

BC/16164
IB/80108



**ESTUDO DO EFEITO GAMETOFÍTICO PRESENTE EM UMA LINHAGEM
DE MILHO (*Zea mays* L.) NORMAL**

Este exemplar corresponde a Redação Final de
Tese defendida pela candidata Cristiane
Savoia Zanchetta e Aprovada pela Comi
São Julgadora. Campinas, 27 de Fevereiro
de 1992.

CRISTIANE SAVOIA ZANCHETTA

Orientador: Prof. Dr. William José da Silva

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biologia da Universidade Estadual de Campinas
para a obtenção do título de Mestre em Ciências
Biológicas.

Área de Concentração: Genética.

CAMPINAS - SP

1992

T/UNICAMP

Z16_e

UNIDADE	I.B.1144
N.º CHAMADA	± 16e
V. _____	EX. _____
TOMBO BCI	16164
PROC.	215792
C <input type="checkbox"/>	D <input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 2000000
DATA	24/03/92
N.º CPD	_____

CM00217547

À minha família,

Odila, Isaltino e André,

dedico.

Ao amigo e companheiro de

todas as horas, Sinval,

ofereço.

AGRADECIMENTOS

- Ao Prof. William José da Silva pela orientação da tese, por toda compreensão, estímulo e confiança.
- Aos Profs. Drs. Alberto José Prioli, George John Shepherd e Rolf Dieter Illg pelo exame da tese e sugestões.
- Ao Sr. João Rosolen pela multiplicação das primeiras sementes.
- À Biologia Vegetal e ao Departamento de Genética Médica pelo auxílio nas análises microscópicas de fluorescência e uso dos equipamentos.
- Aos amigos do campo, Sr. Bento e D. Cida, porto seguro em todas as ocasiões, pelo carinho e pela força.
- À D. Gê, D. Glória, Beth e Olivete, pelo auxílio técnico, carinho e estímulo.
- Às amigas Miriam, Rachel e às companheiras Bia, Patrícia, Fátima, Maria Elisa, Paula e Geralda, que de uma forma ou de outra, contribuíram para a realização deste trabalho.
- Às mais que amigas, Luciane e Rose, pela iniciação científica, pelo carinho com que me receberam, pelo incentivo e confiança no trabalho e por tudo que dividimos na vida e no campo.

- Às "irmãs" Evelyn e Solange, por tudo que aprendemos juntas, pelo companheirismo, carinho e força.

- À minha família pelo incentivo, apoio, confiança e amor durante todos estes anos.

- Ao amigo e companheiro, Sinval, por todo carinho, compreensão, pelos domingos divididos no milharal e pela força que me alimentou nestes últimos anos.

- À Genética e à todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

- À CAPes pelo suporte financeiro.

CONTEÚDO

1. Introdução	1
2. Revisão da Literatura	4
2.1 Mecanismos de Isolamento Reprodutivo em Milho	4
2.1.1 Comportamento do gene Ga^B em milho	13
2.2 Fisiologia da Reprodução	18
2.2.1 Estilo-estigma	18
2.2.2 Pólen, tubo polínico e fertilização	20
2.2.3 Fatores que podem alterar fertilização	23
2.2.4 Microscopia de fluorescência	30
3. Material e Métodos	33
3.1 Germoplasma	33
3.2 Análise Genética	36
3.2.1 Famílias de cruzamento	36
3.2.2 Teste de alelismo	42
3.3 Análise da Expressão do Gene Gametofítico	44
3.3.1 Efeito da idade do estilo-estigma na reação gametofítica	44
3.3.2 Efeito de estímulos do pólen da L222 na ação gametofítica desta linhagem	46
3.2.2.1 Efeito de estímulo transitório	46
3.3.2.2 Efeito de estímulo persistente	47
3.3.3 Medida do diâmetro do grão de pólen	49

3.3.4 Microscopia de fluorescência	50
4. Resultados e Discussão	53
4.1 Análise Genética	53
4.1.1 Linhagem L222 como fêmea de famílias com frequência variada de genes da L222	53
4.1.2 Teste de alelismo	65
4.2 Análise da Expressão do Gene Gametofítico	68
4.2.1 Efeito da idade do estilo-estigma na ação gametofítica	68
4.2.2 Efeito de estímulos de tubos polínicos da L222 na ação gametofítica contra tubos polínicos ga ...	70
4.2.2.1 Efeito de estímulo transitório	70
4.2.2.2 Efeito de estímulo persistente	73
4.2.3 Diâmetro do grão de pólen	78
4.2.4 Comportamento de tubos polínicos em estilo- estigmas da L222	81
5. Conclusões	90
6. Resumo/Summary	92
7. Referências Bibliográficas	96

1. INTRODUÇÃO

Para a observação das leis de Mendel é necessário que haja a distribuição ao acaso, nas células filhas, das combinações gênicas, seguida da fusão, também ao acaso, dos gametas masculinos e femininos. Vários casos, entretanto, têm sido descritos onde a fusão dos gametas é afetada por outros fatores mendelianos, causando desvios de segregação em muitos grupos vegetais como em monocotiledôneas, dicotiledôneas e basidiomicetos (Brieger, 1926).

Proporções mendelianas desviadas das esperadas são conhecidas desde o início do século (Correns, 1902, citado por Emerson, 1934; Jones, 1920, 1922) quando foram estudadas linhagens de milho que apresentavam preferência pelo seu próprio pólen, em misturas de pólen da própria planta com pólen de indivíduos distintos. Essa preferência por pólen próprio foi surpreendente, visto que já eram conhecidos os efeitos de depressão causada pela endogamia e da heterose em milho, com aumento do vigor geral das plantas, da produção de grãos, da taxa de germinação e desenvolvimento mais rápido das plantas resultantes de cruzamento. Esses desvios foram chamados, na época, de "fertilização seletiva" (Jones, 1920).

O milho é uma espécie que exhibe predominantemente fecundação cruzada, com taxa de cruzamento, $\lambda = 0,9$ (Kahler *et al.*, 1984) a $\lambda = 1,0$ (Torreão, 1991), não apresentando restrição,

natural ou artificial, para a ocorrência de autofecundação. Aliás, esse processo tem sido usado extensivamente para a obtenção de linhas puras visando a síntese de híbridos comerciais. Nenhum sistema alélico de auto-incompatibilidade do tipo S e Z, que é comum em gramíneas, tem sido encontrado em milho. Ao contrário, tem sido descritos genes gametofíticos que beneficiam a fertilização com grãos de pólen da mesma planta, nos cromossomos I, III, IV, V e IX (Coe & Neuffer, 1977).

O surgimento de uma linhagem de milho normal com a característica incomun de não ser fecundada por outras linhagens, chamou a atenção dos pesquisadores do Laboratório de Genética de Milho da UNICAMP, pela primeira vez, em 1976. Tal linhagem, denominada L222, ao ser plantada em um campo isolado, ao lado de mais de 80 linhagens de diferentes origens, após a eliminação de suas panículas, produziu enorme quantidade de espigas sem nenhuma semente, ou com formação de apenas 4 ou 5 grãos, que poderiam muito bem, ter sido produzidos por contaminação de pólen da própria L222 em despendoamento inadequado. Pólen da L222, entretanto, produz cruzamentos F_1 com qualquer linhagem, sem restrições, que ao ser usado como fêmea, produz espigas com boa granação.

O isolamento reprodutivo da linhagem L222 foi considerado surpreendente por dois motivos. Primeiro porque esse efeito é extremamente forte, mesmo na presença apenas de pólen estranho, ou seja, na ausência de competição de pólen estranho com pólen da L222. Segundo, porque efeitos semelhantes, do tipo gametofítico, ocorrem naturalmente somente em algumas variedades

de milho pipoca e menos frequentemente, em algumas variedades de milho doce, mas nunca foram descritos em milho de endosperma normal. Desse fato, surgiu o interesse em realizar estudos sobre o comportamento de granação desta linhagem em relação à suas progênes e sobre a natureza da reação de incompatibilidade entre tubos polínicos estranhos e estilo-estigmas da L222, para melhor esclarecer o mecanismo genético que controla esse comportamento promotor de isolamento.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 MECANISMOS DE ISOLAMENTO REPRODUTIVO EM MILHO

Jones (1920) mostrou-se intrigado com alguns resultados de experimentos em que a polinização com mistura de pólen de 1:1 produziu progênies com maior proporção de sementes autofecundadas que o esperado de 50%. Curiosamente, as mesmas plantas que receberam pólen da mistura, ao receberem 100% de pólen estranho apresentaram granação normal.

O conhecimento da presença de certa ação seletiva quando pólen de diferentes plantas é aplicado em estigmas de Nicotiana, espécie que mostra auto-incompatibilidade marcante, levou Jones a experimentar, em milho, misturas de pólen de pares de plantas geneticamente diferentes. Essas plantas, obtidas por sucessivas autofecundações, mostravam vários tipos de endosperma como flint, dente, doce e pipoca. Possuíam então, características uniformes e tipos de endosperma contrastantes como amarelo-normal, amarelo-doce, branco-normal e roxo-doce, suficientemente distintos para discriminar as sementes formadas por autofecundação daquelas resultantes de cruzamento. Dos 20 pares de plantas utilizadas, 17 apresentaram desvios a favor da autofecundação, sendo que em um deles, de 1.410 sementes formadas, 1.403 eram produto de autofecundação, mostrando características iguais às da planta mãe. Observou ainda, que a

vantagem do pólen da própria planta era tanto maior quanto maior fossem as diferenças entre as duas linhagens da mistura. Os desvios encontrados foram mais acentuados em três misturas que envolviam um tipo de milho pipoca, denominado na época, Zea mays everta. Houve um aumento de sementes autofecundadas, em média 47% acima dos 50% esperado, mostrando quase completa não funcionalidade do pólen estranho. Num dos cruzamentos, a aplicação da mistura de duas linhagens em plantas de uma delas produziu 100 sementes autofecundadas e 4 de cruzamento, e em plantas da outra linhagem do par, produziu 1.303 sementes autofecundadas e apenas 3 sementes de cruzamento. O autor se referiu a uma "força" agindo contra tubos polínicos estranhos. Sugeriu então, que tais discrepâncias poderiam ser explicadas por diferenças na taxa de crescimento dos diferentes tubos polínicos da mistura, e já que os estilo-estigmas de milho são muito longos, os tubos próprios deveriam ser mais aptos e ter maiores chances de completar a fertilização.

Nesta época, por outro lado, eram frequentes os relatos de casos onde pólen de uma planta se mostrava incapaz de fertilizar a planta que o produziu (Nicotiana), embora fosse perfeitamente capaz de fertilizar outras plantas da mesma espécie. Darwin já havia descrito muitos exemplos, e posteriormente outros pesquisadores encontraram auto-esterilidade em mais de 35 famílias, juntamente com outros mecanismos que promovem a fecundação cruzada, como protoginia, protandria, heterostilia, etc. (Jones, 1920). O conhecimento destes mecanismos e sua ampla distribuição permitiu sugerir que plantas

vindas do cruzamento teriam maior vantagem seletiva, por apresentarem maior variabilidade genética, e que essa condição deveria ser uma regra entre os seres vivos. À luz destas idéias, a auto-esterilidade seria perfeitamente compreensível, mas a preferência pela autogamia em alguns casos em milho, espécie de fecundação cruzada, sem casos descritos de auto-incompatibilidade e com efeito heterótico pronunciado, parecia contraditória.

Para testar a hipótese de que diferenças na taxa de crescimento dos tubos polínicos seriam responsáveis pela ocorrência de desvios a favor da autofecundação, Jones (1922) preparou cinco tipos diferentes de mistura de pólen envolvendo uma variedade de milho pipoca, Squirrel Tooth ou Rice, de endosperma de coloração branco e textura normal e uma variedade de milho doce, Golden Bantam, de endosperma de cor amarela e textura enrugada. Os tubos polínicos teriam de vencer certa distância do estilo-estigma para atingir o óvulo, dependente da posição deste no ápice ou base das espigas. Havendo diferenças nas taxas de crescimento dos tubos e o pólen próprio sendo mais eficiente, deveria aparecer uma menor quantidade de grãos vindos de cruzamento na base das espigas que no ápice, onde os estilo-estigmas são mais curtos. Apesar de as duas metades das espigas apresentarem número semelhante de grãos, os formados por cruzamento foram inferiores ao esperado, demonstrando mais uma vez, o favorecimento da autofecundação em proporções que variaram de 12 a 41%. Dentre as poucas sementes produzidas pelo cruzamento, havia uma maior proporção destas na metade superior

da espiga, onde os estilo-estigmas são mais curtos. Como as diferenças entre as duas porções da espiga não foram muito grandes, o autor não as atribuiu somente às diferenças na taxa de crescimento dos tubos. Numa das misturas, o desvio foi extremamente alto, pois, das 4.000 sementes formadas apenas 6 eram de cruzamento.

Casos de ação seletiva semelhante foram encontrados em algodão por Ball (1919), citado por Jones (1922), onde das 330 sementes formadas, só 10 eram híbridas e também em Oenothera lamarckiana, cujos tubos cresciam mais rapidamente em seus estigmas que os de O. gigas (Heribert-Nilson (1920), citado em Jones (1922)). No entanto, essas duas espécies têm sistema de incompatibilidade descritos, característica ainda não encontrada em milho.

A possibilidade de diferenças nas taxas de crescimento dos tubos serem explicadas por tipos de reserva do grão de pólen tem sido muito explorada. Análises de plantas mutantes para o gene "waxy" mostraram que o carboidrato de reserva do grão de pólen é um tipo de dextrina, ao invés de amido, e que plantas heterozigotas produzem iguais proporções de grãos de pólen normal, Wx, e mutante, wx, (Brink & MacGillivray, 1924 e Demerec, 1924). A diferença na composição do grão poderia alterar o crescimento dos tubos, principalmente nos primeiros estágios, quando é dependente exclusivamente de suas reservas. Brink & Burnham (1927) concluíram que o gene wx não era responsável pelas taxas de crescimento diferentes, mas que a presença simultânea do gene su afetaria o desenvolvimento dos

tubos em alguma fase inicial. Essa idéia foi contestada por Emerson (1925) que atribuiu as diferenças à existência de algum outro fator acessório no mesmo cromossomo, diferente do gene *su*, que influenciaria a taxa de crescimento dos tubos. No entanto, não foram encontradas diferenças no crescimento de tubos dos 4 genótipos: *SuWx*, *SuwX*, *suWx* e *suwx*. Sugeriu-se que ocorreriam diferenças no tempo de contato do grão de pólen com o estilo-estigma e conseqüente germinação do tubo, que foi muito lenta nos grãos *wx* produzidos por plantas *susu* (Sprague, 1933).

Trabalhando com material de elevada ação seletiva, Jones (1924) cruzou uma variedade de pipoca (*SuSu*) com milho doce (*susu*). Da autofecundação dos F_1 obteve apenas 16% de sementes recessivas, quando o esperado era de 25%. Todas as plantas apresentaram proporções diferentes de 3:1, revelando aumento da porcentagem de sementes com características dominantes. Ao retrocruzar estes F_1 com o parental recessivo, como fêmea, obteve segregação normal de 1:1. No entanto, ao usar o parental dominante como fêmea, os gametas masculinos com fator dominante foram favorecidos, dando a impressão que os grãos de pólen recessivos (*su*), eram discriminados. Concluiu então, que a fertilização seletiva não deveria ser somente devida à diferenças de funcionamento de grãos de pólen normal e "sugary" e que deveria haver um certo grau de interação entre os tubos e o tecido estigmático onde estes crescem, de tal forma que pólen com alelo dominante seria favorecido em estilo-estigmas com o mesmo alelo, em homozigose ou heterozigose. Jones, portanto, foi o primeiro pesquisador a suspeitar de fatores dominantes presentes

no esporófito, capazes de inibir o crescimento de tubos polínicos com o alelo recessivo, causando segregação aberrante com diminuição de sementes portadoras de caracteres recessivos.

Mangelsdorf & Jones (1926) tentaram explicar os resultados anteriores incluindo a presença de um outro fator ligado ao gene Su, que seria responsável pelas alterações observadas na segregação. Por estar atuando no gametófito, chamaram-no de gene gametofítico (Ga), de modo que grãos de pólen contendo Ga teriam vantagem quando o esporófito também possuísse o fator Ga, tanto na forma homozigota dominante quanto heterozigota, sugerindo que este se comportaria como um fator dominante.

De acordo com os resultados de Jones (1924), a ligação entre Ga e Su produziria uma maior proporção de sementes normais, desde que Ga fosse favorecido. Com isso haveria uma diminuição da porcentagem de sementes "sugary", explicando perfeitamente os resultados obtidos. Assim, a autofecundação de plantas F_1 (SuSuGaga) mostraria ação seletiva porque pólen Ga e ga competiriam no tecido esporofítico Gaga e se pólen Ga, carregando o gene Su, fosse favorecido, mais sementes normais seriam formadas. O cruzamento de plantas F_1 , como fêmea, com o pai normal (SuSuGaGa) ou "sugary" (susugaga) não mostraria ação seletiva porque só um tipo de gameta masculino seria formado. O retrocruzamento do F_1 , como macho, com o pai "sugary" envolve quatro tipos de gametas, mas não ocorre ação seletiva porque o esporófito é recessivo (gaga), mas com o pai normal mostra acentuada ação seletiva, visto que gametas Ga e ga competem e Ga

tem vantagem sobre *ga* em esporófito *GaGa*.

Os resultados obtidos com mistura de pólen relatados por Jones (1920, 1922) foram também explicados por Mangelsdorf & Jones (1926) admitindo-se a presença de um fator gametofítico na variedade de pipoca "Rice", influenciando positivamente os tubos polínicos próprios e tornando-os mais aptos para completar a fertilização, acarretando desvios significativos a favor da autofecundação. A ação deste fator gametofítico poderia ser mais acentuada em pipoca que em milho doce, uma vez que no primeiro, houve exclusão quase total de sementes vindas de cruzamento. Posteriormente provou-se que os fatores presentes em milho pipoca eram distintos e de ação mais acentuada (Nelson, 1952).

A suspeita da existência destes fatores gametofíticos surgiu quando os autores (Mangelsdorf & Jones, 1926) cruzavam várias linhagens que segregavam fatores letais e sub-letais, causando vários tipos de sementes defeituosas (*deidei*) tanto em proporção normal (25%) quanto desviada para excesso ou para redução. Assumiram que haveria um fator *Ga* ligado ao gene *dei* e por consequência ao gene *Su*, que influenciaria a taxa de crescimento dos tubos, tornando-os mais rápidos, possibilitando um maior número de gametas com gene *dei* completar fertilização, ou, por outro lado, mais lentos, diminuindo a frequência de sementes "sugary".

A existência de um fator gametofítico poderia explicar também os casos de segregação aberrante de grãos *wx* nos trabalhos de Kempton (1919). A deficiência de sementes *wx* em

plantas F₂ e F₃ poderia ser causada pela ligação de um fator Ga que causaria a redução da eficiência dos tubos, independentemente da constituição do tecido esporofítico onde o tubo cresce, sendo portanto, diferente do fator gametofítico ligado a Su e del. Posteriormente foi determinado que o gene wx estava ligado ao gene gametofítico ga8, no cromossomo IX (Neuffer & Coe, 1974).

A detecção de fatores gametofíticos sempre foi feita baseada na distorção das frequências esperadas para a segregação de mutantes de endosperma como su, del e wx. O aumento da frequência de um mutante indica sua ligação com o fator favorecido, Ga, ou com ga, se houver deficiência do tipo na segregação. Se o gene mutante estiver ligado ao ga, como su, a grande maioria dos gametas su que completariam fertilização seriam Gasu, ou seja, formados por recombinação.

A eficiência de fertilização de ga, estimada por vários autores, oscila entre 0 e 9%, com média de 4%, ou seja, 4% dos gametas ga completam fertilização quando em competição com pólen Ga, em estilo-estigmas de plantas Gaga (Mangelsdorf & Jones, 1926; Demerec, 1929 e Emerson, 1925).

Emerson (1934) estimou a taxa de recombinação entre os genes su e ga como sendo de 28% e a posição dos diferentes locos no cromossomo IV, baseado na frequência dos diferentes marcadores, su, Ts5 ou Tu, em polinizações diferenciais de estilo-estigmas Ga por pólen Ga ou ga. Deste modo, concluiu que os genes Su e tu estariam ligados a Ga, pois apareciam mais frequentemente que a combinação suTu.

Burnham (1936) e Brieger (1937) encontraram algumas linhagens que mostravam fertilização seletiva com relação a mutantes localizados no cromossomo V, como bt (brittle) e pr (purple aleurone). Longley (1961) trabalhou com uma linhagem que possuía uma translocação nos cromossomos V-IX e através da segregação de vários de seus mutantes descreveu um novo gene gametofítico, situado no cromossomo V e denominado Ga2. Seu modo de ação é muito semelhante ao Ga, primeiro a ser descrito em milho (Mangelsdorf & Jones, 1926 e Emerson, 1934), sendo que os dois tipos de pólen, Ga2 e ga2, competem em estilo-estigmas (Brieger, 1937), sendo o pólen ga2 total ou parcialmente bloqueado em estilo-estigmas Ga2Ga2 ou Ga2ga2. Foi verificado que esse efeito gametofítico pode ser alterado pelo ambiente ou por fatores modificadores, também citados, posteriormente por Nelson (1952).

Eyster & Robinson (1936) notaram alterações profundas na segregação de características situadas no cromossomo IX e as atribuíram à presença de um outro gene gametofítico presente neste cromossomo, ga8, de ação semelhante ao Ga e Ga2.

A detecção de um outro gene gametofítico no cromossomo IV, situado do lado oposto ao gene Su e que interage com os alelos Ga e Ga^B, do qual será tratado adiante, foi feita por Jiménez & Nelson (1965). Denominado Ga9^M, sua ação difere dos anteriormente descritos, visto que só atua no grão de pólen, podendo fazer parte de um loco composto de um alelo para o pólen e outro para o estilo-estigma, ou partes diferentes do mesmo gene

com atividade diferenciada. Como $Ga9^M$ parece não funcionar nos estilo-estigmas, nenhum tipo de pólen, Ga^S , Ga ou ga , é favorecido em estilo-estigmas $Ga9^M$. Observaram, ainda, que pólen $Ga9^M$ tem vantagem sobre ga em estilo-estigmas Ga^Sga .

Outros cromossomos também exibem fatores gametofíticos que não foram ainda bem estudados. Podem ser citados o fator $ga6$ no cromossomo I, onde pólen $ga6$ é não funcional em estilo-estigmas $Ga6$ e o fator $ga7$ no cromossomo III, que apresenta somente 10 a 15% de funcionalidade dos grãos de pólen de plantas heterozigotas, independente do genótipo dos estilo-estigmas (Neuffer & Coe, 1974; Coe & Neuffer, 1977).

Exemplos de segregação aberrante também ocorrem em outras espécies. Bemis (1959) estudou a ligação de um gene Ga com uma mutação que altera o padrão de crescimento determinado (d) ou indeterminado (D) de plantas de "lima beans", numa progênie F_2 que apresentava segregação diferente de 3:1 para esse caráter. Este Ga se comportava exatamente como o Ga em milho, sendo que grãos de pólen ga eram inibidos em estiletos $Gaga$ quando em competição com grãos Ga .

2.1.1 COMPORTAMENTO DO GENE Ga^S EM MILHO

Demerec (1929) e Schwartz (1950) analisaram casos semelhantes de esterilidade em cruzamentos de milho pipoca. As

duas linhagens estudadas mostraram-se absolutamente estéreis à pólen de quaisquer linhagens, mas foram perfeitamente capazes de fertilizar outras linhagens. A autofecundação de plantas F_1 do cruzamento dessas pipocas com milho doce, *susu*, resultou em acentuada deficiência de sementes recessivas, cerca de 12%, quando o esperado era de 25%. Da polinização de 14 plantas da variedade de pipoca ($Ga^S Ga^S$), por milho normal (*gaga*), apenas uma semente foi obtida e atribuída à contaminação (Schwartz, 1950).

Demerec (1929) dividiu os estilo-estigmas de plantas de pipoca da variedade "Rice" (Ga^S) em duas metades, polinizando uma com pólen Ga e a outra com pólen *ga*, obtendo resultados que indicaram a deficiência de grãos de pólen *ga* em completar fertilização em estilo-estigmas Ga^S , em ausência de competição. Esse comportamento, embora semelhante ao do fator gametofítico Ga , foi atribuído à existência de um terceiro alelo no loco Ga do cromossomo IV, designado super gametofítico, Ga^S , por ter efeito muito mais acentuado que o alelo Ga . O cruzamento de plantas $Ga^S ga$ com pólen *ga*, produziu espigas parcialmente granadas, e a granadação foi ainda pior ao aplicar pólen *ga* em plantas $Ga^S Ga$. Em estilo-estigmas $Ga^S Ga$, pólen Ga^S tem vantagem competitiva quase total sobre Ga e total sobre *ga*. Por outro lado, plantas *gaga* não apresentam fertilização seletiva, aceitando todos os tipos de pólen, sem qualquer vantagem de um ou de outro. Mostrou ainda que Ga^S está ligado ao gene *Su*, com taxa de recombinação aproximada à calculada por Emerson (1925, 1934) para Ga e interagia perfeitamente com os outros alelos deste locus, provando, mais uma vez, ser alelo do

mesmo loco.

O cruzamento de plantas $Ga^S Ga^S$ com pólen Ga produziu espigas totalmente granadas, mas com pólen ga não houve produção de sementes, mesmo na ausência de competição. A fixação destes estilo-estigmas para análise microscópica, mostrou que, embora não completem fertilização, grãos ga germinam e seus tubos entram no tecido transmissor de plantas $Ga^S Ga^S$, podendo então, ser bloqueados na entrada do saco embrionário ou por reações anormais no óvulo (Schwartz, 1950).

Muitos casos de esterilidade que surgem em cruzamentos de milho deveriam ser atribuídos ao efeito de Ga^S , principalmente em variedades de pipoca, que apresentam efeito gametofítico extremamente forte, denominado incompatibilidade não recíproca por Lyubenov (1982). Um levantamento realizado por Nelson (1952) mostrou que, dentre as 24 variedades de pipoca testadas, como fêmeas, 70% eram totalmente incompatíveis ($Ga^S Ga^S$), uma se apresentou neutra ao cruzamento ($Ga Ga$) e 6 se mostraram compatíveis ($gaga$). Todas as variedades de milho normal eram do tipo $gaga$, pois nenhuma delas induziu fertilização nas variedades de pipoca $Ga^S Ga^S$. A polinização de estilo-estigmas $Ga^S Ga^S$ e fixação em diferentes intervalos de tempo, até 2hs após a polinização, mostrou que pólen ga e Ga^S , aplicados separadamente, germinam rapidamente e têm taxas de crescimento semelhantes, até onde puderam ser seguidos no trato transmissor. Isso confirmou os resultados anteriores de Schwartz (1950), embora os autores discordassem com relação à natureza da inibição, que neste último caso, foi atribuído a desajustes

nutricionais entre polinizações incompatíveis ou à respostas do tipo imunológicas.

House & Nelson (1958) estudaram o desenvolvimento de tubos Ga^S e ga em estilo-estigmas $Ga^S G a^S$ por autoradiografia. Nos cruzamentos incompatíveis, os tubos com genótipo ga apresentaram crescimento por mais de 4hs, que foi reduzido e abolido após 8hs. Além disso, a quantidade de tubos no tecido estilar foi muito inferior a que normalmente ocorre em polinizações compatíveis. Aparentemente, qualquer que seja a natureza da reação, ela começa logo após a germinação e inibe o crescimento dos tubos incompatíveis progressivamente, até sua paralização.

Um tipo de comportamento aparentemente semelhante ao causado pela presença do gene Ga^S foi observado por Sukhapinda & Peterson (1983) no cruzamento de duas progênies de milho normal, de seus estoques para elementos reguladores. Ao polinizar a linhagem A com a linhagem E, houve produção de espigas mal granadas, mas o cruzamento recíproco formou espigas com granação normal, ao longo de 5 anos de testes. No entanto, ao usar como macho linhagens diferentes de E, a linhagem A se comportava de modo normal. Tratava-se portanto, de um caso de incompatibilidade ao cruzamento específica e não recíproca entre as linhagens A e E. Sugeriram que tal caráter deveria ser condicionado por um tipo de interação genético citoplasmática na linhagem A, não apontando para nenhum tipo de fator gametofítico conhecido. Verificaram ainda que pólen incompatível germinava e que a reação de bloqueio não ocorria na superfície.

Apesar disso, o crescimento não foi acompanhado e o sítio de bloqueio não foi determinado, embora devesse ocorrer em algum ponto do interior do estilo-estigma, à semelhança do que ocorre com os genes gametofíticos.

Perry (1945) sugeriu a importância da utilização do gene Ga como redutor de contaminação em campos de produção de sementes. Esse tipo de contaminação é muito comum em campos de milho doce, que por apresentar o alelo ga, não discrimina pólen Ga ou principalmente, ga de milho normal. A introdução de Ga em milho doce, causou redução de aproximadamente 75% na contaminação por milho normal, deixando o autor otimista com relação à obtenção de níveis ainda menores.

A introdução de Ga^s na variedade de milho "Supergold", que aceita pólen de milho normal, e é utilizada na formação de híbridos comerciais de pipoca, pode também reduzir contaminação e facilitar os cruzamentos em campo para produção de sementes de pipoca (Nelson, 1952).

2.2 FISILOGIA DA REPRODUÇÃO

Por ser um cereal de importância econômica, existe uma extensa bibliografia a respeito das estruturas reprodutivas em milho, envolvendo aspectos da ultraestrutura do grão de pólen e do estilo-estigma, a interação destes tecidos na fertilização, bem como de fatores que podem alterar estas interações.

2.2.1 ESTILO-ESTIGMA

O estigma de Zea mays é incomum na família gramineae. Embora do tipo sem secreção abundante, como a maioria, apresenta-se receptivo em toda sua extensão, sendo por isso, denominado estilo-estigma (Miller, 1919; Randolph, 1936 e Heslop-Harrison & Shivanna, 1977).

Em suas margens se estendem 6-10 fileiras de curtos pêlos receptivos ou tricomas, mais concentrados em direção ao ápice, sendo o principal sítio de captura de pólen e onde a adesão do grão é mais intensa (Heslop-Harrison & Shivanna, 1977; Heslop-Harrison et al, 1984b e Styles & Singla, 1987). São pêlos multicelulares com as pontas papiladas, cujas células têm atividade secretória anterior à receptividade e onde se encontram as superfícies receptivas. Por estarem situados angularmente à haste principal, parecem facilitar a condução dos tubos na

direção do ovário e ainda oferecem grande quantidade de secreção intercelular para o crescimento destes (Heslop-Harrison et al, 1984a e 1985).

O estilo-estigma de milho se apresenta muito longo, atingindo em média, 50cm, em forma de fita, bifurcada na extremidade. Segundo Weatherwax (1936, citado em Heslop-Harrison et al, 1984a) tal estrutura resultou da fusão quase total de dois estilódios, seguido de grande alongamento, visto que o estigma de outras gramíneas como Secale cereale e Hordeum vulgare é composto de dois estilódios curtos (Heslop-Harrison & Heslop-Harrison, 1980).

Ao longo de toda sua extensão, o estilo-estigma é atravessado por dois feixes vasculares, separados, por uma camada de parênquima, de um outro tecido concentrado em duas faixas mais internas, denominado tecido transmissor que constitui o sítio de crescimento dos tubos polínicos, embora sem estruturas adaptadas para guiá-los (Kroh et al, 1979 e Heslop-Harrison et al, 1984a). Por esse motivo, Rosen (1961) propôs que deveria haver algum tipo de estímulo quimiotrópico para atrair os tubos até o ovário.

As secreções da superfície formam uma lâmina fina, que mantém-se abaixo da cutícula, aumentando consideravelmente com a maturação do estilo-estigma. Sua função é principalmente adesiva, visto que o tratamento com proteinases incapacita a formação de região de contato entre o grão de pólen e o estilo-estigma, primeiro evento de reconhecimento e indispensável à germinação do tubo polínico (Matson et al, 1974; Heslop-Harrison, 1979c e 1979d).

2.2.2 PÓLEN, TUBO POLÍNICO E FERTILIZAÇÃO

De modo geral, os grãos de pólen possuem uma parede resistente, onde distinguem-se duas camadas principais de origem, morfologia, composição química e domínios fisiológicos distintos. Possuem, em toda sua superfície, poros e fendas que permitem mudanças de volume e troca de substâncias responsáveis por interações entre pólen e estigma (Heslop-Harrison, 1975).

A camada interna, intina, é contínua e reveste a célula vegetativa, permitindo passagem de água através de sua constituição celulósica. De origem haplóide, sua deposição se inicia logo após a liberação dos esporos da tétrade, sendo interrompida na ausência de protoplasto e podendo transportar substâncias de auto-incompatibilidade que atuam no sistema gametofítico (Linskens, 1964; Heslop-Harrison, 1968, 1975), como em Ambrósia, Gladiolos e nas gramíneas Coix, Phalaris e Lolium (Knox & Heslop-Harrison, 1971).

A exina, ou camada externa, de origem diplóide, se mostra mais resistente e apresenta esculturas. É composta de polímeros de carotenóides, a esporopoleína, em vários graus de compactação, que dificulta a passagem de água. Sua formação se inicia ainda na antera, por um tecido especializado, o tapetum, e aumenta após a liberação dos esporos, podendo servir ainda, como reservatório de substâncias derivadas do esporófito e responsáveis por reações de auto-incompatibilidade do tipo esporofítica (Heslop-Harrison, 1968, 1975).

O grão de pólen das gramíneas se encontra parcialmente desidratado, com 10-30% de água na época da dispersão e possui apenas uma região de abertura operculada, por onde emerge o tubo polínico. É considerado de vida curta devido à sua alta taxa metabólica, além de ser trinucleado na época da dispersão, o que reduz suas funções pré-germinatórias, pois o núcleo espermático já se dividiu. Isso permite eventos de reconhecimento e germinação muito rápidos, e contribui para o alto grau de eficiência do sistema reprodutivo nas gramíneas (Miller, 1919; Heslop-Harrison, 1979a, 1979b).

De acordo com Heslop-Harrison (1979b, 1979c, 1979d) os primeiros eventos na interação entre pólen e estigma seriam a adesão, hidratação com trocas de substâncias entre pólen e estigma e conseqüente germinação do grão, pela ação de enzimas que auxiliam a degradação da parede do grão e emergência do tubo.

O tubo polínico geralmente penetra pelas discontinuidades da cutícula do tricoma, ou do corpo principal do estilo-estigma, crescendo através dos espaços intercelulares até o tecido transmissor, sem nunca invadir o tecido condutor (Kroh *et al.*, 1979, Heslop-Harrison *et al.*, 1984b).

O crescimento inicial do tubo se dá por dilatação da intina e progressivamente através da incorporação de polissacarídeos presentes em alta concentração na célula vegetativa. Internamente à parede do tubo, forma-se uma camada calósica bem desenvolvida (Styles & Singla, 1987), responsável pela reação de fluorescência que permite a visualização de tubos no interior do estigma (Currier, 1957; Dumas & Knox, 1983 e

Martin, 1959).

À medida que o tubo avança, o protoplasto das partes mais velhas é reciclado, ao contrário da parede, cuja formação se torna cada vez mais dependente de material exógeno do trato transmissor (Heslop-Harrison *et al.*, 1984b). Neste ponto podem se manifestar barreiras a cruzamentos interespecíficos, talvez por incapacidade de tubos estranhos aproveitarem as reservas do estigma, como foi sugerido ocorrer na incompatibilidade entre Zea e Sorghum, cujos tubos não crescem muito em estilo-estigmas de milho (Mock & Loescher, 1973). O crescimento independente do tubo pode atingir aproximadamente 2cm, o que é evidenciado pelo fato que, tubos que não penetram podem crescer grandes distâncias sobre os estigmas, pela absorção de água e utilização de suas reservas (Heslop-Harrison *et al.*, 1984b, Heslop-Harrison & Heslop-Harrison, 1981).

Tubos polínicos de Sorghum, colocados em estilo-estigmas de milho, crescem por distâncias muito maiores que em seus próprios estigmas, fazendo uso das reservas disponíveis no trato transmissor do estilo-estigma, mas raramente chegam ao ovário (Reger & James, 1982). Por outro lado, tubos de Pennisetum crescem pouco em estilo-estigmas de milho, indicando o uso exclusivo de suas reservas, sem atingir a fase de crescimento dependente (Heslop-Harrison *et al.*, 1984b).

Poucas horas após a germinação, o tubo polínico de milho pode atingir o saco embrionário, crescendo até os núcleos polares. Ocorre então, a dissolução da parede e um núcleo espermático se funde ao óvulo, formando o zigoto, e o outro com

um núcleo polar que imediatamente se funde a outro núcleo polar, originando o endosperma $3n$, o que ocorre de 26 a 28hs após a polinização. Segundo Kroh et al (1979) e Walden (1967), a singamia ocorreria em aproximadamente 24hs.

A quantidade de grãos de pólen que chega aos tricomas é muito grande e, como o ovário de milho é uniloculado, deve existir alguma forma de redução desse número, uma vez que a competição por água, espaço e nutrientes no interior do estilo-estigma também deve ser grande. A germinação de tubos num tricoma provoca reações que levam à oclusão de suas células e posterior morte do tricoma, reduzindo o número de tubos no início do trato transmissor (Heslop-Harrison & Heslop-Harrison, 1980; Heslop-Harrison et al, 1985). Assim que os primeiros tubos alcançam o ovário, uma camada de abscisão começa a ser formada, impedindo a passagem de tubos mais atrasados. De forma geral, a paralização dos tubos pode ocorrer principalmente em 3 sítios: na superfície do estigma, nos tecidos do estilódio e na micrópila (Heslop-Harrison, 1982).

2.2.3 FATORES QUE PODEM ALTERAR A FERTILIZAÇÃO

Vários são os fatores que podem atuar nos processos de polinização, germinação dos grãos de pólen, crescimento dos tubos, fertilização e desenvolvimento das sementes. Sabe-se que várias causas ambientais como variação na temperatura ou na umidade relativa podem alterar a viabilidade

dos grãos e a taxa de crescimento dos tubos (Lonnquist & Jugenheimer, 1943; Sprague (1967) citado em Walden, 1967). No entanto, em polinização massal, o excesso de pólen reduziria drasticamente estes efeitos, que só podem ser considerados quando pólen é fator limitante (Walden, 1967).

Por outro lado, os fatores genéticos que determinam combinações entre pólen e estigma, são os mais relevantes. Muitas características do pistilo e do gametófito masculino devem ser consideradas.

Estilo-estigmas de milho têm receptividade e durabilidade variadas, dependendo da linhagem, e de interações complexas entre o genótipo e o ambiente (Peterson, 1942; Andrew, 1952 e Walden, 1967). A idade do estilo-estigma de milho, correspondendo a diferentes estágios de maturação fisiológica, parece ter importância nos eventos de recepção do pólen, na determinação da sua habilidade competitiva e em suas conseqüentes interações. Por esse motivo, em condições normais, a idade dos estilo-estigmas por ocasião da polinização, pode ser indicada pela porcentagem de granação obtida nas espigas. De acordo com Peterson (1942), os estilo-estigmas permanecem receptivos por mais de duas semanas. O período ótimo para polinização é entre 2-8 dias, onde a granação é uniforme e acima de 90%. Após a primeira semana, a granação cai para 75% em média, atingindo 8% no 19º dia, com aumento da variabilidade entre as espigas coletadas num mesmo dia. Resultados semelhantes foram encontrados por Jones & Newell (1948) e também por Andrew (1952) em milho doce. Esse autor, mostrou ainda, não haver alteração na

granação após corte dos estilo-estigmas. Walden (1967) por outro lado, observou um aumento na granação de espigas polinizadas 24 e 48hs após o corte, provavelmente por diminuição da competição entre tubos.

A idade dos estilo-estigmas pode ter influência no crescimento diferencial de tubos próprios e estranhos, mesmo em linhagens sem efeito gametofítico. Landi & Sanguinetti (1985) observaram um favorecimento de sementes autofecundadas no intervalo de 2-6 dias de exposição, que ia decrescendo até o 10º dia, quando a taxa de fecundação cruzada passava a predominar. Isso causava uma concentração maior de sementes autofecundadas na base das espigas, visto que os estilo-estigmas inferiores amadurecem antes que os do ápice. Isso já havia sido notado por Peterson (1942), cujas espigas polinizadas no primeiro dia granavam apenas na base e as posteriores ao 10º dia, granavam somente no ápice.

Watanabe (1961) propôs que os estilo-estigmas parecem exibir diferentes estágios de maturação, gradativos da base para o ápice, condição esta que afetaria a germinação dos grãos. Em estilo-estigmas imaturos, os grãos de pólen acabam estourando, antes ou logo após a germinação.

Estudos em Lilium indicam que a idade da flor influencia o crescimento de tubos e as reações de incompatibilidade. No período de pós-ântese, entre 6-10 dias, tubos anteriormente incompatíveis, crescem tanto quanto os compatíveis, podendo formar algumas sementes. Neste caso, a suposta substância de incompatibilidade, presente na ântese e

pré-ântese, teria atividade breve e não se acumularia, permitindo às flores mais velhas formarem sementes de polinizações antes incompatíveis (Ascher & Peloquin, 1966).

É muito conhecido o poder de substâncias extraídas de estigmas de algumas espécies, como Petunia e Strelitzia, afetarem a germinação e crescimento de tubos polínicos (Martin, 1970b, 1970c). Tais extratos são geralmente compostos principalmente de misturas complexas de lipídios, que regulariam as trocas aquosas e a adesão dos grãos, e fenóis glicosilados, que forneceriam nutrientes para a germinação, proteção contra agentes agressores, além de papel no estímulo ou inibição do crescimento de tubos incompatíveis (Martin, 1970a; Konar & Linskens, 1966 citado em Martin, 1970a):

Extratos estigmáticos de milho não diferem dos das outras espécies. Foram encontrados mais de 30 componentes, sendo os lipídios e os fenóis glicosilados, os mais abundantes (Martin, 1969, 1970a).

Rosen (1961) relatou a estimulação da germinação e crescimento de tubos, in vitro, por exudatos da superfície estigmática de Lilium. Por outro lado, a adição de extratos de estigmas de várias espécies, inclusive milho, ao meio de crescimento de tubos de Crinum asiaticum, provocou inibição geral do crescimento em vários níveis (Martin & Ruberté, 1972).

Em Lilium nenhum outro tecido, nem outras partes do pistilo, mostraram atividade sobre o crescimento dos tubos. Parece que tais substâncias devem estimular o crescimento de tubos compatíveis e também estar relacionadas à inibição dos

incompatíveis. No outro caso, os extratos devem agir seletivamente, inibindo a germinação in vivo, em diferentes graus, de espécies não relacionadas taxonomicamente. Os estigmas não somente forneceriam condições apropriadas à germinação e desenvolvimento dos grãos de pólen, mas também inibiriam a germinação de grãos de muitas espécies não relacionadas, ocasionando vários tipos de isolamento reprodutivo.

Grandes variações no diâmetro de grãos de pólen podem causar problemas de fecundação. Essa característica em milho pode ser influenciada por vários fatores, tanto genéticos quanto ambientais, como umidade do solo, temperatura e nutrição (Linskens, 1964).

Alguns autores apontaram diferenças no diâmetro dos grãos de uma mesma linhagem, entre diferentes dias de coleta e entre grãos de anteras de diferentes posições na panícula, o que foi contestado pelos experimentos de Pfahler (1973) e Kumar & Sarkar (1983). Neste último trabalho, foram encontradas diferenças apenas entre linhagens de diferentes genótipos, entre anos de experimentação e diferentes localidades, sem interação entre estes fatores. Concluíram então, que o diâmetro do grão de pólen é um caráter estável para uma determinada linhagem, altamente herdável e controlado pelo genótipo do parental feminino, ao contrário de Johnson et al (1976) que afirmou que o diâmetro era influenciado pelo genótipo do gametófito.

Parece ainda que o diâmetro do grão não tem correlação com a taxa de crescimento de tubos de milho in vivo, já que algumas linhagens de pequeno diâmetro mostraram alta taxa

de crescimento, embora em meio artificial a correlação fosse positiva, e tubos de diâmetro semelhante exibiram taxas de crescimento diferentes (Aguirre & Kato, 1979; Kumar & Sarkar, 1980, 1985 e Ottaviano *et al*, 1982).

Relação íntima existe entre o diâmetro do grão e o diâmetro do tubo. Uma vez que os tubos devem penetrar e crescer no tecido transmissor pelos espaços intercelulares, provavelmente comprimindo mecanicamente as células para forçar sua passagem, grandes diferenças entre o diâmetro do tubo e os espaços intercelulares, características de cada linhagem ou espécie, poderiam oferecer barreiras mecânicas à fecundação (Kroh *et al*, 1979 e Heslop-Harrison, 1982).

A inibição de tubos de milho em estigmas de sorgo parece ser a causa do isolamento entre estas duas espécies, provavelmente pela dificuldade dos tubos de milho, de diâmetro duas vezes maior, crescer pelos espaços intercelulares e entrar na micrópila (Laurie & Bennett, 1989).

Como o número de grãos de pólen produzidos é extremamente superior ao número de óvulos, a competição entre os gametófitos masculinos deve representar papel importante na fertilização. A polinização abundante resulta geralmente em progênes mais uniformes e eliminação das formas mais extremas, além de diminuir o tempo entre germinação e fertilização, contribuindo favoravelmente para o processo adaptativo das espécies (Ter-Avanesian, 1978)

O estilo-estigma pode funcionar como filtro para a quantidade de tubos, no momento da transição entre crescimento

autônomo e dependente. Se o tubo precisa de substrato para crescer, as diferenças na capacidade competitiva podem ser causadas por diferenças na capacidade de induzir respostas metabólicas no estigma ou pela incapacidade de aproveitar os produtos que possam ser liberados (Sari Gorla et al, 1976).

O genótipo da planta receptora de pólen tem papel na determinação da capacidade de competição dos grãos e taxa de crescimento dos tubos. Embora seja característica determinada pelo gametófito masculino, esta pode ser aumentada ou diminuída de acordo com o tecido estilar onde cresce, caracterizando um dos muitos tipos de interação entre pólen e estigma (Pfahler, 1967; Sari Gorla et al, 1975; Sari Gorla & Bellintani, 1976). Grãos de genótipo mais competitivo num determinado tipo de estilo-estigma tenderam a manter a competitividade em outros tipos, variando somente a vantagem relativa de um tipo de genótipo de pólen para outro (Sari Gorla et al, 1976).

Vários trabalhos indicam grandes diferenças na capacidade de fertilização de grãos de diferentes genótipos. Pfahler (1965) conclui que o fator que mais parece influenciar tais diferenças é a relação genética entre a planta receptora e a doadora de pólen. Pólen da mesma fonte que a fêmea se mostrou muito mais eficiente na fertilização que pólen de "background" diferente. Deste modo, em populações de fecundação cruzada predominante, deveria haver alto grau de autofecundação, uma vez que esta se mostrou mais eficiente.

Sari Gorla & Rovida (1980) caracterizaram a capacidade de fertilização como sendo um caráter complexo,

resultando da expressão de genes do esporófito e do gametófito masculino, de influências mútuas do estigma e do tubo, e afetado pela composição da população de grãos de pólen que competem num mesmo estigma.

Os efeitos de interação entre tipos de pólen são claros na incompatibilidade. A aplicação, em estigmas de Nicotiana, de misturas de pólen incompatível com compatível inativado por irradiação, permitiu um aumento da fecundação dos tubos incompatíveis. Tem sido proposto, por alguns pesquisadores, que no sistema esporofítico de auto-incompatibilidade, pólen compatível inativado forneceria as substâncias específicas de reconhecimento aos tubos incompatíveis, tornando-os compatíveis na mistura (Pandey, 1977).

2.2.4 MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA

Esse tipo de análise permite a observação do desenvolvimento de tubos polínicos no interior dos estigmas, sua dinâmica e sítio de bloqueio durante as reações incompatíveis (Dumas & Knox, 1983).

A técnica é baseada na apreensão seletiva de substâncias fluorescentes, que emitem luz ao serem irradiados com luz UV (350-400 μm), principalmente pela calose (Martin, 1959; Kho & Baer, 1968). A calose é um polissacarídeo de 1,3 β -glucanos, semelhante à celulose, que aparece em vários tecidos vegetais e parece ter papel junto ao equilíbrio hídrico das

células. Acúmulos de calose são encontrados nos tecidos condutores, principalmente nas regiões de senescência, e em células epidérmicas, marcando reações contra agentes agressores. Pode também ser facilmente observada em grãos de pólen em germinação e nas paredes do tubo polínico, o que permite sua visualização no interior dos estigmas (Currier, 1957). No entanto, a deposição desta substância mostrou ser mais intensa durante as diferentes formas de reação de incompatibilidade entre tubos polínicos e tecido estigmático, marcando o sítio de interrupção dos tubos e tornando-os muito mais evidentes que os tecidos que tem calose mas não participam da reação, como por exemplo, os tecidos condutores (Martin, 1959).

Estudos sobre auto-incompatibilidade e cruzamentos interespecíficos em gramíneas, mostram que os tubos polínicos são interrompidos na superfície do estigma, logo após a germinação (Mock & Loescher, 1973; Shivanna *et al.*, 1978). Nos cruzamentos entre espécies relacionadas, importantes para aumentar a variabilidade genética, a intensidade da reação parece variar de acordo com a distância taxonômica entre as espécies, embora o fenótipo da reação seja muito semelhante ao da auto-incompatibilidade. Já os cruzamentos intergenéricos, mostram resposta muito diversificada (Dumas & Knox, 1983).

De modo geral, as respostas diferem quanto à origem da auto-incompatibilidade. Nos sistemas esporofíticos, ocorre reação no estigma e no pólen, pois a rejeição se faz rapidamente, na superfície do estigma. Nos sistemas gametofíticos, a calose aparece no grão de pólen e principalmente

no tubo, uma vez que a rejeição ocorre no interior do estigma (Heslop-Harrison, 1975; Nasrallah & Nasrallah, 1986).

O monitoramento do tipo de reação entre tubo e estigma e seu sítio, podem definir o tipo de incompatibilidade presente e inclusive auxiliar na determinação de pares de progênies compatíveis para cruzamento em campo.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Todo o trabalho de campo, envolvendo cruzamentos e experimentos, foi realizado na Área Experimental do Laboratório de Genética de Milho da Universidade Estadual de Campinas, S.P., situada a 22º 54' de latitude Sul, em solo do tipo latossolo roxo distrófico. O período de realização dos experimentos se estendeu de Janeiro de 1988 a Dezembro de 1990.

3.1 GERMOPLASMA

As seguintes linhagens homozigóticas sintetizadas no Departamento, foram usadas para a instalação dos vários experimentos programados. São elas:

L222 - é a linhagem que deu a motivação para a realização do presente estudo, por revelar uma forte reação de incompatibilidade à pólen estranho. É derivada da variedade Cuban Yellow Dent, e apresenta endosperma normal amarelo dentado.

L222 wx - é a linhagem L 222, acima citada, porém com a mutação "waxy", no cromossomo IX, que acarreta mudança na composição do amido do endosperma.

Neste caso, o amido é constituído de 100% de amilopectina, ao invés de aproximadamente 75% do endosperma normal, o que deixa a semente com aparência opaca característica, facilmente distinguível do grão normal, cujo amido é complementado de 25% de amilose, composição essa que lhe dá um aspecto vítreo.

As plantas de L222 "waxy" são geralmente mais precoces, mais vigorosas, mais altas e de espigas maiores que a linhagem L222 original. Talvez pela alteração da composição química do grão, a L222 wx tornou-se mais suscetível à fungos, principalmente Fusarium moniliforme, que a linhagem L222 normal.

L902 - Linhagem extraída da variedade Assis Brasil, da raça Cateto, de endosperma flint laranja. Esse tipo de linhagem não apresenta espigas muito desenvolvidas, devido ao tipo de morfologia do grão e da espiga dos tipos Catetos.

L910 - Linhagem isolada da cultivar Asteca Prolífico, população melhorada da variedade sintética Asteca, de endosperma dente amarelo, procedente de germoplasma de baixa altitude do Golfo do México, da raça Tuxpeño.

L937 - Linhagem derivada da cultivar Asteca original, de endosperma dente amarelo, sintetizado de linhagens da raça Tuxpeño, de germoplasma da região de San Luis de Potosi, Costa Atlântica do México.

Apesar de L910 e L937 terem sido derivadas de uma mesma cultivar e possuírem algumas características morfológicas comuns, estas duas linhagens são geneticamente muito distintas, a ponto de apresentarem alta heterose quando cruzadas. Esse é um efeito comumente encontrado em linhagens da raça Tuxpeño. Essas diferenças justificam o uso destas duas linhagens de mesma origem no presente estudo.

L 78 Normal - Linhagem derivada da cultivar Nutrimaiz, que é um sintético derivado de 87,5% de Maya e 12,5% de Pajimaca, com endosperma do tipo amarelo meio dente (Silva *et al*, 1978).

L 60 Normal - Linhagem também obtida de Nutrimaiz com endosperma meio dente.

Embora sejam linhagens da mesma população, L78 e L60 apresentam características distintas e revelam alta heterose ao serem cruzadas.

L903 (BC/PIG) - Linhagem também derivada da raça Cateto, portanto de endosperma flint laranja.

Apresenta um marcador genético no loco R, responsável pela produção de antocianina na aleurona, em presença dos genes A₁, A₂ e C. O alelo marcador é o gene R^{nj}, denominado "Navajo", que além de produzir antocianina no ápice das sementes, acumula o pigmento roxo também no eixo embrionário.

Todas estas linhagens foram obtidas e vêm sendo mantidas, por várias gerações, através de autofecundação na coleção de Germoplasma do Departamento de Genética Vegetal da Universidade de Campinas, pelo Prof. Dr. William José da Silva.

3.2 ANÁLISE GENÉTICA

3.2.1 Famílias de Cruzamento:

Para o estudo de compatibilidade de tubos polínicos de várias linhagens em estilo-estigmas de L222, foram efetuados vários cruzamentos envolvendo as seguintes linhagens: L222 e as linhagens testadoras L902, L910, L937, L78 e L60.

Neste caso, a L222 e as cinco linhagens testadoras, com seus derivados; os cruzamentos F₁, F₂ e retrocruzamentos, foram utilizados para comparar o comportamento

destas progênies com relação à atividade gametofítica e compatibilidade entre estilo-estigmas da L222 e tubos polínicos das linhagens testadoras. Como exemplo das várias famílias estudadas consideremos, a fim de ilustração, apenas aquelas derivadas da L902 para demonstrar a simbologia usada nas várias famílias que participaram da análise genética. São elas:

- L222 - Linhagem mantida por autofecundação.
- L902 - Linhagem mantida por autofecundação.
- F₁ (902x222) - Híbrido simples entre L902 e L222, no qual a linhagem L902 foi usada como fêmea.
- F₂ (902x222) - Derivada da autofecundação do F₁(902x222).
- 902 (BC/222) - Corresponde ao primeiro retrocruzamento do F₁(902x222) com a linhagem L902, tomando o F₁ como fêmea.
- 222 (BC/902) - Corresponde ao retrocruzamento do F₁(902x222) com a linhagem L222, tomando o F₁ como fêmea.

As gerações F₂ e os retrocruzamentos foram sintetizados em Guaira, Estado de São Paulo, por cortesia do biólogo João Rosolen, em época do ano desfavorável para se fazer os cruzamentos na latitude de Campinas. O material foi plantado em Abril de 1988, a partir de sementes das cinco linhagens testadoras, L222 e seus respectivos F₁, multiplicados e sintetizados no verão anterior, na UNICAMP. O objetivo deste plantio fora de época foi de economizar tempo e obter sementes de

todas as famílias com a mesma idade fisiológica, fator importante para a comparação dos resultados.

As famílias em estudo, foram então plantadas em Dezembro de 1988 numa área de aproximadamente 4.000 m², em delineamento inteiramente casualizado com 3 a 5 repetições. A parcela experimental foi constituída de 1 linha de 10m com espaçamento de 1,0m x 0,40m com o "stand" ideal de 50 plantas por linha. Essas parcelas receberam em média, uma adubação equivalente a 80-80-40 Kg de Nitrogênio, P₂O₅ e K₂O por hectare. Cada família foi representada por 4 parcelas.

As progênies foram plantadas no campo, e cruzadas como fêmea e como macho, de acordo com as combinações apresentadas no quadro abaixo, que mostra apenas os cruzamentos realizados com a linhagem L902.

Macho	Fêmea					
	L222	L902	F ₁	F ₂	902(BC/222)	222(BC/902)
L222	(X)	X	X	X	X	X
L902	X	(X)	X	X	X	X
F ₁ (902x222)	X		(X)			
F ₂ (902x222)	X			(X)		
902(BC/222)	X				(X)	
222(BC/902)	X					(X)

(X) Significa progênie autopolinizada, que foi utilizada como controle experimental para a análise do efeito gametofítico.

Essas mesmas progênies foram feitas e analisadas envolvendo L222 e cada uma das linhagens L910, L937, L78 e L60, totalizando 100 tipos de cruzamentos, cujas espigas foram analisadas de acordo com o padrão de granação. Este foi dividido em quatro classes progressivas que permitiram quantificar visualmente e analisar estatisticamente os resultados, na tentativa de explicar o efeito gametofítico presente na linhagem L222 e em suas gerações derivadas. Os limites utilizados para a divisão nas diferentes classes de granação estão na Tabela abaixo e representados na Figura 1:

Classe	Padrão de Granação
0	Espiga com até 3 grãos.
1	Espiga com mais de 3 grãos dispersos ao longo de toda a espiga, sem formação de fileiras
2	Espiga granada, com formação de muitas fileiras, apresentando no entanto, falhas ao longo de sua extensão.
3	Espiga totalmente granada, de modo uniforme, sem levar em conta falhas na granação devidas à idade precoce ou avançada do estilo-estigma (grãos somente no ápice ou na base) ou danos causados por ataques de lagartas ou dobras nos estilo-estigmas (faixa sem grãos).



Figura 1. Da esquerda para a direita, pares de espigas da linhagem L222 classificadas como classe 0, 1, 2 e 3.

Concomitantemente, as espigas de cada tipo de progênie foram analisadas com relação ao comprimento da espiga e ao comprimento de sequências contínuas de grãos, bem como o número de sementes nestes intervalos. Das espigas bem granadas, pertencentes à classe 3, foram analisadas as seguintes variáveis adicionais: número de fileiras e número de grãos num determinado comprimento de uma fileira, que variou, dependendo do tamanho da espiga, de 3-10 cm.

Como o tamanho dos grãos pode variar dentro de uma mesma espiga, foram contadas 5 fileiras por espiga, que em média, resultou no número de grãos/cm/fileira, de cada espiga amostrada. Procedeu-se então, uma análise de regressão linear para determinar a quantidade de grãos/cm característico para cada linhagem e cruzamentos derivados autofecundados. Para a linhagem L902, por exemplo, foram amostradas espigas autofecundadas das seguintes gerações: L222, L902, F_1 (902x222), F_2 (902x222), 902 (BC/222) e 222 (BC/902).

Determinado o coeficiente de regressão (n^o grãos/cm), sempre baseado na linhagem que atuou como fêmea nos cruzamentos, este foi multiplicado pelo número médio de fileiras característico da linhagem ou cruzamento derivado, e pelo tamanho de cada espiga, estimando-se o número de grãos que estas apresentariam se estivessem totalmente granadas. O próximo passo foi comparar esta estimativa com o número de grãos observado para cada espiga, determinando a porcentagem observada de granação.

A análise de variância dos dados de porcentagem de granação, foi feita a partir dos dados transformados para arco.

arco.seno \sqrt{x} individualmente para cada família de cruzamento, e em análise conjunta, assim como o teste de Tukey para as médias.

Efetuuou-se também uma análise de correlação entre a porcentagem de granação assim calculada e a classe de granação atribuída a cada espiga, para se conhecer a vantagem de cada método e seu significado.

3.2.2 Teste de Alelismo:

A fim de se confirmar se o forte efeito gametofítico de L222 é condicionado pelo loco G_a , do cromossomo IV, cruzou-se a linhagem L222, como fêmea, com estoques marcadores de G_a . Um contendo o gene G_a , em linhagem também homozigota para o gene su , denominada F_3 ($902 \times G_a_1 su$). E outra, designada POP 150 (HPXD-1), população de pipoca homozigota para o gene G_a^B . A linhagem L222 foi também cruzada com a população Pajimaca que é homozigota para o gene su , mas sem evidência da presença de G_a .

Nestes cruzamentos, plantas da linhagem L222 receberam pólen dos estoques de mutantes, que mostram vários graus de dificuldade de granação das espigas quando recebem pólen de linhagens de milho normal.

Esses testes, amplamente utilizados em genética, permitem determinar se o mutante em questão é igual a um dos presentes nos estoques marcadores. Desta forma, o cruzamento de L222 com estoques possuindo diferentes alelos Ga, apontaria a presença de alelos Ga ou Ga^s em L222, através da formação de espigas bem granadas.

As linhagens foram plantadas em Fevereiro e Abril de 1990, na Coleção de Germoplasma do Departamento, e foram polinizadas em cruzamentos recíprocos. As espigas foram colhidas em Maio e Julho, com alto teor de umidade, e secas em estufa para reduzir a ação de fungos parasitas. Foram então, analisadas quanto ao padrão de granação e identificação do fator gametofítico.

3.3 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO GENE GAMETOFÍTICO

Esta análise compreendeu uma série de experimentos visando testar várias hipóteses, que poderiam esclarecer o perfil temporal e espacial da ação gametofítica pronunciada da linhagem L222. Os seguintes testes foram realizados:

3.3.1 Efeito da idade do estilo-estigma na reação gametofítica:

Esse experimento foi efetuado para testar se o forte efeito gametofítico presente na linhagem L222 seria alterado no decorrer do desenvolvimento das espigas. A incapacidade de tubos polínicos de outras linhagens crescerem em estilo-estigmas da L222 poderia ser causada pela ação de substâncias inibidoras, produzidas pelos estilo-estigmas. Tais substâncias poderiam ser alteradas ao longo da idade dos estilo-estigmas e desse modo, mudar a expressão dos genes gametofíticos.

Neste experimento foram utilizadas as seguintes linhagens: L222, como receptora de pólen, e as linhagens L902, L910, L937, L 78 e L 60 , como doadoras de pólen.

Com esse objetivo, foram plantadas 20 linhas de 10m da linhagem L222, subdivididas em 5 grupos de plantas receptoras de pólen de cada uma das cinco linhagens testadoras.

Cada linha do grupo recebeu um tratamento diferente, correspondendo a quatro estágios fisiológicos distintos de maturação dos estilo-estigmas, como segue:

1- Estilo-estigma cortado:

As espigas foram cortadas, antes da emergência dos estilo-estigmas, a 1 ou 2 cm da extremidade de suas brácteas e a polinização foi feita 24h após, com as linhagens testadoras. Este tratamento envolveu espigas mais imaturas, com estilo-estigmas ainda não expostos.

2- Estilo-estigma de 2cm:

As espigas foram polinizadas quando os estilo-estigmas estavam com aproximadamente 2cm de comprimento. Em alguns casos, as espigas com poucos estilo-estigmas expostos foram cortadas e polinizadas após 48h, para atingir estágio correspondente.

3- Estilo-estigma de 5cm:

Da mesma forma que o tratamento anterior, porém polinizadas quando os estilo-estigmas estavam aproximadamente com 5 cm, portanto mais velhos que os anteriores. Neste estágio, as espigas estavam completamente desenvolvidas, com todos os estilo-estigmas expostos, e portanto no estágio ideal para produzir granação total (Peterson, 1942).

4- Estilo-estigma velho:

A polinização foi realizada em estilo-estigmas espessos, enrolados e de coloração alterada, no final do período de florescimento.

3.3.2 Efeito de estímulos do pólen da L222 na ação gametofítica desta linhagem:

A fim de verificar se grãos de pólen da linhagem L222 produzem algum tipo de estímulo em seu próprio estilo-estigma, que poderia amenizar o efeito gametofítico contra tubos polínicos de outras linhagens, foram realizados dois tipos de experimentos:

3.3.2.1 Efeito de estímulo transitório:

Neste experimento utilizou-se a linhagem L222, como receptora de pólen, e a linhagem L903 (BC/PIG), como doadora de pólen, para testar se o contato ou a germinação de grãos de pólen da L222 em seus estilo-estigmas, poderia estimular e permitir o crescimento de tubos polínicos que sofrem inibição.

Espigas de L222 foram polinizadas com pólen de uma linhagem contendo um marcador genético dominante de endosperma, o alelo "Navajo", R^{nj} , que torna o ápice das sementes e o eixo embrionário roxos, tornando-os facilmente distinguíveis das sementes normais de L222, incolores para esse pigmento (Kumar & Sarkar, 1987).

Para tanto, foram plantadas 10 linhas de 10m de comprimento da linhagem L222, cujos estilo-estigmas foram

reunidos num feixe semelhante a um pincel e mantidos presos por fita adesiva. Em seguida, a ponta foi aparada com tesoura e apenas a superfície do feixe de estilo-estigmas foi polinizada por pólen da linhagem L222, com o auxílio de um pincel, tomando o cuidado de não expor as partes inferiores dos estilo-estigmas ao pólen. Após 30min, o feixe de estilo-estigmas foi novamente cortado aproximadamente 2 cm abaixo da superfície polinizada, e foi aplicado na nova superfície, pólen da linhagem L903 (BC/PIG) contendo o gene marcador Navajo. Este tratamento foi denominado Navajo. Como controle, foram utilizados dois tratamentos. Em um primeiro, a linhagem L222 teve os estilo-estigmas cortados, como acima, sem que estes recebessem pólen próprio e após 30min, foi polinizada com pólen "Navajo". Este tratamento controle foi denominado "C" e serviu para indicar o efeito do estímulo do pólen da L222 na inibição de tubos polínicos do estoque Navajo. No segundo, a linhagem L222 foi também polinizada com pólen "Navajo" sem qualquer preparo prévio dos estilo-estigmas. Esse controle foi denominado "CB", e serviu para verificar a presença de efeito gametofítico contra pólen do estoque Navajo.

3.3.2.2 Efeito de estímulo persistente:

Trabalhos como o de Pandey (1977) têm mostrado que em experimentos de misturas de pólen, um determinado tipo de

pólen pode facilitar o crescimento de tubos polínicos estranhos, antes impedidos de se desenvolverem nos estilo-estigmas.

Para testar se a produção de algum estímulo exige a presença contínua de tubos polínicos próprios, beneficiando o crescimento de tubos estranhos, plantas da L222wx receberam pólen das linhagens L902, L910, L937, L78 e L60, todas com o gene Wx (normal), em misturas de pólen com a linhagem L222wx. Para tanto, foram coletados, em sacos de papel, pólen de cada uma das linhagens-teste e da L222wx. Em seguida, o pólen de todas as linhagens foi peneirado para a retirada das anteras, e misturado na proporção de 1:1 em volume com pólen da L222wx. Essas cinco misturas foram então depositadas com a ajuda de um pincel nos estilo-estigmas da L222wx, previamente cortados para facilitar a operação e dar oportunidade aos estilo-estigmas de receberem grãos de pólen no mesmo ponto.

Essa técnica de mistura de pólen com uso de gene marcador, no caso o gene wx, permite a visualização da formação de grãos provenientes de autofecundação e de fertilização cruzada com base no tipo de endosperma das sementes produzidas. A ocorrência de grãos normais, ou brilhantes, indica que grãos de pólen das linhagens testadoras venceram as barreiras gametofíticas da L222wx e fecundaram seus ovários, em consequência de algum processo que foi estimulado pela presença de grãos de pólen próprios na mistura, assim como ocorre nos casos com pólen mentor (Pandey, 1977). Como a planta mutante é homocigota recessiva, wxwx, as sementes normais serão heterocigotas e terão endosperma Wxwxwx, brilhante. Do mesmo

modo, o aparecimento de grãos cerosos, de endosperma wwxwx, indicarão a ocorrência de autofecundação.

Foram polinizadas um mínimo de 18 espigas da L222wx em cada um dos cinco tratamentos, que receberam pólen das cinco linhagens testadoras em mistura com L222wx. A frequência de grãos normais foi calculada em cada espiga. Como controle, foram realizados pelo menos 20 cruzamentos de L222wx, como fêmea, com cada uma das cinco linhagens-teste e sem mistura de pólen, com o objetivo de confirmar a presença do efeito gametofítico na linhagem mutante L222wx. Num outro tratamento utilizou-se mistura de pólen de L222 e L903, com o alelo marcador Navajo, na tentativa de verificar se a presença de pólen próprio facilitaria a fecundação com pólen estranho, R^{nj}, cuja semente produzida, de ápice roxo, é facilmente distinguível da semente brilhante resultado da fertilização com pólen de L222.

3.3.3 Medida do diâmetro do grão de pólen:

Para esse experimento as seguintes linhagens foram avaliadas para diâmetro do grão de pólen: L222, L222wx, L902, L910, L937, L78 e L60, para testar a hipótese de que não existem diferenças no diâmetro dos grãos de pólen, entre as diferentes linhagens, que poderiam ser responsáveis por impedimentos mecânicos à fecundação em L222, como foi sugerido por Laurie &

Bennett (1989) para cruzamentos interespecíficos em milho. Foram coletados grãos de pólen de 10 plantas, por linhagem, escolhidas ao acaso. De cada planta foi montada uma lâmina, onde os grãos eram colocados sobre uma gota de água destilada, com o auxílio de um pincel e destas, foram medidos 20 grãos em microscópio munido de ocular graduada.

Através de Análise de Variância e Teste de Tukey foi feita a comparação entre as medidas de diâmetro de cada linhagem, em dois anos consecutivos, para verificar possíveis alterações de diâmetro em consequência de alterações ambientais.

3.3.4 Microscopia de Fluorescência:

Para testar a hipótese de que tubos polínicos estranhos não penetram e/ou crescem nos estilo-estigmas de L222, como ocorre normalmente em cruzamentos incompatíveis em outras gramíneas, esta linhagem recebeu pólen de duas linhagens testadoras de grupos diferentes: uma derivada da Cultivar Nutrimaiz, L60, e outra originada da raça Cateto, de endosperma flint laranja, L902.

Esse tipo de microscopia permite visualizar, a fresco, tubos polínicos no interior de estilo-estigmas e acompanhar seu desenvolvimento. Os estilo-estigmas de L222 polinizados com pólen próprio foram utilizados como controle

experimental. Após a polinização em campo, as espigas foram colhidas em intervalos de 5 hs, constituindo os tratamentos de 5, 10, 15, 20 e 25 hs, em três repetições distintas. Esses intervalos foram escolhidos porque resultados preliminares em nosso trabalho mostraram que por volta de 16 hs, começavam a ocorrer diferenças entre o crescimento de tubos polínicos das linhagens testadoras e os tubos da linhagem L222.

O procedimento para a preparação do material foi o seguinte, modificado de Martin (1959):

- Fixação das espigas em FAA 80% (5 Formalina:5 Ác. Acético:9 Etanol 50%) por, no mínimo, 24 horas.
- Incubação do material - Estilo-estigmas destacados tratados com NaOH 9N à 50 °C por aproximadamente 30 min, para obter tecidos mais transparentes e macios.
- Lavagem do material em água destilada, trocada a cada 15 minutos, durante um mínimo de 1 hora, até desaparecerem os sinais de NaOH do meio.
- Coloração em solução aquosa de Aniline Blue 0,1% em K_3PO_4 0,1N, por no mínimo, 15 horas.
- Montagem do estilo-estigma em lâmina com uma gota de corante e leve esmagamento sob lamínula.
- Observação feita imediatamente após o preparo, em microscópio Zeiss com luz UV, sem filtro seletor para λ específicos.

Em cada lâmina foi marcado o local aproximado de interrupção dos tubos, e a distância deste ponto até o ápice do estilo-estigma, bem como o comprimento total deste, medido com o

auxílio de um barbante fino.

Os tubos polínicos geralmente apresentam forte reação de calose, que sob este tratamento, fluorescem em verde intenso contra o fundo opaco do estilo-estigma. Desta forma, pode-se visualizar como tubos polínicos próprios e das diferentes linhagens testadoras se comportam nos estilo-estigmas de L222. É possível também, acompanhar o crescimento dos tubos desde a sua entrada no tricoma, até sua entrada no ovário, bem como determinar onde ocorre sua interrupção.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO:

4.1 ANÁLISE GENÉTICA:

4.1.1 Linhagem L222 como fêmea de famílias com frequência variada de genes da L222:

O comportamento geral de granação da linhagem L222 como receptora de pólen das várias famílias derivadas da L222 é mostrado na Tabela 1. O emprego da L222 como fêmea das linhagens testadoras L902, L910, L937, L78 e L60, resultou em quase absoluta ausência de grãos, variando de 85,7 a 100% de espigas da classe 0, indicando a presença de efeito gametofítico extremamente forte em estilo-estigmas da L222 contra tubos polínicos das linhagens testadoras. Isso fica claramente caracterizado nos cruzamentos recíprocos envolvendo os mesmos parentais, tendo a L222 como macho, onde houve formação de espigas perfeitamente granadas. Nos cruzamentos em que a linhagem L222 recebeu pólen de plantas das famílias derivadas dela com as linhagens testadoras, a L222 mostrou grau variado de compatibilidade, formando espigas com granação também variada, de acordo com a frequência de genes da L222. O comportamento da linhagem L222 foi semelhante ao descrito por Demerec (1929), Schwartz (1950) e Nelson (1952) em milho pipoca. Segundo estes trabalhos, a maioria das variedades de pipoca possuem o gene Ga^S , que provoca o bloqueio de tubos polínicos ga , presente em todas as variedades de milho normal, mesmo na ausência de competição

Tabela 1. Tipo de granação em espigas resultantes do cruzamento da L222 com progênies derivadas de seu cruzamento com as cinco linhagens testadoras. Neste caso, a L222 atuou como fêmea.

Fonte de Pólen	Total de Espigas	Classes de Granação				Porcentagem da Classe 0
		0	1	2	3	
L222	297	13	74	107	103	4,38
L902	21	18	02	01	0	85,71
F ₁ (902x222)	43	0	02	17	24	0,00
F ₂ (902x222)	69	04	08	21	36	5,80
902 (BC/222)	62	28	08	18	08	45,16
222 (BC/902)	74	02	13	24	35	2,70
L910	57	56	01	0	0	98,25
F ₁ (910x222)	57	01	15	29	12	1,75
F ₂ (910x222)	100	05	22	53	20	5,00
910 (BC/222)	35	19	01	11	04	54,29
222 (BC/910)	69	0	16	33	20	0,00
L937	35	33	02	0	0	94,29
F ₁ (937x222)	55	02	16	20	17	3,64
F ₂ (937x222)	79	09	16	34	20	11,39
937 (BC/222)	58	35	03	15	05	60,34
222 (BC/937)	64	0	08	36	20	0,00
L78	19	18	01	0	0	94,74
F ₁ (78x222)	44	03	11	19	11	6,82
F ₂ (78x222)	84	09	08	35	32	10,71
78 (BC/222)	85	44	09	21	11	51,76
222 (BC/78)	81	04	15	38	24	4,94
L60	24	24	0	0	0	100,00
F ₁ (60x222)	54	03	15	28	08	5,56
F ₂ (60x222)	61	11	08	27	15	18,03
60 (BC/222)	47	24	08	10	05	51,06
222 (BC/60)	54	0	11	22	21	0,00

com tubos Ga^S .

Desta forma, a L222 seria uma linhagem incomum de milho normal por possuir um gene gametofítico, provavelmente do tipo Ga^S , ao invés de ga , presente em todas as linhagens de milho comum. Genes Ga diferem do gene provavelmente presente em L222, uma vez que grãos de pólen ga fertilizam normalmente estilo-estigmas $GaGa$, só ocorrendo inibição de seus tubos na presença de competição com tubos de genótipo Ga (Demerec, 1929). Como visto, nos estilo-estigmas da L222 qualquer tipo de grão de pólen de milho normal é bloqueado, independente da presença de competição com seu próprio pólen. Assim, o gene que está presente em L222 apresenta fenótipo do tipo Ga^S e não do tipo Ga . Se a herança destes genes é do tipo mendeliana, como se postula, é esperado que quanto maior for a contribuição da L222 para a formação de uma determinada progênie, maior deverá ser a granação das espigas resultantes de seu cruzamento com pólen dessas progênies, pois mais grãos de pólen do tipo Ga^S seriam produzidos pelas plantas. Os dados da Tabela 1 parecem estar de acordo com essa suposição. Tanto os F_1 , F_2 e 222(BC/L), que formam no mínimo 50% de gametas Ga^S , apresentaram alta taxa de espigas bem granadas, acima de 80%, principalmente das classes 2 e 3, para todas as linhagens testadoras. A produção de no mínimo metade dos grãos de pólen com gene do tipo Ga^S e a polinização com excesso de pólen deverter contribuído para a boa granação das espigas.

As menores porcentagens de espigas granadas, entre 0 e 5%, foram obtidas nos cruzamentos entre L222 e as linhagens

testadoras, como era esperado, uma vez que as últimas só produzem grãos de pólen ga , incapazes de fertilizar os estilo-estigmas do tipo $Ga^S Ga^S$ da L222. O aparecimento de algumas espigas com poucas sementes poderia ser resultado de contaminação por grãos de pólen do tipo Ga^S , no momento da polinização, visto que as progênes foram plantadas próximas umas das outras e da L222.

Embora a polinização artificial seja rápida, pode ocorrer a entrada de pólen estranho pela ação do vento forte, de insetos que se alimentam de pólen, ou por furos não notados nos sacos de proteção das espigas. A taxa de contaminação é difícil de ser avaliada, a não ser em casos onde há a presença de genes marcadores. Contudo, no caso da L222, a baixa frequência de contaminação por seu próprio pólen, do tipo Ga^S , fica aparente em campos isolados onde a L222 é despendoada, uma vez que é forte o bloqueio a todo tipo de pólen estranho.

Uma porcentagem intermediária de granação, em torno de 40-55%, foi observada nos cruzamentos da L222 com os retrocruzamentos para as linhagens testadoras. Neste caso, ocorreria formação de baixo número de grãos de pólen do tipo Ga^S , devido à baixa frequência da contribuição de genes da L222 para a formação da progênie, mas que poderia ser suficiente para superar a grande quantidade de grãos ga e formar até espigas da classe 3. Portanto, o simples fato de haver produção de certa porcentagem de grãos de pólen do tipo Ga^S na progênie, já tornaria seu cruzamento com L222 pelo menos parcialmente fértil, sendo o retrocruzamento para a linhagem testadora, a progênie menos produtiva, em termos de granação.

A Tabela 2, por outro lado, apresenta o comportamento de granação das progênies da L222, usadas como fêmeas, frente à polinização com suas respectivas linhagens testadoras. O cruzamento que se mostrou mais incompatível, depois do cruzamento da L222 com as linhagens testadoras, foi o do tipo 222(BC/L)x L, com mais de 60% de espigas da classe 0 nas polinizações com L910, L937 e L60, 51% com a L902 e 43% com a L78. Esse comportamento seria o esperado se essa característica mostrasse segregação mendeliana para um loco, pois a progênie deveria ser formada de 50% de plantas com genótipo Ga^Sga , que deveria, portanto, aceitar pólen do tipo ga . No mesmo raciocínio, o retrocruzamento para a linhagem testadora, L(BC/222) deveria produzir plantas do tipo Ga^Sga e $gaga$ em igual proporção, sendo que ambas aceitariam pólen ga vindo das linhagens testadoras. Os dados observados também confirmam esta hipótese, pois esse foi o cruzamento mais compatível em todas as famílias, formando menos de 12% de espigas da classe 0, exceto para L902, que formou 25% de espigas desta categoria.

Igualmente, o F_2 deveria segregar 1/4 das plantas com genótipo do tipo Ga^SGa^S , que não permite crescimento de tubos ga , 1/2 do tipo Ga^Sga e 1/4 $gaga$, que recebem normalmente pólen do tipo ga . Desta forma, 75% das plantas F_2 segregantes cruzadas com as linhagens testadoras deveriam formar espigas granadas, o que está de acordo com os dados da Tabela 2, pois a porcentagem de espigas granadas variou de 47 a 68% para esses cruzamentos, que representa granação considerável se comparada aos valores de granação da L222 autofecundada (Tabela 1).

Tabela 2. Tipo de granação em espigas resultantes do cruzamento das linhagens testadoras com as progênes derivadas do cruzamento da linhagem L222 com as cinco linhagens testadoras. Neste caso, as progênes atuaram como fêmeas dos cruzamentos.

Cruzamento	Total de Espigas	Classes de Granação				Porcentagem da Classe 0
		0	1	2	3	
L222xL902	21	18	02	01	0	85,71
F ₁ (902x222)xL902	42	13	27	02	0	30,95
F ₂ (902x222)xL902	107	57	36	14	0	53,27
902(BC/222)xL902	75	19	32	21	03	25,33
222(BC/902)xL902	96	49	30	17	0	51,04
L222xL910	57	56	01	0	0	98,25
F ₁ (910x222)xL910	56	28	25	03	0	50,00
F ₂ (910x222)xL910	64	31	25	04	04	48,44
910(BC/222)xL910	45	02	17	22	04	4,44
222(BC/910)xL910	37	26	10	01	0	70,27
L222xL937	35	33	02	0	0	94,24
F ₁ (937x222)xL937	38	09	17	04	08	23,68
F ₂ (937x222)xL937	68	22	18	21	07	32,35
937(BC/222)xL937	41	05	15	16	05	12,20
222(BC/937)xL937	64	41	16	06	01	64,06
L222xL78	19	18	01	0	0	94,74
F ₁ (78x222)x L78	26	0	10	10	06	0,00
F ₂ (78x222)x L78	117	55	34	15	13	47,01
78 (BC/222)x L78	80	03	21	31	25	3,75
222 (BC/78)x L78	100	43	38	16	03	43,00
L222xL60	24	24	0	0	0	100,00
F ₁ (60x222)x L60	33	03	14	11	05	9,09
F ₂ (60x222)x L60	28	15	06	06	01	53,57
60 (BC/222)x L60	24	02	10	12	0	8,33
222 (BC/60)x L60	30	18	10	02	0	60,00

Finalmente, as plantas F_1 , de genótipo do tipo $Ga^s ga$, deveriam receber pólen ga das linhagens testadoras, sem discriminação e formar poucas espigas sem grãos. Isso foi confirmado parcialmente pelos dados da Tabela 2, onde a porcentagem de espigas classe 0, para as famílias L60 e L78, não passou de 9%. No entanto, para as famílias L937, L902 e L910 a porcentagem de espigas sem grãos foi relativamente alta, respectivamente 23, 30 e 50%, mostrando que a L222 pode revelar um certo grau de dominância para o gene gametofítico nos estilo-estigmas dos F_1 citados.

Para complementar a ilustração do efeito gametofítico presente na L222 fez-se a análise de variância para cada família nos cruzamentos da L222 com suas progênes e destas com as linhagens testadoras, para a porcentagem de granação. Todos os valores de F foram altamente significativos ao nível de 1 e 5%, apontando diferenças significativas entre os cruzamentos. O efeito gametofítico da L222 foi avaliado de duas maneiras distintas: porcentagem de granação e classes de granação. Para verificar a coerência entre os dois métodos, foi estimado o coeficiente de correlação entre essas duas variáveis. O resultado foi surpreendente, mostrando um $r = 0.93$ para os cruzamentos onde as plantas da L222 atuaram como fêmea e um $r = 0.90$ para os cruzamentos onde as progênes derivadas da L222 foram cruzadas, como fêmeas, com as linhagens testadoras. Esses resultados indicam que os dois métodos são igualmente aplicáveis e uma vez que a separação visual em classes é mais simples e rápida, poder-se-á adotá-la doravante.

A Tabela 3, correspondente à Tabela 1, mostra os resultados do Teste de Tukey para a porcentagem média de granação nos cruzamentos onde plantas da linhagem L222 atuaram como fêmeas. Os dados foram retransformados em porcentagem para melhor visualização das diferenças. De uma forma geral, os cruzamentos da L222 com as linhagens testadoras produziram a menor taxa de formação de grãos, seguidos dos cruzamentos com as progênes do tipo L(BC/222), o que pode ser explicado pela maior frequência de genes da linhagem testadora nestes cruzamentos. Por outro lado, os cruzamentos do tipo L222x F_1 (Lx222), L222x F_2 (Lx222) e L222xL222(BC/L), se comportaram de modo semelhante, ficando sempre agrupados com taxa média de granação ao redor de 50%, porcentagem muito semelhante à taxa de granação máxima observada na autofecundação da L222, que oscilou de 46 a 56%. A taxa de granação em plantas autofecundadas deveria ser superior a 80%, mas particularmente na linhagem L222, ocorre ampla variação no vigor das plantas, que se traduzem em diferenças no florescimento e protrandria, que acabam afetando a produção de pólen e a disponibilidade de estilo-estigmas receptivos no momento da polinização, e que obviamente, afetam a taxa de granação. Nesta linhagem, o ideal seria trabalhar com alto número de plantas por repetição, para poder estimar melhor esses efeitos.

Tendência semelhante foi observada nos cruzamentos das progênes derivadas da L222, como fêmeas, das respectivas linhagens testadoras. De uma maneira geral, notou-se que à medida que a frequência de genes da L222 aumenta nas progênes, como é o

Tabela 3. Teste de Tukey para porcentagem média de granação em espigas obtidas do cruzamento da L222 com as progênes derivadas do cruzamento da L222 com as cinco linhagens testadoras. Neste caso, a L222 atuou como fêmea dos cruzamentos.

Cruzamentos	Linhagens Testadoras (L)				
	902	910	937	78	60
L222xL	0,97 a	0,11 a	0,49 a	0,11 a	0,01 a
L222xF ₁ (Lx222)	62,50 c	43,20 c	42,70 c	29,20 b	36,40 c
L222xF ₂ (Lx222)	55,50 c	45,90 c	46,40 c	54,40 c	42,30 cd
L222xL(BC/222)	25,10 b	26,10 b	25,10 b	26,80 b	18,70 b
L222x222(BC/L)	55,90 c	50,60 c	58,10 c	52,60 c	54,80 d

* Letras distintas na mesma coluna representam diferenças significativas, ao nível de 5%, pelo teste de Tukey.

caso das progênies do tipo L222(BC/L), reduz-se significativamente a porcentagem de granação das espigas resultantes de seus cruzamentos (2,8 a 19,7%), ao receberem pólen das respectivas linhagens testadoras (Tabela 4). De modo oposto, nas progênies do tipo L(BC/222), onde aumenta a frequência de genes das linhagens testadoras, aumenta-se também a taxa de granação (25,1 a 53,5%). Na Tabela 4 observa-se ainda que, nos cinco casos estudados, esses dois tipos de progênies contrastantes diferem significativamente pelo teste de Tukey. Já as progênies F_1 (Lx222) e F_2 (Lx222) pouco diferiram, confirmando os resultados esperados, já que as frequências gênicas para os genes gametofíticos da L222 aí presentes, não diferem entre si.

Para se estudar a natureza da herança do efeito gametofítico, estimou-se, primeiramente, a correlação entre a frequência gênica do gene gametofítico no pólen das plantas das várias progênies, envolvendo genes da L222 e das linhagens testadoras, e a porcentagem de granação em espigas resultantes da polinização em estilo-estigmas da L222. Num segundo caso, foi determinada a correlação entre a frequência gênica do gene gametofítico nos ovários das plantas das progênies e a porcentagem de granação nas espigas resultantes da polinização com pólen de plantas das linhagens testadoras. O resultado é mostrado na Tabela 5. Os dados indicam que os valores de correlação são relativamente altos, na maioria significativos, o que sugere que os efeitos genéticos são evidentes, conseqüentemente garantindo a essa característica uma alta herdabilidade.

Tabela 4. Teste de Tukey para porcentagem média de granação em espigas obtidas do cruzamento das linhagens testadoras com as progênes derivadas do cruzamento da linhagem L222 com as cinco linhagens testadoras. Neste caso, as progênes atuaram como fêmeas.

Cruzamentos	Linhagens Testadoras (L)				
	902	910	937	78	60
L222xL	0,97 a	0,11 a	0,49 a	0,11 a	0,01 a
F ₁ (Lx222)xL	5,90 ab	7,50 bc	35,00 b	29,60 b	32,70 c
F ₂ (Lx222)xL	9,80 b	14,00 c	27,50 b	18,20 b	8,10 b
L(BC/222)xL	25,10 c	35,00 d	33,60 b	53,50 c	31,40 c
222(BC/L)xL	9,80 b	2,80 ab	6,40 a	19,70 b	3,20 ab

* Letras distintas na mesma coluna representam diferenças significativas, ao nível de 5%, pelo teste de Tukey.

Tabela 5. Correlação entre frequência gênica do gene gametofítico nas progênes derivadas dos cruzamentos da L222 com as linhagens testadoras, e a porcentagem média de granação em duas situações. Em uma a L222 atuou como fêmea de suas progênes e, em outra, as progênes atuaram como fêmeas das linhagens testadoras

Pólen	Fêmea	Famílias da L222 com as Linhagens				
		L902	L910	L937	L78	L60
Progênes	L222	-0,91*	-0,92*	-0,96*	-0,90*	-0,97*
Linh. Testadoras	Progênes	-0,87	-0,97*	-0,94*	-0,94*	-0,90*

* Coeficientes significativamente diferentes de zero pelo teste z de Fisher, ao nível de 5%.

4.1.2 Teste de Alelismo:

O fato do forte efeito gametofítico da L222 expressar-se qualitativamente nos vários cruzamentos com as linhagens testadoras, levou-nos a efetuar testes com os genes G_a e G_a^s do cromossomo IV. A Tabela 6 apresenta os resultados dos cruzamentos da linhagem L222 com os testadores para G_a e G_a^s , além de duas linhagens de milho de endosperma normal, L903(BC₂/910) e L937, utilizados como controle e a variedade Pajimaca, de endosperma "sugary". Estes controles permitem avaliar o grau de intensidade do efeito gametofítico presente na linhagem L222. Do cruzamento da L222 com L903(BC₂/910) foram obtidas apenas 703 sementes em 836 espigas polinizadas, quando um total de 148.408 seriam esperadas se não ocorresse este efeito. O cruzamento com L937 mostrou-se totalmente incompatível, sendo que em 10 espigas nenhum grão foi formado.

A linhagem L222, apesar de ser milho normal e não ter qualquer parentesco com milho pipoca ou milho doce, ao ser utilizada como fêmea, apresentou granação surpreendente com os dois estoques de G_a , indicando, sem dúvida, ser homozigota para alelos do loco gametofítico G_a . O estoque de G_a , F₃(902x G_{asu}), é constituído de germoplasma de milho doce e milho normal enquanto que POP150 (G_a^s) é uma população de pipoca originária do sintético HPXD-1, produzido pela Purdue University, Indiana, EUA. Como o milho Pajimaca, que há anos vem sendo

Tabela 6. Número de espigas em cada classe de granação, obtidas do cruzamento da L222, como fêmea, com os estoques de Ga, Ga^S e milho Pajimaca (su). As linhagens L903(BC₂/910) e L937 não apresentam efeito gametofítico e foram, por isso, usadas como controle experimental.

Cruzamento (Fêmea x Macho)	Total de Espigas	Classes de Granação			
		0	1	2	3
L222x903(BC ₂ /910)	836	809	27	0	0
L222xL937	10	10	0	0	0
L222xF ₃ (902xGasu)	6	0	1	3	2
L222xPOP150(Ga ^S)	7	0	1	2	4
L222xPajimaca(su)	8	0	0	6	2
POP150(Ga ^S)xL222	1	0	0	0	1
Pajimaca(su)xL222	5	0	0	1	4
Pajimaca(su)xPOP150	5	0	0	1	4
Pajimaca(su)xF ₃ (902xGasu)	8	0	0	3	5

utilizada comercialmente no país em plantios isolados para o enlatamento, foi capaz de induzir excelente granação em L222, conclue-se que esse sintético também é portador de alelos Ga .

A linhagem POP150(Ga^S), portadora do alelo Ga^S , apresenta granação no máximo de 10-15%, quando polinizada por plantas de milho normal, homozigotas para o gene ga (Silva, comunicação pessoal). Seu cruzamento com L222 resultou em espigas bem granadas, tanto como fêmea como no cruzamento recíproco. A variedade Pajimaca, como fêmea, também produziu espigas com boa granação ao ser polinizada com L222, POP150 e com o estoque $Ga F_3(902 \times Gasu)$, confirmando que a variedade Pajimaca é portadora do fator Ga .

O fato da L222 granar com linhagens portadoras de Ga , Pajimaca e $F_3(902 \times Gasu)$, e com a população POP150(Ga^S), significa que ela possui genes dominantes no loco Ga , mas não garante que o alelo seja, com certeza, o Ga^S . A incapacidade da L222 formar sementes com pólen de dezenas de linhagens normais, indica a possibilidade do gene ser do tipo super-gametofítico. Portanto, pode-se dizer que, se a L222 não possui o alelo Ga^S , ela deve possuir um outro alelo não conhecido, de efeito análogo ou ainda mais acentuado que Ga^S . Isto porque variedades de pipoca portadoras de Ga^S , exibem 10 a 15% de granação quando cruzadas com milho normal (Silva, comunicação pessoal), enquanto a L222 não forma sementes na presença de pólen ga . Um estudo comparativo do alelo " Ga " da linhagem L222 com o alelo Ga^S presente em certas pipocas, em cruzamentos recíprocos usando mistura de pólen com genes marcadores, poderá elucidar este ponto.

4.2 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO GENE GAMETOFÍTICO:

4.2.1 Efeito da idade do estilo-estigma na ação gametofítica:

A Tabela 7 mostra a granação das espigas obtidas do cruzamento da L222 com as cinco linhagens testadoras nos diferentes tratamentos que traduzem estágios fisiológicos distintos dos estilo-estigmas. Nestes cruzamentos, os grãos de pólen das linhagens L910, L937, L78 e L60 mostraram-se incapazes de completar fertilização nos estilo-estigmas da L222, em todos os tratamentos, produzindo 100% de espigas sem grão. O cruzamento da L222 com a linhagem testadora L902 mostrou um comportamento um pouco distinto dos demais, apresentando 4,5% de espigas da classe 1, enquanto que os cruzamentos com as outras linhagens não produziram espigas desta classe. Em cada um dos tratamentos polinizados com L902, formou-se apenas uma espiga da classe 1, com 5, 6, 4 e 11 sementes, respectivamente nos tratamentos "cortado", "2cm", "5cm" e "velho", o que pode ter sido resultado de contaminação com pólen da L222, uma vez que a inibição nas outras quatro linhagens testadoras foi muito pronunciada.

Esses resultados indicam claramente não haver alteração da expressão do efeito gametofítico ao longo do período receptivo dos estilo-estigmas da L222, como ocorre, por exemplo, em *Lilium*. Nessa espécie, o crescimento de tubos

Tabela 7. Efeito da idade dos estilo-estigmas na ação gametofítica da linhagem L222 em quatro estágios de desenvolvimento do estilo-estigma, recebendo pólen das cinco linhagens testadoras, ao longo de dois anos consecutivos, exceto para a L60. É mostrado o número de espigas da classe 0 (S) e o número de espigas da classe 1 (G).

Tratamento do	Linhagens Testadoras									
	902		910		937		78		60	
	S	G	S	G	S	G	S	G	S	G
Cortado	14	1	17	0	9	0	7	0	8	0
2 cm	19	1	24	0	22	0	19	0	15	0
5 cm	26	1	24	0	20	0	17	0	14	0
Velho	25	1	17	0	18	0	20	0	18	0
Total	84	4	82	0	69	0	63	0	55	0

incompatíveis ocorre apenas em flores mais velhas (Ascher & Peloquin, 1966).

Poderia se esperar a possibilidade de um abrandamento do efeito gametofítico em estágios extremos de desenvolvimento dos estilo-estigmas e que, conseqüentemente, os tratamentos "Cortado" e "Velho" produzissem alguma granação, que se localizaria respectivamente, nas porções basal e apical das espigas. Como a produção de grãos em todos os tratamentos foi praticamente nula, conclue-se que o efeito gametofítico é expresso continuamente nos estilo-estigmas da L222.

4.2.2 Efeito de estímulos de tubos polínicos da L222 na ação gametofítica contra tubos polínicos ga:

4.2.2.1 Efeito de estímulo transitório:

Neste caso instalou-se um experimento para testar se a presença de grãos de pólen da L222 em seu próprio estilo-estigma estimularia o crescimento de tubos polínicos estranhos. A polinização da L222 com a linhagem L903(BC/PIG), tendo o gene R^{nj} como marcador, após corte de 2cm dos estilo-estigmas da L222 anteriormente polinizados com seu próprio pólen, resultou em 55 espigas, das quais 9 apresentaram granação, mas nenhum grão roxo

(RNj--), proveniente do cruzamento com pólen Navajo, foi encontrado (Tabela 8). O aparecimento de algumas espigas granadas (classes 1 e 2) parece indicar que o tempo de 30min permite que poucos grãos da L222 germinem e consigam que seus tubos cresçam mais de 2cm antes da polinização com pólen com alelo RNj. Segundo Heslop-Harrison (1979c), a taxa de crescimento de tubos polínicos em milho é, em média, de 3 μ m/seg, resultando em 30min, num crescimento aproximado de 0,54cm ou cerca de um quarto do comprimento de estilo-estigma cortado no experimento. Assim, o aparecimento de espigas com mais de 4 grãos sugere que alguns grãos de pólen da própria linhagem podem ter caído mais próximos ao ápice da espiga, abaixo do local de corte dos estilo-estigmas, podendo crescer e completar a fertilização.

No tratamento controle (C), em que os estilo-estigmas da L222 foram tratados como no tratamento com gene marcador, mas sem polinização prévia com L222, 100% das espigas formadas foram da classe 0. A não formação de espigas com grãos está em concordância com os experimentos anteriores, com as linhagens testadoras, pois o forte efeito gametofítico contra pólen RNj, bloqueia seu crescimento nos estilo-estigmas da L222. Isso mostra que no tratamento com o marcador Navajo não ocorre qualquer efeito do pólen da L222 que possa alterar o efeito gametofítico, diminuindo a inibição dos tubos polínicos portadores do gene ga.

O tratamento denominado controle simples (CS), envolvendo apenas a polinização do marcador Navajo em estilo-estigmas da L222, confirma que o efeito gametofítico desta

Tabela 8: Tipo de granação das espigas da L222 resultantes da polinização com a linhagem L903(BC/PIG) contendo o gene R^{nj} , que produz o fenótipo Navajo, 30 min após a polinização prévia com pólen da L222 e corte dos estilo-estigmas. O controle (C) é análogo ao tratamento anterior, porém sem polinização prévia com L222. No controle simples (CS) a polinização foi feita com o marcador R^{nj} , porém sem manipulação dos estilo-estigmas.

Trata- mento	Total de Espigas	Classes de Granação				Porcentagem da Classe	Grãos Navajo Por Espiga
		0	1	2	3		
Navajo	55	46	6	3	0	83,64	0
C	4	4	0	0	0	100,0	0
CS	17	17	0	0	0	100,0	0

linhagem, inibe 100% dos tubos polínicos "Navajo", sendo portanto, extremamente forte, visto que as 17 espigas formadas foram da classe 0, sem nenhuma semente roxa (Tabela B).

A característica comum aos três tratamentos é a completa ausência de grãos "Navajo", indicando que nenhum estímulo transitório, quer de contato, quer fisiológico dos grãos de pólen ou dos tubos polínicos da L222 em seus estilo-estigmas, parece facilitar de algum modo o crescimento de tubos estranhos. Nota-se ainda, que o efeito gametofítico da L222 contra pólen R^{nj} da linhagem L903(BC/PIG), é também extremamente forte, igualmente às linhagens anteriormente testadas, independente de haver ou não manipulação dos estilo-estigmas. Esse tipo de comportamento parece, pois, não ter qualquer semelhança com os sistemas de auto-incompatibilidade do tipo esporofítico, onde as prováveis substâncias de reconhecimento estariam presentes na camada externa do grão de pólen e entrariam em contato com o estigma imediatamente, provocando reações de rejeição ou estímulo de crescimento dos tubos (Heslop-Harrison, 1968, 1975).

4.2.2.2 Efeito de estímulo persistente:

Neste experimento, testou-se a possibilidade da necessidade de pólen das linhagens testadoras contarem com estímulos contínuos, fornecidos pelos tubos polínicos da L222,

para crescer e completar fertilização em estilo-estigmas da L222.

Os dados da Tabela 9 mostram que a granação das espigas da L222wx, polinizadas com mistura de 1:1 de pólen próprio com cada uma das linhagens testadoras, foi bastante variável, com representantes nas quatro classes de granação. Em todos os tipos de mistura de pólen, um número grande de sementes de endosperma ceroso (wx) foi obtido, variando de 750 a 2044, enquanto que o número de sementes de endosperma normal foi extremamente baixo, de 1 a 12. Isso indica que a fertilização de gametas femininos da L222wx por tubos polínicos das linhagens testadoras, ocorreu muito raramente, o que claramente deve ser atribuído ao efeito gametofítico inibidor contra tubos polínicos das linhagens testadoras.

Em um experimento paralelo, introduziu-se dois outros tratamentos, polinização da L222wx apenas com o pólen das cinco linhagens testadoras e autofecundação da L222wx, que atuaram como controle complementar. Nesse experimento efetuou-se a polinização de 155 espigas da L222wx com pólen das cinco linhagens testadoras e os resultados encontram-se na Tabela 10. Observa-se que houve formação de grande quantidade de espigas sem grão, variando de 93,3 a 100%, confirmando que o forte efeito gametofítico presente na L222 (Tabela 1), não é alterado na linhagem mutante portadora do gene wx. No entanto, apareceram 3 espigas da classe 1, com 4, 6, e 7 sementes de endosperma normal. Tais sementes normais, supostamente resultantes da fecundação de ovários da L222wx por grãos de pólen das linhagens testadoras, foram germinadas ao lado de sementes da L222wx autofecundada e

Tabela 9. Classes de granação de espigas e sementes normais e (wx), resultantes da polinização de estilo-estigmas da L222wx por mistura de pólen próprio com cada uma das 5 linhagens testadoras, na proporção de 1:1, em volume.

Mistura de Pólen	Classes de Granação				Total de Espigas	Sementes	
	0	1	2	3		wx	normal
L222wx+L902	6	17	8	0	31	2.044	1
L222wx+L910	5	25	3	0	33	1.434	1
L222wx+L937	11	18	1	1	31	750	5
L222wx+L78	0	7	11	4	22	1.743	12
L222wx+L60	1	5	8	4	18	1.611	6

Tabela 10. Número de espigas distribuídas em classes de granação e porcentagem de espigas da classe 0, obtidas pela polinização da L222wx com as 5 linhagens testadoras, e na autofecundação da L222wx, em 2 anos consecutivos de experimentação

Tipo de Cruzamento	Total de Espigas	Classes de Granação				Porcentagem da Classe 0
		0	1	2	3	
L222wx x L902	33	31	2	0	0	93,94
L222wx x L910	42	41	1	0	0	97,62
L222wx x L937	28	28	0	0	0	100,00
L222wx x L78	20	20	0	0	0	100,00
L222wx x L40	32	32	0	0	0	100,00
L222wx x Autof.	85	3	21	41	20	3,53

dos F_1 da L222 com as cinco linhagens testadoras, para verificar a possibilidade de contaminação nas espigas da classe 1. Nos cruzamentos com L902 e L910 muitas plântulas não puderam ser diferenciadas claramente em relação aos controles, mas nenhuma parecia ser F_1 , por serem de menor tamanho e de caule mais delgado. Essas sementes, poderiam então, ter sido originadas de contaminações por pólen da L222 normal.

No tratamento de mistura de pólen (Tabela 9), os grãos normais também foram germinados com o objetivo de observar possíveis contaminações. A ocorrência de plântulas F_1 pareceu ser grande, principalmente nas misturas com L78 e L60, respectivamente, 91,67% (11) e 66,67% (4), além de 1 plântula em L937, cerca de 20% das sementes formadas nesse cruzamento. Nos outros cruzamentos, a falha na germinação foi alta, com respectivamente 1, 4 e 1 sementes em L910, L937 e L78. Isso mostrou que na mistura de pólen, alguns raros grãos de pólen das linhagens testadoras poderiam completar fertilização. Por outro lado, em misturas de pólen semelhantes, envolvendo o alelo R^Nj e pólen da L222, não houve produção de grão algum proveniente de fecundação cruzada. Além disso, em nenhum cruzamento a porcentagem de grãos normais atingiu 1%, taxa que pode ser atribuída a possíveis falhas no sistema de barreiras à polinização indesejada.

Os dados das Tabelas 9 e 10 deixam claro que a característica gametofítica da L222wx não foi alterada na presença de misturas de pólen com as linhagens testadoras. Grãos de pólen da própria linhagem, L222wx, presentes por um longo

tempo em seus estilo-estigmas, não foram capazes de fornecer estímulos suficientes para a redução do efeito de inibição tubos estranhos, contrariamente ao que sugeriu Pandey (1977) para sistemas de auto-incompatibilidade esporofítico.

4.2.3 Diâmetro do grão de pólen:

Um estudo comparativo da medida do diâmetro do grão de pólen da linhagem L222 e das cinco linhagens testadoras foi feito na tentativa de se detectar o efeito dessa variável no crescimento de tubos polínicos em estilo-estigmas da L222, cujos resultados estão na Tabela 11. No primeiro ano de observação, o diâmetro médio dos grãos de pólen das diferentes linhagens variou de 93,54 μm para L222, a 99,03 μm para L60. No segundo ano, o diâmetro das mesmas linhagens variou em amplitude um pouco maior, entre 91,78 e 101,36 μm . Nas medidas de 1989 a única diferença significativa no diâmetro do grão de pólen ocorreu entre as linhagens L222 e L60. No ano seguinte, houve problemas de germinação e florescimento das linhagens L937, L78 e L60 e a coleta de pólen não pode ser sincronizada. A diferença entre L222 e L60 foi confirmada, embora neste ano, a linhagem L222 diferisse significativamente de todas as outras linhagens. O diâmetro médio dos grãos de pólen da L222 sempre se mostrou inferior aos das outras linhagens e o da L60, sempre teve o maior diâmetro médio, em ambos os períodos de observação.

Tabela 11. Teste de Tukey para o diâmetro médio (μm) de grãos de pólen das linhagens L222 normal, L222wx e das 5 linhagens testadoras, medido em período consecutivo de dois anos.

Linhagem	Diâmetro Médio	
	1989	1990
L 222	93,54 a	91,78 a
L 222wx	97,97 a b	98,53 bc
L 902	97,18 a b	95,63 b
L 910	95,18 a b	95,92 b
L 937	96,13 a b	98,86 bc
L 78	96,20 a b	97,64 b
L 60	99,03 b	101,36 c

Letras distintas na mesma coluna representam diferenças significativas ao nível de 5% pelo Teste de Tukey.

Como as linhagens se comportaram de modo relativamente pouco distinto nos dois anos, as diferenças devem ser atribuídas a efeitos ambientais e a possíveis interações de genótipo x ambiente. As diferenças médias entre elas, entretanto, devem ser atribuídas também a efeitos genéticos, uma vez que a ordem de grandeza entre elas é aparentemente mantida nas duas condições. Alguns autores têm encontrado diferenças no diâmetro dos grãos de um mesma linhagem num mesmo período de coleta, ou em anos consecutivos (Pfahler, 1973 e Kumar & Sarkar, 1983), como observado neste trabalho. As diferenças extremas de 10% no diâmetro do grão de pólen entre a L222 e uma linhagem testadora, podem representar uma diferença pouco maior que 30% no volume do esporo, o que poderia realmente oferecer alguma limitação física para a penetração do tubo no tecido transmissor do estilo-estigma, como sugeriu Laurie & Bennett (1989), para cruzamentos interespecíficos entre milho e sorgo.

A existência de forte efeito gametofítico na linhagem L222wx, entretanto, cujos grãos de pólen são dos maiores, oferece pouco argumento para se atribuir a inibição dos tubos polínicos estranhos à barreiras mecânicas que dificultem seu crescimento em estilo-estigmas da L222.

4.2.4 Comportamento de tubos polínicos em estilo-estigmas da L222:

A fim de se compreender melhor a expressão gênica da ação gametofítica presente em L222, principalmente quando e onde ocorre a inibição dos tubos polínicos das linhagens testadoras, estudou-se comparativamente, o desenvolvimento de tubos que sofrem e que não sofrem inibição ao crescerem em estilo-estigmas da L222. Para tanto, comparou-se o crescimento dos tubos polínicos da L222 com os das linhagens L902 e L60, escolhidas ao acaso, para este experimento. Os dados de crescimento percentual de tubos polínicos obtidos a partir de microscopia de fluorescência, permitiram estimar 3 equações de regressão. São elas $Y_{L222} = -1,99 + 3,94x$ para a autofecundação de L222, $Y_{L60} = 18,88 + 0,23x$ e $Y_{L902} = 20,78 + 0,35x$ para a polinização incompatível de L222 com as linhagens L60 e L902, onde Y é a taxa de crescimento do tubo polínico e x é o tempo (horas) após a polinização. Nas Figuras 2, 3 e 4 observa-se que as taxas iniciais de crescimento dos tubos polínicos foram bem semelhantes, tanto em cruzamentos compatíveis, com pólen da L222, quanto nos incompatíveis, com pólen da L60 e da L902, uma vez que 5 horas após a polinização, o crescimento dos tubos ficou ao redor de 20% nos dois tipos de cruzamento. Esses resultados concordam plenamente com os obtidos por Schwartz (1950), Nelson (1952) e House & Nelson (1958) com linhagens que possuíam genes gametofíticos, Ga^S . Esses autores, no entanto, não acompanharam

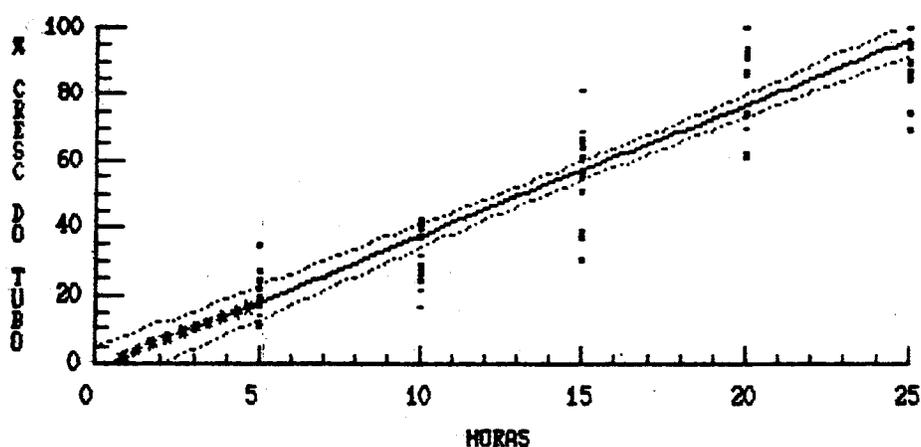


Figura 2. Linha de regressão (----) e intervalo de confiança a 5% (.....) para os dados de crescimento percentual de tubos polínicos em cruzamentos compatíveis de L222 em seus estilo-estigmas. A equação de regressão é dada pela expressão $Y = -1,99 + 3,94x$.

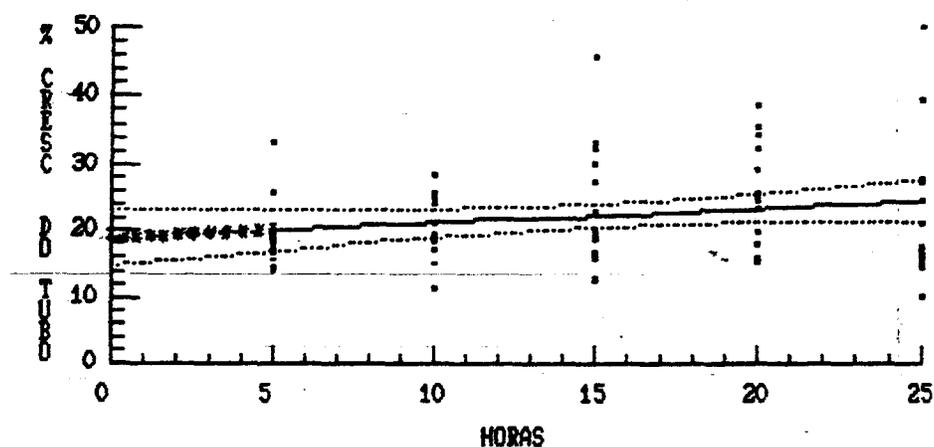


Figura 3. Linha de regressão (----) e intervalo de confiança a 5% (....) para os dados de crescimento percentual de tubos polínicos em cruzamentos incompatíveis de L60 em estilo-estigmas da L222. A equação de regressão é dada pela expressão $Y = 18,88 + 0,23x$.

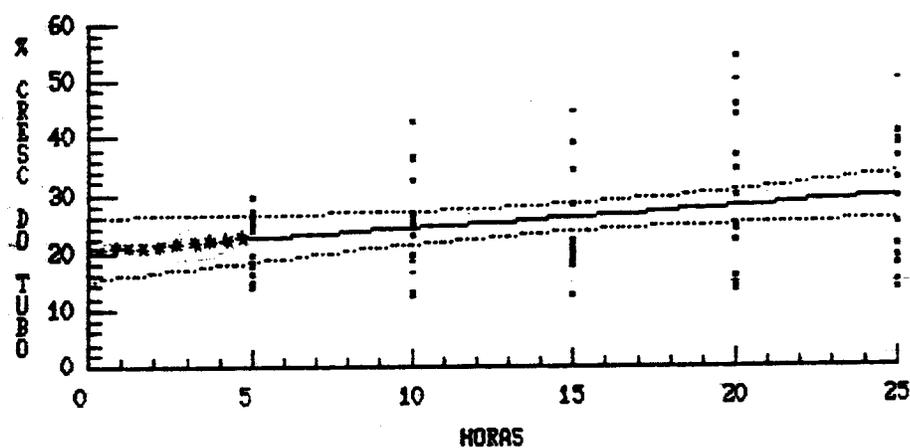


Figura 4. Linha de regressão (----) e intervalo de confiança a 5% (....) para os dados de crescimento percentual de tubos polínicos em cruzamentos incompatíveis de L902 em estilo-estigmas da L222. A equação de regressão é dada pela expressão $Y = 20,78 + 0,35x$.

o crescimento dos tubos polínicos por períodos suficientemente longos, até se concretizar a fertilização.

Como descrito por vários autores como Miller (1919), Heslop-Harrison & Shivanna (1977) e Heslop-Harrison *et al* (1984a, 1984b, 1985), os tubos polínicos crescem em direção ao ovário paralelamente aos vasos condutores, sem invadí-los, em pequeno número e somente dois ou três alcançam o ovário. Apresentam fluorescência em toda sua extensão e mostram poucos acúmulos de calose, que são típicos em reações de incompatibilidade (Dumas & Knox, 1983). Desta forma, os tubos polínicos se destacaram do resto do estilo-estigma, sendo facilmente localizados (Figura 5), mas não foi possível evidenciar qualquer diferença ao nível morfológico que pudesse caracterizar a reação como compatível ou incompatível.

O crescimento dos tubos polínicos na autofecundação da L222 mostrou-se contínuo e progressivo até a chegada ao ovário, atingindo 100% do crescimento ao redor de 25hs após polinização. Um alto coeficiente de correlação, de 0,92, entre a distância percorrida e o tempo utilizado, revelam existir uma forte relação linear entre as duas variáveis, o que também indica uma velocidade de crescimento uniforme do tubo polínico da L222 em seus estilo-estigmas, ao redor de 4% por hora (Figura 2).

Pelo teste de Tukey os cruzamentos incompatíveis, da L60 e da L902 em estilo-estigmas da L222, mostraram crescimento de tubos polínicos significativamente distinto do crescimento dos tubos da L222 (Tabela 12). A porcentagem de crescimento dos tubos não variou muito de um tratamento para

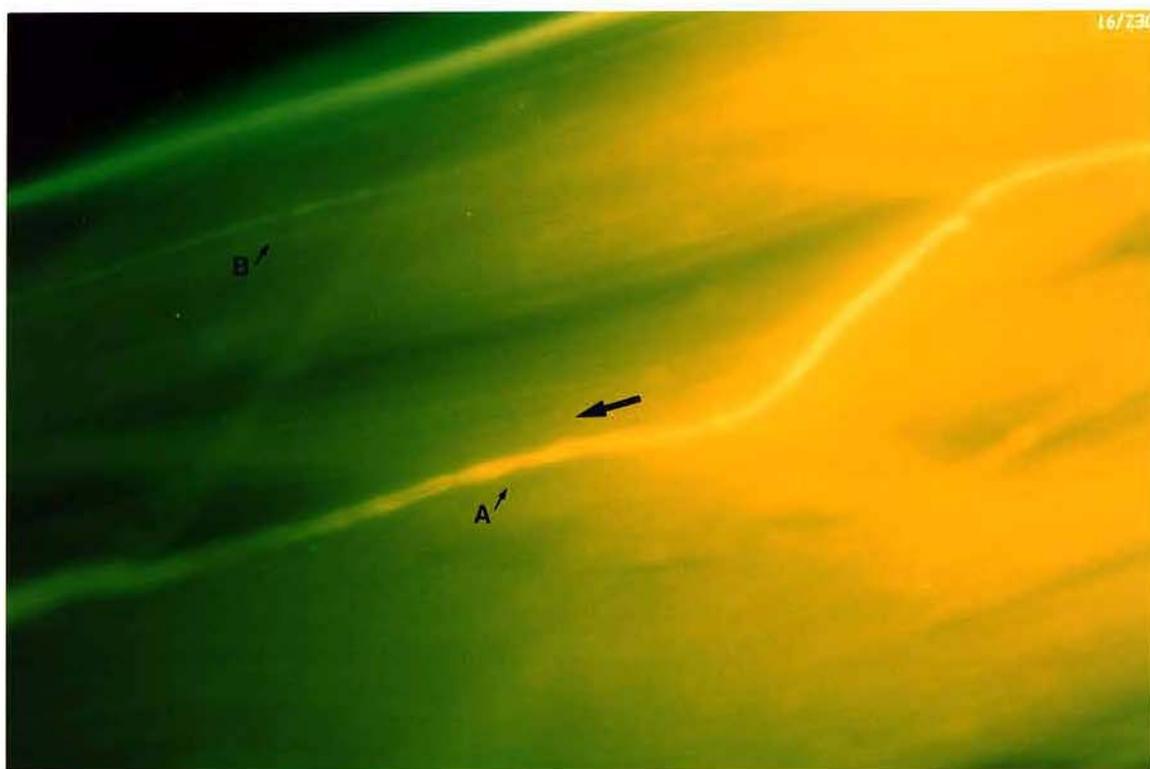


Figura 5. Tubo polínico da L902 em estilo-estigma da L222, observado em microscópio UV, em aumento 10x. A seta maior indica o crescimento do tubo polínico (A). B= Vaso condutor.

Tabela 12. Teste de Tukey para o crescimento percentual de tubos polínicos das linhagens L222, L60 e L902 em estilo-estigmas da L222.

Linhagem	Crescimento do Tubo Polínico
L222	43,83 a
L60	22,28 b
L902	26,71 b

Letras distintas representam diferenças significativas ao nível de 5% pelo Teste de Tukey.

outro e teve progressão extremamente lenta, sendo que a maioria dos tubos cresceu até 25% do tamanho do estilo-estigma em L60 e aproximadamente 30% em L902, mesmo 25hs após polinização. Nestes casos, obviamente, houve pouca correspondência entre porcentagem de crescimento dos tubos polínicos e horas de polinização, o que é traduzido por um r ao redor de 0,2. As retas de regressão para as linhagens testadoras L60 e L902 estão nas Figuras 3 e 4. O baixo coeficiente de correlação para essas linhagens mostra uma possível desorganização no crescimento de tubos polínicos induzido pelo sistema gametofítico da linhagem L222, com muitos tubos sendo bloqueados logo após o início do crescimento, (10 a 20%), outros chegando a crescer cerca de 20 a 30% da distância a ser percorrida, e poucos mostram crescimento superior a 40%. Nenhum tubo, entretanto, conseguiu atingir o ovário e completar fecundação. House & Nelson (1958) observaram em milho pipoca, que o crescimento de tubos em polinizações compatíveis se dava de modo linear e que a diminuição do crescimento de tubos incompatíveis era progressiva até ser abolida ao redor de 8hs. As observações feitas com a linhagem L222, extendidas até 25hs após a polinização, também levam a resultados semelhantes, sugerindo que o gene gametofítico presente nesta linhagem de milho normal deve, por sua característica, ser semelhante ao gene presente em milho pipoca.

No presente caso, pode-se dizer que o crescimento de tubos polínicos de linhagens ga em estilo-estigmas $Ga^S Ga^S$ da L222 ocorre normalmente do início até 5-10hs após a polinização. Após 10hs da polinização esse crescimento vai sendo reduzido até

ser abolido por completo, ao redor de 20-25hs, não permitindo que nenhum tubo atinja o ovário. Esse tipo de incompatibilidade tem resposta totalmente diferente das respostas de auto-incompatibilidade ou de isolamento reprodutivo interespecífico em gramíneas, onde os tubos são inibidos na superfície do estigma, no início do crescimento (Mock & Loescher, 1973; Shivanna *et al*, 1978). Este trabalho parece indicar que o crescimento dos tubos incompatíveis começa a sofrer redução gradativa, talvez no momento de transição entre o crescimento autônomo e o dependente de reservas do estilo-estigma. é possível que a reação só ocorra quando o tubo começa a ter necessidade de aproveitar as reservas do estilo-estigma e se mostra incapaz de induzir tal resposta, como propõe vários trabalhos de Nelson (1952), Mock & Loescher (1973), Heslop-Harrison & Heslop-Harrison (1982) e Heslop-Harrison *et al* (1984b), ou ainda por reações de incompatibilidade do tipo imunológica, também sugerida por Nelson (1952). De qualquer forma, os resultados contrariam a hipótese de incompatibilidade pós-zigótica (Schwartz, 1950), visto que tubos incompatíveis não conseguem alcançar o ovário.

5. CONCLUSÕES

1. O efeito gametofítico presente na linhagem de milho normal L222, que se manifesta em seus estilo-estigmas inibindo o crescimento de tubos polínicos de outras linhagens de milho normal, é extremamente forte e, possivelmente, mais seletivo que os que tem sido descritos até agora.

2. O comportamento da L222 tanto nos cruzamentos com as linhagens testadoras, como nos testes de alelismo, permite concluir que a linhagem L222 apresenta um alelo do tipo super-gametofítico, Ga^s , da série alélica do loco Ga do cromossomo IV. É descrita pela primeira vez uma linhagem de milho normal possuidora deste alelo que era conhecido apenas em algumas populações de milho pipoca e outras raras populações de milho doce.

3. A idade fisiológica do estilo-estigma da linhagem L222 não altera sua característica gametofítica de inibição de tubos polínicos estranhos.

4. A presença de grãos de pólen ou tubos polínicos da linhagem L222, normal ou wx, não atenuam a capacidade de seus estilo-estigmas inibirem tubos polínicos estranhos, indicando também, não haver produção de qualquer tipo de estímulo, temporário ou permanente, que poderia auxiliar o crescimento dos

tubos estranhos.

5. O diâmetro dos grãos de pólen no germoplasma estudado parece não ter qualquer efeito no crescimento de tubos polínicos estranhos ao longo dos estilo-estigmas da L222.

6. Em estilo-estigmas da L222, os tubos polínicos tanto da L222 quanto das linhagens testadoras, têm germinação e taxa de crescimento iguais até aproximadamente 5 a 10hs após polinização, quando atingem cerca de 30% do percurso até o ovário. A partir desse período, os tubos estranhos tem seu crescimento reduzido e não chegam a atingir metade da distância até o saco embrionário. Tubos de L222, no entanto, têm crescimento linear, na base de 4% por hora, alcançando o ovário entre 20 e 25hs após a polinização.

6. RESUMO

O estudo do comportamento incomum de uma linhagem de milho normal, L222, mostrando acentuada deficiência de granação em cruzamentos com várias linhagens, constituiu o objetivo principal deste trabalho. Vários experimentos foram realizados para se entender as bases genéticas dessa característica. Cruzamentos artificiais da L222 com 5 linhagens de milho normal de características distintas foram realizados, e as várias progênies derivadas desses cruzamentos foram cruzadas tanto com a linhagem L222 como com as cinco linhagens amostradas.

Destes cruzamentos ficou evidenciado que a linhagem L222 apresenta efeito gametofítico extremamente forte, inibindo tubos polínicos de outras linhagens. Testes de alelismo indicaram que a L222 apresenta um alelo do tipo supergametofítico (Ga^S), no loco Ga do cromossomo IV, pela primeira vez descrito em uma linhagem de milho normal.

Estudos da interação de tubos polínicos inibidos x tecido estigmático da L222, mostraram que nenhum estímulo, transitório ou permanente, desencadeado pela presença de tubos da L222 em seus próprios estilo-estigmas auxiliam o crescimento dos tubos estranhos. As diferenças registradas no diâmetro dos grãos de pólen da L222 e das linhagens testadoras pareceu não ter participação na expressão do gene gametofítico.

A germinação e o crescimento de tubos polínicos da L222 e dos tubos polínicos estranhos em estilo-estigmas da L222 são semelhantes até aproximadamente 5 a 10hs. Após esse

período, o crescimento dos tubos polínicos estranhos é reduzido, não atingindo a metade da distância até o ovário. Tubos da L222, ao contrário, tem crescimento linear, na velocidade de 4% por hora, alcançando o ovário entre 20 e 25hs após a polinização.

SUMMARY

The study of an unusual behavior of a field corn inbred line, L222, showing a poor seed set when crossed with field corn inbreds, was the main purpose of this work. Several experiments were made to understand the genetic basis of this feature. Artificial crossings of L222 with five distinct inbred lines of field corn were made and families derived from those crosses were crossed with L222 as well with the five tester inbred lines.

From those crosses it was shown that L222 reveals a very strong gametophytic effect, inhibiting foreign pollen tubes. Allelism tests pointed out that L222 has a super-gametophytic allele like that in the Ga locus of chromosome IV, shown for the first time to be present in field corn germoplasm.

Interactions between arrested foreign pollen tubes x L222 stigmatic tissue showed that stimulus of any sort, transitory or permanent, caused by the presence of L222 pollen tubes in their own style-stigmas, caused any growth in the foreign tubes. Differences found in pollen diameter of L222 and of the other inbreds studied seemed to have no effect on the expression of the gametophytic gene.

L222 and foreign pollen tube germination and growth on L222 style-stigmas are alike until 5 to 10h after pollination. From there on, foreign tubes growth is reduced and

they were not able to go through a half of the distance to the ovary. L222 tubes, on the contrary, showed linear growth with a velocity of 4% per hour, reaching the ovary between 20-25h after pollination.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIRRE, C.D.G. & KATO, T.A.Y. 1979. Competencia entre el polen de Maiz y de teocintle durante la fecundacion. *Agrociencia*, 32: 109-21.
- ANDREW, R.H. 1952. Duration of silk receptiveness in sweet corn inbreeds. *Agronomy Journal*, 44(7): 387-88.
- ASCHER, P.D. & PELDQUIN, S.J. 1966. Effect of floral aging on the growth of compatible and incompatible pollen tubes in *Lilium longiflorum*. *Amer. J. Bot.* 53(1): 99-102.
- BEMIS, W.F. 1959. Selective fertilization in Lima Beans. *Genetics*, 44: 555-62.
- BRIEGER, F.G. 1926. Mendelian factors producing selective fertilization. *Amer. Nat.* 60: 183-91.
- 1937. Genetic control of gametophyte development in Maize. I. A gametophyte character in chromosome five. *Jour. Genet.* 34: 57-80.
- BRINK, R.A. & BURNHAM, C.R. 1927. Differential action of the sugary gene in Maize on two alternative classes of male gametophytes. *Genetics*, 12: 348-78.
- BRINK, R.A. & MACGILLIVRAY, J.H. 1924. Segregation for the waxy character in Maize pollen and differential development of the male gametophyte. *Amer. J. Bot.* 11: 465-69.
- BURNHAM, C.R. 1936. Differential fertilization on the BtPr linkage group of Maize. *Jour. Amer. Soc. Agron.* 28: 968-75.
- COE Jr., E.H. & NEUFFER, M.G. 1977. The genetics of corn. In: Sprague, G.F. (ed.) *Corn and Corn Improvement*. American Society of Agronomy Inc. Publisher, Madison, Wisconsin, USA.
- CURRIER, H.B. 1957. Callose substance in plant cells. *Amer. J. Bot.* 44: 476-88.
- DEMEREC, M. 1924. A case of pollen dimorphism in Maize. *Amer. J. Bot.* 11: 461-64.
- 1929. Cross sterility in Maize. *Zeitschrift Indukt. Abst. Vererb.* 50: 281-91.
- DUMAS, C. & KNOX, R.B. 1983. Callose and determination of pistil viability and incompatibility. *Theor. Appl. Genet.* 62: 1-10.
- EMERSON, R.A. 1925. A possible case of selective fertilization in Maize. *Anat. Rec.* 29: 136.

- 1934. Relation of the differential fertilization genes *Gaga*, to certain other genes of the Su-Tu linkage group of Maize. *Genetics*, 12: 137-56.
- EYSTER, W.H. & ROBINSON, B.A. 1936. Gametophytic genes in relation to modified ratios. *Amer. Nat.* 70: 50.
- HESLOP-HARRISON, J. 1968. Pollen wall development. *Science*, 161: 230-37.
- 1975. The physiology of the pollen grain surface. *Proc. R. Soc. London B*, 190: 275-99.
- 1979 a. An interpretation of the hydrodynamics of pollen. *Amer. J. Bot.* 66(6): 737-43.
- 1979 b. Pollen walls as adaptative systems. *Ann. Mis. Bot. Garden*, 66: 813-29.
- 1979 c. Pollen-stigma interaction in grasses: a brief review. *New Zeland J. Bot.* 12: 537-46.
- 1979 d. Aspects of the structure, cytochemistry and germination of the pollen of Rye (*Secale cereale* L.). *Ann. Bot.* 44(suppl. 1): 1-47.
- 1982. Pollen-stigma interaction and cross-incompatibility in the grasses. *Science*, 215: 1358-64.
- HESLOP-HARRISON, Y. & SHIVANNA, K.R. 1977. The receptive surface of the Angiosperm stigma. *Ann. Bot.* 41: 1233-1258.
- HESLOP-HARRISON, J. & HESLOP-HARRISON, Y. 1980. The pollen-stigma interaction in the grasses. I. Fine structure and cytochemistry of the stigmas of *Hordeum* and *Secale*. *Acta. Bot. Neerl.* 29(4): 261-76.
- 1981. The pollen-stigma interaction in the grasses. II. Pollen tube penetration and the stigma response in *Secale*. *Acta. Bot. Neerl.* 30(4): 289-307.
- HESLOP-HARRISON, Y.; REGER, B.J. & HESLOP-HARRISON, J. 1984 a. The pollen-stigma interaction in the grasses. 5. Tissue organization and cytochemistry of the stigma (silk) of *Zea mays* L. *Acta Bot. Neerl.* 33(1): 81-99.
- 1984 b. The pollen-stigma interaction in the grasses. 6. The stigma (silk) of *Zea mays* L. as host to the pollens of *Sorghum bicolor* (L.) Moench and *Pennisetum americanum* (L.) Leeke. *Acta Bot. Neerl.* 33(2): 205-27.
- 1985. The pollen-stigma interaction in the grasses. 7. Pollen tube guidance and the regulation of tube number in *Zea mays* L. *Acta Bot. Neerl.* 34(2): 193-211.

- HOUSE, L.R. & NELSON Jr., O.E. 1958. Tracer study of pollen tube growth in cross-sterile Maize. *Jour. Hered.* 49(1): 18-21.
- JIMENEZ, J.R. & NELSON, O.E. 1965. A new fourth chromosome gametophyte locus in Maize. *Jour. Hered.* 56: 259-63.
- JOHNSON, C.M.; MULCAHY, D.L. & GALINAT, W.C. 1976. Male gametophyte in Maize: Influences of the gametophytic genotype. *Theor. Appl. Genet.* 48: 299-303.
- JONES, D.F. 1920. Selective fertilization in pollen mixtures. *Biol. Bull.* 38(5): 251-289.
- 1922. Selective fertilization and the rate of pollen tube growth. *Biol. Bull.* 43(3): 167-74.
- 1924. Selective fertilization among the gametes from the same individuals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 10: 218-21.
- JONES, D.M. & NEWELL, L.C. 1948. Longevity of pollen and stigmas of grasses: Buffalo grass, *Buchloe dactyloides* (Nutt.) Engelm. and corn, *Zea mays* L. *Jour. Amer. Soc. Agro.* 40: 195-204.
- KAHLER, A.L., GARDNER, C.O. & ALLARD, R.W. 1984. Nonrandom Mating in Experimental Population of Maize. *Crop Sci.* 24: 350-54.
- KEMPTON, J.H. 1919. Inheritance of waxy endosperm in Maize. U.S. Dept. Agr. Bureau of Plant Industry Bull. 254: 1-99.
- KHO, Y.O. & BAER, T. 1968. Observing pollen tubes by means of Fluorescence. *Euphytica*, 17: 298-302.
- KNOX, R.B. & HESLOP-HARRISON, J. 1971. Pollen wall proteins: The fate of intine-held antigens on the stigma in compatible and incompatible pollinations of *Phalaris tuberosa* L. *J. Cell Science*, 2(1): 239-251.
- KROH, M.; GORISSEN, M.H. & PFAHLER, F.L. 1979. Ultrastructural studies on styles and pollen tubes of *Zea mays* L. General survey on pollen tube growth *in vivo*. *Acta Bot. Neerl.* 28(6): 513-18.
- KUMAR, D. & SARKAR, K.R. 1980. Correlation between pollen diameter and rate of pollen tube growth in Maize (*Zea mays* L.) *Indian Journ. Exper. Biol.* 18: 1242-44.
- 1983. Factors affecting pollen grain diameter in Maize *Indian Journ. Genet.* 43(2): 156-59.
- 1985. Inheritance of Maize (*Zea mays* L.) pollen tube growth *in vitro*. *Indian Journ. Exper. Biol.* 23(2): 110-11.

- 1987. Genetic structure of the R-Navajo Allele in Maize, *Zea mays* L. Theor. Appl. Genet. 24: 476-79.
- LANDI, P. & SANGUINETI, M.C. 1985. Competition between self and foreign pollen in Maize (*Zea mays* L.) as affected by female sporophyte, plant density and silk age. *Maydica*, 30: 421-26.
- LAURIE, D.A. & BENNETT, M.D. 1989. Genetic variation in *Sorghum* for the inhibition of Maize pollen tube growth. *Ann. Bot.* 64: 675-81.
- LINSKENS, H.F. 1964. Pollen physiology. *Ann. Rev. Plant Physiol* 15: 255-70.
- LONGLEY, A.E. 1961. A gametophyte factor on chromosome 5 of Corn. *Genetics*, 46: 641-47.
- LONNQUIST, J.H. & JUGENHEIMER, R.W. 1943. Factors affecting the success of pollination in Corn. *J. Amer. Soc. Agron.* 35(11): 923-33.
- LYUBENOV, A. 1982. Selective fertilization in Maize. *Genetics and Plant Breeding*, 15(3): 244-49.
- MANGELSDORF, P.C. & JONES, D.F. 1926. The expression of Mendelian factors in the gametophyte of Maize. *Genetics*, 11: 423-55.
- MARTIN, F.W. 1959. Staining and observing pollen tubes in the style by means of Fluorescence. *Stain Tech.* 34: 125-28.
- 1969. Compounds from the stigmas of ten species. *Amer. J. Bot.* 56(9): 1023-27.
- 1970 a. Compounds of the stigmatic surface of *Zea mays* L. *Amer. J. Bot.* 34: 835-42.
- 1970 b. Pollen germination on foreign stigmas. *Bull. Torrey Bot. Club.* 22(1): 1-6.
- 1970 c. The stigmatic exudate of *Strelitzia*. *Phyton*, 22(1): 47-53.
- MARTIN, F.W. & RUBERTÉ, R. 1972. Inhibition of pollen germination and tube growth by stigmatic substances. *Phyton*, 30(1/2): 119-26.
- MATSON, O.; KNOX, R.B.; HESLOP-HARRISON, J. & HESLOP-HARRISON, Y. 1974. Protein pellicle of stigmatic papillae as a probable recognition site in incompatibility reactions. *Nature*, 247: 298-300.
- MILLER, E. 1919. Development of the pistillate spikelet and fertilization in *Zea mays* L. *Jour. Agri. Res.* 18(5): 255-66.

- MOCK, J.J. & LOESCHER, W.H. 1973. Incompatibility of Maize and Sorghum manifest in failure of pollen growth. *Egypt. J. Genet. Cytol.* 2: 338-44.
- NASRALLAH, M.E. & NASRALLAH, J.B. 1986. Molecular Biology of Self-incompatibility in plants. *Trends in Genetics*, 2: 239-44.
- NELSON Jr., O.F. 1952. Non-reciprocal cross-sterility in Maize. *Genetics*, 37: 101-24.
- NEUFFER, M.G. & COE Jr., E.H. 1974. Corn (Maize). In: *Handbook of Genetics II*. King, R.C. (ed.), Plenum Press, N.Y. 632pp.
- OTTAVIANO, E.; SARI GORLA, M. & PE, E. 1982. Male gametophytic selection in Maize. *Theor. Appl. Genet.* 63: 249-54.
- PANDEY, K.K. 1977. Mentor pollen: Possible role of wall-held pollen growth promoting substances in overcoming intra and interespecific incompatibility. *Genetica*, 47(3): 219-29.
- PETERSON, D.F. 1942. Duration of receptiveness in corn silks. *J. Amer. Soc. Agron.* 34: 369-71.
- PERRY, H.S. 1945. The Ga gene as a means of reducing contamination of sweet corn. *Jour. Hered.* 36: 131-34.
- PFAHLER, P.L. 1965. Fertilization ability of Maize pollen grains: I. Pollen sources. *Genetics*, 52: 513-520.
- 1967. Fertilization ability of Maize pollen grains. II. Pollen genotype, female sporophyte and pollen storage interactions. *Genetics*, 52: 513-31.
- 1973. *In vitro* germination and pollen tube growth of maize (*Zea mays* L.) pollen. VIII. Effects of ultraviolet irradiation. *Rad. Bot.* 13: 13-18.
- RANDOLPH, L.F. 1936. Developmental morphology of the caryopsis in Maize. *Jour. Agri. Res.* 53(12): 881-916.
- REGER, B.J. & JAMES, J. 1982. Pollen germination and pollen tube growth of Sorghum when crossed to Maize and Pearl Millet. *Crop Sci.* 22(1): 140-44.
- ROSEN, W.G. 1961. Studies on pollen-tube chemotropism. *Amer. J. Bot.* 48: 889-95.
- SARI GORLA, M. & BELLINTANI, R. 1976. Variation of pollen fertilization ability in relation to the genotype of the stylar tissue. *Maize News Letter*, 50: 77-79.
- SARI GORLA, M. & ROVIDA, E. 1980. Competitive ability of Maize pollen. Intergametophytic effects. *Theor. Appl. Genet.* 52: 37-41.

- SARI GORLA, M.; OTTAVIANO, E. & FAINI, D. 1975. Genetic variability of gametophyte growth rate in Maize. *Theor. Appl. Genet.* **46**: 289-94.
- SARI GORLA, M.; BELLINTANI, R. & OTTAVIANO, E. 1976. Competitive ability of Maize pollen. Interaction between genotypes of pollen and stylar tissues. *Maydica*, **21**: 77-88.
- SCHWARTZ, D. 1950. The analysis of a case of cross-sterility in Maize. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **36**: 719-24.
- SHIVANNA, K.R.; HESLOP-HARRISON, Y. & HESLOP-HARRISON, J. 1978. Inhibition of the pollen tube in the self-incompatibility responses of Grasses. *Incompat. Newsletter*, **10**: 5-7.
- SILVA, W.J.da; TEIXEIRA, J.P.F.; ARRUDA, P. & LOVATO, M.B. 1978. Nutrimaiz, a tropical sweet corn cultivar of high nutritional value. *Maydica*, **23**(3): 129-137.
- SPRAGUE, G.F. 1933. Pollen tube establishment and the deficiency of waxy seeds in certain Maize crosses. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **12**: 838-41.
- STYLES, E.D. & SINGLA, C. 1987. Pollen tube growth in Maize. *Maydica*, **32**: 139-50.
- SUKHAPINDA, K. & PETERSON, P.A. 1983. Non-reciprocal partial cross-incompatibility in Maize. *Can. J. Genet. Cytol.* **25**: 270-77.
- TER-AVANESIAN, D.V. 1978. The effect of varying the number of pollen grains used in fertilization. *Theor. Appl. Genet.* **52**: 77-79.
- TORREÃO, A.B.F. 1991. O papel da dispersão do Teosinte na domesticação do Milho. Campinas, 121p. Dissertação-Mestrado em Ciências Biológicas - Instituto de Biologia, UNICAMP.
- WALDEN, D.B. 1967. Male gametophyte of *Zea mays* L. I. Some factors influencing fertilization. *Crop Sci.* **Z**: 441-43.
- WATANABE, K. 1961. Studies on the germination of grass pollen. II. Germination capacity of pollen in relation to the maturity of pollen and stigma. *Bot. Mag. Tokyo*, **Z4**: 131-37.