmente quantitativas. Devemos, porém, distinguir a ramificação das inflorescências e dos antocládios que são morfológicamente bastante diferentes.

2) — A base genética das variações descritas do milho é a seguinte: elas dependem, em milho puro, da presença de vários gens determinadores, destacando-se entre êles o gen **Tu** (tunicata) por sua ação fenotípica muito diversa e pleiotrópica. Êstes determinadores agem sempre em conjunto com complexos de modificadores. Nos descendentes do cruzamento de *Zea* x *Euchlaena*, a presença dos determinadores se torna dispensável e o fenótipo é essencialmente determinado pelos conjuntos dos modificadores.

3) — Achamos material que comprova várias hipóteses sôbre a estrutura da espiga do milho cultivado.

a) Não pode haver a menor dúvida de que o eixo central da flecha é homólogo à espiga ramificada e que os ramos da flecha correspondem aos ramos de espigas ramificadas.

b) Demonstramos que a espigueta biflora das *Maydeae* é uma estrutura reduzida e observamos espiguetas multiflorais com até três flores férteis, além de outras flores estéreis e imperfeitas.

c) Em apóio à hipótese de Collins (9) de que o par de espiguetas por alvéolo é o que resta de um pequeno ramo, observamos uma reversão à forma inicial, isto é, ramos com numerosas espiguetas.

d) Comprovamos uma nossa nova hipótese de que o aumento do número de grãos e a irregularidade das fileiras, observada às vezes na base de espigas, são devidas não a um aumento do número de fileiras de alvéolos, mas ao aumento de dois para três, quatro, etc., do número de espiguetas por alvéolo.

e) A nossa hipótese de que o elevado número de fileiras de alvéolos é devido à intercalação de novas fileiras entre as duas fileiras do milho primitivo, e à substituição simultânea da filotaxia em espiral $\frac{1}{2}$ por uma

simetria de fileiras longitudinais, pôde ser comprovada diretamente pela observação de espigas com duas fileiras de alvéolos apenas, na parte apical, e fileiras mais numerosas, na parte basal.

4) — Já tentamos em outros trabalhos (4 e 6) reconstruir a estrutura mais provável da espiga do milho selvagem, tendo sido agora possível adicionar outros caracteres. Assim, não temos mais dúvida de que ela apresentava as espiguetas aos pares, arranjadas em duas fileiras longitudinais de alvéolos, obedecendo a uma filotaxia em espiral $\frac{1}{2}$. Estas fileiras de alvéolos não estavam colocadas nos flancos opostos da ráquis, como em *Euchlaena* ou *Tripsacum*, mas estavam deslocadas para a face ventral da mesma. Das quatro fileiras de espiguetas, as duas internas eram femininas ou hermafroditas e sésseis, e as externas masculinas e pedunculadas. A protoginia muito pronunciada das flores, na mesma inflorescência, permitiu que, na fase feminina da antesis, a inflorescência permanesse dentro das palhas, exceto as barbas; saindo as anteras mais tarde, quando as glumas já estavam endurecidas. Dêste modo, as espiguetas estavam fora das palhas na fase masculina. Possivelmente, já havia uma diferenciação no sentido de as inflorescências terminais serem ramificadas e predominantemente masculinas, e as inflorescências laterais nos ramos de ordem superior dos antocládios, não ramificadas e bissexuais.

Podemos acrescentar mais os dois caracteres descritos anteriormente: os grãos eram protegidos individualmente pelas glumas endurecidas e longas, devido à presença do gen **Tu**, e as espiguetas inteiras, quando maduras, se separavam da ráquis pela formação de uma camada de separação na sua base.

Somente foram eliminados êstes últimos dois caracteres pela introdução de gens de uma espécie de *Tripsacum*, na fase anterior à domesticação do milho; os demais caracteres primitivos se perderam pela acumulação de gens mutados e seleção dos complexos de modificadores.

5) — Finalmente, discutimos alguns problemas da teoria da evolução. Explicamos em outro trabalho (5) como a mudança do conjunto de modificadores, causada pela seleção, pode ser responsável pelo aparecimento de séries filogenéticas. Por outro lado, a existência de tais séries ou de tendências filogenéticas, são dificilmente explicadas pelo acúmulo de mutações gênicas, não dirigidas.

Para as *Gramineae*, Arber (1) demonstrou a existência de “tendências inerentes filogenéticas” e um grande paralelismo da filogenia nos diferentes grupos desta ordem de plantas.

Demonstramos que em milho, de fato, estão inerentes muitas possibilidades filogenéticas, as quais fizemos aparecer em consequência da mudança de modificadores. Baseados nestes experimentos, explicamos assim o mecanismo genético das tendências filogenéticas descritas por Arber.

Estas possibilidades filogenéticas que existem em milho, fazendo aparecer caracteres de outros gêneros, permitem também formular uma hipótese genética para o paralelismo da filogenia, supondo apenas que as

diferentes *Gramineae* contêm gens que, sem que sejam idênticos, podem determinar o aparecimento de caracteres fenotípicos correspondentes e semelhantes.

SUMMARY

1) The present paper deals with variations in the structure of the inflorescences of the *Maydeae Americanae*, especially of the ear of *Zea Mays*, which came under observation during our genetical studies during the last 10 years. Care was taken to include only such structures which were observed frequently and had in general an aspect which could not be described as a pathological abnormality, but rather as a reversion to a phylogenetically primitive type or as a new form.

The aberrations may be summarized as follows:

a) **Individual flowers.** Reversion to the hermaphrodite state of the usually unisexual flowers in *Maydeae* were described. Such flowers are however already so well known that no details need to be given.

b) **Many flowered spikelets.** The spikelet in all the *American Maydeae* are normally two flowered. In forms of *tunicata*, obtained by selection, spikelets were obtained with up to three perfect flowers, all producing well developed kernels (Fig. 4-6), with a maximum of five flowers. The structure of three-flowered spikelets is explained in the diagrams Fig. 2 and 3. Owing to the organization of the flowers, the embryos of the first and third are turned towards the base of the inflorescence and the embryo of the second flower towards its tip. The embryos in two-flowered spikelets are normally turned to the base (first flower) and to the tip (second flower). (Cutler, 10). Cases were observed of three flowered spikelets with one abortive flower, both the remaining embryos, produced by the first and third flower, turned towards the base of the inflorescence.

c) **Number of spikelets per alveolus.** In maize and in the male parts of the inflorescences of *Euchlaena* and *Tripsacum* two spikelets are formed per alveolus, while in the female parts of the latter genera one spikelet is present, though occasionally exceptions are found. Collins (8) explained the appearance of the double spikelet as remainder of a small spikelet branch which has been lost during evolution. The normal structure and that of a spikelet branch is shown schematically in Fig. 3, e-f.

In the tassels of several *tunicata* plants small and regular branches of spikelets appeared in the alveoli, their form depending upon three factors: a) number of spikelets, b) length of the internodes of the spikelet branch, c) length of the individual pedicel of each spikelet, as may be seen in the fotos of Fig. 4-5.

An increase in the number of spikelets per alveolus in the ear has been observed frequently in material of two sources: descendants of the hybrid **maize x teosinte** and **Paulista Pointed Pop Corn**.

The descendants of the cross *Zea x Euchlaena* have very frequently only two rows of alveoli, well separated from each other. This separation is accentuated still further by the development of a scaly outgrowth from the rachis, as in *Euchlaena*, which limits each alveolus at its base and on both sides. The segregates may have these scales not only well developed, but they are also frequently colored, as is the cases representad, with black dots. Thus the identification of each alveolus is very easy and fig. 7 shows an ear with two rows of well defined alveoli, each with three spikelets or three mature kernels each.

The ears of **Paulista Pointed Pop Corn** offer excellent material since here the rows of alveoli are very clearly defined and separated by deep ridges, the double rows of kernels being very salient. The kernels correspond always, in the ears used, to single spikelets as shown by their glumes, well developed in this variety, and the position of their embryos. In Fig. 9, a, the deep ridge separating the rows of alveoli on the left and right is clearly seen as a series of black deep shadowns in the centre of the photo. In Fig. 9, b we have the same ear photographed from another angle. One row of alveoli is seen in the centre, in clear contrast against two strips of black

paper inserted in the two lateral ridges. This row of alveoli contains very clearly two rows of kernels or spikelets in its upper part and many irregular rows in the lower half showing the increase of spikelet number. Fig. 9 c-f represents another ear with five rows of alveoli, which are very distinct in the upper part of the ear. The ear was broken into three parts and the cross sections photographed. The upper two thirds with a regular row arrangement (Fig. 9 c-d) show clearly the five rows of alveoli and the 10 rows of kernels. The lower part (Fig. 9e) shows still the pentagonal form of the rachis and the five rows of alveoli may still be distinguished. But the increased number of spikelets, which vary from 2 to 4, do not permit a regular arrangement of rows of kernels within the regular rows of alveoli.

The appearance of small branches in the alveoli of mutants of maize is not anything really new, but as far as I know an increase of the number of sessile spikelets in the ear from two to three which was observed in several descendants of the *Zea-Euchlaena* cross and its increase to three or four in the basal region of ordinary corn ears has not been registered before. The explication for this form of increase is easily to be drawn from an inspection of the photos in Figs. 4 and 5, where we find various stages in the reduction of branches with many spikelets to two, three or four sessile spikelets.

d) **Number of rows of alveoli.** There can be little doubt that the basic number of rows in the *Maydeae Americanae* is always two as shown by all inflorescences in *Tripsacum* and *Euchlaena* and by the tassel branches in maize and the branches in *Zea "ramosa"*. The increase of rows in the ear and the central spike of maize has been the object of a very extensive literature. Mangelsdorf and Reeves, (15), gave a very detailed review), and I explained this increase as a simple interpolation of new rows, such as occurs in succulent plants and can be easily seen for instance in different species of *Cereus*. The correctness of this interpretation can be shown directly in ears of maize which have two rows at the tip and more numerous rows at the bottom and which appeared in my material of Brazilian Early and Brazilian Sweet Corn, extracted from multiple crosses between Brazilian, European and North American corn, and with much more frequency among the descendants of the maize-teosinte cross. Three such cases are reproduced in Fig. 10.

The situation is represented schematically in Fig. 11. The diagram Fig. 11a represents the primitive form with two rows of alveoli, each with two rows of kernels. The interpolation of two new rows (Fig. 11b) causes a disturbance of the equilibrium which forces the two original rows to become dislocated, as shown in Fig. 11d, thus resulting finally the normal ear with four rows of alveoli or eight rows of kernels, all equally spaced. The interpolation of a single row of alveoli causes a similar disturbance (Fig. 11c) which causes distortions until all rows are equidistant (Fig. 11e). For some reasons, still unknown, the ears remain twisted in the latter case with three rows, while in the former a twisting occurs only in the transition zone.

These drawings however are not abstractions, but represent the situation actually observed and represented by the Fig. 10, a-b e Fig. 10, c-d, with an increase from two to four rows and by the Fig. 10, e-f with an increase from two to three rows. The two first ears, photographed each from two different angles, show clearly that the two rows of the top region become neighbours at the bottom, while the new rows are interpolated on the opposite side of the rachis. The last ear shows the permanent twist in the lower third of the ear, and it may be added that all ears, with I have observed so far, with three rows of alveoli are always twisted over their whole length.

I postulated furthermore that originally the alveoli followed an alternating spiral arrangement or a phyllotaxy of $1/2$, while the interpolation of new rows abolished this spiral and substituted a longitudinal row arrangement, again as in *Cactaceae* and other succulent forms. The fotos in Fig. 10 show that this is actually the case. The arrangement of the alveoli in the two-rowed part of the ear follows the spiral ($1/2$), while the spiral is completely lost in the many rowed region. The rows may be twisted in ears with an uneven row number, but this twist has nothing to do with the original spiral of the alveoli, as may be seen clearly in Fig. 10, e and f. It may

be mentioned that the situation in the latter ear is still more complicated by the fact that the alveoli contain frequently three, instead of two spikelets.

e) **Asymmetry of the inflorescence.** In the male inflorescences of all the *Maydeae Americanae* a pronounced asymmetry of the rows may be observed which are not localised on the sides of the rachis but are pushed towards its ventral surface. In the female parts of *Tripsacum* and *Euchlaena* on the other side, the spikelets are always on opposite sides, while nothing can be said with regards to the many rowed corn ear and the central spike of the tassel. I have no doubt that the original type of maize with only two rows of alveoli was asymmetrical, which seems to be very clear when inspecting two rowed ears or too rowed parts of ears of mutants. It is very interesting to note that there is a segregation in the descendants of the *Zea-Euchlaena* cross with two rowed ears, which may be symmetrical (Fig. 8, c-d) or asymmetrical (Fig. 7, Fig. 8, a-b). The symmetry is independent from the number of rows of kernels which may be either one or two per alveolus.

Besides this asymmetrical arrangement of the rows of alveolus, there may appear in maize an asymmetry between the rows of spikelets: a regular combination of one row of sessile female and pedicelled male spikelets. Such a situation in the tassel branches of *tunicata* and tassel seed is shown in Fig. 13, a and b, and that of an ear with 4 rows of alveoli in Fig. 13, c e d.

f) A detailed and comparative study of the *ramification of inflorescences* in the three genera of *Maydeae Americanae* showed an extreme degree of uniformity, which apparently has not been noticed to this extent before.

The terminal inflorescence, of main shoot or branches, has essentially the same structure: there is always a central or main spike which may be branched at its base. In *Tripsacum*, these branches follow an alternate spiral arrangement while in the tassel of maize and teosinte and in branched maize ears they form one or more whorls. The alveoli, even in many-rowed maize, are always arranged in two rows on all these branches. Below the inflorescence and again in all three genera there are several sterile leaves which may be more or less transformed into husks and which only very exceptionally produce branches in their axils.

The branches, produced by the lower leaves, terminate again in an inflorescence which may be branched or not, followed first by sterile leaves or husks and then by fertile leaves bearing again branches of higher order. In *Tripsacum australe* all branches of any order are essentially alike, except for a progressive reduction of the branching of the inflorescence. Branches of third or fourth order bear simple terminal spikes. In *Zea* and *Euchlaena* the lateral branches of main stalks form a compound which we may call with Goebel (11) an anthocladium. Its structure is explained by the two photos in Fig. 14 which were taken from two descendants of the cross *Zea* x *Euchlaena*.

These anthocladiums have a terminal inflorescence which may be a simple ear (Fig. 15b), a slightly (Fig. 14) or an extremely branched inflorescence, carrying male and female spikelets on its four rowed branches (Fig. 16) or which may finally be a normal tassel (Fig. 15a). There follow a few sterile leaves, forming the individual husks of the terminal inflorescence and then fertile leaves or husks which are protecting the rest of the anthocladia. In their axils there are again branches ($n+2$) with terminal inflorescences, always represented by an ear, protected by their individual and sterile husks, followed by other husks which protect both the branch ($n+2$) and its higher derivatives. The anthocladium of Fig. 15 carries branches up to those of order ($n+4$).

The difference of *Zea* and *Euchlaena* is only of quantitative nature. In *Zea* generally there is developed only the terminal ear of the lateral branch of order ($n+1$) and only rarely some ears, terminal of the order ($n+2$) which may be called also lateral to the branch ($n+1$), as shown by Brieger (6). All leaves are transformed generally into husks. In *Euchlaena*, on the other side, the terminal inflorescence of order ($n+1$) is generally a tassel and this branch carries almost normal leaves. Those of the lower nodes produce in their axils the anthocladia, with the branches ($n+2$), ($n+3$), etc. which together form the cluster of ears. Every ear as a terminal

inflorescence of its branch is protected by individual husks, besides the basal husks, as described above, which protect each branch and all its laterals of higher order.

In the descendants of the *Zea-Euchlaena* corn an interesting detail was found, and the following three types were established: a) maize type derivatives where all inflorescences had a high number of rows of alveoli. b) teosinte-type derivatives where all inflorescences had only two rows of alveoli, and c) intermediate derivatives where only the main terminal inflorescence of order $(n + 1)$ was many rowed and sometimes also inflorescences of order $(n + 2)$, especially the prophyllary branch, all other inflorescences being two-rowed. These complicated relations obscure frequently the rule established by Langham (14) about the correlation between row number in the lateral ear and the central spike of the tassel.

These observations lead to a revision of the old hypothesis of Ascherson (2) about the origin of the many-rowed ear by a fusion of the ear clusters in *Euchlaena*. Weatherwax (20) has given already one very decisive argument against this hypothesis, explaining that a fusion must result in the forming of an ear where the number of kernel rows should be a multiple of four and that of alveoli a multiple of 2. Another difficulty is that the original hypothesis would require a complete disappearance of all individual husks, and no signs of this has ever been observed. Langham (14) who tried to revive the hypothesis was probably mistaken, interpreting as a fusion, structures which were only branched terminal ears, which its branches forced almost into the main spike by the pressure of the involving glumes.

2) After describing these deviations from the normal type of maize ears and inflorescences, its genetical basis was discussed. First it was thought that definite genes were involved, such as the ramosa-gen, the dwarf-factors which frequently cause the appearance of perfect bisexual flowers, the tassel seed factors, etc, and finally the tunicat factor which has the most extreme range of phenotypic effects as shown in several previous publications (Brieger, 4, 5, 6, 7). Both the studies of tunicata maize had already shown that the modifier genes are at least as important as the main determining gen. By selection I succeeded to increase to a extreme degree their effects on the tassel. Crossing these derivations of Paulista Pod' Corn to *Euchlaena* a complete change of the situation was brought about. The effects on the tassel disappeared immediately in the F1 with Guatemala teosinte while in those with Mexico teosinte the glumes in the tassel remained shightly enlarged. On the other side, changes occurred in the ear structure unknown to pure maize, as illustrated by Brieger (6). The descendants of these crosses showed that the specific determiner genes of maize are dispensable and that a recombination of *Zea* and *Euchlaena* modifiers is completely sufficient.

I described in the present paper only variations in the structure of inflorescence which appeared both in descendants of the hybrids and in pure maize. No similar variations have been observed in *Euchlaena* or in *Tripsacum*, the third species of the group. We may thus conclude that these variations were all inherent to corn, hypostatic recessive to the many genes accumulated during domestication and reappearing again after the substitution of these genes of domestication by the wild type modifiers derived from *Euchaena*.

3) The final conclusions of the preceding chapter leads us to a reconsideration of our concepts about the structure of the wild ancestor. I discussed the problem in several previous publications (4, 6) and shall repeat the main conclusions without entering into a detailed discussion. Cultivated maize is derived from a wild grass which had simple ears with two rows of alveoli, grains protected by large, pointed and horny glumes, due to the presence of the gene **Tu**, and an abscission layer at the base of each spikelet. Thus the grains fell off when mature with their protective glumes, separated from the rachis which was thin, flexible and not brittle. This grass happened to cross with some form of *Tripsacum* with its grains mainly protected by special scales, having relatively small glumes due to the presence of the gen **tu**. The rachis of this species is always horny, brittle and breaks on maturity into parts at each node. In natural descendants of these hybrids segregates appeared which were homozygous **tutu** and thus had small glumes, while maize factors suppressed the deve-

lopment of the scales. Both abscissions layers were mutually suppressed, that at the base of the spikelet from maize and the other, from *Tripsacum* at each node of the rachis.

We now may add more informations about the probable structure of the original inflorescences. The lateral inflorescences were asymmetrical and contained in each of the two rows of alveoli one row of sessile female or hemaphroditic spikelets and another row of pedicelled male spikelets. The very pronounced protogyny of flowers in the same inflorescence permitted that the inflorescences remained within the husks or within the sheaths of only slightly altered leaves during the female phase, emitting only the silks. During the following male phase, the inflorescences were pushed out of the glumes by the lengthening of the internodes, thus permitting the shedding of the pollen, while at the same time the glumes of the already fertilized female flowers had become already big and horny, protecting the kernels in the milkstage.

The terminal inflorescences may have been branched with one or more whorls of branches at its base, and the number of branches was less in the lateral inflorescences of higher order. There may have been already some more pronounced differentiation of terminal and lateral inflorescences with a predominance in the former of male spikelets. There exists a possibility that the spikelets were many flowered and thus this wild grass did not really belong to the *Andropogoneae*, as already supposed by Harshberger.

It seems now possible to make a drawing of this hypothetical wild type, but I think it even possible to find eventually among the descendants of the maize-teosinte cross most of these characters in combination, thus permitting to take a photograph.

4) The results described opened the way for drawing still more general conclusions about the mechanism of evolution, by combining two sets of facts with the new results obtained.

In the first place, we may mention the conclusions at which Agnes Arber (1) arrived in her detailed study on the evolution of the order *Gramineae*. She stated that there exists a) "inherent phylogenetical trend" for reduction and sterility in inflorescence and flowers, and b) a large measure of repetition and of parallel evolution in different systematic groups.

In the second place I may refer to the general hypothesis about the role of a modifier shift in evolution which I have developed (Brieger, 6). My observations started in 1929 when I observed in the cross *Nicotiana Sanderae* x *N. Longiflora* that a gene, without effect in the latter species, acquired a semilethal effect in the F₁ hybrid. An identical case was reported a year later by Hollingshead. In subsequent studies, I have been able to show experimentally the importance which a shift or rearrangement of the modifier complexes may have, and which may not only affect the dominance of certain characters, a fact already very well known by many authors, but may cause the appearance of completely new phenotypes. Such a change in the modifier complex may be brought about by selection, artificial or natural, following a gen mutation which opens new phenotypic possibilities or simply after a change in the direction of selection in material sufficiently heterozygous.

In the present paper I have shown that there exists in cultivated maize an enormous amount of "inherent possibilities" which may become reality after changing the composition of the modifier complexes. Thus a "parallel evolution" may become started, or even a "reversion of evolution". It may be sufficient to cite the appearance of plants with two rows of three spikelets each, such as in *Hordeum*, or of many flowered spikelets as in the *Panicaceae*.

Thus the facts reported here offer more support for the hypothesis on the importance of the modifier shift in evolution which seems to me a very efficient corollary to the mutation theory and helps to overcome at least one serious difficulty of the latter. It is extremely difficult to believe that the accumulation and selection of disorderly chance mutations may cause an orderly evolution. Besides, the mutation theory is incompatible with such concepts as that of "inherent trends". But since the latter undoubtedly exist and since evolution is not disorderly, as shown by a very large number of comparative studies of larger taxonomical groups, an explanation for this

orderliness must be found. I believe that the hypothesis of the modifier shift offers the necessary explanation, which is well in accordance with experimental evidence, and with our concepts of physiological genetics.

LITERATURA CITADA

1. **Arber, A.** The Gramineae — A study of cereal, Bamboo, and Grass. Cambridge Univ. Press. 480 pag. 1934.
2. **Ascherson, P.** Bemerkungen über astigen Maiskolben Bot. Ver. Prov. Brandenburg. **21**; 133-138. 1880.
3. **Blaringhem, L.** Production par traumatisme d'une forme nouvelle de maïs à caryopsis multiples, *Zea Mays* Var. *Polysperma*. Compt. Rend. Acad. Sci. (Paris) **170**: 677-679, 1920.
4. **Brieger, F.G.** Origem do milho. "Semana da Genética". Rev. Agr. **18**: 409-418. 1943.
5. **Brieger, F.G.** Considerações sobre o mecanismo da evolução. Anais da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, **1**: 177-211. 1944.
6. **Brieger, F.G.** Estudos Experimentais sobre a origem do milho. Anais da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba. **1**: 225-278. 1944.
7. **Brieger, F.G.** Estudos genéticos sobre o milho tunicata. Anais da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba: **2**: 209-238. 1945.
8. **Collins, J.N.** Origin of maize. Jour. Wash. Acad. Sci. **2**: 520-530. 1912.
9. **Collins, J.N.** Structure of the maize ear as indicated in *Zea-Euchlaena* hybrids. Jour. Agr. Res. **17**: 127-135. 1919.
10. **Cutler, H.C.** Espiguetas de dois grãos no milho. Anais da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". Piracicaba. **2**: (423'-430). 1945.
11. **Goebel, K.** Organographie der Pflanzen. Ergänzungsband **2**. Jena. Gustav Fischer.
12. **Huelsen, W. A. and M. C. Gillis.** Inheritance of kernel arrangement in sweet corn. Illinois Agr. Exp. St. Bull. **320**: 299-336. 1929.
13. **Kempton, J.H.** Floral abnormalities in maize. U.S. Dept. Agr. Bur Plant Indus. Bull. **278**, 18 pp. 1943.
14. **Langham, D.C.** The inheritance of intergeneric differences in *Zea-Euchlaena* hybrids. Genetics **25**: 88-108 (Abstract in Genetics, 1939, **24**: 78). 1940.
15. **Mangelsdorf, P.C. and G.R. Reeves.** The origin of Indian corn and its relations. Texas Agr. Exp. Sta. Bull. **574**: 1939.
16. **Nilson, H.N.** *Salix Laurina*. Die Lösung einer mehr als 100 jährigen phylogenetischen Streitfrage, Fys. Selsk. Handl N.F. **39**: 1-89. 1928.
17. **Randolph, L.F.** Developmental morphology of the caryopsis in maize Jour. Agr. Res. **53**: 881-916. 1936.
18. **Stratton, M.E.** The morphology of the double kernel in *Zea Mays* var. *polysperma*. N.Y. (Cornell) Agr. Exp. Sta. Mem. **69**: 17 pp. 1923.
19. **Tavcar, A.** Beitrag zur Vererbung der Korureihenanzahl an Maiskolben. Zeitschr. f. Züchtung, **20**: 364-376. 1935.
20. **Weatherwax, P.** The evolution of maize. Bull. Torrey Bot. Club. **45**: 309-342. 1918.
21. **Weatherwax, P.** The phylogeny of *Zea-Mays*. Amer. Midland Nat. **16**: 1-71. 1935.

EXPLICAÇÃO DAS FIGURAS

- Fig. 1** — a) Diagrama da flor das *Liliaceae* (E: eixo principal; Et: eixo lateral; B1, B2, B3; brácteas estéreis.
 b) Diagrama de uma espigueta típica (E: eixo principal; et: eixo da espigueta; Ge e Gi: glumas estéreis; L: lema; P: pálea; l: lodículos).
 c) Diagramas das espiguetas e flor do bambu (letras como na figura anterior).
 d) Esquema de uma espigueta bifloral (letras como na figura anterior).

- Fig. 2** — a) Diagramas de espiguetas com duas e três flores (explicação das letras como na figura 1,a).
- Fig. 3** — a) até d) Esquemas de espiguetas com duas e três flores.
e) Alvéolo com duas espiguetas biflorais sésseis.
f) Alvéolo com racemo com três espiguetas biflorais.
- Fig. 4** — a) Alvéolos isolados de flechas do milho tunicata, com grãos maduros nas espiguetas.
- Fig. 5** — a-j) alvéolos isolados e k-l) pares de alvéolos com número variável de espiguetas do milho tunicata.
a até g da planta 109-593-44; h até l da planta 104-593-44.
- Fig. 6** — a) Ramos de flechas do milho tunicata com alvéolos com duas ou mais espiguetas e com espiguetas com duas ou três flores.
a: da planta 104-593-44; b-c da planta 109-593-44.
- Fig. 7** — Espiga assimétrica de um descendente (7-486-44) do cruzamento milho x teosinto com duas fileiras de alvéolos e três fileiras de grãos por alvéolo. a: desenho de um grão isolado com a tapa protetora e a gluma externa; b: grão isolado; c: gluma externa isolada; d-e: vistas das duas faces da espiga mostrando a assimetria; f: vistas do flanco A; g: vista do flanco B.
- Fig. 8** — Espigas de descendentes do cruzamento de milho x teosinto.
a-b) vistas de lados opostos da espiga assimétrica da planta 11-487-44.
c-d) vistas da espiga simétrica da face e de flanco da planta 10-488-44.
- Fig. 9** — Espigas de milho pipoca pontudo paulista com duas fileiras de grãos por alvéolos na parte apical e 3 e 4 fileiras na parte basal. a-b) da planta 8-571-42; c-f) da planta 33-591-42.
- Fig. 10** — Espigas de descendentes do cruzamento milho x teosinto com duas fileiras de alvéolos na parte apical e três fileiras (e-f) ou quatro fileiras (a-d) na parte basal.
a-b — da planta 16-407-44.
c-d — da planta 27-372-44.
e-f — da planta 13-488-44.
- Fig. 11** — Esquemas da interpolação de uma fileira adicional de alvéolos (a-c-e) ou duas fileiras adicionais (a-b-d).
- Fig. 12** — Esquema do arranjo dos alvéolos a até d: duas fileiras de alvéolos com filotaxia em espiral $1/2$; a: tipo original hipotético com racemos em cada alvéolo; b: tipo dos ramos da flecha de milho e teosinto e da parte masculina da inflorescência de *Tripsacum*; c: tipo da espiga de *Euchlaena* e da parte feminina da inflorescência de *Tripsacum*, com uma só espiguetas sésseis; d: tipo básico de milho com duas espiguetas sésseis; e: intercalação de duas fileiras adicionais e substituição da filotaxia em espiral por fileiras longitudinais, conforme o esquema da fig. 11; f: o acréscimo de novas fileiras, segundo a teoria de Collins (1919).
- Fig. 13** — Formação de pares de espiguetas sésseis femininas e espiguetas pedunculadas masculinas, formando fileiras regulares. a: ramo da flecha de milho tunicata com grãos maduros; b: ramo da flecha de milho "tassel seed" durante o florescimento; c-d: espiga de um descendente do híbrido milho x teosinto, 8-375-44, vista de dois lados.
- Fig. 14** — Antocládios de dois descendentes do cruzamento milho x teosinto, com espigas terminais (n+1) ramificadas (r) a: planta 17-374-44; b: planta 5-374-44.
- Fig. 15** — Ramificação dos antocládios em dois descendentes do cruzamento milho x teosinto.
- Fig. 16** — Espigas do descendente do cruzamento milho x teosinto, 18-408-44. a: espiga ramificada terminal do antocládio; b: espiga não ramificada lateral do antocládio; c-e: ramos vistos do lado ventral; f: eixo principal; g-i: ramos vistos do lado dorsal, da espiga ramificada.

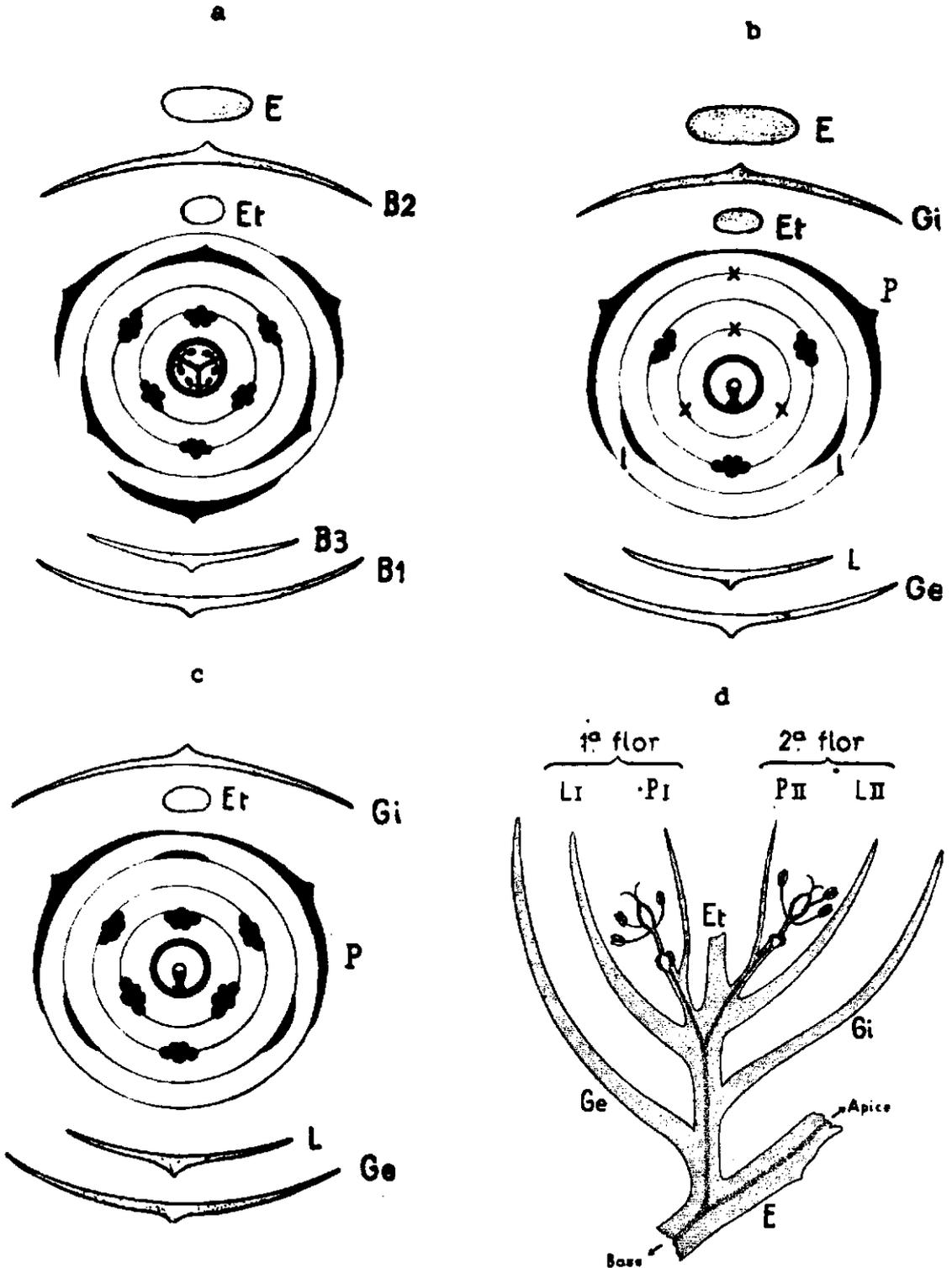


Fig. 1

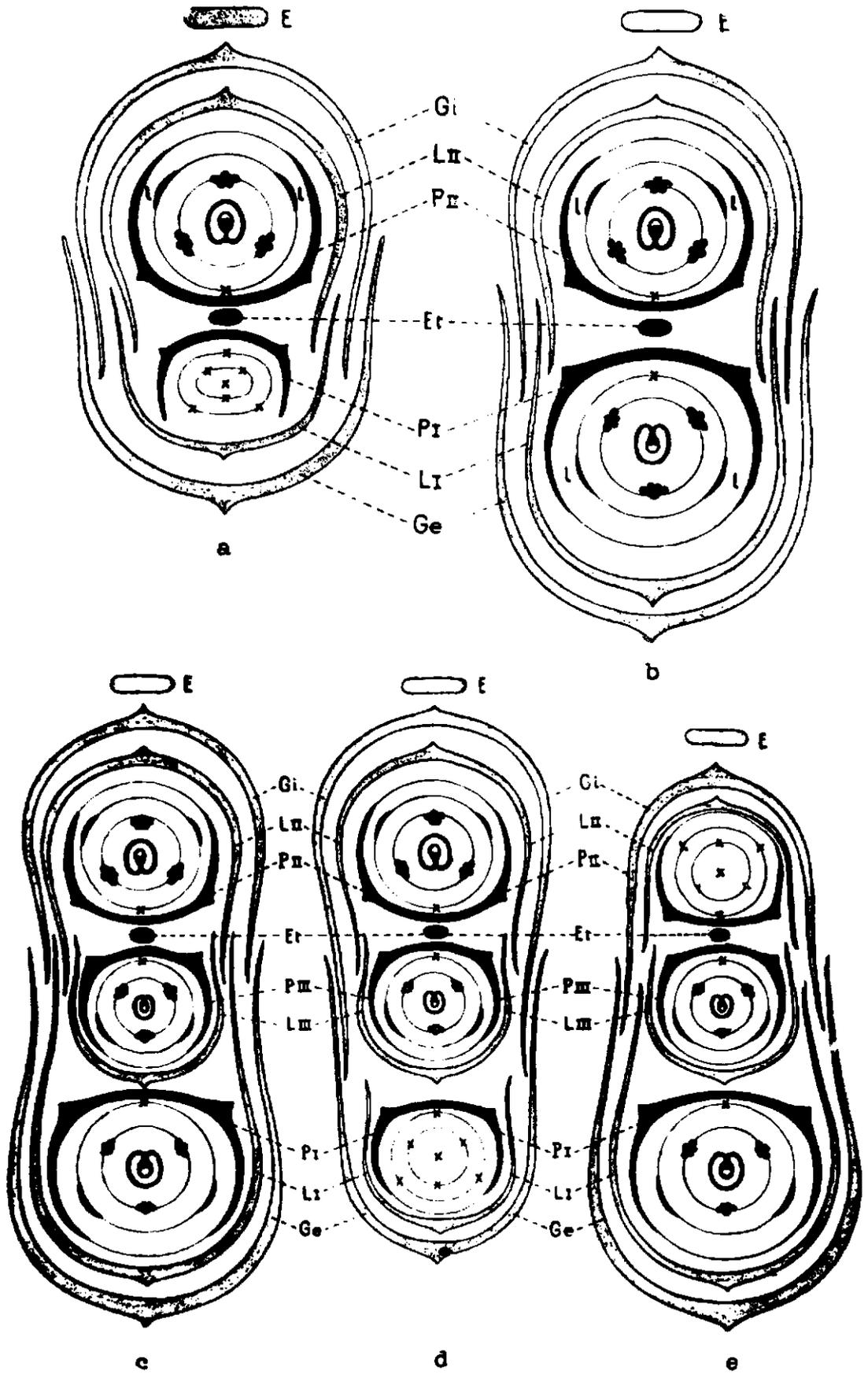


Fig. 2

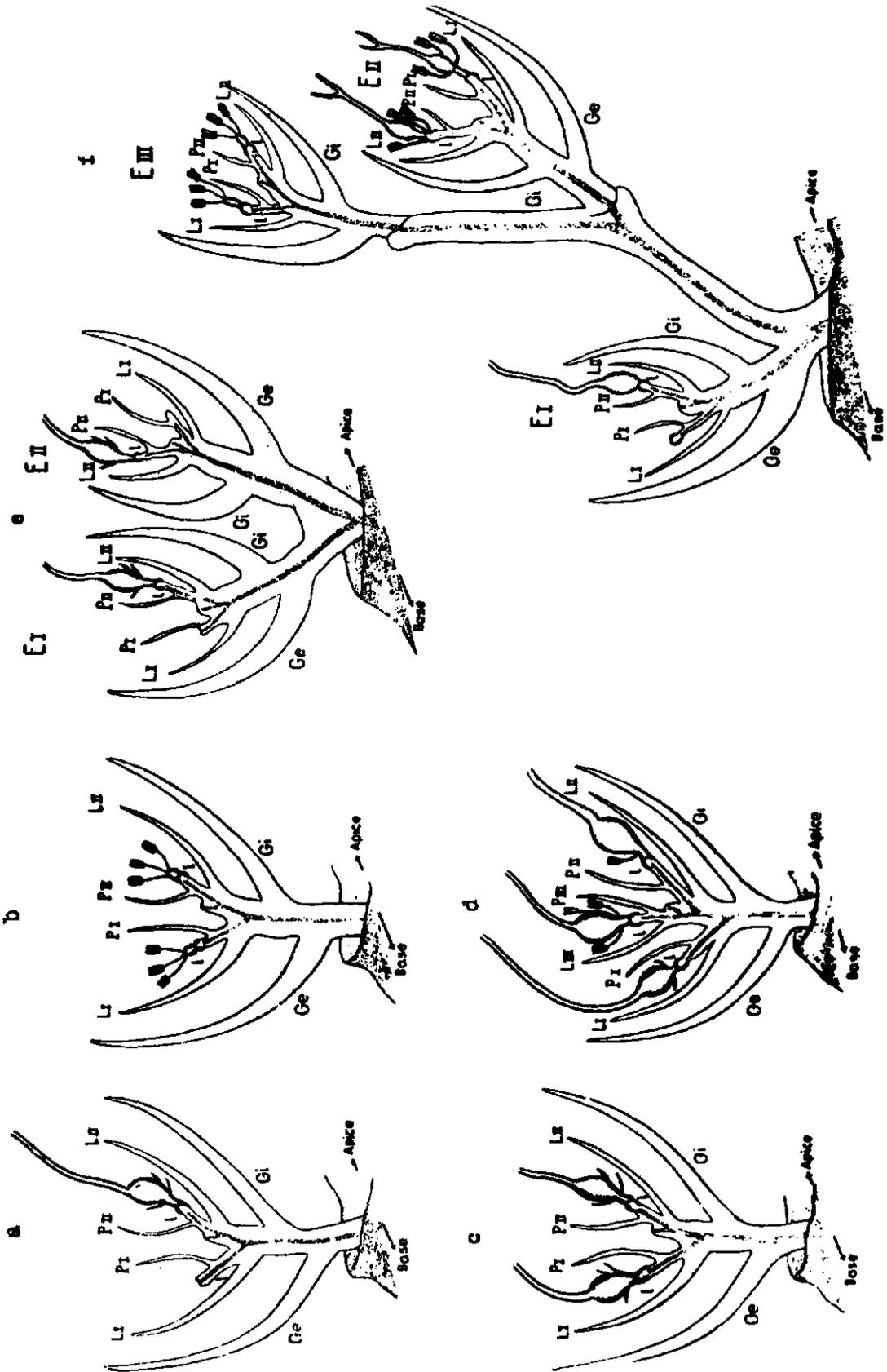


Fig. 3



Fig. 4

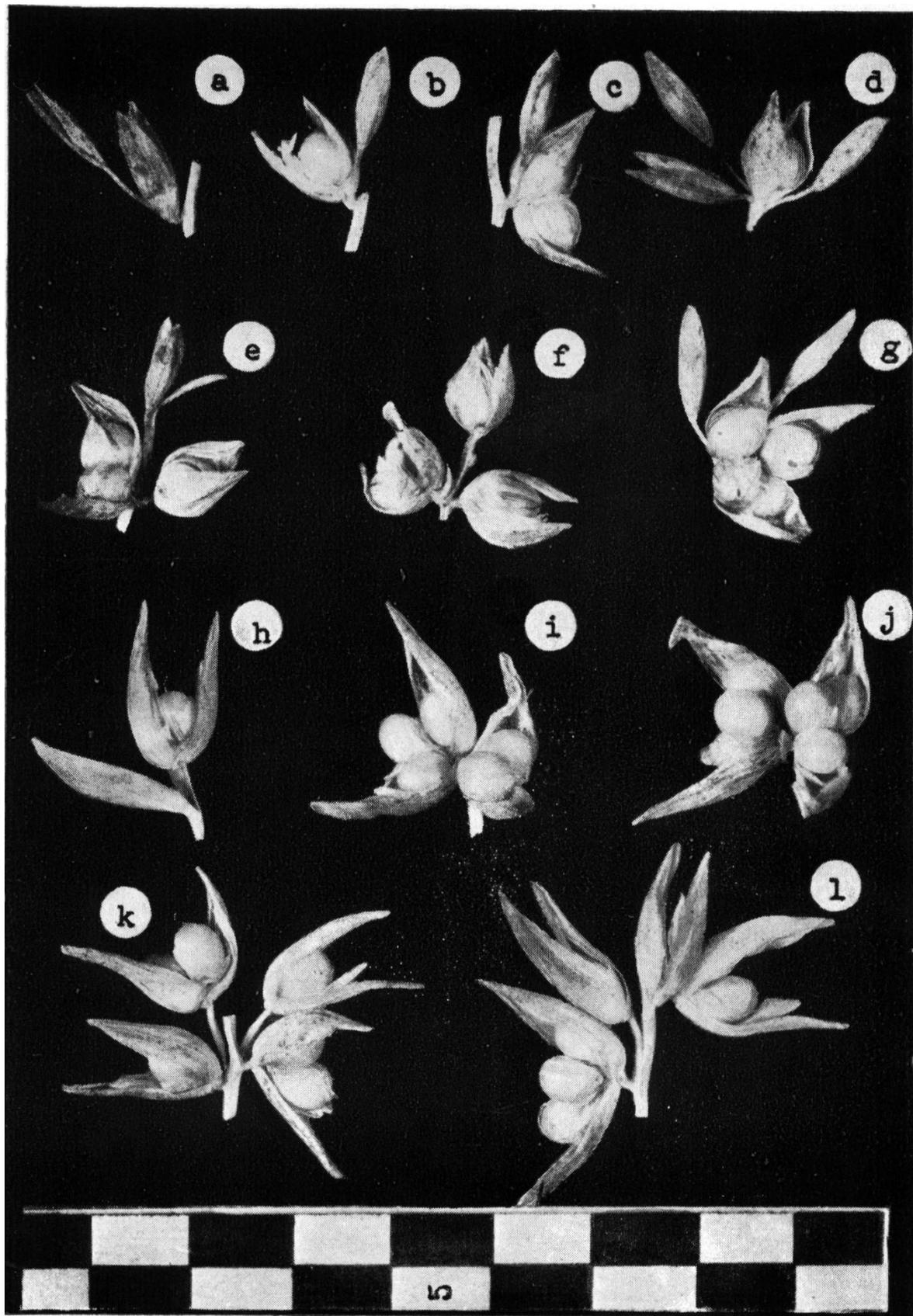


Fig. 5



Fig. 6

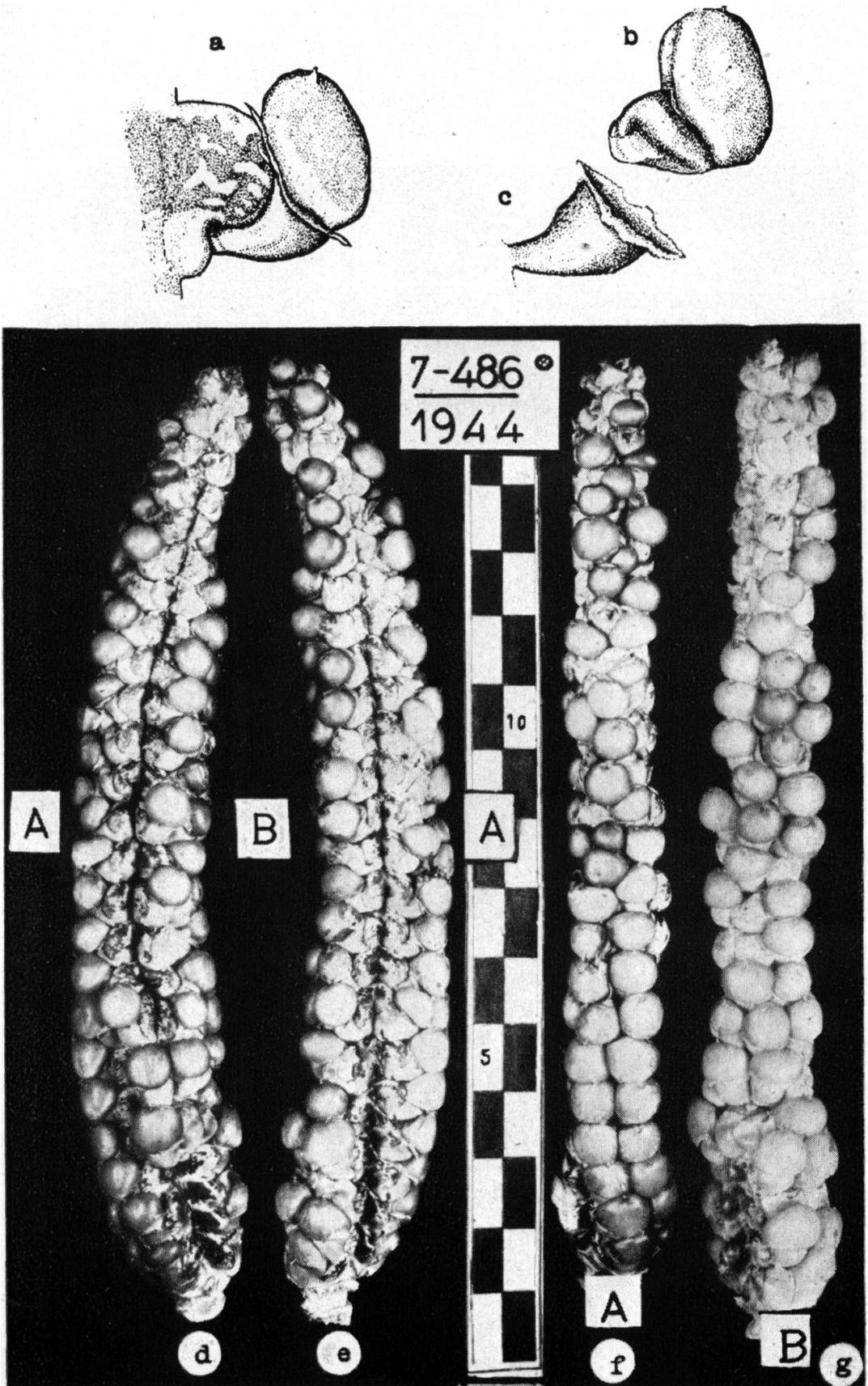


Fig. 7

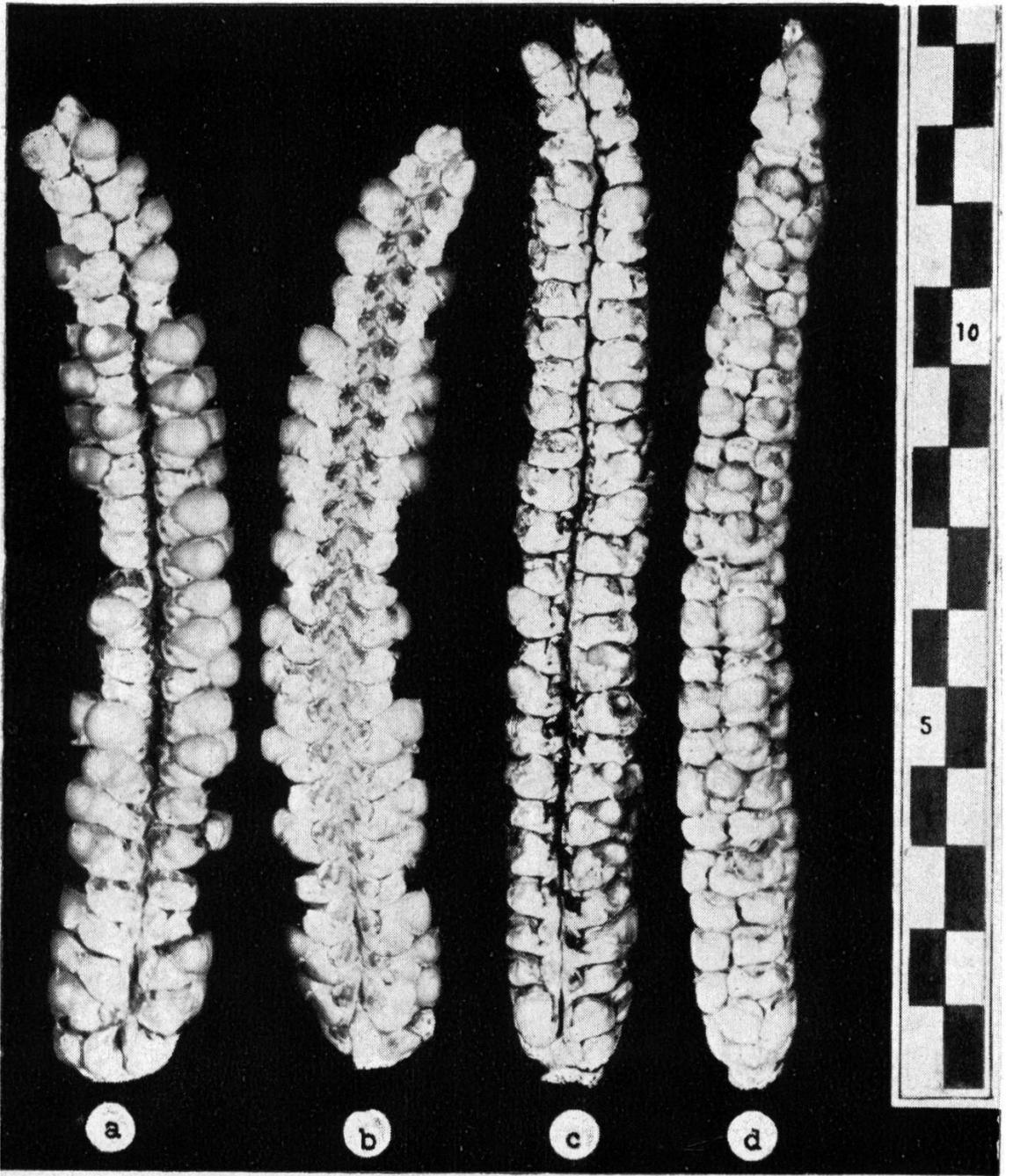


Fig. 8

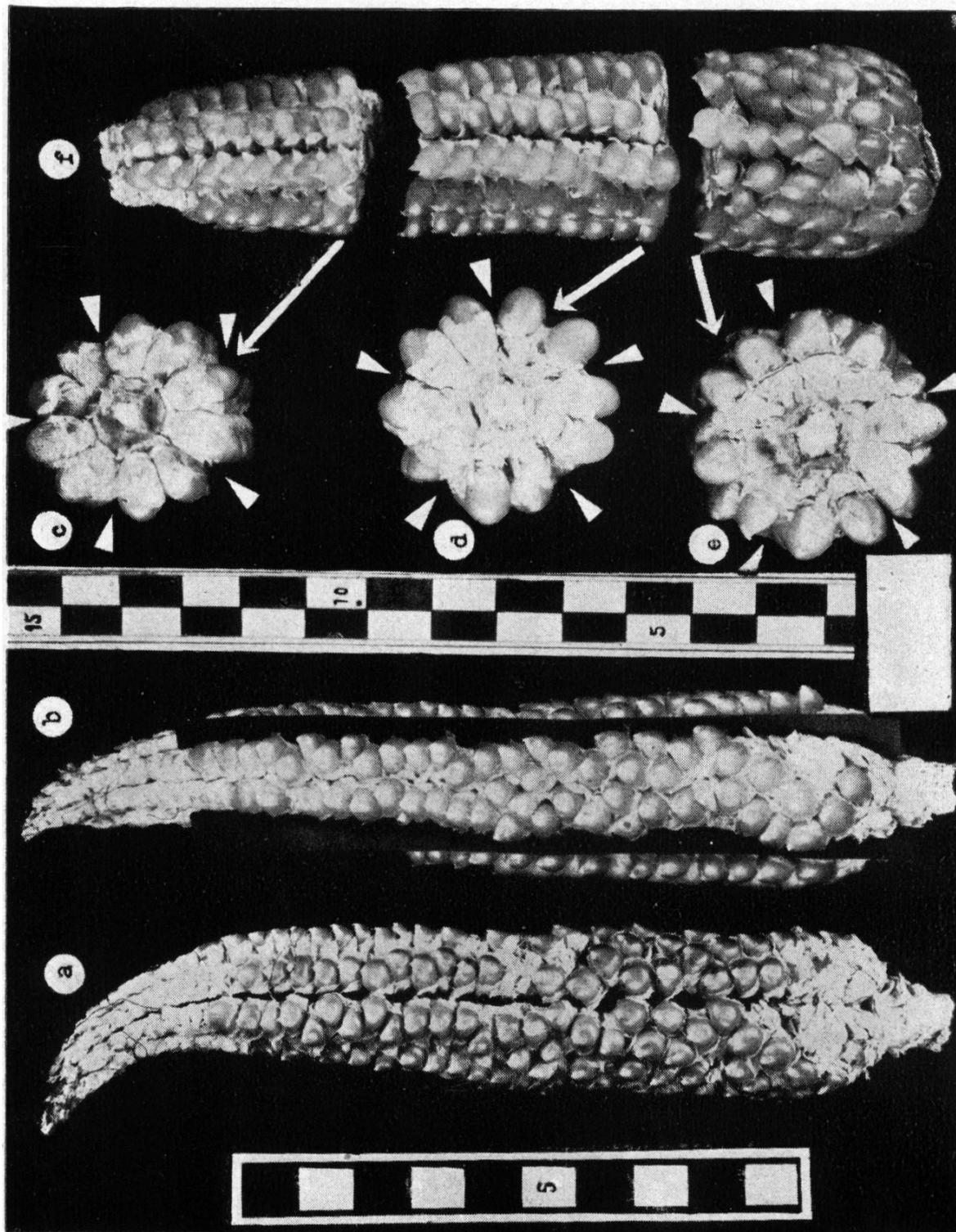


Fig. 9

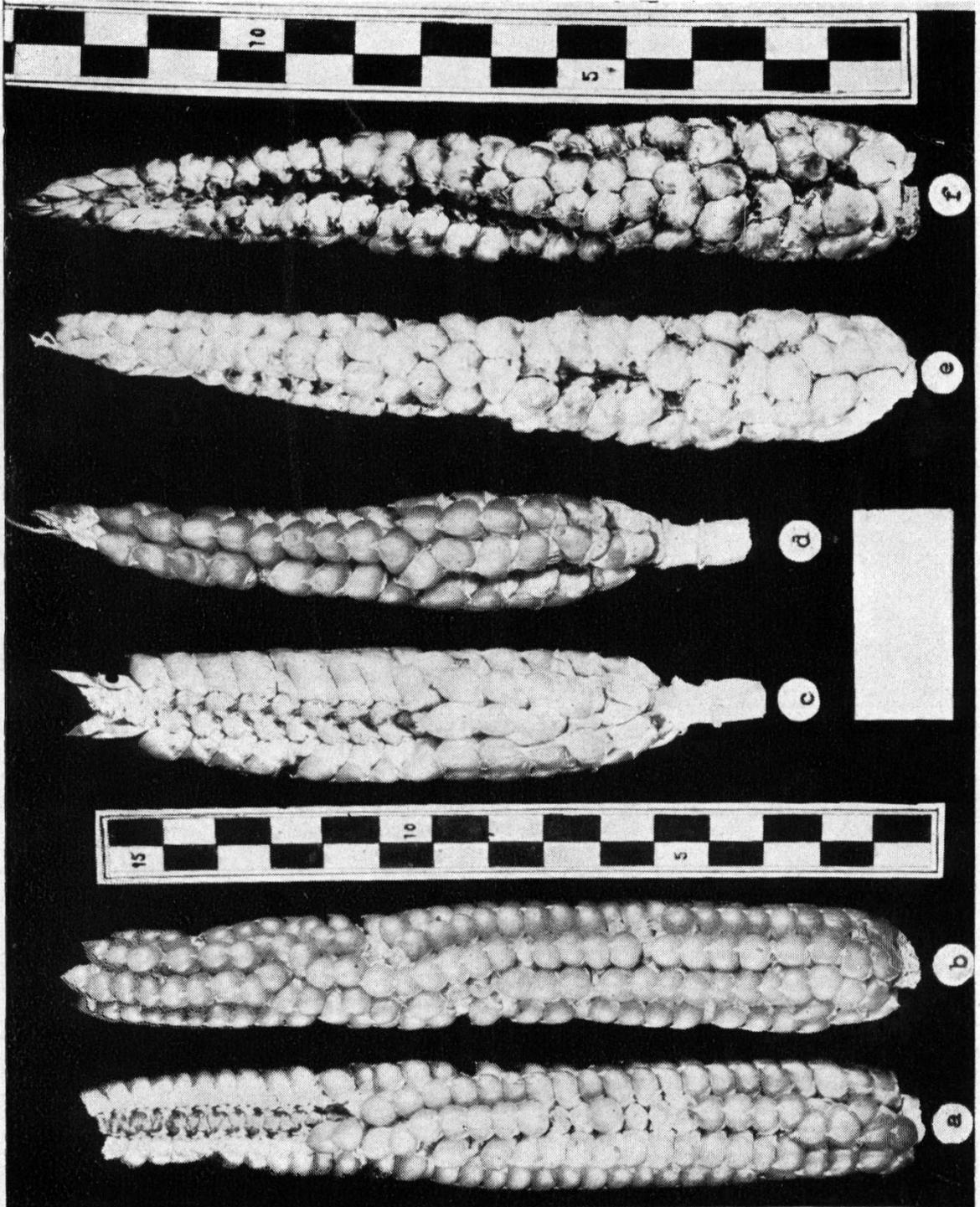


Fig. 10

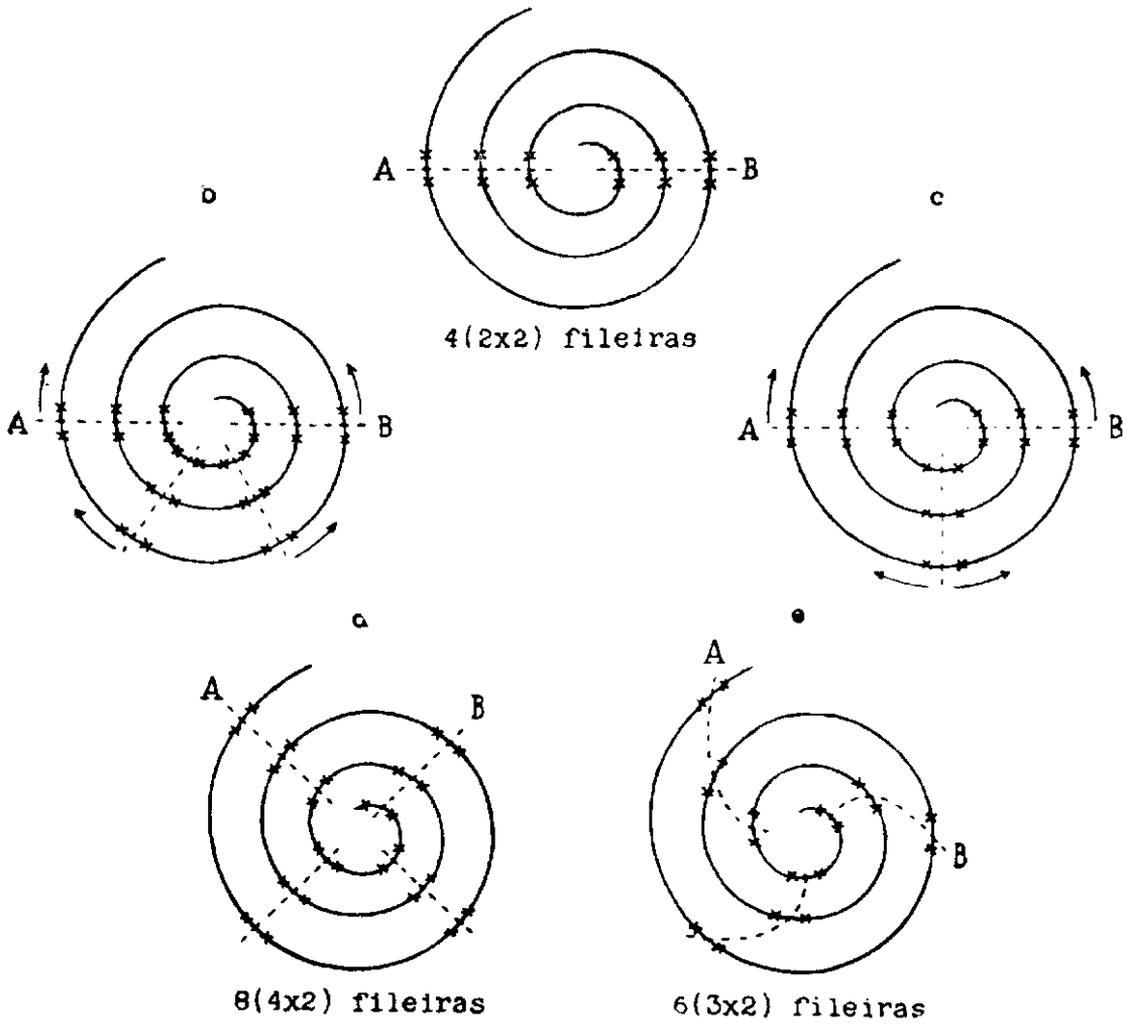


Fig. 11

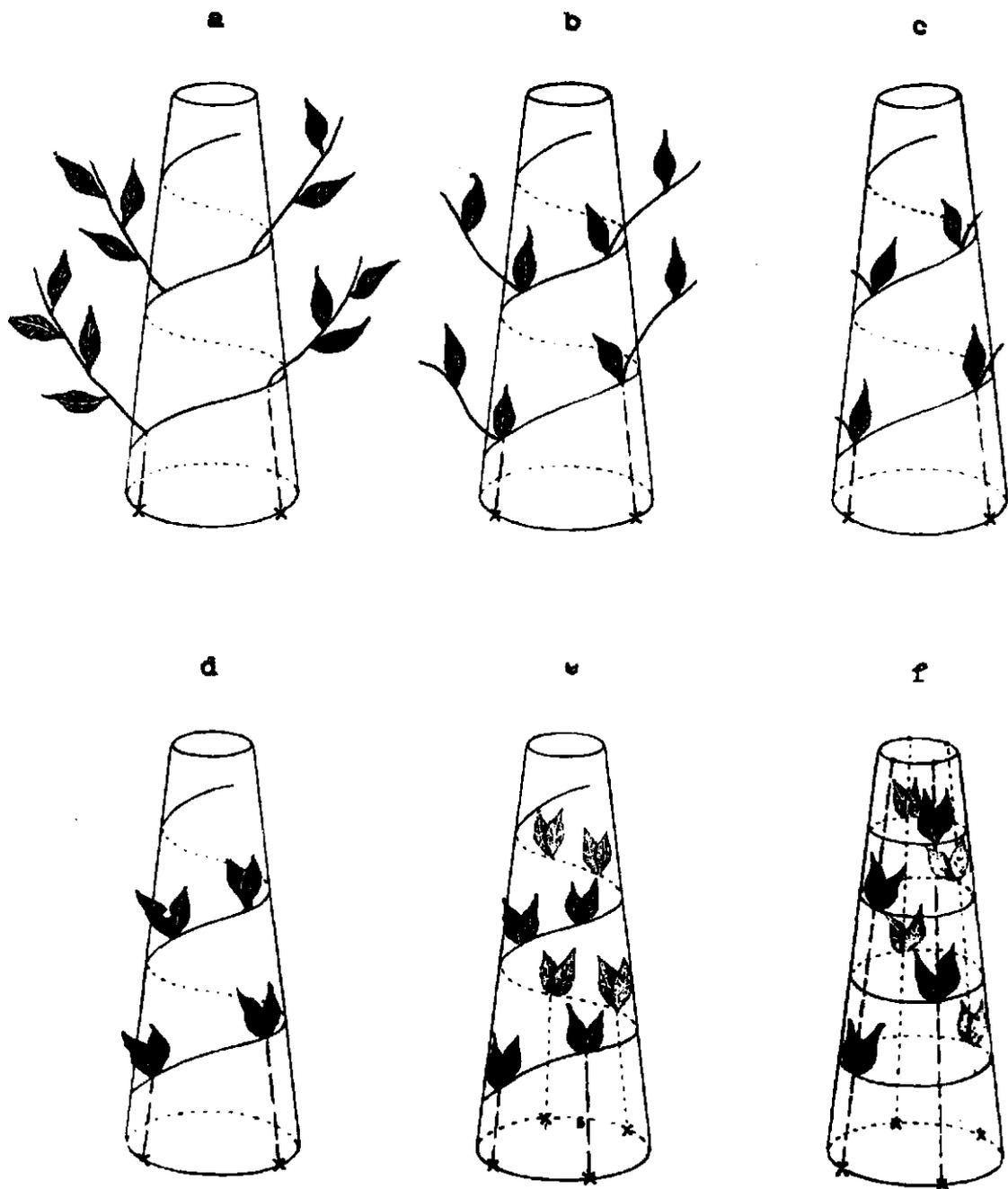


Fig. 12



Fig. 13

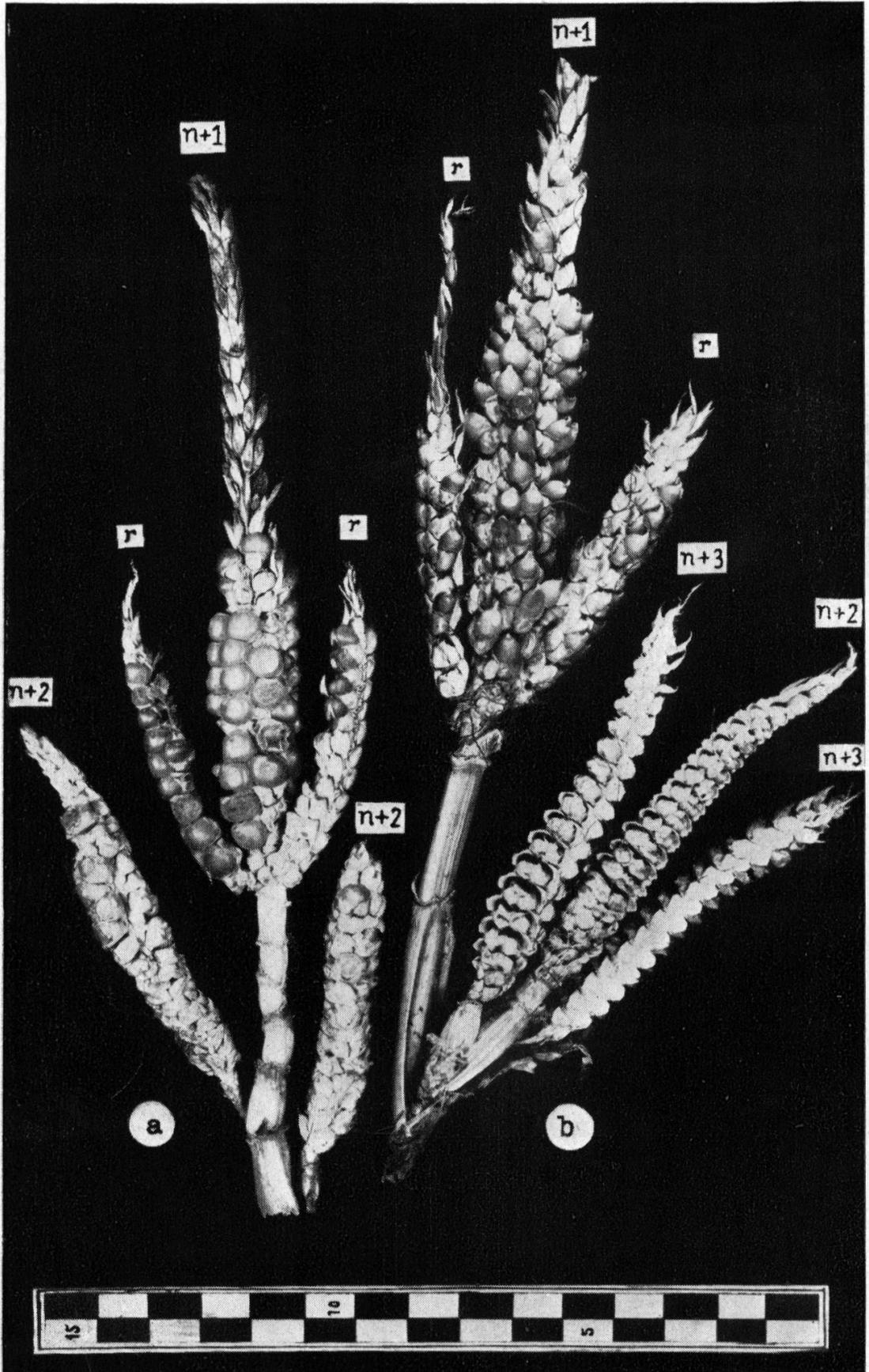


Fig. 14

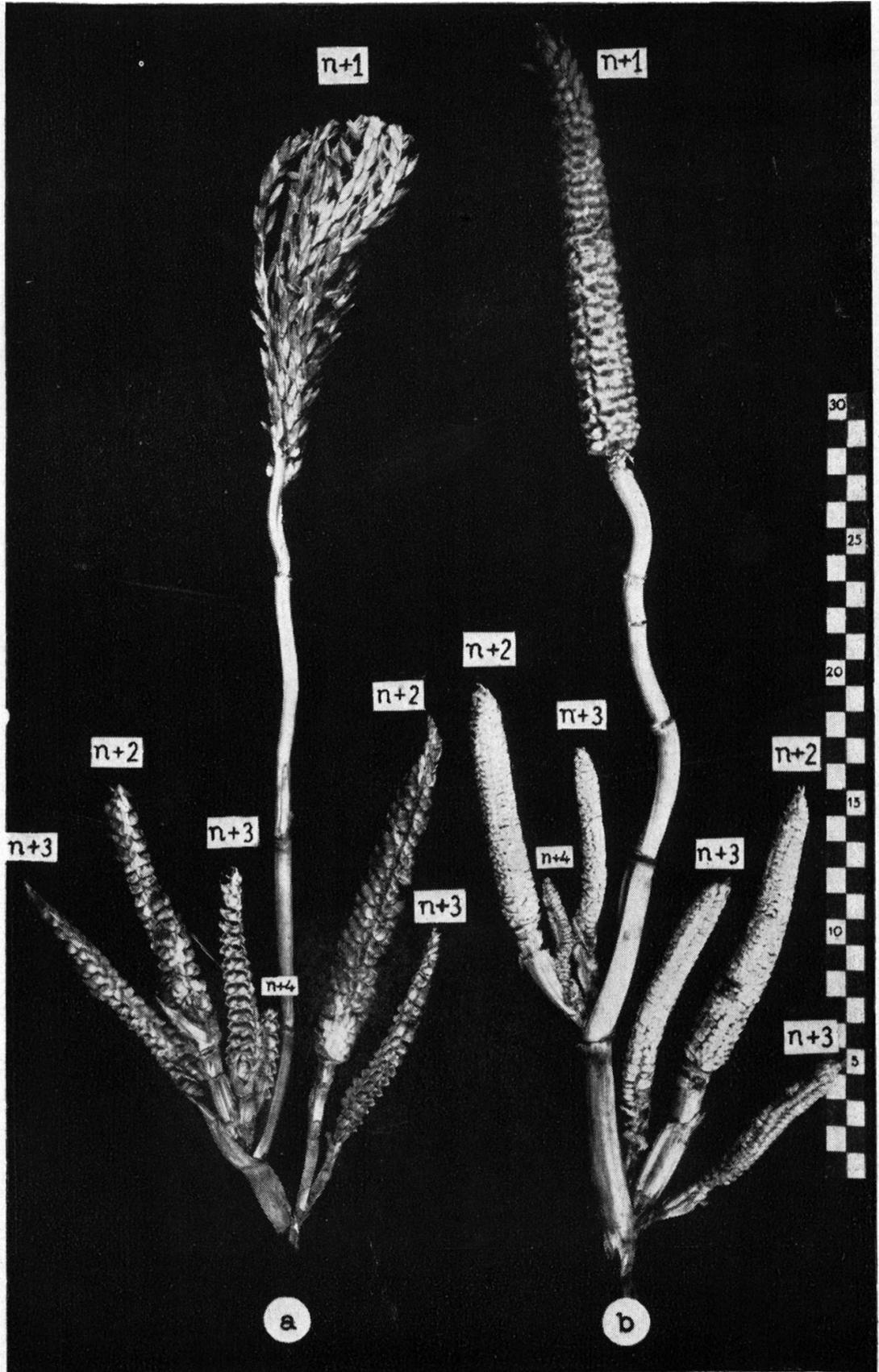


Fig. 15

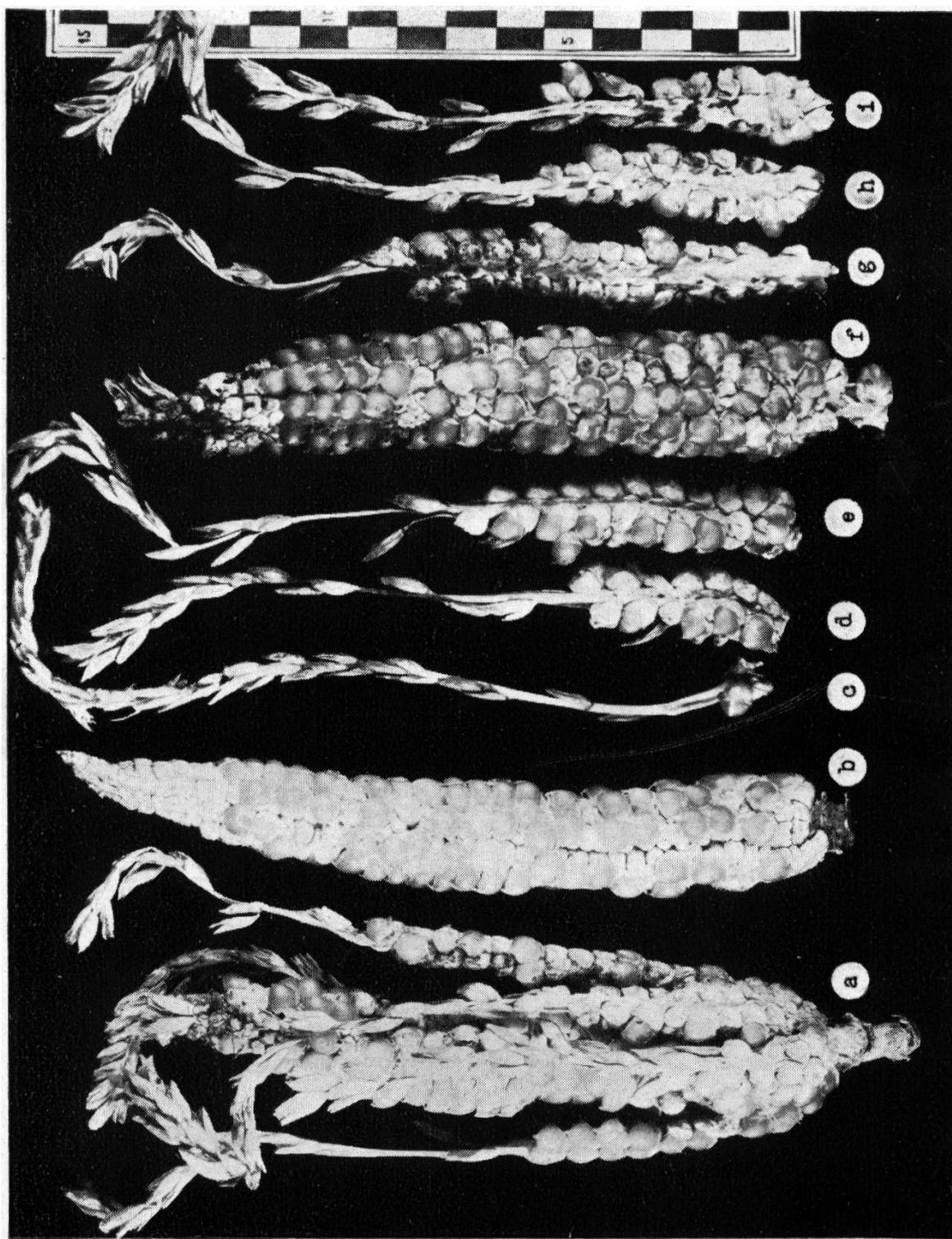


Fig. 16