

UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE
CAMPINAS

BC/8180
IB/81392

MESTRADO

INSTITUTO DE BIOLOGIA

1987

FOTOPERIODISMO E COMPETIÇÃO DE GRÃO DE
PÓLEN COMO MECANISMOS DE ISOLAMENTO
GENÉTICO ENTRE MILHO E TEOSINTE.

JACKSON JOSÉ FRIDMAN

Este exemplar corresponde a redação final da Tese
Defendida pelo candidato Jackson J. Fridman
e aprovada pela Comissão Julgadora.

— : Jackson J. — 20/07/87

FOTOPERIODISMO E COMPETIÇÃO DE GRÃO DE PÓLEN COMO
MECANISMO DE ISOLAMENTO GENÉTICO ENTRE MILHO E TEOSINTE.

JACKSON JOSÉ FRIDMAN

Tese apresentada no Instituto de
Biologia da Universidade Estadual
de Campinas para a obtenção do
título de Mestre em Ciências.

Orientador : William José da Silva

Campinas

1987

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

IB	T/81392
lassif.	
utor	F9127
	Ex.
ambo BC/	8180
	IB/81392

IB/81392
BC/8180

- Aos meus pais,
Isidoro e Paulina Fridman,
ofereço

- À amiga e companheira,
Rose,
dedico

Agradecimentos

Ao orientador, William José da Silva, pela eficiência no treinamento e pelas lições de atitude científica que, tenho certeza, marcarão profundamente minha formação na área da pesquisa.

À professora Laudemir Maria Prioli, pela paciência, dedicação e amizade demonstrados durante a realização do trabalho.

Aos colegas João Batista Rosolen, Ricardo Antunes de Azevedo e Alberto José Prioli, pelo apoio e incentivo.

Aos amigos Srs. Bento Libânio e Oswaldo Federicci, e Sra. Aparecida Ramos Libânio.

Ao Edson Pinto Ribeiro pela assistência e amizade durante a impressão deste trabalho.

A todos funcionários e pós-graduandos do Departamento de Genética e Evolução que direta ou indiretamente colaboraram para a realização desse trabalho.

CONTEÚDO

	Página
INTRODUÇÃO.....	1
REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. Os parentes mais próximos e a origem do milho.....	3
2.2. Hibridação entre milho e teosinte.....	12
2.3. Isolamento genético de milho e teosinte.....	16
2.3.1. Pólen e tubo polínico.....	18
2.3.2. Competição de grãos de pólen de milho e teosinte..	20
2.3.3. Fatores gametofíticos no isolamento reprodutivo entre milho e teosinte.....	24
2.3.4. Estudos de germinação e interação pólen x estilo - estigma.....	26
2.3.5. Heterofertilização.....	33
2.4. Florescimento e o isolamento temporal de milho e teosinte	35
2.4.1. Introdução.....	35
2.4.2. Fotoperiodismo em milho e teosinte.....	36
2.4.3. Medida do florescimento.....	43
MATERIAL E MÉTODOS.....	47
3.1. Material.....	47

3.2. Indução do florescimento em milho e teosinte.....	49
3.2.1. Introdução.....	49
3.2.2. Delineamento Experimental.....	49
3.2.3. Unidades de calor para o florescimento.....	50
3.2.4. Fotoperíodo e a indução do florescimento.....	51
3.3. Estudos de competição de grãos de pólen.....	51
3.3.1. Introdução.....	51
3.3.2. Competição de grãos de pólen de milho e teosinte em estilo-estigmas de milho.....	52
3.3.2.1. Coleta do material.....	52
3.3.2.2. Técnica de polinização e uso do gene marca- dor.....	52
3.3.2.3. Medidas de grão de pólen em milho e teosin <u>u</u> te.....	54
3.3.2.4. Correção da frequência relativa de sementes pelo diâmetro do pólen.....	54
3.3.2.5. Pólen normal e abortado em milho e teosinte	55
3.3.2.6. Comprimento de estilo-estigma de milho e teosinte.....	56
3.3.2.7. Presença de fatores esporofíticos ou inibi- dores do tubo polínico em milho.....	56
3.3.2.8. Velocidade de germinação e desenvolvimento inicial de tubos polínicos de pólen de mi- lho e teosintes em estilo-estigmas de milho.	57

3.4. Heterofertilização	58
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	60
4.1. Estudos de fotoperiodismo em milho e teosinte.....	60
4.2. Estudos de competição de grãos de pólen de milho e teosinte	69
4.3. A heterofertilização e o isolamento genético de milho e teo sinte	81
Conclusão	85
Sumário	89
Summary	90
Referências Bibliográficas	92

1. Introdução

O milho, planta cultivada de grande importância no hemisfério Ocidental, tem seu centro de origem em regiões do México e Guatemala. A origem do cereal vem sendo debatida desde o final do século passado e até nossos dias, tem sido objeto de vigorosa controvérsia científica.

Apesar de ser uma das espécies que atingiu o mais alto grau de domesticação, o milho pouco difere de seu mais próximo parente selvagem, o teosinte. As diferenças principais se encontram na estrutura dística e fragmentável de infrutescência do teosinte, em contraposição a uma estrutura polística, não fragmentável, da espiga do milho. Existem, por outro lado, aproximadamente 250 raças de milho descritas, cujas diferenças não são cromossômicas mas gênicas (Paterniani, 1984). Todas essas raças são cultivadas, não se conhecendo nenhuma forma não cultivada ou selvagem.

As várias raças ou espécies de teosinte, todas selvagens, vegetam abundantemente no centro de origem e podem se cruzar com o milho cultivado. Esse híbrido é facilmente identificado pelos agricultores locais, por apresentar arquitetura de planta intermediária entre as duas espécies. Os híbridos são frequentemente férteis, o que obviamente sugere a ocorrência de trocas gênicas (Wilkes, 1967).

Tem sido considerado por muitos autores que a infiltração genética de teosinte em milho é um dos fatores impor-

tantes que tem contribuído nas mudanças evolutivas das populações de milho (Wellhausen et alii, 1951; Mangelsdorf, 1961; Wilkes, 1967, 1977; Doebley, 1984). Wilkes (1967), analisando a coloração de plantas de milho e teosinte, sugere a existência de um fluxo gênico de milho em direção a teosinte, nas regiões de Central Plateau e Vale do México.

Kato e Vargas (1986), estudando pigmentos fotossintéticos em milho e teosinte, concluíram que em populações simpátricas dessas espécies, a introgressão não tem ocorrido por um longo período. Essa informação, surpreendentemente, coloca dúvidas sobre a existência real de um fluxo gênico vigoroso entre as duas espécies.

Assim sendo esse trabalho foi realizado visando coletar evidências sobre a ocorrência ou não de introgressão preferencial entre milho e diferentes espécies de teosinte. Procurou-se ainda conhecer um pouco mais sobre a existência de barreiras genéticas que poderiam limitar cruzamentos naturais, e finalmente estudar o papel da resposta ao fotoperíodo como fator de isolamento da forma selvagem em relação à forma cultivada.

2. Revisão de Literatura

2.1. Os parentes mais próximos e a origem do milho.

Tem sido um procedimento relativamente simples monitorar a origem de alguns cereais tais como o trigo, a cevada e o arroz, espécies que proporcionaram o nascimento da agricultura do este e oeste asiático. Lá se encontram, ainda hoje, as espécies silvestres das quais derivaram esses cereais. Dai a possibilidade dos geneticistas identificarem as sucessivas formas de cultivo e a seleção que ocorreu para aprimoramento das características visando colheitas mais fáceis e abundantes (Beadle, 1980). No caso do milho, entretanto, a completa sucessão de tipos, dos mais primitivos aos cultivados, ainda hoje não foi encontrada.

O milho moderno, com espigas contendo grande número de grãos, protegidos por brácteas, não se assemelha morfológicamente a qualquer tipo de planta da América que possa candidatar-se como seu provável ancestral. Assim sendo, deve ter surgido de alguma espécie silvestre através da domesticação e seleção realizados pelos antigos habitantes da América do Norte e Central. A existência, ou não, de algo como o milho silvestre, tem se constituído, por si só, em polêmica científica objeto de acirradas discussões (Beadle, 1980).

A resolução do problema da origem do milho, assim como suas relações com plantas aparentadas vivendo simpátrica e alopatricamente, transcende o interesse puramente acadêmico. Pois a identificação do germoplasma ancestral, bem como a elucidação de aspectos evolutivos envolvendo milho e seus parentes selvagens, podem gerar informações valiosas para a produção de populações com diversidade genética mais apropriada.

Um grande número de teorias tem sido proposto, desde o início do século, a respeito da origem do milho. Mais recentemente, estas podem ser divididas em duas principais escolas de pensamento. Uma que sugere que o cereal originou-se direta e unicamente do teosinte, por seleção praticada pelo homem (Beadle, 1980; Galinat, 1970, 1971, 1975, 1978; de Wet e Harlan, 1972; Iltis, 1983; Kato, 1975; de Wet et alii, 1971, 1978) e outra sugerida por Mangelsdorf (1974, 1983, citado por Chughtai; 1985, 1986) que diz ser o teosinte originário do milho, ou de um "milho selvagem", ainda não descoberto, e provavelmente extinto.

Uma terceira hipótese mais abrangente, surgida a mais tempo, diz respeito a uma origem comum do milho, teosinte e tripsacum e foi proposta por Harsberger (1893, citado por Randolph, 1976). Segundo esse autor esses três taxa desenvolveram-se independentemente por evolução divergente de um ancestral comum remoto. O autor aparentemente foi influenciado pelas características primitivas de uma planta que supoz ser o "milho selvagem", porém identificada mais tarde (Harsberger, 1896, citado por Randolph, 1976) como um híbrido natural de milho e teosinte.

A descoberta, mais recentemente, de um teosinte perene diplóide, **Zea diploperennis** (Iltis et alii, 1979), em Jalisco, México, deu novo alento à hipótese, que um "milho selvagem" ou primitivo deu origem ao teosinte. Pois tem sido sugerido, pelos defensores dessa idéia, que o milho deu origem aos teosintes anuais através da introgressão em uma espécie perene ancestral de teosinte (Mangelsdorf, 1984). Procurando evidências nesse sentido foram sintetizadas populações híbridas de **Zea diploperennis** e um milho pipoca mexicano primitivo, raça Palomero Toluqueno, através de retrocruzamentos e F2, e avaliadas em campos experimentais na Flórida, Texas e Argentina. Um grande número de plantas dessas populações apresentaram características botânicas essenciais de teosinte anual, ou sejam, espigas e espiguetas estamimadas semelhantes àquelas das raças existentes de teosinte anual.

Ainda, segundo Mangelsdorf (1984), a descoberta de plantas de milho, bem preservadas, por McNeish (1985) dentro de cavernas não habitadas no Vale de Tehuacán, México, mostram uma idade aproximadamente de 5000 A.C.. Esses espécimens são tipos com todas as características botânicas do cereal atual, exceto a altura da planta. Em contraste, o mais antigo e autêntico exemplar de teosinte estudado por McNeish nas cavernas do México, são datados de aproximadamente 1500 A.C.. Além disso, em quatro outros sítios nos quais ocorreram evidências tanto de milho como de teosinte, o milho consistentemente precede o teosinte, em um caso específico, por cerca de 2000 anos (Mangelsdorf, 1983; citado por Mangelsdorf, 1984)

A teoria da origem do teosinte, proveniente da hibridação entre milho e teosinte perene diplóide, apresentada

mais recentemente, pode ser questionada através de experimentos envolvendo técnicas de genética molecular. Esses experimentos (Dennis e Peacock, 1984; Wilson e Larkins, 1984; Hake e Walbot, 1980; Hehl et alii, 1985; Chughtai, 1985 e Timothy et alii, 1979) mostram um grau de interrelacionamento maior entre milho e teosintes anuais mexicanos. Confirmando esses achados, outros experimentos envolvendo análises bioquímicas (Smith et alii, 1985; Mastebroek et alii, 1981), mostram que o milho é mais proximamente relacionado com os teosintes anuais do que com qualquer outro de seus parentes selvagens, como os teosintes perenes, ou representantes dos gêneros *Tripsacum* e *Coix*. Esse fato, nas palavras de Mangelsdorf (1984), já há mais de um século, não é motivo de controvérsia. O que os experimentos não conseguem mostrar é se a relação de parentesco mais próxima é devida ao fato do teosinte anual ser o ancestral do milho ou o milho ser o ancestral dos teosintes anuais. Os dois conceitos, ainda que idênticos a respeito de relações genéticas, diferem em seu relacionamento cronológico. Já tivemos oportunidade de relatar que segundo dados arqueológicos de espécimens coletados por Mangelsdorf e seus colegas, sobre idade do mais velho registro sobre milho e teosinte, a resposta parece ser inequívoca. O milho tem idade maior. Restam dúvidas, entretanto, sobre a autenticidade dos materiais amostrados, como cita Beadle (1980): "Em primeiro lugar e contrariamente a suposição de Mangelsdorf, descobriu-se recentemente duas sementes muito semelhantes ao do teosinte Chalco em um extrato pré-cerâmico, não alterado, de aproximadamente 7000 anos, em um sítio arqueológico situado a uns 32 Km a sudoeste da Cidade do México". Ainda no mesmo trabalho o autor levanta dúvidas quanto a pureza de amostra de grãos de pólen coletadas em escavações profundas na Cidade

do México, que serviram como provas para antecipar o aparecimento do milho em relação ao teosinte. Sugere o autor, (Beardle, 1980) que tais amostras estariam contaminadas por grãos de pólen provenientes de áreas próximas às escavações.

Uma outra variante da teoria do milho como ancestral do teosinte também proposta por Mangelsdorf e Reeves (1939, citados por deWet e Harlan, 1972) ficou conhecida como a hipótese "Tripartite" que diz ser o teosinte produto do cruzamento de uma forma ancestral de milho com *tripsacum*. Essa teoria proposta em 1939 e reexaminada por deWet e Harlan (1972), provocou mais controvérsias, e talvez por isso mesmo, despertou mais interesse que qualquer outra. A hipótese tripartite propõe que o ancestral do milho domesticado foi um agora extinto milho pipoca que em estado selvagem cruzou-se com o *tripsacum* gerando o teosinte. Posteriormente a introgressão com teosinte ou *tripsacum*, dessa forma ancestral e selvagem de milho, deu origem às raças modernas do cereal. As evidências contrárias a essa hipótese, entretanto, são muito abundantes. Citologicamente essas duas espécies não são proximamente relacionadas (Chandravadana e Galinat, 1971, citados por Galinat, 1974). Ademais milho e *tripsacum* nunca se cruzam na natureza. Os híbridos produzidos experimentalmente são completamente estéreis, pois nenhum dos 18 cromossomos de *tripsacum* pareiam normalmente com os 10 cromossomos de milho. Finalmente foi mostrado que blocos de genes responsáveis pela formação da cúpula do fruto, em teosinte, não poderiam ter surgido da introgressão por *tripsacum* (Galinat, 1971, 1977). Devido ao grande acúmulo de provas em contrário, essa hipótese foi abandonada por Mangelsdorf por volta de 1974. Pois Galinat (1971, 1974a), em colaboração com o próprio Mangels-

dorf, mapeou um número de genes de milho em *tripsacum*. Ao fazer isso, ele descobriu que um complexo de genes bastante ligados, localizados no cromossomo IV do teosinte, e também do milho, acha-se distribuído, pelo menos, em três cromossomos diferentes de *tripsacum*. Logo, como foi dito anteriormente, a falta de um conjunto de loci no *tripsacum*, que corresponda a esse segmento do cromossomo IV, constitui um difícil obstáculo para postular a descendência do teosinte da introgressão de *tripsacum* em milho (Galinat, 1971).

Uma modificação da teoria de Mangelsdorf, que o teosinte é proveniente do milho, é apresentada por Magoja et alii (1985) envolvendo a análise de 10 caracteres morfológicos das plantas em seis espécies de teosinte e uma variedade de milho. Essa análise segundo os autores mostrou, que os teosintes são produtos da introgressão de milho, primeiro no mais primitivo teosinte, ***Zea perennis*** (teosinte perene tetraplóide) e depois nos demais teosintes anuais diplóides.

Finalmente devemos mencionar a teoria que sugere que o milho originou-se direta e exclusivamente do teosinte através de seleção praticada pelo homem. Segundo Beadle (1980) essa seleção foi levada a efeito nos últimos 8000 a 15000 anos. As diferenças entre milho e teosinte são interpretadas como sendo de natureza puramente agrônômica. Nessa linha, segundo Iltis (1983), o milho é o teosinte (***Euclaena mexicana, sensu lato***), domesticado. Pois não diferem em quaisquer de seus caracteres básicos, quer vegetativo, floral ou genético. As peculiaridades do milho se resumem nas estruturas de sua inflorescência feminina, notadamente a raquis (sabugo). Essas alterações morfológicas podem ser facilmente interpretadas,

como resultado da seleção praticada pelo homem, para suprir suas necessidades em mais alimentos e mais fácil colheita.

Existem na verdade, evidências genéticas e citológicas bastante sólidas, de que o milho e teosinte, são bem aparentados. Eles tem o mesmo número e apresentam alta homologia de cromossomos (Kato, 1975). Os teosintes mexicanos, muitos dos quais receberam forte introgressão do milho e o milho mexicano, apresentam a mesma morfologia de cromossomo. Os cromossomos dos teosintes da Guatemala e da Flórida, entretanto, tem "knobs" terminais.

Dados obtidos por Smith et alii (1982) observando "knobs" cromossômicos em milho e teosinte mostraram não haver clara semelhança entre esses dois grupos. Entretanto, a análise de 46 posições de "knobs" em cromossomos extranumerários, designados cromossomos B, mostrou que o teosinte que mais se aproxima do milho foi o teosinte anual mexicano da raça Central Plateau. Os demais teosintes anuais, originários do México ou da Guatemala, mostraram-se mais afastados filogeneticamente.

Doebley (1983) analisou características de plantas pouco afetadas pelo processo de domesticação. Investigou a morfologia comparativa da inflorescência masculina (panícula) de uma larga amostra de populações de teosintes e raças de milho selecionadas. Esses conhecimentos aliados a dados citológicos, bioquímicos e genéticos, obtidos na literatura, mostraram que os teosintes anuais não são intermediários entre milho e *Zea diploperennis*, um fato que lança dúvidas sobre a hipótese que os teosintes anuais representam uma geração hí-

brida avançada de *Zea diploperennis* e um hipotético "milho selvagem". As evidências taxonômicas morfológicas levaram o autor a credenciar a hipótese de que um teosinte anual é o ancestral direto do milho.

Simultaneamente Iltis (1983), querendo dar mais detalhes dessa sequência, sugeriu uma teoria alternativa para explicar como a espiga de milho desenvolveu-se a partir da espiguetas masculina de um teosinte anual mexicano. Sugere que a espiga de milho foi derivada de uma espiguetas central da panícula de teosinte que é terminal às ramificações primárias laterais. Ainda segundo o autor, essa hipótese é mais consistente com a morfologia e explica a ausência de diferenças bioquímicas entre essas taxa. O milho, segundo Iltis (1983), é o único com inflorescências unissexuais que desenvolveram através de uma rápida transmutação sexual envolvendo a condensação das ramificações primárias laterais as quais conduziram seus pendões terminais para a zona de expressão sexual feminina, acarretando uma forte dominância apical e uma grande mudança na alocação de nutrientes. A transmutação sexual, proposta por Iltis, vem encontrar apoio em trabalhos envolvendo a expressão sexual em milho. A expressão sexual pode ser modificada consideravelmente por fatores genéticos e não genéticos (Frankel e Galun, 1977; Peterson, 1976). Segundo Peterson (1976) a expressão de órgãos sexuais masculinos ou femininos, em plantas de milho, muitas vezes mostram reversão sexual por meio da qual espiguetas masculinas desenvolvem-se em inflorescências femininas e partes pistiladas são observadas em espiguetas masculinas do pendão. Estas reversões podem ser iniciadas tanto por condições do meio ambiente como pela atividade de um certo número de genes.

Nos dias atuais são abundantes as evidências que parecem indicar o milho como sendo derivado de um teosinte anual. Trabalhos publicados recentemente mostram o teosinte **Zea diploperennis** ser radicalmente diferente do milho, e o teosinte anual da região de Guerrero, México (**Zea mays parviglumis**), o provável ancestral do milho (Doebley, 1983)

Outras evidências complementares vem de documentos históricos que mostram aspectos da linguagem e do folclore local. A palavra teosinte deriva do Asteca **Teocintli**, e significa "a espiga do milho de Deus" (Beadle, 1980). Como diz o autor, como saberiam os Astecas que o teosinte teria alguma relação com o milho? Seria este um caso de memória cultural? Afora isso, em muitas partes do México o teosinte é conhecido como "Madre del Maiz", ou seja, mãe do milho.

Nesse levantamento são claras as evidências de que os teosintes mexicanos anuais são os parentes mais próximos do milho, ficando os teosintes da Guatemala um pouco mais distantes. Embora alguns pontos ainda estejam necessitando de posterior evidência, parece que ocorre atualmente uma tendência da literatura oferecer mais frequentemente dados apoiando a hipótese do teosinte anual mexicano ser o tipo selvagem que deu origem ao milho cultivado, em consequência do processo de domesticação.

2.2. Hibridação entre milho e teosinte

Apenas recentemente os melhoristas tem demonstrado a viabilidade do uso de germoplasma mais primitivo para melhorar o milho. Tais programas incluem a incorporação de genes que condicionam alto valor nutritivo, resistência a patógenos ou insetos (Galinat, 1977; Galinat e Pasupuleti, 1982; Bird, 1982; Cohen e Galinat, 1984), ou ainda para aumentar a heterose e variabilidade (Mangelsdorf, 1961; Beadle, 1980, Magoja e Pischedda, 1986). Mangelsdorf (1961) sugere que genes que conferem resistência ao calor e a seca podem ter originado por introgressão de genes de teosinte em milho.

A introgressão de genes de uma planta selvagem em um parente cultivado tem sido documentada em muitas plantas cultivadas como em arroz, sorgo e milho. Porém o que é impar em híbridos de milho x teosinte é o fluxo de genes que ocorre da planta cultivada para a planta selvagem (Wilkes, 1967). Existe, entretanto, em milho e teosinte, no México e em regiões próximas da fronteira da Guatemala, alguns exemplos de introgressão recíproca. Daí poder se considerar a evolução de milho e teosinte como um caso de modelo de hibridação introgressiva.

O termo hibridação introgressiva foi proposto por Anderson e Hubrich (1934, citados por Wilkes, 1967) para descrever uma gradual infiltração do germoplasma de uma espécie em outra, com um concomitante aumento de variabilidade. Essa introgressão recíproca tem sido considerada pelas duas cor-

rentes que procuram interpretar a relação do milho com o teosinte (Chughthai, 1985). Os que propõem a hipótese de um ancestral comum tomam esse fato como um indicador de proximidade genética, alegando que uma espécie de teosinte mexicano seria o tipo ancestral comum. O milho teria divergido obedecendo a diferentes pressões evolutivas e principalmente por seleção praticada pelo homem. Por outro lado os proponentes da teoria de um milho primitivo selvagem, agora extinto, sugerem que a aparente proximidade genética entre milho e teosinte, e a conseqüente hibridação introgressiva, é o resultado da introgressão de milho em teosinte e, portanto, o milho teria de certa forma, originado as espécies de teosinte como elas são conhecidas atualmente (Mangelsdorf, 1984).

A descoberta dos primeiros híbridos entre milho e teosinte remontam ao final do século passado. Wilkes (1967) descreveu três áreas no México e na Guatemala onde milho e teosinte hibridizam e onde existe um sistema pelo qual agricultores da região exploram esse efeito para aumentar suas colheitas de milho.

A interfertilidade e a ampla hibridação proporcionando trocas gênicas entre os dois taxa, levou Mangelsdorf (1961) a afirmar que "uma classificação mais realística seria dizer que aqui, Chalco, onde híbridos de milho e teosinte são abundantes) milho e teosinte representam uma única espécie dimórfica na qual um componente é preservado pelo homem e o outro pela natureza".

Muita variabilidade encontrada em raças de milho tem sido atribuída à introgressão provinda de teosinte ou tripsa-

cum (Wellhausen et alii, 1951, 1958; Mangelsdorf, 1961). A introgressão por teosinte tem sido unanimamente considerada como a fonte imediata de caracteres tripsacóides no milho da América Central e México. Esses caracteres tripsacóides são, por exemplo, aumento do número de perfilhos, plantas mais baixas, folhas mais estreitas e colmo mais espesso. Os híbridos F₁ são usualmente vigorosos e férteis e são facilmente retrocruzados com qualquer grupo parental. Como consequência, segundo Mangelsdorf (1961), existe um constante fluxo gênico entre as duas espécies, isto é, um fluxo que move-se em ambas direções. Na região de Chalco, México, plantas de teosinte tem a mesma coloração e as mesmas bainhas pilosas semelhantes ao do milho plantado na área (Mangelsdorf, 1961; Wilkes, 1967, 1977).

Na mesma linha Wilkes (1967) observou que nas regiões de Central Plateau e Vale do México a formação de antocianina é encontrada em todas populações de teosinte. Notou que populações mais primitivas de teosinte eram predominantemente de cor roxa avermelhada clara, uma vez que o gene B, intensificador dessa cor ocorria em baixa frequência nessas populações. Entretanto, em campos cultivados onde teosinte ocorre ao lado de plantas de milho com coloração roxa avermelhada mais intensa o autor observou que a frequência de genes B em plantas de teosinte é muito alta e muitas plantas de teosinte tem uma coloração roxa avermelhada mais intensa. Wilkes em suas pesquisas não havia encontrado essa coloração em populações selvagens e suspeita que ela tenha surgido na população de teosinte no Vale do México através de hibridação com a raça de milho local, Chalqueño. Por outro lado, Wilkes (1967) notou que na região do rio Balsas o fluxo gênico entre

teosinte e milho é quase que inteiramente em uma só direção, ou seja, de teosinte para o milho.

Baseando-se em registros arqueológicos, MacNeish (1985), revela que em cada sequência arqueológica, hibridação de milho com teosinte vem após as primeiras ocorrências de milho e a frequência de cruzamentos aumentou em tempos mais recentes. Os registros de milho sofrendo introgressão por teosinte segundo o autor podem ser datados de aproximadamente 4000 A.C.

Verifica-se pelos dados na literatura que o fluxo gênico pode ocorrer em ambas direções, porém, Wilkes (1967) sugere que a infiltração é maior no sentido de milho para teosinte, do que no sentido inverso.

Segundo Randolph (1976), a introgressão de genes de milho em teosinte, no México, foi tão forte que amostras de teosinte daquele país dificilmente podem representar, com segurança, a espécie, em trabalhos de genética e taxonomia.

Por outro lado, Doebley (1984) sugere que as evidências da introgressão de milho em teosinte parecem refletir adaptação de populações particulares de teosinte às exigências de habitats específicos. Assim sendo, dependendo da população, em um determinado local, o teosinte simpátrico mostrará coloração avermelhada na folha, tamanho maior dos grãos, formato triangular dos frutos e a presença de "knobs" internos nos cromossomos. No entanto, segundo o autor, o teosinte tem permanecido relativamente livre de contaminação por milho pelo menos a respeito daqueles caracteres que afetam a sobrevi-

vência do teosinte na natureza, notadamente a dispersão de sementes.

Confirmando essas observações, Kato e Vargas (1986), estudando pigmentos fotossintéticos, concluíram que em populações simpátricas de milho e teosinte a introgressão não tem ocorrido por milênios, provavelmente, ou não está ocorrendo em nossos dias, a despeito da hibridação com constante produção de híbridos férteis. Evidências recentes nesse sentido são apresentadas por Smith et alii (1985). Em estudo envolvendo eletroforese para 19 enzimas em milho e teosinte provenientes de populações do México e Guatemala, sugerem que não existe uma clara evidência mostrando introgressão recente entre milho e teosinte.

Fica claro dos estudos publicados até aqui, que milho e teosinte se inter cruzam sem dificuldades, produzindo híbridos férteis, quer em cruzamentos naturais, quer em polinizações artificiais. Estudos recentes, entretanto, evidenciam, surpreendentemente, que milho e teosinte, embora coabitando, mantem-se isolados na natureza, guardando cada um as características morfológicas e fisiológicas do taxon.

2.3. Isolamento genético de milho e teosinte

Como o híbrido de milho e teosinte é totalmente fértil, e a introgressão entre milho e teosinte tem-se reve-

lado pouco significativa, aspectos envolvendo mecanismos de isolamento das duas espécies tornam-se bastante importantes. O isolamento geográfico ou a domesticação do milho, fora do alcance do teosinte, seriam os meios mais simples para se impedir a troca gênica. O isolamento espacial entre milho e teosinte, no entanto, tem sido quebrado nos últimos 5000 anos, especialmente após a invasão espanhola no México.

Mesmo ocorrendo simpatricamente, milho e teosinte podem apresentar um isolamento temporal em decorrência do ciclo reprodutivo distinto. Os dois grupos podem se isolar, em consequência do florescimento em épocas distintas. Isso, entretanto, será objeto de análise posterior.

Por outro lado alguns mecanismos genéticos podem promover o isolamento de plantas numa comunidade. Em milho, por exemplo, ocorre uma série alélica Ga^S , Ga , ga , localizada no cromossomo IV, com presença de genes que podem condicionar uma inibição do gametófito masculino. Um outro mecanismo que poderia ocorrer seria a existência de uma barreira cromossômica, como por exemplo, a observada entre *Zea perennis*, teosinte perene tetraplóide ($n=20$), e o milho ($n=10$), uma vez que a semente com embrião triplóide, resultante do cruzamento, tem tamanho extremamente reduzido e dificilmente chega a produzir uma planta adulta. Um outro mecanismo que poderia ocorrer seria um rearranjo cromossômico tal que, poderia prevenir ou inibir a permuta entre cromossomos de milho e teosinte, protegendo assim, genes localizados em certos segmentos cromossômicos vitais para a sobrevivência da espécie.

2.3.1. Pólen e tubo polínico

Estudos de grão de pólen de milho e teosinte tem sido realizados buscando evidências para elucidar a origem do milho (Mangelsdorf et alii, 1978). Em consequência do valor econômico do cereal existe obviamente uma bibliografia muito mais intensa a respeito do pólen de milho, englobando vários aspectos da composição química (Pfahler e Linskens, 1970, 1971; Goss, 1968), da germinação "in vivo" e "in vitro", de estudos de substâncias de crescimento (Fukui et alii, 1958), de dispersão e deposição do pólen de milho (Raynor et alii, 1972) e de estudos detalhados de germinação.

Raynor et alii (1972) estudando a dispersão e deposição de pólen de milho em parcelas experimentais, mostraram que essa deposição é influenciada pelo tamanho dos grãos de pólen. Eles encontraram que à 60 metros da fonte, na direção do vento, as quantidades foram em média de 1% daquelas encontradas à 1 metro e que a quantidade total de pólen permanecendo no ar à 60 metros é de 5% daquela verificada à 1 metro.

Por outro lado em estudos de germinação de grão de pólen e formação do tubo polínico, Ter-Avanesian (1978) mostrou que existe um efeito de quantidade de grãos de pólen no desenvolvimento do tubo polínico. Demonstrou que existe uma redução da taxa de crescimento do tubo polínico quando poucos

grãos de pólen germinam nos estilo-estigmas.

Basicamente o estudo da germinação de grãos de pólen é feito em dois sistemas: "in vivo" e "in vitro". Kumar e Sarkar (1975) estudando o crescimento de tubos polínicos nesses dois sistemas mostraram, em estudos de correlação de tamanhos de pólen e taxa de crescimento de tubo polínico, em meio artificial, que um grão de pólen de maior tamanho mostra uma maior taxa de crescimento do tubo polínico do que um grão de pólen menor. O coeficiente de correlação obtido para esse estudo "in vitro" foi de 0.84. Entretanto um coeficiente de correlação não significativo, de -0.30, foi obtido entre tamanho de grão de pólen e taxa de crescimento do tubo polínico em estilo-estigmas frescos "in vivo". Os mesmos autores (Kumar e Sarkar, 1985) mostraram existir um controle esporofítico poligênico determinando o comprimento do tubo polínico "in vivo".

Pfahler e Linskens (1972) investigaram a germinação e crescimento do tubo polínico "in vitro" do milho, combinando efeitos de armazenamento de pólen em mutantes de endosperma. Mostraram que esses alelos também afetam a composição química do grão de pólen, e que diferenças na germinação "in vitro" e habilidade de fertilização podem estar associados com o genótipo do pólen.

É sabido que o teosinte, de um modo geral, apresenta tamanho de grão de pólen menor que o do milho (Aguirre e Kato, 1979). Banerjee e Barghoorn (1971) e Kumar e Sarkar (1983), mostraram também, que existe uma influência tanto do meio ambiente como do genótipo determinando o diâmetro do

grão de pólen. O genótipo, entretanto, foi considerado ter um papel predominante nessa expressão fenotípica. A ausência de interação de genótipo x local e genótipo x ano, sugere que o diâmetro do grão de pólen pode ser qualificado como herdável e altamente estável. Ainda segundo Kumar e Sarkar (1983) o diâmetro do grão de pólen em milho é de herança quantitativa sendo primariamente controlado pelo genótipo da planta mãe. O tamanho do grão de pólen pode estar correlacionado com outras características da planta. Galinat (1961) mostrou que existe uma associação entre o tamanho do grão de pólen com o comprimento do estilo-estigma em milho. Segundo esse autor essa correlação não é o resultado da ação pleiotrópica de genes, mas seria um efeito secundário surgido em consequência da seleção de milho para espigas mais longas.

O diâmetro do grão de pólen (Kumar e Sarkar, 1980; Aguirre e Kato, 1979), bem como o comprimento do estilo-estigma (Hofmeyr, 1961) e seu diâmetro (Galinat et alii, 1981) podem influir no desenvolvimento do tubo polínico de milho e teosinte, dificultando ou mesmo impedindo a hibridação dos dois taxa.

2.3.2. Competição de grãos de pólen de milho e teosinte

Diversos estudos envolvendo a competição de grão de pólen entre milho e teosinte foram realizados "in vivo". Em 1970, Gil estudou a frequência de plantas de milho em cruza-

mentos envolvendo misturas de pólen de milho e teosinte em estilo-estigmas de milho. O autor observou que 59% das raças de milho, com espigas polinizadas com uma mistura de pólen de milho e teosinte não apresentaram nenhuma semente originária da fecundação de ovários de milho por pólen de teosinte. Algumas raças de milho permitiram cruzamentos com teosinte, porém existiu uma forte seleção em favor do pólen de milho e somente duas raças de milho (7%) não mostraram evidências da existência de um mecanismo prevenindo a fertilização de óvulos de milho por pólen de teosinte.

Em 1979, Aguirre e Kato estudaram a competição entre pólen de milho e teosinte durante a fecundação usando como marcador genético o gene recessivo waxy, que em dose dupla torna a semente opaca. Concluíram que a competição se deve a uma velocidade diferencial no crescimento dos tubos polínicos nos estilo-estigmas de milho, registrando uma menor velocidade para o pólen de teosinte. O pólen do híbrido F₁ mostrou uma capacidade competitiva similar à do pólen do milho. Não foi constatada a existência de uma relação direta entre o tamanho dos grãos de pólen e a capacidade destes na fecundação.

Em 1980, Galinat estudando a competição do tubo polínico entre teosinte e milho, em estilo-estigmas cortados de milho, utilizando como marcador um gene dominante que condiciona a cor roxa da aleurona, encontrou um maior número de fertilizações de óvulos de milho por pólen de teosinte, contrariando obviamente as informações obtidas por Aguirre e Kato (1979).

Goodman et alii (1983) deram evidências que raças de

teosinte apresentam um comportamento diferente quanto a capacidade de se cruzar com o milho, quando o milho é usado como fêmea nos cruzamentos. A habilidade de fertilização foi medida pela quantidade de sementes obtidas no cruzamento de milho com cada raça de teosinte estudada. Foram observadas diferenças substanciais na quantidade de sementes dos vários cruzamentos. As raças Central Plateau e Balsas, com uma média de 114 e 107 sementes obtidas, respectivamente, ambas originárias do México, cruzaram mais facilmente com o milho enquanto que as raças Guatemala e Huehuetenango, originárias da Guatemala e *Zea diploperennis*, teosinte perene diplóide originário do México, produziram uma quantidade reduzida de sementes, ou seja, 57, 57 e 26, respectivamente. O autor também encontrou surpreendentemente apenas 26 sementes em cruzamentos de milho com a raça de teosinte Chalco, também mexicana e anual.

Há também a possibilidade que o tamanho do grão de pólen possa estar ligado a habilidade competitiva de cada material em função de diferentes adaptações acumuladas durante o curso da evolução. Assim, Galinat (1979), sugere que um menor tamanho do grão de pólen do teosinte moderno é uma adaptação secundária para promover a autofecundação. Supondo-se que o milho e teosinte divergiram durante a domesticação, o teosinte ficaria ameaçado de extinção pela assimilação de características do tipo domesticado, principalmente envolvendo características da espiga do milho. Ainda, segundo o autor deveria existir uma vantagem seletiva para um pólen menor competir favoravelmente em estigmas curto de teosinte. Afirma que a pressão seletiva em plantas polinizadas pelo vento tendem a favorecer os tipos que produzem uma ampla liberação de pólen pequeno.

Galinat et alii (1981) ainda estudando o mesmo tema questiona porque os teosintes simpátricos ao milho tem pólen pequeno, enquanto que os teosintes mais isolados do milho, tais como as raças da Guatemala e Honduras, tem pólen do tamanho daquele do milho primitivo, como é o caso da raça Chapalote. Segundo o autor, o problema da proteção do teosinte impedindo a hibridação introgressiva por milho envolve a competição de tubos polínicos dentro dos estilo-estigmas de teosinte. Para estudar isto, o autor usou como marcador genes para cor de aleurona e mistura de pólen das duas espécies. De acordo com os seus dados existe um excesso de fertilização por pólen de teosinte, 379, em relação à polinizações por pólen de milho, 82, em estilo-estigmas de teosinte. Isto é o oposto do que teria ocorrido se a mesma mistura de pólen houvesse sido colocada em estigmas de milho.

Essa habilidade competitiva, pode também ser devida a interação entre genótipos de pólen e tecidos do estilo-estigma, e não somente devido a tamanhos diferentes de grão de pólen e estilo-estigma. De fato Gorla et alii (1976) estudando interações entre genótipos de pólen e tecidos do estigma notaram, do momento da germinação do pólen, e particularmente, durante a passagem do tubo polínico através do tecido de transmissão do estilo-estigma, que existem importantes interações metabólicas entre pólen e estilo-estigma que determina a habilidade competitiva relativa dos grãos de pólen. Desse modo, mesmo em espécies que não revelam auto-incompatibilidade, o esporófito feminino atua como um mecanismo seletivo na transmissão do pólen. Salientam que mesmo que ocorram diferenças na taxa de crescimento dos tubos po-

línicos, condicionado pelo genótipo do pólen, a real possibilidade dos núcleos alcançarem os óvulos vai depender do suporte dos tecidos do estilo-estigma onde o tubo cresce, uma vez que as reservas nutricionais do pólen se exaurem nesse processo. A interação pólen x estilo-estigma observadas pelos autores indica, também, que a habilidade de fertilização do tubo polínico depende da habilidade do genótipo dos tecidos da fêmea de complementar as necessidades do gametófito masculino. Talvez seja essa interação a razão da falta de boa correspondência entre experimentos "in vivo" e "in vitro".

2.3.3. Fatores gametofíticos no isolamento reprodutivo entre milho e teosinte

Sabe-se que a autoincompatibilidade e a incompatibilidade sexual de plantas é uma inibição geneticamente dirigida. Se a incompatibilidade resulta somente de efeitos de alelos idênticos presentes no pólen e nos tecidos do pistilo, então o sistema é denominado gametofítico. O sistema é denominado esporofítico quando é o genótipo do esporófito, ao contrário daquele do gameta masculino que determina o alelo ativo do pólen (Townsend, 1971 citado por Ferrari e Wallace, 1977). Um exemplo dessa interação, incompatibilidade, envolvendo fatores geneticamente controlados, que podem mudar o comportamento de determinado tipo de grão de pólen em um determinado tecido estilar, é a série de genes gametofíticos (**Ga**, **ga**) que são encontrados no cromossomo IV do milho. Sa-

be-se que na presença do gene **Ga** no genoma da planta, os grãos de pólen portadores desse fator serão mais viáveis no momento da fecundação. Grãos de pólen portadores da forma recessiva, **ga**, sofrerão uma inibição no desenvolvimento do tubo polínico. Shmaraev e Podolskaya (1981) estudando a habilidade de cruzamento entre teosinte anual mexicano, raça Chalco e o milho doce da variedade Golden Batan, mostraram que o teosinte tem o gene gametofítico para incompatibilidade ligado ao gene Sugary no cromossomo IV.

Em trabalho semelhante Bianchi (1957), mostrou existirem outros fatores gametofíticos envolvidos na fecundação de milho e teosinte. Analisando mutantes de endosperma, em gerações avançadas de híbridos de milho x teosinte, Bianchi reconheceu a presença de genes que produzem endospermas inviáveis. Contudo gerações avançadas cruzadas com estoques portadores de vários genes testadores mostrou que fatores **Ga** poderiam explicar a segregação aberrante observada. Esses fatores gametofíticos estariam no cromossomo IX, ligados ao gene Waxy (**Wx**) .

Nelson (1981) reexaminou o fenômeno das proporções aberrantes em milho, através do estudo de progênies de um estoque **Su/su**. O autor observou um excesso de até 20% de sementes com fenótipo enrugado em muitos cruzamentos entre plantas irmãs provenientes de sementes heterozigotas para o gene Sugary (**Su/su**) e plantas homozigotas recessivas (**su/su**). Nelson propõe que ao contrário de um único fator do tipo **Ga**, seja também considerado, um outro fator gametofítico.

O efeito causado pela mistura de diferentes tipos de

grão de pólen, ou efeitos intergametofíticos foi estudado por Gorla e Rovida (1980), usando a técnica de mistura de pólen e o gene marcador opaque-2. O efeito do gene marcador de pólen foi analisado através do estudo de progênies de plantas $o2/+$, autofecundadas por quatro gerações. O pólen levando o alelo recessivo $o2$ revelou uma menor taxa de germinação do que o alelo correspondente dominante. Nenhuma diferença entre os dois tipos de pólen foi observada com respeito a taxa de crescimento do tubo polínico. Esses autores confirmaram ainda a existência de interações intergametofíticas.

2.3.4. Estudos de germinação e interação pólen estilo-estigma

Gorla et alii (1975) também sugerem a ocorrência de interação pólen x estilo-estigma ou pólen x pólen nos estudos "in vivo" da taxa de crescimento do tubo polínico em milho. A interação pólen x pólen foi estudada por Pandey (1977). Segundo o autor tem se demonstrado que para certas espécies vegetais, combinações normalmente incompatíveis inter ou intraespecíficas podem se tornar compatíveis pela mistura de pólen compatível (mentor), morto por irradiação ou por agente químico, com pólen incompatível no momento da polinização. Segundo o autor, tem sido proposto, por outros pesquisadores, que no sistema esporofítico de incompatibilidade o pólen mentor compatível provê uma substância específica de reconhecimento ausente no pólen incompatível, tornando o último com-

patível.

Substanciais quantidades de proteínas são contidas nas paredes dos grãos de pólen (Knox e Heslop Harrison, 1969, 1970, 1971a, citados por Pandey, 1977). Essas substâncias são rapidamente liberadas quando o grão de pólen é umedecido (Knox, 1973 citado por Pandey, 1977). Essas enzimas poderiam alterar a germinação de certos tipos de grão de pólen.

Pfahler (1967) estudou o efeito da interação do genótipo do pólen, do esporófito feminino e do armazenamento dos grãos de pólen na habilidade de fertilização utilizando como gene marcador a série de genes *Y,y* para cor do endosperma. Concluiu que as três variáveis estudadas influem na capacidade de fertilização e que de um modo especial a variação resultante dos períodos de estocagem estava associada com a linhagem usada como fêmea nos cruzamentos.

Van Der Donk (1975, citado por Gorla et alii, 1976) sugere que uma vez que o grão de pólen tem limitadas reservas de substrato, é razoável pensar-se que no mínimo uma parte do substrato necessário para o crescimento do tubo polínico é derivada do estilo-estigma, o qual, para este propósito, expressaria um grupo especial de genes.

A receptividade do estigma não é constante ao longo do florescimento. De fato a idade dos estilo-estigmas deve ser considerada em estudos de competição de grãos de pólen. Sabe-se que sob condições de campo os estigmas são polinizados tão logo são expostos fora da espiga, enquanto que em ex-

perimentos de polinização controlada os estilo-estigmas são utilizados com diferentes idades. Peterson (1942) estudando a duração da receptividade em estigmas de milho, através da quantidade de sementes obtidas, mostrou que a receptividade estendeu-se por um período maior que 19 dias. A obtenção de sementes em estilo-estigmas com um dia de idade pode atingir a 58%, enquanto que estigmas de 2 a 8 dias de idade apresentam granação mais uniforme, alcançando 91%. A partir daí, a quantidade de sementes obtidas declinou, alcançando 8% em estilo-estigmas com 19 dias de idade. Corroborando esses achados Jones e Newell (1948) mostraram que a quantidade de sementes produzidas pode ser considerada como indicativo da idade dos estilo-estigmas. A quantidade de sementes obtidas em estilo-estigmas de dois dias de idade foi de 55%. Estigmas de 2 a 12 dias de idade tiveram uma média de 60%, com um pico de 66% sendo alcançado no oitavo dia. A quantidade de sementes decresceu para 41% em estigmas de 14 dias atingindo 2% em estigmas de 24 dias de idade.

A idade do estilo-estigma também afeta a habilidade competitiva de grãos de pólen distintos. Landi e Sanguinetti (1985), por exemplo, notaram que a competição entre pólen da própria planta receptora e pólen estranho foi afetada, entre outros fatores pela idade dos estilo-estigmas. A frequência de autofecundações mostrou um aumento em estilo-estigmas com dois dias de exposição em relação a estilo-estigmas de 6 dias de idade. Em seguida houve um pequeno decréscimo na taxa de autofecundações em estilo-estigmas expostos a 10 dias. Portanto, também a idade do estigma deve ser considerada importante na interação pólen x estilo-estigma.

No sentido de explicar essa interação estudos ultraestruturais em estilo-estigmas e tubos polínicos de milho foram efetuados por Kroh et alii (1979) e Heslop-Harrison et alii (1984a). Segundo esses autores o estilo-estigma após um período de divisão celular, cresce em comprimento na zona basal principalmente por extensão celular. A principal superfície receptora de pólen é constituída por duas zonas marginais irregulares de tricomas. Os tricomas estendem-se por todo comprimento do estilo-estigma exceto numa zona de cerca de 5mm distante da inserção no ovário. As células dos tricomas são adaptadas para produzir secreção interna e externa, como ocorre nas outras gramíneas. No estágio receptivo são cobertos por uma superfície contínua contendo componentes pécticos e proteináceos. A morfologia do complexo celular basal do tricoma é tal que provê uma via de sensoreamento inicial para o tubo polínico em sua entrada no eixo principal do estigma. O tecido de transmissão ao longo do estigma é composto de células alongadas e fusiformes com abundante secreção intercelular. Como em outros estigmas de gramíneas, esta secreção que forma o meio transmissor para o tubo polínico, contém proteínas e polissacarídeos na forma de ácidos pécticos. Kroh et alii (1979) verificaram que o milho possui estilo-estigmas variando de 1 até 30cm de comprimento, e que os tubos polínicos demoram em média 24 horas para alcançar o ovário. Durante esse período, grandes quantidades de carboidratos da parede do tubo devem ser sintetizados, e o diâmetro do tubo polínico no estigma pode variar entre 6 e 13 μ .

A germinação do pólen e o desenvolvimento do tubo polínico tem sido estudados tanto em milho como em outros cereais. A receptividade dos estigmas de milho ao pólen de mi-

lho e *Sorghum bicolor* (L.) Moench foi estudado "in vivo" (Heslop-Harrison, 1984b) e "in vitro" (Dhaliwal e King, 1978). Os últimos autores ainda estudaram a polinização direta de óvulos de milho "in vitro" por pólen de teosinte. Dhaliwal e King (1978) efetuaram a polinização direta de óvulos de milho "in vitro" com pólen de milho, teosinte e sorgo. Segundo eles os tubos polínicos de sorgo penetram e crescem em estilo-estigmas de milho, porém, atingem apenas 3 a 5mm.

Heslop-Harrison et alii (1984b) mostraram que a germinação dos pólenes de milho, sorgo e *Pennisetum* e a penetração em estilo-estigmas de milho, em temperatura normal de crescimento, é afetada principalmente pela umidade atmosférica. O ponto ideal para as três espécies é conseguido com umidade relativa superior a 70%. Nessas condições os tricomas atuam como um sítio mais favorável para a ligação do pólen, seguido da hidratação, germinação e penetração. Mostraram ainda que em polinizações controladas envolvendo apenas um único grão de pólen, o tempo mínimo de ligação do pólen ao tricoma à germinação foi de 9 minutos para o próprio pólen de milho, 1 minuto e 25 segundos para o pólen de sorgo e 1 minuto e 42 segundos para o pólen de *Pennisetum* em umidade relativa de 70%. Observou-se que embora os tubos polínicos de sorgo possam apresentar taxas de crescimento até superiores às registradas em seu próprio estilo, falham em localizar o trato transmissor no estilo-estigma de milho. O crescimento do tubo polínico de milho, embora menor, é bem orientado. Ao que parece, segundo os autores em todas as três espécies a entrada do tubo polínico promove a secreção de polissacarídeos pécticos e proteínas pelas células do eixo do estilo-estigma. Presumivelmente produtos de secreção adicional

são também liberados nos espaços intercelulares dos tratos de transmissão durante a passagem do tubo polínico. A via total de crescimento do tubo polínico em milho pode ser superior a muitos decímetros. Segundo os autores o grão de pólen de milho não poderia sustentar mais do que 2cm de crescimento da parede do tubo polínico.

Heslop-Harrison et alii (1985) estudando a biologia da reprodução em milho constataram que o estigma pode suportar a hidratação e germinação de considerável número de grãos de pólen, ainda que, em geral, somente um tubo polínico penetre a micrópila para efetuar a fertilização. Miller (1919, citado por Heslop-Harrison, 1985), após uma centena de observações verificou que não mais do que um único tubo é visto na cavidade do ovário. Embora Heslop-Harrison et alii (1985) não tenham encontrado uma sensível eliminação de tubos polínicos, não existem dúvidas que uma severa redução do número de tubos ocorra antes da fase final de crescimento dentro da cavidade do ovário. A natureza desse processo de eliminação dos tubos polínicos é de considerável interesse científico. Em primeiro lugar porque revelaria mecanismos que atuam sobre os tubos polínicos de diferentes genótipos afetando as proporções genotípicas observadas em segregações. Em segundo lugar porque mostraria como se processa o controle para se evitar a penetração de tubos polínicos estranhos promovendo o isolamento genético. Esses autores propõem os seguintes passos para explicar uma eliminação gradual do número de tubos polínicos ao longo do estilo-estigma em seu processo de crescimento: (1) pela competição nos tricomas receptivos e nos tratos de transmissão, (2) pela eliminação dos tubos polínicos mais tardios na entrada da zona de abscisão do estilo-estigma,

(3) pela contração da zona dos tratos de transmissão na parede superior do ovário, e (4) na vizinhança da micrópila. O controle exercido na zona de abscisão parece ser o mais efetivo. Concluíram que os tubos polínicos de milho penetrando em estilo-estigma de milho, de maneira usual, através de tricomas receptivos, são canalizados em direção ao ovário, principalmente por obstáculos mecânicos. Esses tubos, entretanto, podem estar sujeitos a um controle quimiotrópico ao longo do estilo-estigma. Existem também sugestões de que fatores quimiotrópicos difusíveis originados na vizinhança da micrópila podem ser responsáveis pelo direcionamento final do crescimento do tubo. Esses fatores seriam os produtos dos núcleos, ou do integumento adjacente. A possibilidade de que o saco embrionário produza fatores quimiotrópicos tem sido amplamente aceita. De fato, tem se apontado (Heslop-Harrison et alii, 1985), as sinérgides como possíveis fontes dessas substâncias. O aparato filiforme da sinérgide tem características de uma célula de transferência da parede, sugerindo uma função secretora em algum estágio do desenvolvimento. Contudo, os mesmos autores encontraram abundante produto de secreção nos espaços intercelulares entre as colunas nucelares da micrópila.

2.3.5. Heterofertilização

O termo heterofertilização foi aplicado por Sprague (1929) para definir o processo pelo qual o embrião e o endosperma da mesma semente diferem geneticamente. Em milho a heterofertilização tem sido identificada por diversos pesquisadores. Sprague (1929, 1932) estudando a herança da cor de escutelo e aleurona mostrou a existência de heterofertilização em milho, ocorrendo com frequência média de aproximadamente uma semente em 80. Em algumas linhagens de alta taxa de heterofertilização, entretanto, esse valor chegou a 25%.

No Brasil, Paterniani (1963) também observou heterofertilização em endosperma e embriões de milho usando para monitorar o processo um loco que é responsável pela presença de características na semente conferindo coloração branca ou amarela ao endosperma. A variedade de milho estudada mostrou uma proporção de 0,2% de heterofertilização.

Na tentativa de se conhecer um pouco mais da natureza desse evento Sarkar e Coe (1971) procuraram alguns fatores para explicar a heterofertilização em milho. Utilizando como marcadores a coloração roxa do escutelo e do endosperma encontraram nas linhagens estudadas uma frequência de 1,15% de heterofertilização. Verificaram que a degeneração ou atenuação de núcleos espermáticos durante o crescimento do tubo polínico através do estilo-estigma não parece estar relacionado com o fenômeno da heterofertilização. Com o mesmo objetivo,

mais recentemente, Robertson (1984) estudando diversas linhagens de milho, mostrou que estoques distintos apresentaram diferentes porcentagens de heterofertilização. Estudando herança para cor de aleurona e escutelo, encontrou heterofertilização variando numa faixa de 1 a 5%. Não encontrou, entretanto, evidências concretas que pudessem elucidar a natureza da heterofertilização.

Sementes com embriões e endospermas diferindo geneticamente resultam da fertilização da oosfera e dos núcleos polares por núcleos espermáticos de grãos de pólen de diferentes genótipos. Na verdade existem outros fenômenos que teoricamente, poderiam produzir uma não correspondência genética entre o embrião e o endosperma de uma mesma semente. Um deles poderia ocorrer em segregações envolvendo translocações B-A. Beckett (1978) estudando translocações B-A em milho mostrou que essas translocações parecem não levar alelos de genes encontrados no complemento normal e é relativamente inerte ou inócua quando baixo número está presente.

Sarkar e Coe (1971) também descartaram a possibilidade dos dois núcleos espermáticos de um mesmo grão de pólen fecundarem apenas a oosfera ou apenas o núcleo polar requerendo um segundo núcleo espermático de outro grão de pólen para completar a dupla fertilização. A ocorrência de mutação no locus estudado poderia também simular a heterofertilização. Entretanto, os autores observaram que heterofertilização ocorre em frequência muito alta para ser explicado simplesmente por mutação. A verdade é que até agora não tem sido a-

presentado nenhum trabalho revelando a causa da heterofertilização.

Desse capítulo percebemos que vários estudos tem sido realizados mostrando que ocorre uma clara competição entre pólen de teosinte e milho, evidenciando a existência de mecanismos pré-zigóticos de isolamento dos dois germoplasmas na natureza. Embora se conheça a consequência do processo, não se tem informações até agora que mostrem onde e como se manifestam esses mecanismos.

2.4. Florescimento e o isolamento temporal de milho e teosinte

2.4.1. Introdução

Embora convivendo no mesmo habitat, o milho cultivado e seus prováveis antepassados, os teosintes, podem apresentar diferentes respostas ao comprimento do dia. Como consequência podem florescer em épocas distintas e assim manter-se isolados geneticamente. Dai o interesse de se estudar mecanismos genéticos que condicionam essas diferenças.

2.4.2. Fotoperiodismo em milho e teosinte

Foi o fisiologista Henfrey, na metade do século XIX, um dos primeiros pesquisadores a considerar a possibilidade da duração do dia influenciar o desenvolvimento da planta e, a distribuição da espécie. Coube a Tournois, entretanto, verificar que o florescimento é controlado pela duração do dia (Válio, 1979). Allard e Garner (1923, citados por Russel e Stuber, 1983a), consolidaram o papel do efeito da duração do dia como principal agente indutor do florescimento de muitas espécies, entre elas, o milho. Deve-se a eles, ainda, a introdução do termo fotoperíodo para a duração do dia e fotoperiodismo para a resposta dos organismos à duração relativa do dia e da noite.

Como salienta Válio (1979) as respostas fotoperiódicas podem ser consideradas como modificações ou combinações de três tipos básicos: resposta de dia curto, de dia longo e neutro ou indiferente. Plantas de dias neutros ou indiferentes são aquelas cujo fotoperíodo parece não afetar o florescimento. As plantas de dias curtos florescem somente, ou mais rapidamente, quando recebem iluminação por um período inferior a certo número de horas por dia. Este número de horas por dia varia de espécie para espécie e é chamado de fotoperíodo crítico. O contrário ocorre em plantas de dias longos, que florescem somente, ou mais rapidamente, quando recebem iluminação por um período superior a certo número de horas por dia, ou seja, iluminação além do fotoperíodo crítico.

Garner e Allard (1923, citados por Russel e Stuber, 1983b) foram os primeiros a reportar que em algumas cultivares de milho o florescimento é atrasado sob fotoperíodos de dias longos.

Kiniry et alii (1983) estudando o intervalo sensível ao fotoperíodo de dias curtos em milho, mostraram que as plantas são insensíveis a esse fotoperíodo imediatamente após a sua emergência, permanecendo assim até 4 a 8 dias antes da iniciação da panícula. A iniciação da panícula é o primeiro sinal visível da mudança do estado vegetativo para o estado reprodutivo (Russel e Stuber, 1984). Temperaturas superiores a 8 e 7 C são necessárias para a iniciação da panícula e antese, respectivamente. A temperatura ótima para ambos oscila ao redor de 28 C. Acima desse valor a taxa de desenvolvimento da panícula decresceu (Warrington e Kanemasu, 1983). Nesse estudo a resposta ao fotoperíodo não foi alterada pela temperatura. Bonaparte (1975) estudou o efeito da temperatura e outras variáveis na emergência da panícula de milho. Mostrou que a extrusão é lenta quando a planta é submetida à baixas temperaturas diurnas, baixa fertilidade e baixa quantidade de umidade no solo. Contudo a panícula desenvolve normalmente em temperatura constante de 26 C e em comprimento de dia constante de 16 horas.

A fotosensibilidade além de sofrer interações com agentes físicos do meio ambiente, também é influenciada pelo genótipo da planta. Rogers (1950) estudando a herança para resposta ao fotoperíodo em milho e teosinte afirma que variedades de milho norte-americanos são influenciadas pelo foto-

período. Por outro lado, Rood e Major (1980) encontraram variabilidade genotípica para resposta ao fotoperíodo em variedades de milho precoce. Russel e Stuber (1983b) encontraram ação gênica aditiva para esse caráter condicionado por pequeno número de genes. Ainda segundo esses pesquisadores, híbridos de ciclo médio ou tardio submetidos a fotoperíodo curto, revelam uma ampla variação de fotosensibilidade, sugerindo dessa forma que esses dois tipos, podem estar sob o controle de diferentes loci.

A resposta ao fotoperíodo pode se confundir com o efeito da temperatura. Allison e Daynard (1979) mostram que a data de florescimento em milho foi adiantada, pelo aumento de temperatura ou diminuição do fotoperíodo. Russel e Stuber (1983a) mostraram que o efeito do fotoperíodo, avaliado através de dias para a iniciação da panícula e número total de folhas, foi consideravelmente maior do que o efeito de temperatura. Uma análise de variância indicou que a interação do fotoperíodo x temperatura foi significativa para a iniciação da panícula. Contudo, segundo Russel e Stuber (1983a) a herança de fotosensibilidade em milho não está ainda totalmente entendida, permanecendo de modo particular, muitas questões concernentes a natureza e importância da interação do fotoperíodo x temperatura.

O efeito do fotoperíodo induzindo o florescimento das plantas pode modificar a arquitetura das plantas. Rood e Major (1981) estudando a herança do perfilhamento e tempo de florescimento em F₂ de milho precoce, mostrou que estes caracteres são geneticamente relacionados, e que o potencial para produção de perfilhos em milho é geneticamente controla-

do e relacionado com o grau de introgressão de teosinte (Seghal, 1963 citado por Rood e Major, 1981). Por seu turno Harris et alii (1976) estudando o controle e a herança da prolificidade em milho mostraram que um forte potencial para prolificidade é aparentemente devido a uma condição genética recessiva. Postularam um modelo de herança qualitativa condicionando o desenvolvimento de plantas de várias espigas.

São poucos os trabalhos publicados a respeito do controle do florescimento em teosinte. O primeiro trabalho sobre o assunto foi realizado por R.A. Emerson (1924). Plantas submetidas a 10 horas de luz do dia floresceram mais precocemente do que àquelas expostas ao comprimento total do dia. Os estudos de Emerson, entretanto, não mostraram o efeito da temperatura na determinação do florescimento.

Melhus e Ahrens (1959), mais tarde, estudando o efeito do fotoperíodo no crescimento e desenvolvimento do teosinte, mostraram que para latitudes correspondentes ao Estado de Iowa nos EUA, ao redor de 42N, o fim de Julho e começo de Agosto foram as melhores datas para se cultivar teosinte. Pois nesse período, os dias começam progressivamente a se encurtar. Detectaram ainda a existência de profundas diferenças na resposta ao fotoperíodo, de teosintes coletados em latitudes distintas. Teosintes do México mostraram respostas mais fracas ao fotoperíodo, do que teosintes da Guatemala e da Flórida. O crescimento e desenvolvimento de plantas provenientes dessas três regiões foi próximo do normal em regiões submetidas a dias mais curtos.

Wilkes (1967), observou que em populações naturais as ramificações laterais ocorrem somente em nós superiores,

porém quando as plantas são cultivadas em latitudes maiores existe uma pronunciada tendência para ramificação ou perfilhamento dos nós mais baixos. Teosinte é considerado uma planta de dia curto, necessitando de uma indução menor do que 10 horas para florescer, como mostrou Emerson (1924). A resposta para tratamento artificial de dias curtos apresentou-se diretamente relacionada com a latitude da coleção original. As primeiras populações a florescer foram as provenientes do México, seguido das provenientes da Guatemala.

Wilkes (1967) ainda mostrou que o número médio de nós acima do nível do solo, em plantas de teosinte de populações naturais é aproximadamente 20. Nessas populações as ramificações ocorrem nos nós superiores e apresentam uma panícula terminal dando a planta uma aparência de candelabro. O grau de perfilhamento é variável para as diferentes raças de teosinte. Os teosintes mexicanos perfilham menos que os teosintes da Guatemala. O número de perfilhos mostrou-se correlacionado positivamente com dias para o florescimento e resposta ao comprimento do dia. Revelou-se, entretanto, negativamente correlacionado com a altura da planta. O florescimento do teosinte parece variar mais no sentido Norte-Sul. Devido aos perfilhos, ao grande número de nós produzindo o fruto pistilado e o desenvolvimento de inflorescências terminais nas ramificações laterais, o florescimento do teosinte pode estender-se por um período de 30 dias.

A estação de crescimento do teosinte no México é de Julho até Outubro, com florescimento de Setembro até Outubro. Wilkes (1967) sugere que cinco das seis raças conhecidas de teosinte podem ser distinguidas por sua resposta ao tratamen-

to de dia curto (Tabela 1).

Langham (1940) induziu o teosinte a florescer em casa de vegetação para facilitar a hibridação com milho. Esse período de indução começou quando as plantas estavam no estágio de plântula e continuou até a antese. As três variedades mexicanas requerem uma média de 33 dias de indução para o florescimento. A variedade de teosinte proveniente da Guatemala necessitou de 47 dias. Seus estudos mostraram que a fraca resposta ao fotoperíodo, verificada em milho, foi dominante e segregou como um caráter mendeliano simples.

Rogers (1950) também estudou a herança do fotoperíodo em milho e teosinte em condições de campo, no Texas. Usou três variedades do México, duas da Guatemala e uma proveniente da Flórida. O crescimento das plantas foi iniciado em casa de vegetação e depois proseguiu em condições de campo. O tempo para antese variou de 110 a 207 dias sob condições de dias longos, os quais variavam de 13 a 14 horas. O milho plantado no mesmo período floresceu aos 58 dias. Nesse trabalho Rogers mostrou que no mínimo alguns dos genes responsáveis pela resposta ao fotoperíodo estavam nos cromossomos 8, 9 e 10, e que presumivelmente esses genes tinham a mesma origem. A resposta ao fotoperíodo foi do tipo quantitativo, influenciada por genes modificadores.

Kempton (1924, citado por Wilkes, 1967) estudou um total de 38 caracteres que distinguem milho do teosinte. Sómente dias para o florescimento aproximou-se de uma segregação mendeliana de 3:1.

Tabela 1. Resposta à tratamento de dias curtos verificada em cinco raças de teosinte (Wilkes, 1967).

Dias para florescimento	Local de origem da coleção	Latitude
70	México : Sierra Madre Occidental	26°15"
79-82	México : Central Plateau e Vale do México	21°-19°
86-91	México : Rio Balsas e Sierra Madre del Sur	18°30" 17°15"
99	Guatemala : Sudoeste da Guatemala	14°30"
104-108	Guatemala : Huehuetenango	16°

Mangelsdorf (1947, citado por Wilkes, 1967) não confirmou a segregação mendeliana comunicada por Langham (1940). Para resposta ao fotoperíodo determinou que os genes responsáveis para a forte resposta de teosinte à dias curtos estão nos cromossomos 8 e 10 de teosinte da Guatemala e provavelmente cromossomo 10 de teosinte do México. Ainda segundo Mangelsdorf (1947) as respostas diferenciais de diferentes variedades foi devida a genes modificadores, com a existência de genes que controlam a precocidade no cromossomo 3. Ainda segundo o autor, o número de perfilhos foi controlado em sua maior parte por genes nos cromossomos 1, 2 e 7, sendo que o perfilhamento é mais pronunciado em variedades da Guatemala do que em variedades provenientes do México, indicando uma associação entre a origem geográfica e a resposta ao fotoperíodo, embora os dois caracteres estejam sob o controle de diferentes genes, não proximamente ligados.

Um aspecto pouco abordado em estudos de fotoperíodo, é o fato deste fenômeno ser considerado um disparador de mudanças fisiológicas e estruturais das plantas. Moss e Heslop-Harrison (1968) estudando a relação entre fotoperíodo e alguns caracteres em milho da cultivar Golden Bantan, mostraram que para plantas sob fotoperíodo de 8 horas de luz, em comparação com o controle sob fotoperíodo de dia longo, revelaram uma tendência para reversão sexual na panícula. Este efeito é anulado ou reduzido pela interrupção da noite por luz em baixa intensidade.

Peterson (1976) estudando a inatividade de certos genes e a evolução da unisexualidade em espiguetas de milho, aponta para a existência de evidências de um sistema gênico

complexo que altera a sexualidade de uma inflorescência unisexual. Isto ocorre, por exemplo, em um número de linhagens que parecem perfeitamente normais em seu meio ambiente padrão no meio-oeste do Estados Unidos. Entretanto, desenvolvem partes pistiladas na panícula, quando cultivadas na Flórida. As variantes podem ser consideradas mutantes condicionais, isto é, fenotipicamente instáveis sob alterações do meio ambiente. Neste caso, o sistema unissexual balanceado facilmente torna-se não balanceado e produz inflorescências hermafroditas sob fotoperíodos alterados. Essa modificação em uma parte floral não requer portanto mudanças em genes estruturais, duplicações ou perdas, podendo ocorrer, segundo o autor em consequência de mudanças em genes regulatórios que iniciam as modificações.

Tal mudança, proposta por Iltis(1983), foi o passo crítico na passagem do teosinte para o milho, chamado pelo autor de transmutação repentina engatilhada pelo meio ambiente.

2.4.3. Medida do florescimento

Em uma dada região duas formas tem sido usadas para quantificar o florescimento do milho. Dias após o plantio (DAP) e Acúmulo de Unidades de Calor ou Graus Dias. A avaliação do florescimento da inflorescência masculina, em dias a-

pós plantio, é uma prática comum tanto em trabalhos envolvendo reações à fotoperíodo em milho como também em teosinte (Emerson, 1924; Melhus e Ahrens, 1959; Langham, 1940; Rogers, 1950). Essa medida é anotada quando pelo menos 50% das plantas, dentro da parcela, de um experimento liberam pólen. O outro critério, Acúmulo de Unidades de calor, não é prática muito comum em teosinte. Em milho e outras espécies cultivadas, entretanto, essa já é uma prática comum, sendo inúmeros os trabalhos que empregam esse procedimento. Historicamente foi Reamur em 1873 o primeiro a sugerir que "a somatória da temperatura média é constante para se atingir uma determinada fase do desenvolvimento da planta, em uma dada espécie" (Kish, 1967, citado por Villa Nova et alii, 1973).

Hoje aceita-se amplamente que a temperatura é um dos fatores primários controlando não só o crescimento das plantas como também a sua distribuição na Terra. A velocidade de muitos processos fisiológicos, que ocorrem em plantas, incluindo o crescimento, é marcadamente influenciado pela temperatura. Efeitos qualitativos e quantitativos da temperatura manifestam-se diretamente no desenvolvimento das plantas (Holmes e Robertson, 1959).

é muito difícil de se visualizar como uma reação poderia ser influenciada para expressar o crescimento total da planta do plantio até a maturação. Contudo, processos químicos e físicos ocorrendo dentro e fora da planta estão sujeitos as mesmas leis. Qualquer aparente inconsistência manifestada no crescimento bruto das plantas é provavelmente o resultado da sobreposição de muitas reações variadas. Aparentemente, o desenvolvimento das plantas acha-se estreitamente

ligado à temperatura (Holmes e Robertson, 1959). A temperatura dos órgãos vegetais tende a seguir a temperatura do ambiente em que a planta vive (Villa Nova et alii, 1972). Abaixo de certa temperatura, seu desenvolvimento é praticamente nulo. A esta temperatura limite denominou-se Temperatura-Base (TB).

A quantidade de "calor efetivo para o crescimento" durante o dia tem sido calculada como os graus de temperatura média diária acima da temperatura básica. Essa quantidade acumulada nos vários dias, da emergência ao florescimento, é denominado unidades de calor ou graus dias. Esta idéia, segundo Holmes e Robertson (1959), postula que existe uma temperatura base para todo o ciclo de vida, ainda que a temperatura do dia e da noite sejam de igual importância para o crescimento da planta. É provável que graus dia expressem a interação de alguns fatores que afetem a planta simultaneamente, isto é, nível de fertilidade do solo, população de plantas, tipo de solo, temperatura do solo e umidade (Villa Nova et alii, 1972).

Enquanto a teoria das Unidades de Calor tem mostrado ser útil em manipular resultados de uma única localidade, sérios erros podem ocorrer se essas reações são extrapoladas para outras áreas (Holmes e Robertson, 1959), em virtude de novas variáveis que surgem, entre elas o efeito do fotoperíodo. Além disso do ponto de vista micrometeorológico algumas objeções podem ser feitas, pois, as medidas de temperatura devem ser obtidas dentro da comunidade vegetal e não no posto meteorológico. Entretanto, deve-se ressaltar que as condições microclimáticas são resultantes da interação entre a comunidade vegetal e as condições macroclimáticas, sendo, portanto,

válida a utilização de dados obtidos no Posto Meteorológico (Villa Nova et alii, 1972).

Atualmente aceita-se a definição de Graus Dia, apenas variando a temperatura base de acordo com a espécie vegetal. Para o milho admite-se 10 C como base (Newman, 1968, citado por Villa Nova et alii, 1972; Tolenaar et alii, 1979; Abasi et alii, 1985; Mederski et alii, 1973). Segundo Mederski et alii (1973) outros métodos utilizando diferentes temperaturas bases, 4.4, 6.7 e 8.9 C, não devem ser utilizados por apresentarem altos coeficientes de variação, bem maior que os obtidos para temperatura base de 10 C.

Deve-se por outro lado frisar que o emprego do método de acúmulo de unidades de calor pode variar de acordo com a fase fisiológica da planta em que é aplicado, devendo de preferência ser aplicado do plantio até a maturação (Mederski et alii, 1973). Ainda segundo o autor, seus dados permitem afirmar que o método de acúmulo de unidades de calor para classificar híbridos de milho quanto a maturação foi superior ao método de contagem de dias após o plantio.

Embora o número de contribuições na área de resposta comparativa de milho e teosinte, ao fotoperíodo, seja modesto, e os estudos se restrinjam mais à observações de campo ficou evidenciado, que o milho é menos sensível ao fotoperíodo que o teosinte. Esse fato, merece atenção, uma vez que a resposta diferencial é condicionada geneticamente e pode se constituir em importante fator promovendo a evolução simpátrica das duas espécies.

3. Material e Métodos

3.1. Material

O presente estudo foi realizado na Área Experimental do Laboratório de Genética de Milho da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), localizada a 22°54' de latitude Sul, durante os anos de 1983 a 1986. O trabalho foi iniciado em 1983, ocasião em que foram selecionados e multiplicados os vários germoplasmas.

O germoplasma utilizado nos diversos experimentos acha-se listado na tabela 2, obedecendo a classificação proposta por Doebley e Iltis (1980). Todas as populações de teosinte utilizadas nesse estudo já possuíam pelo menos 4 ciclos de multiplicação em nossa Área Experimental, quando iniciamos os nossos trabalhos. Essas populações são provenientes do Centro Internacional para o Melhoramento do Milho e Trigo (CIMMYT), no México, e foram gentilmente cedidas pelo Dr T.A. Kato. A cultivar de milho, Pajimaca, representou nesse estudo a espécie cultivada, **Zea mays mays**. Essa população melhorada, procedente de Cuba, é uma variedade de milho doce que foi muito utilizada comercialmente na década de 70 pelas várias indústrias que enlatavam milho no país. É homozigota para o gene recessivo sugary (**su**), fator esse que em dose dupla, al-



AMP

Tabela 2. Germoplasma de milho e teosinte estudados. Denominação usada e classificação segundo Doebley e Iltis (1980) e procedência.

GERMOPLASMA	SECCÃO	LOCAL DE COLETA	ALTITUDE (m)	LATITUDE LONGITUDE	CRESCIMENTO
TEOSINTE					
Los reyes (Zea mays ssp mexicana)	Zea	0,8Km de Los reyes (México)	2200	19°21' N 98°58' W	Anual
El Batán (Zea mays ssp mexicana)	Zea	Texcoco - El Batán	2150	19°31' N 98°53' W	Anual
Luxuriantes (Zea Luxuriantes)	Luxuriantes	Jutiapa-El Progreso (Guatemala)	1025	14°22' N 89°51' W	Anual
Piploperene (Zea piploperennis)	Luxuriantes	Cerro San Miguel-Sierra Manantlan (México)	2300	19°31' N 104°13' W	Perene
MILHO					
Jimaca (Zea mays ssp mays)	Zea	Cultivar - (Cuba)	Nível do mar		Anual

tera o endosperma, conferindo um alto acúmulo de polissacarídeos solúveis em água, denominado fitoglicogênio. Conseqüentemente um baixo acúmulo de amido se verifica na semente. Como consequência, na maturação fisiológica, confere um aspecto enrugado ao grão mutante. Torna-se, portanto, um marcador genético facilmente reconhecido nas sementes, e daí ter sido escolhido no presente trabalho.

O teosinte, por seu turno, possui no loco Sugary o alelo dominante, **Su**, responsável por sementes ricas em amido e conseqüentemente, com aspecto liso, normal. A baixa frequência do alelo recessivo, **su**, tanto em populações de teosinte como de milho se deve ao fato do alelo recessivo apresentar menor taxa de germinação das sementes em decorrência da maior susceptibilidade ao ataque de fungos, principalmente **Fusarium e Diplodia**, e insetos, notadamente, carunchos e traças. Gerações avançadas de vários cruzamentos de teosintes com milho cultivado tem confirmado essa expectativa em nossas pesquisas, tendo se verificado a ausência desse alelo em todas as populações de teosintes analisados. O gene sugary (**su**) localizado no cromossomo IV do milho, em consequência do exposto, foi usado para monitorar cruzamentos de teosinte e milho, em uma mesma espiga.

3.2. Indução do florescimento em milho e teosinte.

3.2.1. Introdução.

Esse estudo foi feito para se verificar a resposta relativa do milho e dos vários teosintes à temperatura e fotoperíodo. A diferença nos padrões de florescimento de milho e teosinte pode se constituir em importante mecanismo para se promover o isolamento genético parcial dos dois taxa na natureza.

3.2.2. Delineamento Experimental

Foram instalados experimentos em delineamento Inteiramente Casualizado com duas repetições por época. O experimento foi plantado de 30 em 30 dias ao longo do período de um ano, com o primeiro plantio sendo efetuado a 28/8/84 e o último a 29/7/85. A parcela experimental constou de uma linha de 4 metros com "stand" ideal de 20 plantas por canteiro. Os dados coletados foram, data de florescimento, dado pela antese de pelo menos 50% das plantas de cada repetição, e altura das plantas.

3.2.3. Unidades de calor para o florescimento

Além do florescimento ter sido medido pelo número de dias do plantio à antese, ele foi também estudado pelo acúmulo de unidades de calor ou graus dia (GD). O grau dia foi calculado pela fórmula proposta por Mederski et alii (1973), que utiliza a temperatura de 10 C positivos como temperatura base para o desenvolvimento do milho, ou seja:

$$GD = \frac{T_{max}(C) + T_{min}(C) - 10}{2}$$

Grau dia negativo é considerado zero, uma vez que as plantas não se desenvolvem nessas condições.

A somatória de graus dia diários, do plantio até a antese, fornece a quantidade de graus dia acumulados, necessários para o florescimento de cada germoplasma na latitude em estudo. Os dados de temperatura máxima e mínima foram gentilmente fornecidos pela Seção de Climatologia Agrícola do Instituto Agronômico de Campinas.

3.2.4. Fotoperíodo e a indução do florescimento

O fotoperíodo médio mensal descrito por Ometo (1981) é mostrado na tabela 3. Esses dados são demonstrados, para podermos acompanhar o florescimento de milho e teosinte com respeito a variação do comprimento do dia.

3.3. Estudos de competição de grãos de pólen.

3.3.1. Introdução

Os experimentos foram realizados em dois anos consecutivos para permitir uma melhor avaliação dos efeitos de interação genótipo x ambiente, notadamente variação de temperatura e umidade, que claramente afetam o desenvolvimento das plantas, e mais precisamente os tecidos reprodutivos. Os resultados do primeiro ano, entretanto, foram basicamente semelhantes aos do segundo ano. Os resultados que serão apresentados se referem ao segundo ano apenas, por envolverem, ao contrário do primeiro ano, todos os germoplasmas considerados necessários para o presente estudo.

Tabela 3. Fotoperíodo médio mensal ao longo do ano, na latitude de 22°54' S. (Ometto, 1981).

Mês	Fotoperíodo	Mês	Fotoperíodo
Janeiro	13h12'	Julho	10h48'
Fevereiro	12h48'	Agosto	11h08'
Março	12h04'	Setembro	12h00'
Abril	11h23'	Outubro	12h42'
Maio	10h51'	Novembro	13h06'
Junho	10h36'	Dezembro	13h24'

3.3.2. Competição de grãos de pólen de milho e teosinte em estilo-estigmas de milho.

3.3.2.1. Coleta do material.

Os grãos de pólen de milho e dos diferentes teosintes foram coletados em campo durante a ântese de cada material, com auxílio de sacos de papel que protegem totalmente as panículas. Aproximadamente três horas após o início da ântese, o pólen depositado nos sacos de papel era coletado e levado ao laboratório para ser inicialmente submetido a um processo de limpeza, com auxílio de uma peneira para retirada de impurezas. Em seguida foram feitas quatro misturas de pólen de milho com pólen de cada um dos quatro teosintes, em idênticos volumes.

3.3.2.2. Técnica de polinização e uso do gene marcador.

Essas misturas de pólen eram levados ao campo e aplicadas nos estilos-estigmas da cultivar de milho doce Pajimaca. Os estilo-estigmas de milho foram previamente protegidos com saco plástico antes de sua exposição para se proceder

aos cruzamentos planejados. Os estilo-estigmas foram cortados a uma altura de 1,5 a 2,0cm da ponta da espiga, formando um pincel, em cuja superfície era colocada a mistura de pólen. Após se efetuar a polinização, as espigas eram cobertas por um saco especial de papel resistente à umidade, iguais aos que foram colocados previamente na panícula para a coleta do pólen. Esses sacos ficaram cobrindo as espigas até a maturação fisiológica.

Com este procedimento, os ovários de milho fecundados por grãos de pólen de milho produziram sementes com aspecto enrugado, ou seja, homozigotas para o gene sugary (**SU SU**), porém os ovários de milho fecundados por grãos de pólen de teosinte, na mistura de pólen, produziram sementes com aspecto normal (liso), ou sejam, heterozigotas para o gene Sugary (**Su Su**). As frequências relativas dos dois tipos de sementes, enrugada ou lisa, foram determinadas em três regiões da espiga de milho. A espiga de milho dividida em três terços, regiões apical, mediana e basal, foi usada para se avaliar a velocidade relativa de crescimento do tubo polínico de milho e teosinte.

Em cada uma das quatro combinações de milho e tipos de teosinte, foram realizadas pelo menos 40 polinizações envolvendo a mistura de pólen correspondente, em estilo-estigma de milho Pajimaca. Para análise estatística foi retirada uma amostra, ao acaso, de 20 espigas.

3.3.2.3. Medidas de grão de pólen em milho e teosinte.

Por ocasião do florescimento de cada material, foram tomadas medidas do diâmetro do grão de pólen de cada germoplasma para posterior estudo de correlação do tamanho do grão de pólen com o comprimento médio dos estigmas de cada germoplasma. Para tanto foram escolhidas 20 plantas, ao acaso, e de cada planta foram medidos 20 grãos de pólen. Para isso, os grãos de pólen foram levados a uma lâmina e depositados sobre uma gota de água destilada, e em seguida recobertos com uma lamínula. O diâmetro dos grãos de pólen foram medidos em micra com o auxílio de uma ocular micrométrica. Os resultados foram anotados para se estudar o possível efeito dos diferentes tamanhos do grão de pólen de milho e teosinte na habilidade competitiva dos tubos polínicos, nas diferentes misturas.

3.3.2.4. Correção da frequência relativa de sementes pelo diâmetro do pólen.

Como idênticos volumes de pólen de milho e pólen de teosinte foram misturados, diferenças no diâmetro do pólen de cada fonte produziriam desvios na proporção esperada de 50% de sementes lisas e enrugadas. O diâmetro do grão de pólen de

milho e teosinte foi medido e as frequências esperadas dos dois tipos de sementes foram corrigidas para o teste de hipótese. A seguinte fórmula, proposta por Pfahler (1965) foi usada: $p = [X^3 / (X^3 + Y^3)] \cdot 100$, onde, p é a porcentagem de cada tipo de grão de pólen na combinação, X é o diâmetro médio do grão de pólen da planta receptora da mistura de grãos de pólen, e Y é o diâmetro médio do grão de pólen da planta doadora de metade do volume de pólen na mistura. O valor obtido na fórmula representa a porcentagem esperada de pólen de cada fonte doadora na mistura, como também a quantidade de cada tipo correspondente de sementes a ser esperada em uma amostra de 100 sementes, se obviamente for igual a habilidade de fertilização de cada tipo de grão de pólen na mistura.

3.3.2.5. Pólen normal e abortado em milho e teosinte.

Fez-se uma análise comparativa da quantidade de grãos de pólen normais e abortados em milho e teosinte. Para isso foi coletado pólen de 20 plantas escolhidas ao acaso e, a seguir, o pólen foi submetido a um tratamento com Iodo-Iodeto (Iugol), diluído em água destilada (1:20ml) e observado ao microscópio óptico comum. Foram analisados 200 grãos de pólen de cada planta, perfazendo um total de 4000 grãos de pólen de cada material original.

3.3.2.6. Comprimento de estilo-estigmas de milho e teosinte.

Foram tomadas medidas do comprimento médio dos estilo-estigmas nas mesmas plantas em que foi avaliado o diâmetro dos grãos de pólen. Essa medida foi tomada como distância do ponto médio da espiga à extremidade oposta do estilo-estigma, no momento de sua exposição máxima. Para alcançar a exposição máxima as plantas não foram polinizadas.

3.3.2.7. Presença de fatores esporofíticos ou inibidores do tubo polínico em milho.

A presença de fatores esporofíticos ou inibidores do tubo polínico em milho foi analisada efetuando-se 15 polinizações em espiga de milho Pajimaca com 100% de pólen de cada um dos teosintes separadamente. A quantidade de sementes permitiu a classificação das espigas em 3/3, espigas bem granadas; 2/3, com espigas granando apenas o terço apical e o terço mediano; 1/3, com granadação apenas da região apical e finalmente 0/3, sem granadação. Os resultados foram analisados pelo teste não paramétrico de Friedman.

3.3.2.8. Velocidade de germinação e desenvolvimento inicial de tubos polínicos de pólen de milho e teosintes, em estilo-estigmas de milho.

A velocidade de germinação de tubos polínicos de milho e teosintes em estilo-estigmas de milho foi analisada procedendo-se ao corte uniforme dos estilo-estigmas de milho a um comprimento de aproximadamente 2,0cm da ponta da espiga. O pólen de cada material, isto é, pólen de milho e pólen de cada um dos quatro teosintes, foi cuidadosamente pincelado na superfície dos estilo-estigmas cortados. Os estilo-estigmas foram cortados 1,0cm abaixo da superfície polinizada em 6 tratamentos de 30 em 30 minutos, ou seja, 30, 60, 90, 120, 150 e 180 minutos. O experimento foi feito com duas repetições, correspondendo cada repetição a uma espiga. Os resultados foram analisados pelo teste não paramétrico de Friedman.

3.3.3. Competição de grãos de pólen em estilo-estigmas de teosinte.

Esse estudo foi feito para se avaliar a competição diferencial de grãos de pólen de milho e de teosinte em estilo-estigmas de teosinte. As polinizações foram feitas utilizando-se uma mistura de pólen de milho e teosinte em volumes idênticos, como descrito anteriormente. O resultado das poli-

nizações foi determinado através do fenótipo das plantas obtidas. Pólen de teosinte com núcleo fecundando óvulo de teosinte produz obviamente plantas de teosinte, enquanto, pólen de milho produz plantas F₁, híbridas, de fenótipo facilmente identificável. Nesse experimento, os estilo-estigmas de teosinte não foram cortados ao mesmo comprimento antes das polinizações por serem relativamente curtos. Aqui também foi usada a fórmula de Pfahler (1965) para correção da proporção de pólen esperado de cada germoplasma na mistura.

3.4. Heterofertilização

Outro ponto estudado nos experimentos de competição de grãos de pólen de milho e teosinte foi a ocorrência de heterofertilização, assunto abordado aqui para se investigar aspectos de introgressão entre milho e teosinte.

Em Janeiro de 1986, foi realizado um experimento para se estudar esse fenômeno, tanto em sementes lisas, como em sementes enrugadas provenientes do experimento de competição de grãos de pólen de milho e teosinte, em estigmas de milho. Para tanto, foram tomadas ao acaso, 10 espigas de milho doce Pajimaca polinizadas com mistura de pólen de milho e cada um dos quatro grupos de teosinte, obtidos ao longo de dois anos de experimentação. Essas espigas foram divididas em três partes iguais, basal, média e superior e as sementes lisas e enrugadas de cada seção separadas, contadas e plantadas separa-

damente em linhas adjacentes para quantificação da taxa de heterofertilização. A porcentagem de heterofertilização corresponde ao número de sementes lisas que produzem plântulas de milho adicionado ao número de sementes enrugadas que produzem plântulas F₁, híbridas, no total de sementes estudadas.

4. Resultados e Discussão

4.1. Estudos de fotoperiodismo em milho e teosinte.

O estudo comparativo do efeito do fotoperíodo no florescimento de representantes do gênero *Zea*, teosinte e milho, tem sido pouco explorado, quer no centro de origem quer em outras condições tropicais. Esse tipo de informação pode ser extremamente útil para explicar a oportunidade de hibridação entre o cereal cultivado, milho, e seu provável ancestral selvagem, o teosinte. Como em regiões tropicais a variação do comprimento do dia, não se apresenta associada a fatores limitantes que impeçam o cultivo das plantas ao longo do ano, o estudo do fotoperíodo nessas condições torna-se bastante apropriado. Além da importância desses conhecimentos para estudo de evolução e domesticação do milho, eles oferecem também a oportunidade para se identificar características agronomicamente favoráveis em teosintes que podem eventualmente serem incorporadas em milho. Seriam elas resistência a patógenos ou insetos (Galinat, 1977; Galinat e Pasupuleti, 1982; Bird, 1982; Cohen e Galinat, 1984), e o uso de germoplasma selvagem como fonte de variabilidade genética para o milho (Mangelsdorf, 1961; Beadle, 1980; Magoja e Pischedda, 1986). Segundo Mangelsdorf (1961) o teosinte, através de hibridação introgressiva pode ter sido fonte de genes que conferem ao milho resistência ao calor e a seca.

A resposta ao fotoperíodo desses representantes, através de plantios periódicos ao longo do ano, em condições tropicais, onde o efeito da temperatura é amenizado no inverno, pode fornecer dados importantes quanto à proximidade filogenética das diferentes espécies de milho e teosinte, e dessa maneira fornecer subsídios para conhecimento do grau de parentesco entre milho e as várias espécies de teosinte disponíveis.

De uma maneira geral, considera-se que o fotoperíodo é um fator primário no isolamento reprodutivo parcial do milho e teosinte, no centro de origem. Segundo Wilkes (1967) a importância do isolamento sazonal como barreira do fluxo gênico entre esses dois taxa só seria superada pelo isolamento geográfico, que como acentua o autor (Wilkes, 1967, 1977), tem sido quebrado continuamente, desde a invasão espanhola em terras do México.

Deve-se por outro lado encarar o isolamento sazonal com certa cautela, pois o teosinte por ser uma planta selvagem, mantida pela natureza, provavelmente apresenta um banco de sementes no solo, o qual apresentará uma germinação diferencial, prolongando dessa maneira a época de florescimento em teosinte. Tal mecanismo efetivado pela seleção natural protegeria a população contra adversidades climáticas à época do florescimento, ajudando a promover dessa maneira a perpetuação da espécie. Um outro aspecto que poderia aumentar o tempo de liberação de pólen em teosinte, tornando o isolamento sazonal menos efetivo, seria a não sincronia do florescimento das inflorescências masculinas do colmo principal e das

ramificações laterais do teosinte. Wilkes (1967) sugere que essa não sincronia pode fazer com que a disponibilidade de pólen em plantas de teosinte seja mantida por até um mês.

O estudo do fotoperiodismo fornece ainda informação sobre o grau de interação de Zea x fotoperíodo, ao nosso ver, outra característica importante, para se entender melhor a domesticação do milho. É sabido que o milho é uma das plantas cultivadas que apresenta a menor fotosensitividade (Rogers, 1950), sendo por isso esperado que as mudanças na estrutura da planta não sejam tão drásticas em decorrência da variação do fotoperíodo. Por outro lado, como o teosinte, é considerado planta de dia curto (Emerson, 1924; Langham, 1940; Rogers, 1950; Melhus e Ahrens, 1959), espera-se que ele revele uma maior sensibilidade ao fotoperíodo. O teosinte segundo Melhus e Ahrens (1959) cresce naturalmente desde a região sudoeste do México Central até Honduras (lat. N 14° até 26°), em climas semi-áridos e em altitudes que variam de 600 a 2400m. Em função dessa grande adaptação ocorrem diversas populações de teosinte com diferentes respostas ao fotoperíodo.

Os dados da tabela 4 mostram que existe um amplo espectro de resposta ao comprimento do dia nos diferentes germoplasmas. Percebe-se claramente que existe uma forte interação germoplasma x fotoperíodo, com os teosintes respondendo diferentemente do milho com relação ao fotoperíodo. Devemos ressaltar que as condições experimentais em Campinas, são pouco diferentes das existentes no habitat natural dos teosintes, notadamente a altitude, que sabidamente afeta as plantas como a latitude. Altitudes maiores atuam como se a planta estivesse vegetando em altas latitudes, portanto em

Tabela 4. Florescimento da panícula (em dias após o plantio), média de 40 plantas em 2 repetições, nos cinco germoplasmas estudados, em 12 plantios mensais ao longo do ano, em Campinas, S.P., Brasil (lat. 22°54'S), avaliados em um experimento de Blocos ao Acaso com 2 repetições.

Data do Plantio	Germoplasma				
	Pajimaca	Los Reyes	Diploperene	Luxurians	El Batan
28/08/84	79	86	218	219	57
28/09/84	73	96	187	188	76
28/10/84	66	80	157	158	74
30/11/84	64	98	124	108	61
03/01/85	59	63	90	81	59
27/01/85	72	68	73	77	58
28/02/85	78	59	76	83	51
28/03/85	92	59	71	98	49
01/05/85	112	64	94	116	58
29/05/85	114	70	139	125	68
28/06/85	104	56	119	136	a
29/07/85	83	69	110	251	63

a - não observado

regiões de dias mais longos. Wilkes (1967) diz que o teosinte possui no seu habitat natural a época de germinação, crescimento e florescimento mais restrito. Tal época inicia-se com as chuvas de verão e se prolonga por não mais de 3 ou 4 meses, com excessão da região de Huehuetenango, onde tal período pode prolongar-se por até 5 meses. É nesta época que pode ocorrer, nessa região da Guatemala, a sobreposição do florescimento de milho e teosinte criando assim condições para trocas gênicas.

Os dados da tabela 4, analisados através de uma Análise de Variância para Experimentos em Blocos Casualizados mostra serem significativas as diferenças entre tratamentos. O valor de F obtido (11,8495) é superior ao verificado na tabela de limites unilaterais de F (3,51) para 5 e 40 graus de liberdade, ao nível de 1% de probabilidade. As diferenças entre médias dos tratamentos, analisadas pelo Teste de Tukey mostraram que os teosintes anuais mexicanos El Batán e Los Reyes, juntamente com a cultivar Pajimaca formam um grupo, sendo o outro grupo formado pelos teosintes Luxurians e Diploperene.

Os dados da tabela 5, resumindo a tabela anterior apresentando o número de dias para o florescimento da panícula, nos mostram o florescimento médio da panícula, em sua amplitude mínima e máxima, em dias após o plantio, nos cinco germoplasmas, e ainda, o coeficiente de variação para dias do plantio ao florescimento. O coeficiente de variação, obviamente, é tanto menor quanto menor for a fotosensibilidade do material. Percebe-se daí que podemos agrupar os cinco germoplasmas em dois grupos distintos. Um que apresenta menor sen-

Tabela 5. Florescimento médio da panícula, em dias após o plantio (DAP) nos cinco germoplasmas, juntamente com os respectivos coeficientes de variação.

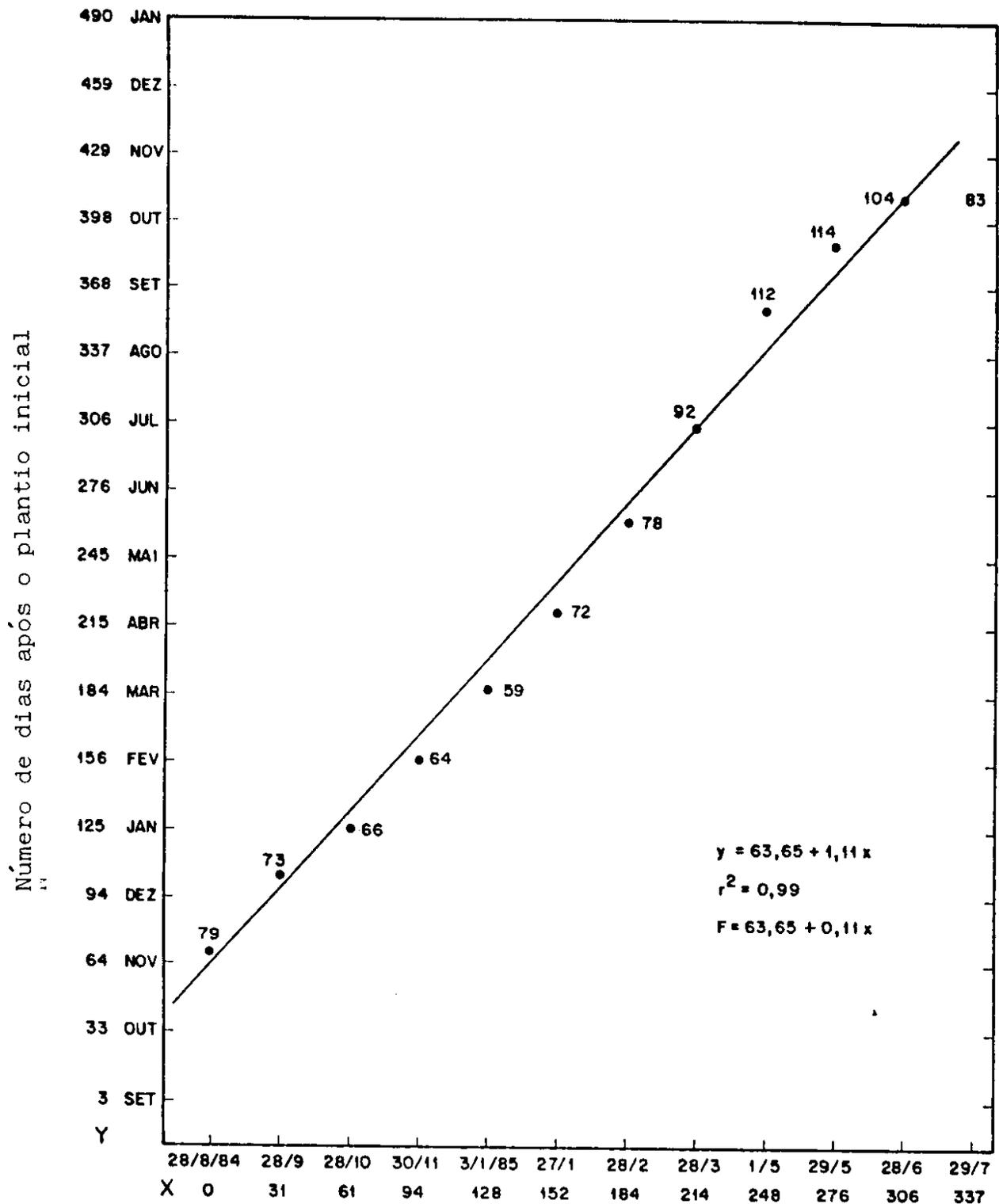
Germoplasma	Coeficiente de variação %	amplitude	
		mínima	máxima
El Batan	13,9	49	76
Los Reyes	19,9	56	98
Luxurians	41,5	77	251
Diploperene	38,5	71	218
Pajimaca	22,4	59	114

sibilidade ao fotoperíodo, composto pela cultivar de milho, Pajimaca, e pelos teosintes anuais mexicanos, El Batán e Los Reyes, que mostraram coeficientes de 22,4; 13,9 e 19,9% respectivamente. O outro grupo, com maior fotosensibilidade, é composto pelo teosinte perene diplóide, Diploperene, e pelo teosinte anual da Guatemala, Luxurians, com coeficiente de variação aproximadamente duas vezes superior ao do primeiro grupo.

Essa divisão em dois grupos mostra uma maior proximidade filogenética do milho com os teosintes anuais mexicanos e obviamente um maior distanciamento dos teosintes da Seção Luxuriantes, confirmando também nesse aspecto, não considerado por Doebley e Iltis (1980), a colocação por eles sugerida do milho e dos teosintes anuais mexicanos na Seção Zea e de *Zea diploperennis* e *Zea luxurians* na Seção Luxuriantes.

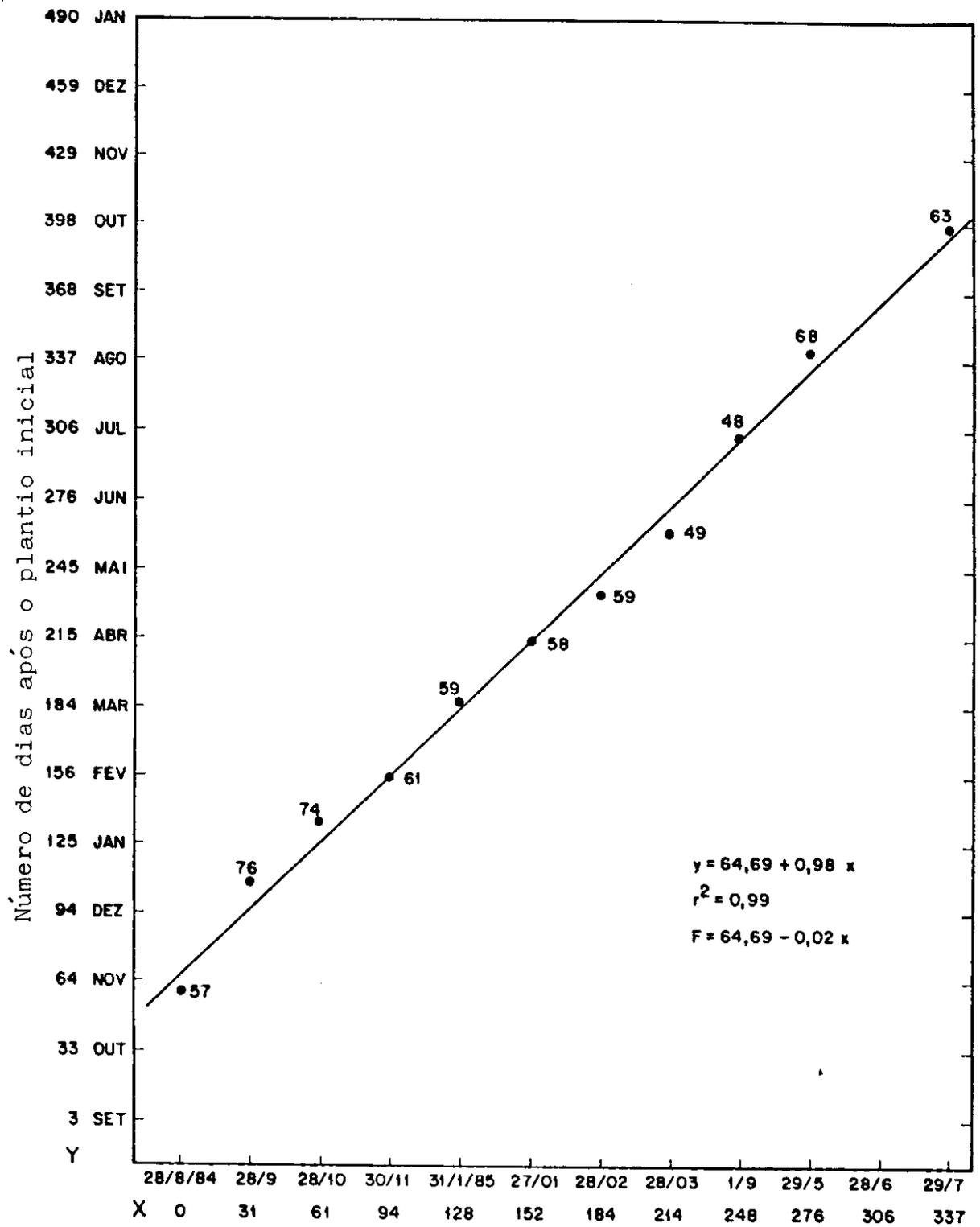
Uma outra informação desse quadro se refere a indução do florescimento em teosinte em fotoperíodos de até 13h24min. Isso sugere que o teosinte não é uma planta de dia curto obrigatório, complementando informações de vários autores (Emerson, 1924; Wilkes, 1967) que estudaram a indução do florescimento em teosinte recomendando um fotoperíodo indutor de 10 horas.

Os dados do plantio e florescimento estão também ilustrados nas figuras 1 a 5 e mostram através de linhas de regressão linear a reação de cada material à indução do florescimento em plantios a partir de 28 de Setembro, que funciona como ponto de origem em nosso gráfico.



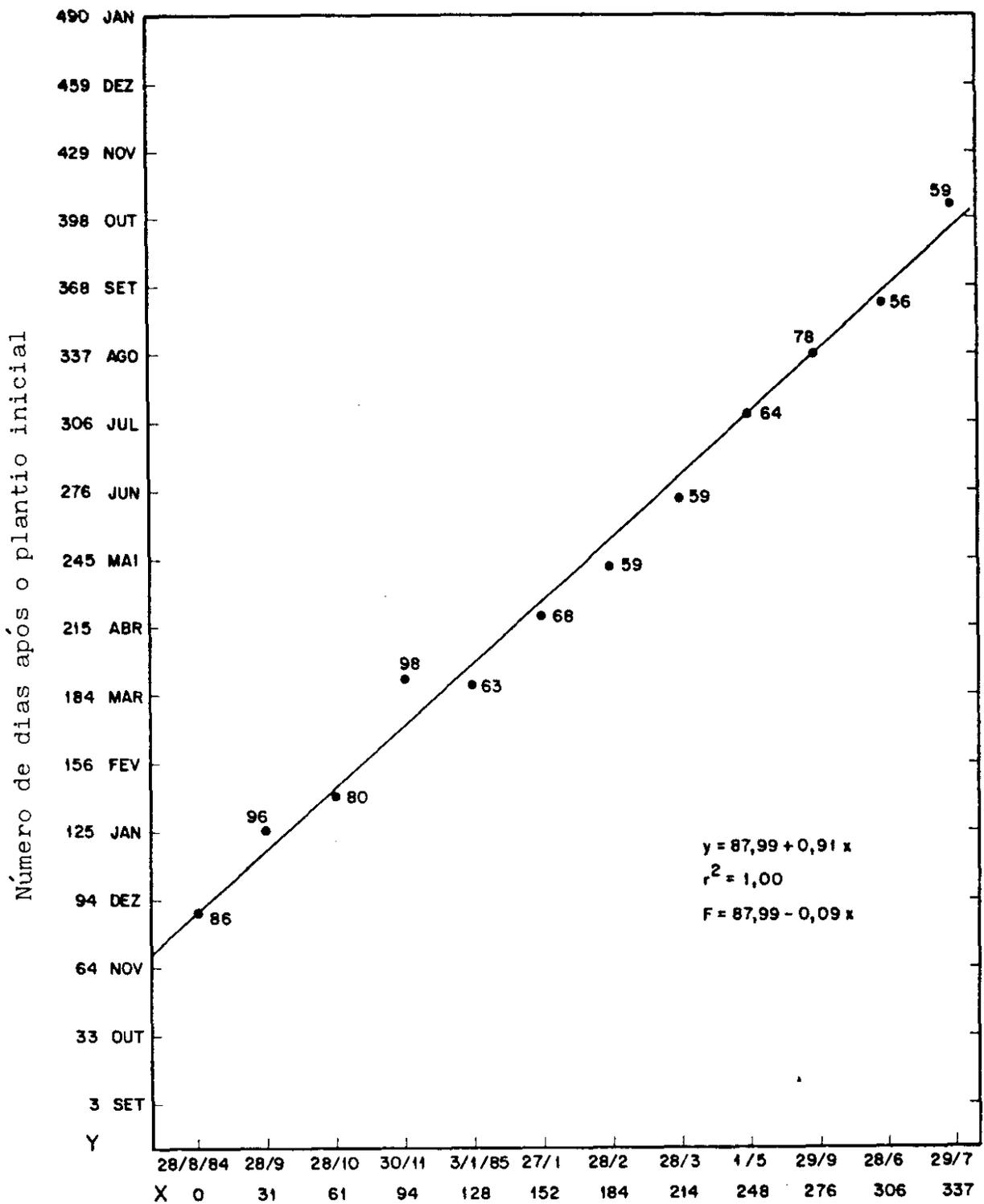
Datas de plantio (linha superior) e número de dias após o plantio inicial (linha inferior)

Figura 1. Regressão entre época de plantio determinada pelo número de dias (x) após 28/8/84 (1ª época), e número de dias (y= x+dias) para o florescimento, envolvendo 12 plantios mensais em milho Pajimaca. F é o número de dias para o florescimento após 28 de Setembro.



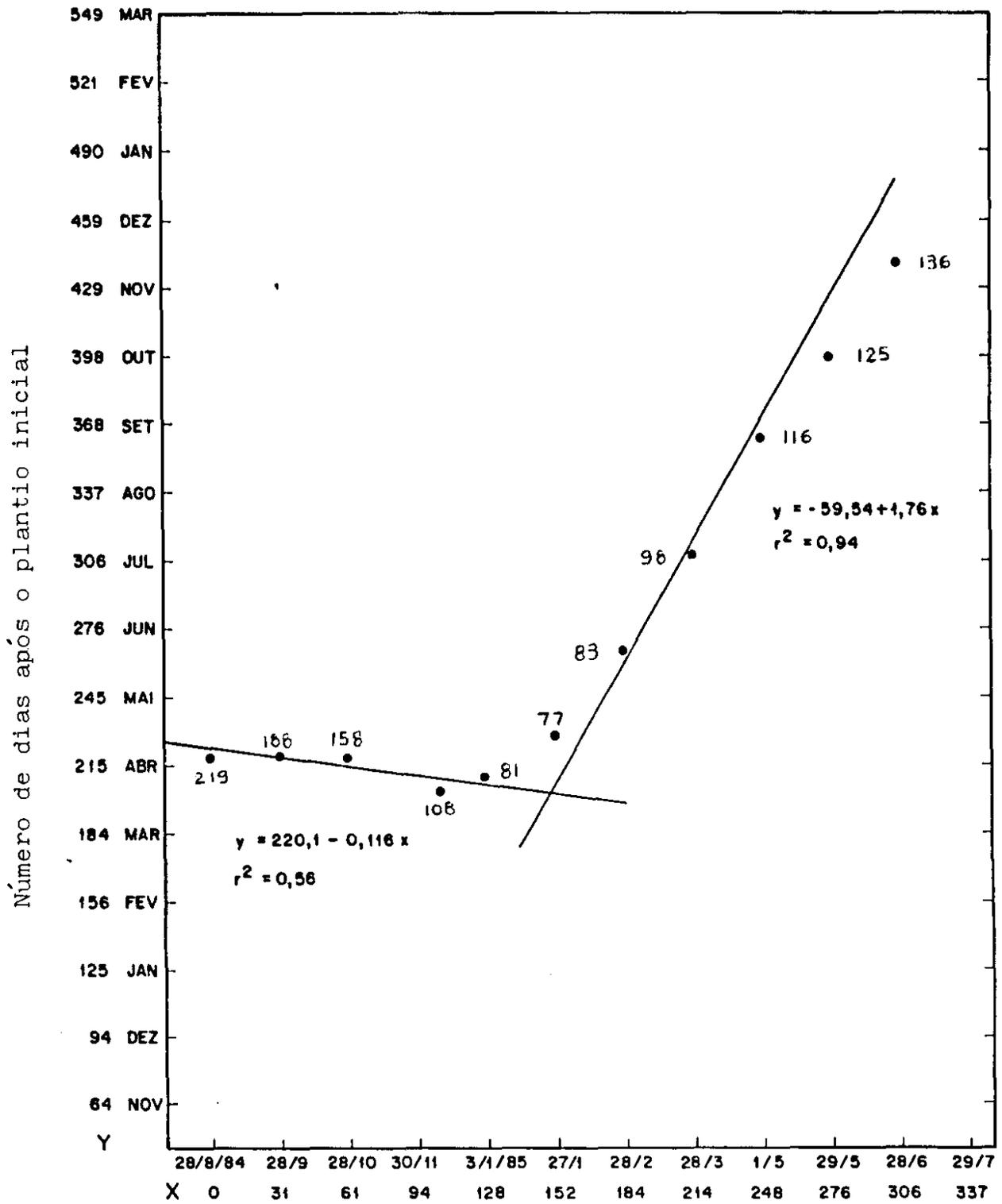
Datas de plantio (linha superior) e número de dias após o plantio inicial (linha inferior)

Figura 2. Regressão entre época de plantio determinada pelo número de dias (x) após 28/8/84 (1ª época), e número de dias (y= x+dias) para o florescimento, envolvendo 12 plantios mensais em teosinte El Batán. F é o número de dias para o florescimento após 28 de Setembro.



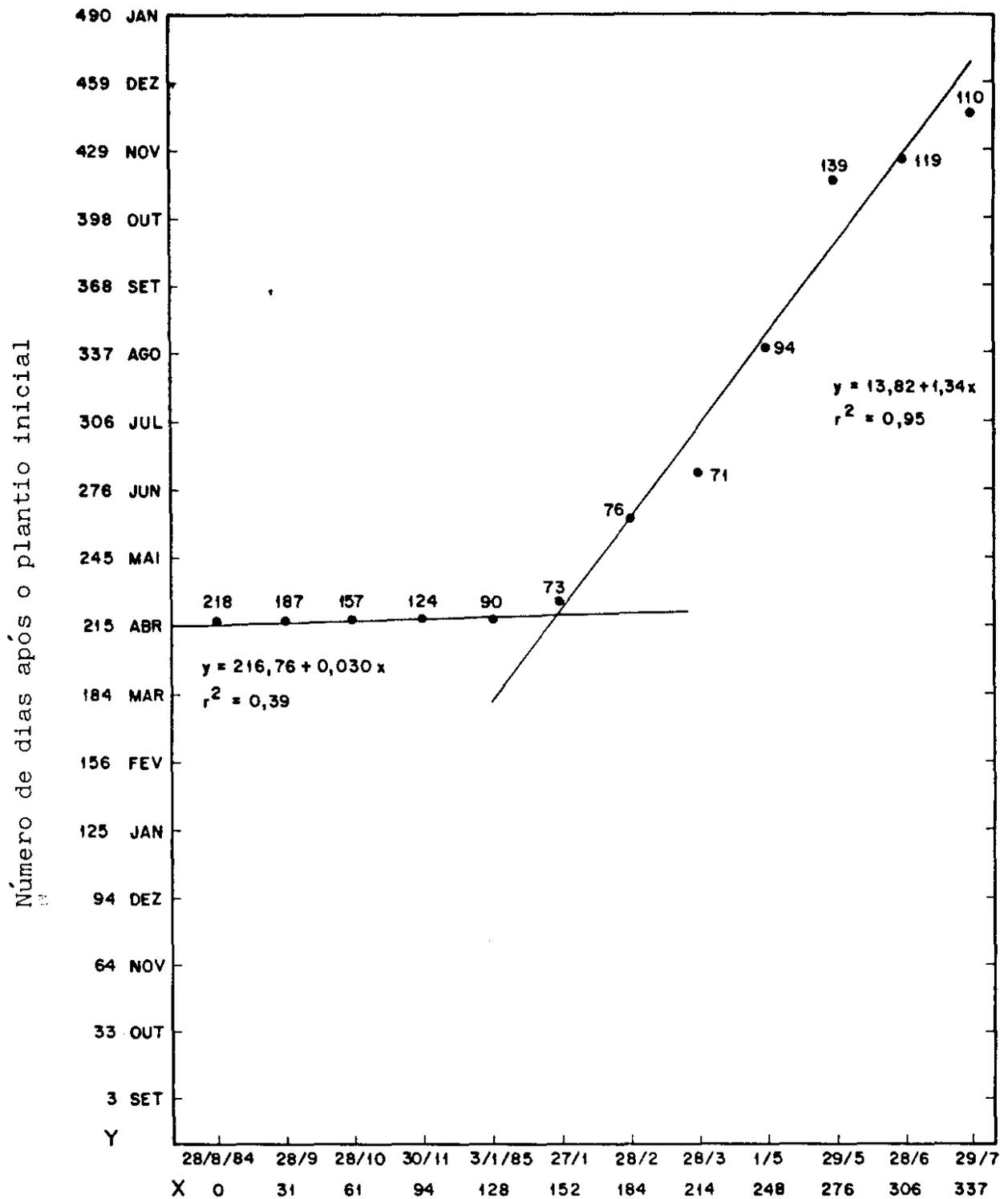
Datas de plantio (linha superior) e número de dias após o plantio inicial (linha inferior)

Figura 3. Regressão entre época de plantio determinada pelo número de dias (x) após 28/8/84 (1ª época), e número de dias (y= x+dias) para o florescimento, envolvendo 12 plantios mensais em teosinte Los Reyes. F é o número de dias para o florescimento após 28 de Setembro.



Datas de plantio (linha superior) e número de dias após o plantio inicial (linha inferior)

Figura 4. Regressão entre época de plantio determinada pelo número de dias (x) após 28/8/84 (1ª época), e número de dias (y= x+dias) para o florescimento, envolvendo 12 plantios mensais em teosinte Luxurians.



Datas de plantio (linha superior) e número de dias após o plantio inicial (linha inferior)

Figura 5. Regressão entre época de plantio determinada pelo número de dias (x) após 28/8/84 (1ª época), e número de dias (y= x+dias) para o florescimento, envolvendo 12 plantios mensais em teosinte Diploperene.

Podemos verificar que os germoplasmas menos sensíveis ao fotoperíodo, ou seja, milho e teosintes El Batán e Los Reyes podem ter o seu florescimento durante a fase experimental representado graficamente através de uma única reta de regressão (figuras 1, 2 e 3). As equações de regressão linear permitem, com precisão, a predição da data de florescimento de cada germoplasma em plantios realizados em nossa Área Experimental. Basta na função linear substituir Y por $F+X$, onde F é o número de dias para florescer e X é o número de dias após 28 de Setembro, para o plantio.

Por sua vez as figuras 4 e 5 referentes ao florescimento dos teosintes Luxurians e Diploperene, mostram que esses materiais concentram o período de florescimento no mês de Abril quando os plantios são efetuados de Setembro a Janeiro, respondendo de forma linear distinta em plantios fora desse período. Outra particularidade que pode ser observada com relação a esses dois teosintes, é que apresentam ciclo bem maior ao longo do ano em comparação com os demais da Secção Zea. Esses teosintes são mais sensíveis ao fotoperíodo, necessitando de 12 horas ou menos de luz para indução de florescimento em plantios de Setembro a Janeiro (figuras 4 e 5). Fotoperíodos acima de 12h48min não induzem à passagem do estado vegetativo ao estado reprodutivo no período de plantio de Setembro a Janeiro.

Sabe-se que o florescimento, como qualquer fenômeno biológico, é efeito da interação de genótipo e meio ambiente. Com relação ao florescimento existem duas componentes principais do meio ambiente influenciando nesse fenômeno, fotoperíodo e

temperatura (Russel e Stuber, 1983a). Porém os mesmos autores, sugerem que para milho, quando considera-se como medida para florescimento, dias para o aparecimento da panícula, o fotoperíodo mostra influência maior que a temperatura, porém, não é desprezível a influência de interações fotoperíodo x temperatura.

Verifica-se que existe grande homologia entre os dados publicados em pesquisas realizadas no Hemisfério Norte, com os dados verificados em nossa Área Experimental em Campinas. Wilkes (1967) mostrou que os teosintes provenientes do México são de um modo geral mais precoces do que aqueles de latitudes mais ao Sul, ou seja, da Guatemala, em estudos realizados na Estação Experimental de Waltham, Massachusetts (42°N). Disse existir uma relação direta entre a resposta ao tratamento de dia curto com a latitude do local onde foi feita a coleta do germoplasma no México ou Guatemala. As primeiras populações a florescer são as do México seguindo a partir daí um direcionamento do florescimento à medida que se caminha para o Sul. Tal fato também verificado por Melhus e Ahrens (1959) indica definitivamente que os meses onde o fotoperíodo começa progressivamente a diminuir são os melhores para se plantar o teosinte, pois são nessas condições que se encontra mais facilmente a indução fotoperiódica. Isso também foi observado em nossos trabalhos.

Um outro aspecto, já discutido por outros pesquisadores (Bonaparte, 1975; Warrington e Kanemassu, 1983; Abassi et alii, 1985) é que o florescimento deve sofrer interações de diversos componentes do meio ambiente. Um dos principais é a temperatura. A separação dos efeitos de luz e temperatura

torna-se bastante difícil em estudos realizados no campo, uma vez que os efeitos de fotoperíodo e temperatura se confundem, pois no período do aumento de horas de luz ocorre paralelamente um aumento de temperatura. Por outro lado o menor fotoperíodo também acha-se associado com períodos de abaixamento de temperatura. Isso obviamente é um problema sério em experimentos em latitudes onde o frio pode impedir o desenvolvimento das plantas.

Para se conhecer em nossa latitude um pouco mais dessas interações, as temperaturas máximas e mínimas, foram usadas para se estimar as unidades de calor ou Graus Dias necessários para a indução do florescimento de cada material. Os Graus Dias até o florescimento são mostrados na tabela 6. As diferenças encontradas são de 197 Graus Dias para o cereal cultivado, 453 para o teosinte El Batan e 855 para o teosinte Los Reyes. As diferenças encontradas para o teosinte Luxurians, 2222, e Diploperene, 2106 Graus Dias são bem maiores, que os do primeiro conjunto. Milho e teosintes anuais mexicanos formam um grupo, e os teosintes Luxurians e Diploperene, outro, como foi visto na resposta ao fotoperíodo.

Os dados de Graus Dias para explicar o florescimento, entretanto, devem ser encarados com bastante cautela uma vez que a amplitude deveria ser mínima para plantios ao longo do ano. Se a amplitude cresce, obviamente significa que outros fatores diferentes da temperatura, estão afetando a indução do florescimento das plantas. A sensibilidade ao fotoperíodo deve ser um fator importante, como vimos anteriormente notadamente nos teosintes da Secção Luxuriantes. Assim sendo, apenas em milho parece ser viável a estimativa da épo-

Tabela 6. Amplitude das unidades de calor ou Graus Dias, do plantio ao florescimento da panícula dos cinco germoplasmas, em 12 épocas de plantio ao longo do ano.

Germoplasma	amplitude	
	mínima	máxima
El Batán	563	1016
Los Reyes	483	1338
Luxurians	1107	3329
Diploperene	757	2863
Pajimaca	831	1027

ca do florescimento por meio do acúmulo de unidades de calor.

Os dados de sensibilidade ao fotoperíodo nos germoplasmas estudados, fornecem subsídios apoiando a classificação sistemática sugerida por Doebley e Iltis (1980) que colocam o milho e teosintes anuais mexicanos na Seccão Zea e os teosintes da Guatemala e Diploperene na Seccão Luxuriantes, baseado em características morfológicas da inflorescência masculina.

Em consequência da fase de indução do florescimento, ocorrem alterações na arquitetura das plantas. A altura das plantas ilustradas na tabela 7 mostra uma direta associação entre essa característica e a sensibilidade ao fotoperíodo. O menor coeficiente de variação para o milho em relação aos teosintes anuais pode ser uma consequência direta da domesticação.

Com base nos padrões de resposta de milho e teosintes parece que, independente da ordem cronológica de aparecimento do milho e do teosinte, deve existir no centro de origem dessas espécies franca possibilidade de sobreposição de florescimento e com isso permitir trocas de genes entre milho e teosintes *Zea mays mexicana* que são simpátricos ao milho. No caso dos teosintes da Seccão Luxuriantes as diferenças de resposta ao fotoperíodo em relação ao milho são tão extremas, que esse efeito parece se constituir em mecanismo de isolamento genético, nos locais onde cohabitam naturalmente, milho e teosinte.

Tabela 7. Alturas mínimas e máximas (Média de 20 plantas), na época do florescimento, obtidas nos 12 plantios, para os cinco germoplasmas, juntamente com os respectivos coeficientes de variação.

Germoplasma	Coeficiente de variação (%)	amplitude (cm)	
		mínima	máxima
El Batan	71,2	45	220
Los Reyes	70,1	30	250
Luxurians	135,8	50	420
Diploperene	94,6	60	300
Pajimaca	47,3	145	300

Segundo Wilkes (1967), entretanto, devem existir mecanismos que, operando agora e/ou no passado, tem conseguido manter o isolamento de duas taxa facilmente cruzáveis e altamente interférteis. Na mesma linha Doebley (1984) e Kato e Vargas (1986) acham que a introgressão de milho e teosinte não estaria ocorrendo e provavelmente não tem ocorrido por milênios a despeito da facilidade de hibridação com produção de híbridos férteis. Esses mecanismos embora sugeridos não foram encontrados até agora.

Na tentativa de se estudar um mecanismo pré-zigótico de isolamento que pudesse impedir a hibridação natural, pensamos em investigar a competição de tubos polínicos de milho e teosinte em estilo-estigmas de milho e em estilo-estigmas de teosintes.

4.2. Estudo de competição de grãos de pólen de milho e teosinte.

Para se estudar esse aspecto, que pode ocorrer em populações simpátricas de milho e teosinte, foram utilizados vários experimentos envolvendo milho e os quatro tipos de teosinte.

No primeiro deles, foram tomadas medidas de tamanho de grão de pólen e comprimento de estilo-estigmas em milho e

teosinte. Pois, segundo Galinat (1981), o tamanho menor do grão de pólen de teosinte é coadaptado ao estilo-estigma mais afilado desse taxa. Ainda de acordo com o mesmo autor, em trabalho de 1979, o menor tamanho do pólen do teosinte moderno, funcionaria como uma adaptação secundária para promover a auto-fertilização. Na tabela 8 é mostrado o valor médio do comprimento dos estilo-estigmas, e o diâmetro médio do grão de pólen dos cinco germoplasmas estudados. Os dados mostram que os estilo-estigmas de milho são cerca de três vezes superiores em comprimento à média dos teosintes. O diâmetro do grão de pólen do milho é cerca de 20% superior à média dos demais teosintes.

O coeficiente de correlação entre o comprimento dos estilo-estigmas e o diâmetro do grão de pólen nos cinco germoplasmas estudados foi de 0,78. Isso mostra que grãos de pólen maiores ocorrem juntamente com estilo-estigmas mais longos e vice-versa. Estabeleceu-se como hipótese de trabalho que grãos de pólen maiores estariam mais adaptados a estilo-estigmas longos e por consequência poderiam percorrer tubos polínicos de maior comprimento que os grãos de pólen de menor diâmetro. Seria o mesmo que dizer que grãos de pólen de milho competiriam igualmente com grãos de pólen de teosinte em estigmas de teosinte mas levariam vantagem quando colocados em estilo-estigmas de milho. Na realidade é essa a direção de introgressão verificada em trabalhos anteriores (Wilkes, 1967; Gil, 1970; Aguirre e Kato, 1979).

Para avaliar essa hipótese planejou-se uma série de experimentos de mistura de grãos de pólen de milho e teosinte polinizando-se tanto estilo-estigmas de milho como de teosin-

Tabela 8. Valores médios do comprimento dos estilo-estigmas e diâmetro do grão de pólen em 20 plantas dos cinco germoplasmas estudados.

Germoplasma	Comprimento médio cm	Diâmetro
El Batan	6,1 ± 1,3	103,1 ± 5,3
Los Reyes	6,4 ± 0,9	95,5 ± 6,6
Luxurians	6,9 ± 0,7	107,4 ± 4,4
Diploperene	4,7 ± 0,6	91,2 ± 4,3
Pajimaca	19,5 ± 1,4	120,1 ± 5,1

tes.

Antes porém, foi executado um experimento com polinização de estilo-estigmas de milho com 100% de pólen de teosinte para se detectar possível efeito gametofítico inibidor do desenvolvimento do tubo polínico, bem como para se avaliar o potencial de caminhamento do tubo polínico de teosinte em milho. Os dados encontrados na tabela 9 analisados pelo teste não paramétrico de Friedman mostram um qui-quadrado ($K=0,075$) superior ao limite usual de 5% de probabilidade, indicando que as diferenças encontradas são devidas ao acaso e não são significativas. Porém observando a alta heterogeneidade dos resultados na tabela 9, podemos transformá-los pelo uso da fórmula $\sqrt{X+0,5}$ e sobre o resultado aplicar uma Análise de Variância. Tal análise demonstrou a existência de um valor de F (0,044) para os quatro teosintes, que é inferior ao verificado na tabela de limites bilaterais ao nível de 5% de probabilidade para o caso de F(1 (0,069), indicando existir alguma heterogeneidade entre os materiais. Essa heterogeneidade parece indicar a existência de diferenças de coadaptação dos gametófitos masculinos de teosinte em tecidos esporofíticos de milho. Porém, o que podemos concluir dos dados da tabela 9 é a não existência de um forte fator gametofítico que impeça a fecundação de ovários de milho por grãos de pólen de teosinte. Por outro lado, examinando as espigas de milho resultantes desse experimento, pudemos observar a não existência de qualquer semente com aspecto enrugado. Tal ocorrência, parece indicar, que de fato, deve ser muito baixa a frequência do gene **su** em sua forma mutante nas populações de teosinte estudadas. As figuras 6 e 7 mostram o tipo mais frequente de granação encontrados nas quatro variedades estudadas.

Tabela 9. Tipo de granação observada em espigas de milho em polinização com 100% de grãos de pólen de cada um dos quatro teosintes. Granação completa (3/3), granação do terço apical e mediano (2/3), granação apenas do terço apical (1/3) e granação nula (0/3).

Pólen	Tipos de Granação				Total de Espigas
	3/3	2/3	1/3	0/3	
El Batan	07	07	04	01	19
Los Reyes	16	07	02	00	25
Luxurians	03	16	00	05	24
Diploperene	01	03	09	12	25
Total	27	33	15	18	93

Figura 6. Espigas de milho polinizadas por 100% de pólen de teosinte.

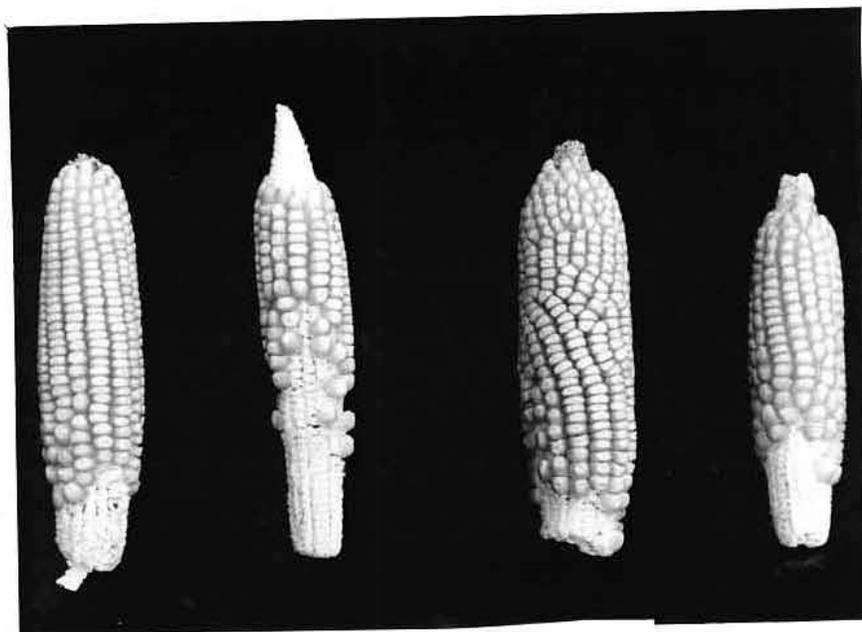


TEOSINTE EL BATAN



TEOSINTE LOS REYES

Figura 7. Espigas de milho polinizadas por 100% de pólen de teosinte.



TEOSINTE LUXURIANS



TEOSINTE DIPLOPERENE

Essas informações sobre granação parcial de espigas de milho por grãos de pólen de teosinte parecem não rejeitar a hipótese de que grãos de pólen menores formam tubos polínicos menores. Fornecem ainda subsídios rejeitando a possibilidade de expressão de genes gametofíticos no milho inibindo o desenvolvimento de tubos polínicos de teosinte uma vez que é alta a frequência de tubos polínicos que atingiram pelo menos um terço da espiga de milho.

As nossas observações parecem também confirmar dados de Goodman et alii (1983), de que raças de teosinte mostram diferentes habilidades de cruzamento com milho quando o último é usado como fêmea. Para esses pesquisadores o teosinte *Diploperene* também mostrou baixa capacidade de granação em espigas de milho. O que não se pode detectar nesse experimento foi a existência de inibição de pólen de teosinte por parte dos tecidos do estilo-estigma de milho, o que obviamente limitará a fecundação de óvulos localizados mais na base da espiga.

A fase seguinte foi a de estudar a competição de grãos de pólen de milho e teosinte em estigmas das duas espécies, pois Landi e Sanguinetti (1985) sugerem que existe uma competição entre pólen de milho e pólen de outras espécies quando estas são postas a germinar em estilo-estigmas de milho. Pensou-se que a velocidade de formação do tubo polínico poderia ser um dos componentes da habilidade diferencial dos dois tipos de pólen. Desse modo, estabeleceu-se uma hipótese que na região da espiga de granação perfeita, digamos no terço superior, pólen de milho e teosinte tem a mesma velocidade

para germinar e formar o tubo polínico. Para avaliar essa hipótese foi feito um experimento para aferir a velocidade de germinação e desenvolvimento inicial de tubos polínicos de pólen de milho e teosintes em estilo-estigmas de milho. Os dados na tabela 10 analisados pelo teste não paramétrico de Friedman mostram existir heterogeneidade entre os resultados observados recomendando claramente a rejeição da hipótese, isto é, que o pólen dos cinco germoplasmas tem a mesma velocidade de formação do tubo polínico. O milho é o mais rápido seguido dos teosintes El Batan, Los Reyes e Luxurians. O teosinte Diploperene parece ser o mais lento, e pouco adaptado para se desenvolver em estilo-estigmas de milho.

Os resultados apresentados até aqui sugerem que tanto o tamanho do grão de pólen como a velocidade de crescimento do tubo polínico são fatores para explicar a existência de mecanismos de isolamento de espécies simpátricas de milho e teosinte. Interessante notar que outros fatores podem muito bem estarem atuando, pois o grão de pólen de milho não tem condições de suportar o crescimento do tubo por mais de 2,0cm de comprimento (Heslop-Harrison et alii, 1984b). Após essa distância tem de recorrer a substratos exógenos encontrados pelo tubo ao longo do estilo-estigma, durante a sua extensão.

Registros na literatura (Wilkes, 1967, 1977), revelam que a situação mais comum onde ocorre a hibridação introgressiva é encontrada quando plantas de teosintes em situação de simpatria com milho coincidem o período de florescimento, proporcionando uma mistura de pólen na polinização. Esses fatores nos levaram a estudar competição de grãos de pólen tam-

Tabela 10. Número de sementes obtidas em espigas de milho polinizadas com pólen de cada um dos cinco germoplasmas. Os estilo-estigmas foram cortados a 1,0cm abaixo da superfície polinizada, em 6 tratamentos após a polinização. Os valores referem-se ao total de sementes obtidas em 2 espigas.

Pólen	Tempo para o corte (min.)					
	30'	60'	90'	120'	150'	180'
El Batan	05	01	02	15	21	14
Los Reyes	00	12	13	23	00	07
Luxurians	00	00	24	19	06	08
Diploperene	00	00	00	00	07	00
Pajimaca	44	267	83	389	160	88

bém em experientos de mistura de pólen. Nesses experimentos obviamente a hipótese avaliada é que o pólen de milho é igualmente competitivo com os pólenes dos teosintes. Os resultados da polinização em estigmas de milho são mostrados na tabela 11. Sementes lisas, são sementes F₁ resultantes da fertilização de ovários de milho com núcleos espermáticos de teosinte.

Fica claro pelo exame da tabela 11 que o pólen de milho leva enorme vantagem sobre o pólen de teosinte, sendo os valores de qui-quadrado obtidos altamente significativos, evidenciando claramente que tanto o tamanho de grão de pólen como a velocidade de formação do tubo polínico tem efeito decisivo na maior capacidade competitiva do grão de pólen de milho sobre os de teosinte, em estilo-estigmas de milho.

Todos os quatro teosintes apresentaram baixíssima porcentagem de cruzamento na região apical em comparação com as obtidas nos experimentos de polinização com 100% de pólen de teosinte. Isso evidencia claramente o efeito de maior velocidade de desenvolvimento do tubo polínico de milho em relação ao dos teosintes quando em competição em estilo-estigma de milho, constituindo-se em fator mais importante que a própria maior distância que pode percorrer nos estilo-estigmas de milho. A velocidade de desenvolvimento do tubo polínico do pólen de milho em estilo-estigmas da própria espécie deve ser considerado fator importante como mecanismo de isolamento genético e uma forma de evitar introgressão da espécie selvagem simpátrica.

Se considerarmos que em média na mistura de pólen

Tabela 11. Valores observados e esperados de sementes lisas, isto é, semente F₁ resultantes da fertilização de óvulos de milho Pajimaca com núcleos de pólen de teosinte, em experimentos de mistura de pólen de milho e teosintes, em terço apical, mediano e basal da espiga.

Pólen	Total		Região		
			Apical	Mediana	Basal
El Batan	6597	Obs.	46	90	27
		Esp.	877	1713	1455
		Tot.	1413	2793	2373
		χ^2	2037***	3974***	3624***
Los Reyes	6086	Obs.	40	41	12
		Esp.	995	1656	1464
		Tot.	1469	2489	2201
		χ^2	2741***	4708***	4305***
Luxurians	6611	Obs.	48	52	08
		Esp.	1872	2727	2012
		χ^2	2393***	3569***	2776***
Diploperene	6117	Obs.	01	04	04
		Esp.	1029	1772	1452
		Tot.	1480	2548	2089
		χ^2	3371***	5788***	4741***

tinha-se cerca de 67% de grãos de pólen de teosinte e foram produzidos apenas 1,9% de sementes F1 de teosinte e milho, fica claro que a probabilidade de cruzamentos de teosinte com milho na natureza é um evento extremamente raro, mesmo que haja coincidência no florescimento das espécies simpátricas.

Uma amostra de espigas de milho Pajimaca polinizadas por mistura de pólen, provenientes desse experimento, pode ser vista nas figuras 8 e 9. Nota-se que a granação das espigas é completa apesar da baixa frequência de cruzamentos de teosinte x milho, revelando que os estilo-estigmas se encontram com alta receptividade.

Outro fator que poderia influir nesses resultados poderia ser a frequência de grãos de pólen abortados observados em cada material. Um grande número de grãos de pólen abortados poderia indicar ainda uma menor adaptação da espécie de teosinte às condições de nossa Área Experimental ou ainda algum problema genético na meiose. Verifica-se porém na tabela 12 que as porcentagens de grãos de pólen normais observadas são superiores a 92,8% no caso dos teosintes embora a maior porcentagem de grãos de pólen abortados tenha sido encontrada na população Los Reyes. Tal porcentagem, entretanto, é suficientemente alta para garantir granação completa da espiga do milho.

Nossos dados concordam com aqueles publicados por Aguirre e Kato (1979) e Gil (1970). Ambos apontam uma clara vantagem do pólen de milho sobre pólen de teosinte quando ambos germinam sobre estilo-estigma de milho. Pode-se então lançar a questão. Será que o pólen de milho não desenvol-

Figura 8.. Sementes normais e enrugadas de milho Pajimaca. A mistura de pólen de milho + teosinte usada na polinização das espigas de milho está identificada pela legenda na base das espigas.

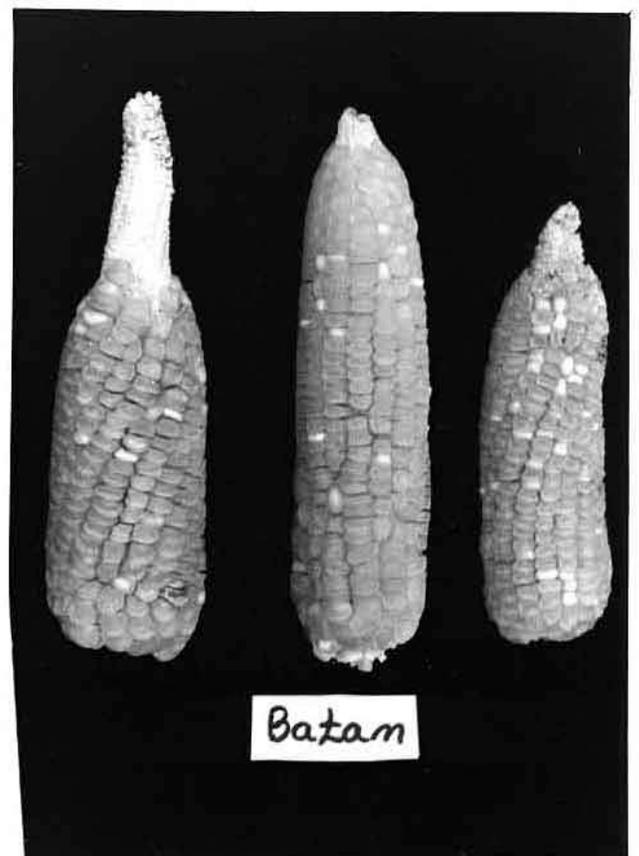
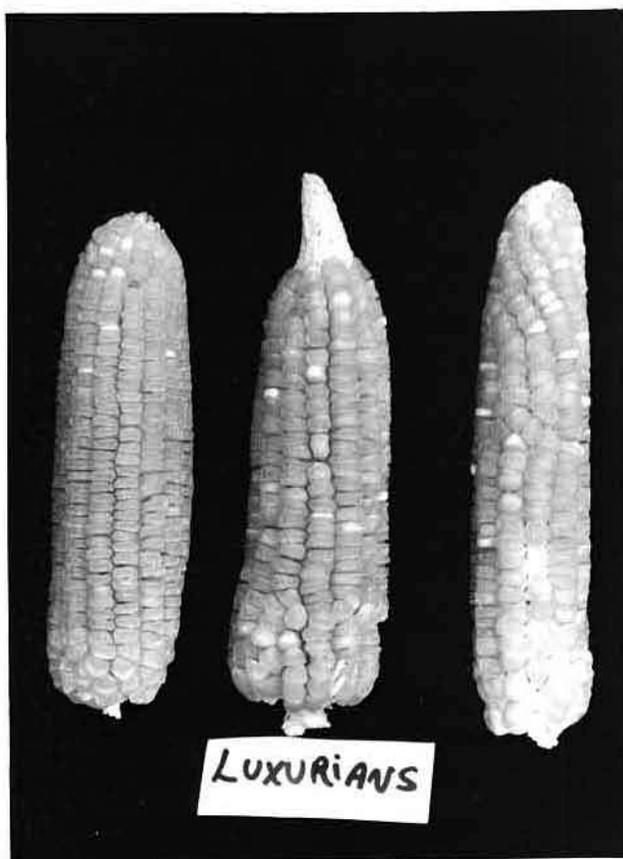


Figura 9. Sementes normais e enrugadas de milho Pajimaca. A mistura de pólen de milho + teosinte usada na polinização das espigas de milho está identificada pela legenda na base das espigas.

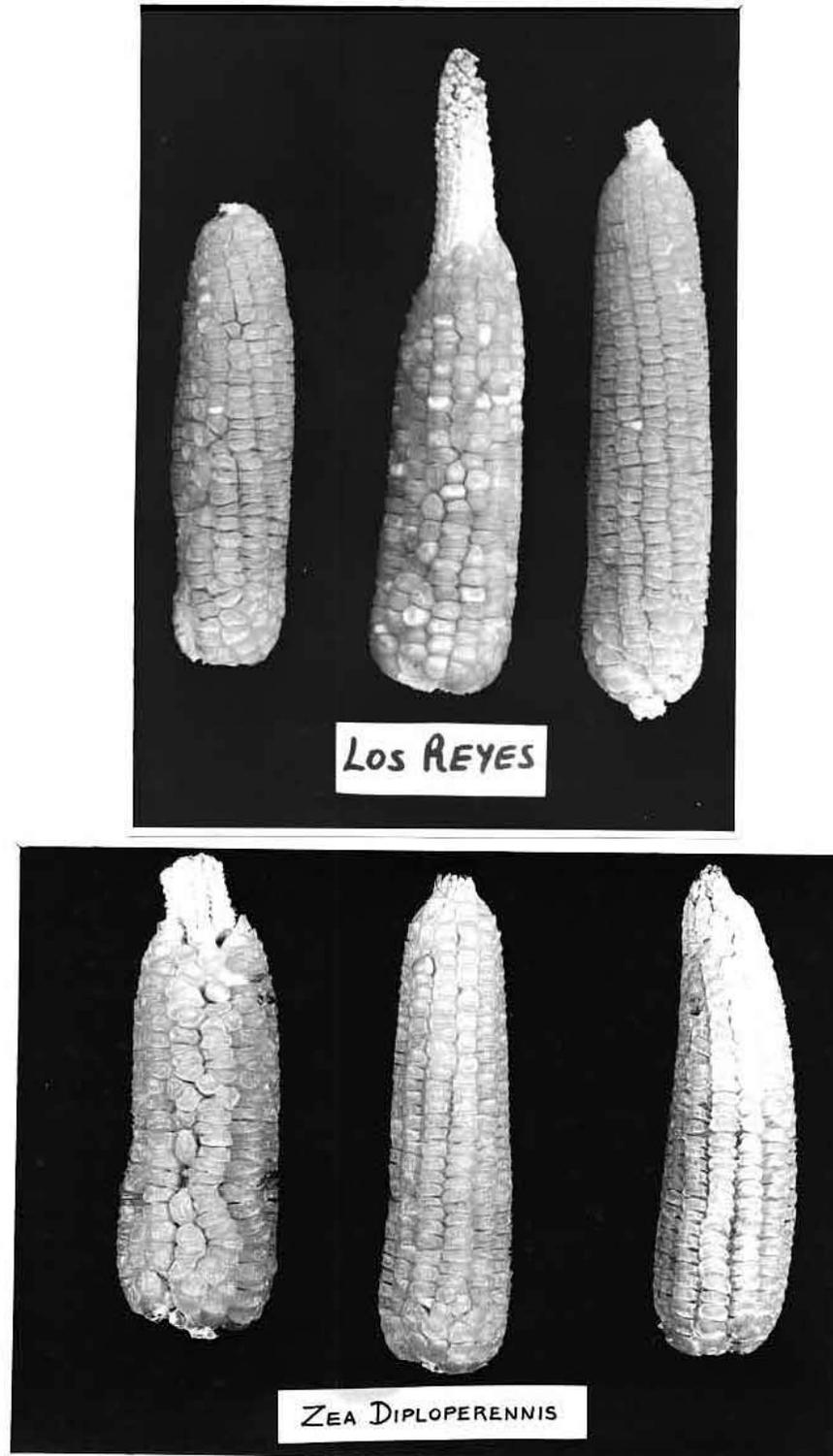


Tabela 12. Número médio de grãos de pólen normais em um total de 200, analisados nos cinco germoplasmas.

Germoplasma	Pólen normal n°
El Batan	191,2 ± 11,8
Los Reyes	185,6 ± 17,7
Luxurians	189,3 ± 12,6
Diploperene	188,8 ± 16,8
Pajimaca	197,2 ± 4,1

veu-se melhor nesse experimento, simplesmente porque ele está perfeitamente adaptado aos estilo-estigmas da própria espécie? Não seria a maior velocidade e a maior distância percorrida do tubo polínico consequência desse fato?

De fato muitos trabalhos de competição de grão de pólen sugerem a existência de uma maior compatibilidade entre o pólen e o estilo-estigma da mesma espécie (Gorla et alii, 1976; Galinat, 1980, 1981; Landi e Sanginetti, 1985). Podemos então acrescentar aqui, como hipótese de trabalho, um terceiro efeito, ou seja, que exista uma coadaptação entre gametófitos e esporófitos da mesma espécie, o que obviamente é esperado em consequência da seleção natural. Diríamos que o esporófito feminino, ou melhor ainda, que o conjunto esporófito feminino-gametófito masculino acha-se plenamente afinado para identificar e otimizar o desenvolvimento do gametófito masculino correspondente da espécie.

O efeito da melhor coadaptação do gametófito masculino com o esporófito feminino de uma mesma espécie pode ser testado através do uso de mistura de gametófitos masculinos de espécies diferentes em tecido estilar das duas espécies. Para complementar essa informação foram efetuados experimentos de competição de grãos de pólen em estilo-estigmas de teosinte. Os resultados são mostrados na tabela 13. Verifica-se inicialmente que o total de sementes observadas é relativamente baixo devido a dois fatores: a emasculação de plantas de teosinte envolve um alto grau de dificuldade e a polinização produz normalmente pequena quantidade de sementes em teosinte. Os qui-quadrados observados indicam desvios nas proporções esperadas, e esses desvios como pode ser observado

Tabela 13. Número observado e esperado de plantas F_1 de milho \times teosinte, em polinizações por mistura de pólen de milho e teosintes, em estilo-estigmas dos quatro teosintes estudados.

Pólen	Total	Plantas F_1		χ^2
		esperado	observado	
El Batan	109	42	01	65,1**
Los Reyes	87	29	00	43,5**
Luxurians	55	23	15	4,8**
Diploperene	60	18	56	114,6**

no quadro, ocorrem nas duas direções, ou seja, excesso de sementes polinizadas por pólen de teosinte, em três casos, e excesso de sementes polinizadas por pólen de milho, em um caso. O primeiro fato que chama a atenção é a quase ausência de polinizações por pólen de milho em ovários de teosinte anual mexicano. Para os teosintes El Batan e Los Reyes, simpátricos ao milho, as porcentagens de polinizações por pólen de milho foram respectivamente de 0,91% e 0%, evidenciando a existência de fatores gametofíticos inibindo o tubo polínico de milho em estilo-estigmas dessas duas espécies. Esse efeito gametofítico deve ter surgido ao longo do tempo, durante a coevolução de milho e teosinte, promovendo o isolamento da espécie cultivada pelo homem, da espécie selvagem preservada pela natureza. Esses resultados esclarecem dúvidas surgidas recentemente, pois Doebley (1984) mostrou que enquanto existem evidências que algumas populações de milho contém germoplasma de teosinte, a introgressão por milho em teosinte deve ser circunstancial para permitir a adaptação de populações particulares de teosinte às exigências de habitats específicos criados com a agricultura. Segundo o autor, entretanto, o teosinte tem permanecido relativamente livre de contaminação por milho pelo menos com respeito aos caracteres que afetam a sua sobrevivência, notadamente características das espigas e de seu frutos. Ainda segundo esse autor, o baixo nível de introgressão de milho em teosinte, ainda que possível de ocorrer permanecia até então não documentado (Doebley, 1984). Outros pesquisadores também deram a sua contribuição nessa área. De fato, Kato e Vargas (1986) analisando pigmentos fotossintéticos em milho e teosinte sugerem que em populações simpátricas dessas duas espécies a introgressão não tem ocorrido por um longo tempo, provavelmente muitos milênios, e não está

realmente ocorrendo, a despeito da hibridação que constantemente produz híbridos férteis.

Ainda dentro dos resultados da tabela 13 verifica-se que o pólen de milho é um pouco mais aceito em estilo-estigma de teosinte Luxurians e amplamente aceito em teosinte Diploperene. No caso de teosinte Luxurians foi observado 27,3% de plantas tipo F₁, o que indica uma inibição muito mais branda do que a verificada nos casos anteriores dos teosintes mexicanos. Porém o caso mais notável foi o observado em teosinte Diploperene onde o pólen de milho levou ampla vantagem em relação ao pólen da própria espécie. Nesse aspecto Galinat (1979, 1981) sugeriu que o problema da proteção do teosinte da introgressão por milho envolve a competição de tubos polínicos dentro de estilo-estigmas de teosinte. Seus dados preliminares em estilo-estigmas de teosinte, indicam que eles tem menos células no tecido, com paredes mais finas do que os dos estilos de milho. Segundo a teoria de Galinat os tubos polínicos mais finos do pólen menor de teosinte poderiam abrir seu caminho mais rapidamente entre as células mais finas e menores dos estilo-estigmas de teosinte, do que em relação aos tubos polínicos mais grossos de milho. Segundo esse autor essas características que ocorrem em teosintes que são simpátricos ao milho, foram desenvolvidas como uma barreira protetora do teosinte para reduzir a possibilidade de hibridação introgressiva por milho. Essa idéia poderia muito bem explicar os casos dos teosintes mexicanos, mas dificilmente poderia ser aplicada para o caso de Luxurians, ou menos ainda para teosinte Diploperene, onde 93,3% das polinizações obtidas foram efetuadas por pólen de milho, gerando plantas híbridas. A idéia de Galinat fica ainda mais comprometida se conside-

rarmos que o pólen de teosinte *Diploperene* é o menor de todos teosintes, com 91μ de diâmetro, contra 120μ do milho.

Essa idéia de barreira mecânica, já prejudicada, dificilmente poderia ser aplicada para explicar a inibição do desenvolvimento de tubos polínicos de teosintes em estilo-estigmas de milho. Dai pensarmos na possibilidade de ocorrência de genes gametofíticos com inibição química, a semelhança do que ocorre com os fatores já discutidos no loco **Ga**.

Não podemos, entretanto, afastar a possibilidade da existência de outros tipos de barreiras mecânicas, já que isso ocorre em milho. De fato, Heslop-Harrison et alii (1985) sugerem que barreiras mecânicas são efetivas durante a germinação de pólen de milho em estilo-estigmas da própria espécie, promovendo redução do número de tubos polínicos que percorrem os tecidos condutores dos estilo-estigmas.

Como consequência da domesticação do milho a partir do teosinte, e subsequente seleção praticada pelo homem, visando uma maior produção de alimentos, desenvolveu-se uma estrutura especial, totalmente nova, uma espiga polística, com características morfológicas únicas capaz de proporcionar uma rápida acumulação de matéria seca nos grãos. Essas novas espigas, agora reduzidas a uma ou duas por planta, com várias fileiras de grãos e comprimento médio de 18 a 20cm, acham-se inseridas na parte mediana ou no terço superior do colmo único. Paralelamente aos longos estilo-estigmas, que frequentemente oscilam entre 18 e 40cm de comprimento, nas cultivares comerciais, o pólen de milho teve um aumento pronunciado de

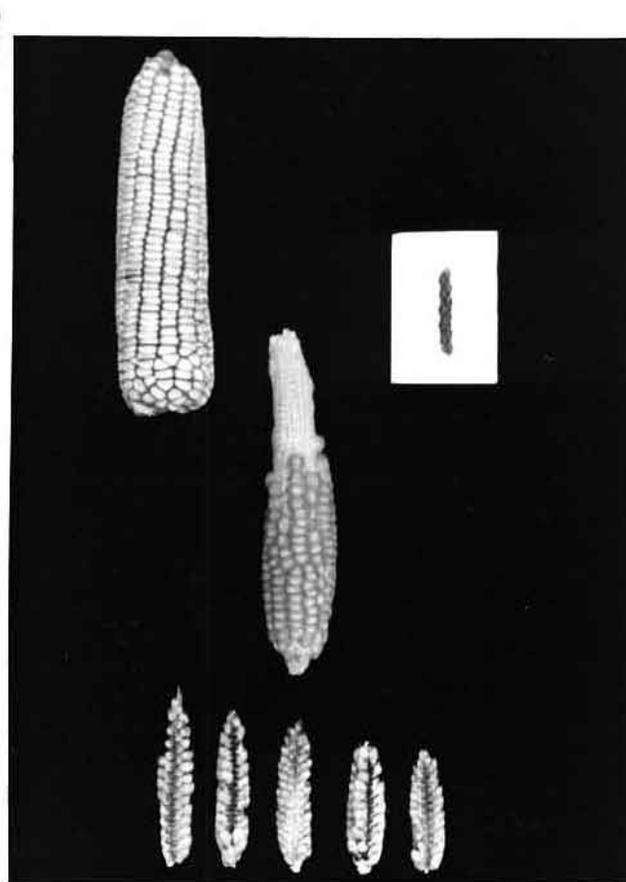
volume, capaz de formar um tubo polínico com velocidade várias vezes superior à dos vários teosintes estudados em estilo-estigmas de milho. Consequentemente a introgressão de teosinte em milho é realizada dificilmente.

O teosinte, por seu lado, logo após a domesticação do milho, vegetando simpatricamente, ao receber pólen de milho, produzia sementes F₁ viáveis, que por apresentarem glumas soldadas (ver fig. 10), não conseguiam se disseminar naturalmente, e se afortunadamente fossem cobertas por solo, poderiam produzir plantas numa touceira, as quais não conseguiriam diferenciar o colmo, e consequentemente não formariam os órgãos reprodutivos. Com isso os cruzamentos interespecíficos eram, e são hoje, fortes candidatos à extinção. Esse isolamento pós-zigótico, que possivelmente ocorreu no início da domesticação, envolve gastos de energia desnecessários. Nessas condições adversas de simpatria, criadas pelo ambiente alterado da Agricultura, o teosinte, pela ação da seleção natural, teve tempo de desenvolver mecanismos genéticos de isolamento mais eficientes, como o tipo pré-zigótico que descrevemos, e que parece ocorrer nos teosintes mexicanos, El Batán e Los Reyes, que habitam com o milho o mesmo ambiente.

Por outro lado, os tipos Luxurians e Diploperene já parcialmente isolados do milho, temporalmente, em consequência da maior sensibilidade ao fotoperíodo, não foram submetidos à pressão de seleção para o desenvolvimento de mecanismos genéticos gametofíticos de isolamento.

Desse experimento conclue-se que existem mecanismos genéticos que, produzindo barreiras mecânicas ou químicas, i-

Figura 10. Espiguetas de plantas híbridas resultantes do cruzamento de milho recebendo pólen de teosinte na linha inferior. Na parte superior são mostradas as espigas de milho e teosinte, cujo cruzamento produziu, na parte central, uma espiga não granada apenas na metade apical.



nibem o desenvolvimento do tubo polínico, promovendo o isolamento pré-zigótico, tanto em milho, espécie domesticada, como em teosinte, espécie selvagem, que vivem simpatricamente. A maior velocidade de desenvolvimento do tubo polínico em estilo-estigma da mesma espécie, presente em milho e provavelmente também em teosinte, parece ser uma componente importante do mecanismo genético de isolamento.

Numa análise preliminar para confirmar os cruzamentos de teosinte com milho obtidos em espigas de milho, nos experimentos de mistura de pólen observou-se um fato pouco comum. Algumas sementes lisas consideradas sementes F₁ que, portanto, deveriam produzir plantas F₁, com as espigas características (figura 10), ao contrário, produziram plantas de milho, semelhantes à da variedade Pajimaca. Essas plantas, autofecundadas, confirmaram o prognóstico e produziram sementes enrugadas sugerindo a possibilidade de ocorrência de heterofertilização. A partir dessas observações foram realizados experimentos para confirmar a ocorrência e determinar a frequência de heterofertilização, tanto em sementes lisas, como em sementes enrugadas.

4.3. A heterofertilização e o isolamento genético de milho e teosinte

A frequência de heterofertilização em sementes lisas, isto é, proporção de sementes com embrião de milho e en-

dosperma resultante da fusão do núcleo espermático de teosinte com núcleos polares de milho, e frequência de heterofertilização em sementes enrugadas, com embrião Fi, são mostradas na tabela 14. Fica claro, em todas as misturas de pólen de milho com teosinte, que existe uma direta associação negativa entre número de sementes analisadas e porcentagem de heterofertilização, que chega a atingir valores de 88,5%, quando apenas sementes lisas são consideradas. As porcentagens registradas nas sementes enrugadas ficam dentro do intervalo citado em estudos recentes de Robertson (1984). Nas sementes lisas é bem alta a frequência de heterofertilização, e ocorre em limites superiores aos revelados por Sprague (1929,1932). Por outro lado deve-se resaltar que provavelmente esteja ocorrendo em baixa frequência, heterofertilização envolvendo núcleos espermáticos de diferentes tubos polínicos de grãos de pólen de milho. Porém, devido a técnica do gene marcador utilizada em nosso trabalho, não pudemos identificar ou quantificar a ocorrência de tal fenômeno.

Ficou evidente em demonstração anterior que o pólen dos vários tipos de teosintes apresentam um claro retardamento no desenvolvimento do tubo polínico, em relação ao pólen de milho, em estilo-estigma de milho. Esse efeito decorre possivelmente de interações físicas e químicas que ocorrem no tecido. Se considerarmos como hipótese, já sugerida por Heslop-Harrison et alii (1985), que apenas um tubo polínico penetra no ovário, mesmo havendo uma pequena oferta de tubos de teosinte na região da micrópila do ovário de milho, em decorrência da inibição de tubos ao longo do estilo-estigma, um baixo número de sementes lisas deveria ocorrer, bem como uma taxa de heterofertilização oscilando entre 0 e 3%. Como, en-

Tabela 14. Total do número de sementes analisadas e frequência de heterofertilização do tipo I (total de embrião de milho com endosperma liso), tipo II (total de embrião F₁ com endosperma enrugado), tipo III (total de endosperma liso com embrião de milho) e tipo IV (total de endosperma enrugado com embrião F₁) em Experimentos de mistura de pólen de milho Pajimaca e El Batan, Pajimaca e Los Reyes, Pajimaca e Luxurians e Pajimaca e Diploperene, em estilo-estigmas de Pajimaca, em dois anos consecutivos.

Tipo	Ano	El Batan		Los Reyes		Luxurians		Diploperene	
		sem.*	freq.*	sem.	freq.	sem.	freq.	sem.	freq.
I	1º	95	0,1675	36	0,1653	66	0,1519	02	0,5000
	2º	92	0,2392	42	0,0472	66	0,8186	-	-
II	1º	1186	0,0143	1211	0,0141	1235	0,0073	1298	0,0054
	2º	1098	0,0155	1196	0,0041	1073	0,0018	-	-
III	1º	96	0,1764	50	0,4000	65	0,1382	08	0,8853
	2º	87	0,1956	45	0,1102	14	0,1393	-	-
IV	1º	1185	0,0134	1397	0,0042	1237	0,0032	1292	0,0007
	2º	1103	0,0199	1193	0,0017	1125	0,0480	-	-

* sem. = semente

* freq. = frequência

tretanto, porcentagens baixas de heterofertilização não ocorreram em sementes lisas, mas ao contrário altas, oscilando entre 4,7 e 88,5%, fomos obrigados a concluir, que outros tubos polínicos, no caso de milho, também penetraram no saco embrionário e competiram, ai dentro, com vantagem, com os núcleos de teosinte. Se os efeitos físicos e/ou químicos que ocorrem dentro do ovário de milho, são os mesmos encontrados dentro dos estilo-estigmas, a maior velocidade do tubo polínico de milho deve ser, aqui também, considerada a principal componente que define o maior sucesso da competição de grãos de pólen de milho em relação ao teosinte dentro do saco embrionário de milho. A menor capacidade de competição do pólen de teosinte com milho, em espigas do último, que já é reduzi-díssima, tem na heterofertilização um mecanismo adicional para promover o isolamento genético dessas espécies simpátri-cas.

Como relataram Heslop-Harrison et alii (1985) existe um encaminhamento mecânico em certos setores do tubo polínico no estilo-estigma, porém não existem evidências para esse fato nas vizinhanças da micrópila. Nesse caso, disseram os autores, os fatores quimiotrópicos ali presentes devem ser os responsáveis pelo encaminhamento final do crescimento do tubo polínico. Esses fatores quimiotrópicos, segundo eles, seriam originários de células próximas da micrópila, provavelmente das sinérgides. O aparato filiforme dessas células tem características de células de transferência de parede, sugerindo uma função secretora em algum estágio do desenvolvimento.

Embora não tenhamos, em nosso trabalho, condições de identificar a natureza da competição dentro do ovário pode-

mos, sem dúvida, pelo menos como hipótese acatar essa idéia de Heslop-Harrison (1985) e sugerir que ela deve ser a causa da heterofertilização, atuando nesse caso como um mecanismo de proteção, impedindo a hibridação introgressiva de teosinte em milho, a nível de saco embrionário.

Conclusão

Nesse trabalho procurou-se evidenciar relações de alopatridia entre milho e 4 tipos de teosintes, bem como identificar mecanismos genéticos que condicionam o isolamento da forma cultivada, da forma selvagem.

Dos estudos de fotosensibilidade pode-se concluir que o milho, *Zea mays mays* e os teosintes anuais mexicanos simpátricos ao milho, El Batan e Chalco Los Reyes, ambos representantes de *Zea mays mexicana*, todos da Secção Zea, tem respostas semelhantes ao fotoperíodo. Por sua vez, diferem amplamente dos teosintes da Secção Luxuriantes, *Luxurians* e *Diploperene*, respectivamente, representantes de *Zea luxurians* e *Zea diploperennis*. A presença de genes distintos nas duas Secções, determina um comportamento diferente nos dois grupos, com relação ao potencial genético para indução do florescimento. Isso parece constituir-se em mecanismo de isolamento genético temporal do milho e seus parentes selvagens mais distantes. O desenvolvimento de mecanismos de isolamento são importantes para a sobrevivência do ancestral selvagem, uma vez que o fluxo gênico da espécie domesticada produz tipos que são facilmente extintos na natureza. Fica claro que a domesticação, também aqui, tornou a espécie cultivada mais precoce e insensível ao fotoperíodo.

Dos estudos de competição de grão de pólen conclui-se que o pólen de milho leva nítida vantagem sobre pólen

de qualquer teosinte, quer os mais próximos, da Seccção Zea, quer os mais distantes da Seccção Luxuriantes, quando ambos são postos a germinar em estilo-estigmas de milho. Essa ampla vantagem é dada pela maior velocidade de germinação e desenvolvimento do tubo polínico e pela maior distância que o tubo de milho pode atingir em estilo-estigma de milho. Esse comportamento superior possivelmente decorre de interações químicas favoráveis que ocorrem entre o produto dos tubos e o produto das células do tecido estilar. Em consequência disso ocorre um efetivo isolamento reprodutivo do milho, impedindo dessa maneira uma forte hibridação introgressiva de teosinte em milho. A própria domesticação deve ter desenvolvido esses mecanismos, uma vez que a seleção para tipos mais produtivos acarretou um aumento notável no tamanho das espigas e consequentemente no comprimento dos estilo-estigmas. Como a polinização é feita pelo vento, o pólen de teosinte simpátrico competitivo reduziria a produção de alimentos por planta na geração seguinte, e com certeza, as plantas assim inferiores seriam descartadas. A iniciativa contínua de seleção para tipos mais produtivos, feita pelo homem, deve ter selecionado os mecanismos aqui detectados, visando a manutenção da produção de grãos nas populações locais melhoradas.

Quando pólen de milho e pólen de teosinte são postos a germinar em estilo-estigmas de teosinte, tres padrões foram observados. Os teosintes anuais mexicanos, El Batan e Los Reyes, mostraram uma forte inibição do tipo gametofítico ao pólen de milho. O teosinte anual da Guatemala, Luxurians, mostrou uma inibição mais atenuada e finalmente o teosinte perene diplóide, Diploperene, não revelou qualquer inibição ao pólen de milho, que pelo contrário, foi mais vantajoso que

o próprio pólen da espécie. O fato dos teosintes mais próximos do milho, que vivem simpatricamente, terem ainda o mesmo tipo de resposta ao fotoperíodo, portanto, tornando possível o florescimento simultâneo e conseqüentemente o fluxo gênico entre os dois grupos, associado a inviabilidade dos híbridos F₁, aliados aos riscos de extinção das espécies selvagens, deve ter levado a seleção natural a desenvolver mecanismos genéticos de isolamento pré-zigótico, que permitem o reconhecimento e imediata inibição do tubo polínico da espécie domesticada, como aqui foi mostrado. Por outro lado a existência de mecanismo de isolamento temporal na Seccção Luxuriantes já é aparentemente suficiente para o não desenvolvimento de mecanismos de inibição gametofítica. Com isso cria-se um aparente paradoxo onde as espécies selvagens mais distantes aceitam com mais facilidade os gametas da espécie domesticada, do que os gametas das espécies selvagens simpátricas.

Além da inibição gametofítica de tubos polínicos de teosinte, ao longo do estilo-estigma de milho, do local de germinação do esporo até a micrópila, colheram-se nesse trabalho evidências que essa inibição continua a se manifestar dentro do saco embrionário. Isso foi possível de se detectar através do fenômeno da heterofertilização que aqui ocorreu com frequências bem maiores que as até então relatadas. O núcleo de teosinte parece também ser menos competitivo que o núcleo de milho no interior do ovário. Tres coisas ao nosso ver podem ter ocorrido para a expressão dessa competição dentro do gametófito feminino. São elas, a própria inibição dos tubos polínicos de teosinte nos estilo-estigmas de milho, a ponto de reduzir sensivelmente a frequência de núcleos de teosinte próximo da micrópila. Segundo, após a entrada rara

do tubo polínico de teosinte pela micrópila, deve ocorrer a falha de um sinal, ou ainda, ocorrer algum sinal que permite autorizar a entrada de outros tubos polínicos de milho que, pela inibição estilar de tubos de teosinte, devem estar na entrada do ovário em frequência máxima. Terceiro, já dentro do ovário, enquanto um dos núcleos de teosinte se funde, quer com os núcleos polares, quer com o óvulo, o outro é inibido e perde a competição com um dos núcleos de milho que foi deixado entrar dentro do saco embrionário. Em decorrência disso surge uma alta taxa de heterofertilização. Com isso explica-se esse fenômeno não entendido pelos pesquisadores até agora. Essa inibição pode até ocorrer de maneira diferente de uma antibiose. Poderia surgir da secreção de quimiotrópicos, de células que atuam dentro do ovário, que nesse caso não seriam identificadas pelo pólen de teosinte e conseqüentemente desorientaria a rota normal do tubo polínico, objetivando a fusão nuclear. Em conseqüência dessa desordem, oportunisticamente, os núcleos de milho, em alta oferta nas proximidades do ovário, seriam deixados entrar no saco embrionário e causariam a heterofertilização.

Aparentemente a inibição dentro do ovário é uma extensão do que já se manifesta nos estilo-estigmas, constituindo-se numa efetiva barreira genética para impedir o fluxo gênico entre a espécie domesticada, o milho, e o ancestral selvagem simpátrico, o teosinte.

SUMÁRIO

O presente estudo foi realizado na Área Experimental do Laboratório de Génética de Milho da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), latitude 22°54' S. Foram realizados experimentos de campo para estudar a resposta de milho e teosinte ao fotoperíodo, bem como experimentos de competição de grão de pólen, como mecanismo de isolamento dos dois taxa na natureza. Foram utilizadas 4 populações de teosinte, *Zea mays mexicana*, raças El Batán e Los Reyes; *Zea diploperennis* e *Zea luxurians* e ainda um cultivar de milho, Pajimaca, representando a espécie cultivada *Zea mays mays*.

Do estudo de fotosensibilidade conclui-se que o milho e os teosintes anuais mexicanos El Batán e Los Reyes, da Secção Zea, tem respostas semelhantes quanto ao fotoperíodo. Por sua vez, diferem completamente dos teosintes Luxurians e Diploperene, da Secção Luxuriantes. Isso parece constituir-se em mecanismo de isolamento genético temporal do milho e seus parentes selvagens mais distantes. Tais mecanismos são importantes para a sobrevivência do ancestral selvagem, uma vez que o fluxo gênico da espécie domesticada produz tipos que são facilmente extintos na natureza.

As informações obtidas ds estudos de competição de grão de pólen, sugerem a existência de barreiras genéticas bem definidas entre os dois taxa que vegetam simpatricamente, colocando dúvidas sobre a existência de um fluxo gênico vigoroso entre as duas espécies.

SUMMARY

This research was carried out at the Experimental Area of the Maize Genetic Laboratory of the State University of Campinas (UNICAMP), latitude 22°54' S. Field experiments were done in order to study the response of maize and teosinte to photoperiod, and to investigate competition of pollen grains of the two taxa, as possible mechanisms of isolation of the two groups in nature.

Four populations of teosinte were studied. El Batán and Los Reyes as *Zea mays mexicana* and Diploperene and Luxurians as *Zea diploperennis* and *Zea luxurians* respectively. The cultivar Pajimaca was used, as representative of the cultivated species *Zea mays mays*.

From the photosensitivity study it was concluded that maize and annual Mexican teosintes, El Batán and Los Reyes, of Section *Zea* have similar response to photoperiod. However, they differ entirely from teosintes Luxurians and Diploperene, of the Section *Luxuriantes*. This seems a mechanism of temporal genetic isolation of maize and its most distant wild relatives. Such mechanism is important to the survival of the wild ancestor as gene flow from the domesticated species to the wild species, yields hybrids that may easily be extinct in nature.

The informations from pollen grains competition study suggested that exist a well defined genetics barriers between the two taxa living simpatrically, what makes one to doubts whether there really be a vigorous gene flow between the two species, as belived.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abasi, L., et alii 1985. Comparison of heat units and calendar days for predicting silking dates in maize in a tropical rain-forest location. *Maydica* XXX: 15-30.
- Aguirre Gonzales, C.D. e Kato Y., T.A. 1979. Competencia entre el polen de maiz y de teocintle durante la fecundacion. *Agrocien- cia* 109-121.
- Allison, J.C.S. e Daynard, T.B. 1979. Effect of change in time of flowering, induced by altering photoperiod or temperature, on attributes related to yield in maize. *Crop Science* 19: 1-4.
- Banerjee, U.C. e Barghoorn 1971. Factors controlling pollen grain size in maize. *Maize Genetic Cooperation. News Letter* 45: 244-245.
- Beadle, G.W. 1980. El origen del maiz. *Scientific American* 242: 96-103.
- Beckett, J.B. 1978. B-A translocations in maize. *The Journal of He- redity* 69: 27-36.
- Bianchi, A. 1957. Gametophyte factors in maize-teosinte derivatives. *Genetics* 42: 360-361.

Bird, R.M. 1982. Maize and teosinte germoplans banks. Maize for biological Research ed. por Plant Mol. Biology Association.

Bonaparte, E.E.N.A. 1975. The effects of temperature, day lenght, soil fertility and soil moisture on leaf number and duration to tassel emergence in *Zea mays* L. *Annals of Botany* 39: 853-861.

Chughthai, S. 1985. Knob heterochromatin in relation to origin and evolution of maize. Seminário apresentado no curso de "Plant Biology" em Urbana, Illinois. 20 pgs.

Cohen, J.I. e Galinat, W.C. 1984. Potential use of alien germoplasm for maize improvement. *Crop Science* 24: 1011-1015.

De Wet, J.M.J. et alii 1971. Origin and evolution of teosinte (*Zea mexicana* (Schrad.) Kuntze). *Euphytica* 20: 255-265.

De Wett, J.M.J. e Harlan, J.R. 1972. Origin of maize: the tripartite hypothesis. *Euphytica* 21: 271-279.

De Wet, J.M.J. at alii 1978. The origin of tripsacoid maize. *Evolution* 32 (2).

Dhaliwal, S. e King, P.J. 1978. Direct pollination of *Zea mays* in vitro with *Z. mays*, *Z. mexicana* and *Sorghum bicolor* pollen. *Theoretical and Applied Genetics* 53: 43-46.

- Dennis, E.S. e Peacock, W.J. 1984. Knob heterochromatin homology in maize and its relatives. *Journal of Molecular Evolution* 20: 341-50.
- Doebley, J.F. e Iltis, H.H. 1980. Taxonomy of *Zea* (Gramineae). I. A subgeneric classification with key to taxa. *American Journal of Botany* 67: 982-993.
- Doebley, J.F. 1983. The maize and teosinte male inflorescence: a numerical taxonomic study. *Annals Missouri Botanical Garden* 70: 32-70.
- 1984. Maize introgression into teosinte - a reappraisal. *Annals Missouri Botanical Garden* 71: 1100-1113.
- Doebley, J.F. et alii 1984. Isoenzymatic variation in *Zea* (Gramineae) *Systematic Botany* 9: 203-218.
- Emerson, R.A. 1924. Control of flowering in teosinte. *The Journal of Heredity* 15: 41-48.
- Ferrari, T.E. e Wallace, D.H. 1977. A model for self-recognition and regulation of the incompatibility response of pollen. *Theoretical and Applied Genetics* 50: 211-225.
- Frankel, R. e Galun, E. 1977. *Pollination mechanisms reproduction and plant breeding*. Springer-Verlag.

Fukui, H.N. et alii 1958. Growth substances in corn pollen. *Plant Physiology* 33: 144-146.

Galinat, W.C. 1961 b. Corn's evolution and its significance for breeding. *Economic Botany* 15: 320-325.

----- 1970. The cupule and its role in the origin and evolution of maize. *Agricultural Experiment Station/Univ. of Massachusetts/Amherst Bulletin* n° 585.

----- 1971. The origin of maize. *Annual Review of Genetics* 5: 447-478.

----- 1974. Intergenomic mapping of maize, teosinte and tripsac-
cun. *Evolution*, 27: 644-655.

----- 1975. The evolutionary emergence of maize. *Bulletin of Torrey Botanical Club* 102: 313-324.

----- 1977. The origin of corn. In *Corn and Corn Improvement* (G. F. Sprague, ed.). American Society of Agronomy Inc. Madison, Wisconsin USA.

----- 1978. The inheritance of some traits essential to maize and teosinte. Offprint from: *Maize Breeding and Genetics* (Ed) D.B. Walden.

----- 1979. Small pollen in modern teosinte as a secondary adaptation for self-fertilization. Maize Genetic Cooperation News Letter 53: 98-99.

----- 1980. Preliminary studies of maize vs. teosinte pollen tube competition in short styles. Maize Genetic Cooperation News Letter 54: 120-121.

Galinat, W.C. et alii 1981. The small pollen of teosinte is coadaptive with the more slender, thin-walled styles of teosinte. Maize Genetic Cooperation News Letter 55: 110-111.

Galinat, W.C. e Pasupuleti, .V. 1982 b. *Zea diploperennis* : II. A review of its significance and potential value for maize improvement. Maydica XXVII: 213-220.

Gil, M.C. 1970. Frequencies of maize by teosinte crosses in a simulation of a natural association. Maize Genetic Cooperation News Letter 44: 21-24.

Goodman, M.M. et alii 1983. Races of teosinte show differential crossability with maize when maize is used as the female parent. Maize Genetic Cooperation News Letter 57: 130-131.

Gorla, M.S. et alii 1975. Genetic Variability of gametophyte growth rate in maize. Theoretical and Applied Genetics 46: 289-294.

- Gorla, M.S. et alii 1976. Competitive ability of maize pollen. Interaction between genotypes of pollen and stylar tissues. *Maydica* XXI: 77-80.
- Gorla, M.S. e Rovida, E. 1980. Competitive ability of maize pollen. Intergametophytic effects. *Theoretical and Applied Genetics* 57: 37-41.
- Goss, J.A. 1968. Development, physiology and biochemistry of corn and wheat pollen. *The Botanical Review* 34: 333-341.
- Hake, S. e Walbot, V. 1980. The genome of *Zea mays*. its organization and homology to related grasses. *Chromosoma* 79: 251-270.
- Harris, R.E. et alii 1976. Control and inheritance of prolificacy in maize. *Crop Science* 16: 843-850.
- Hehl, R. et alii 1985. DNA sequence homology among members of the *Cin 1* repetitive DNA family in maize and teosinte *Maydica* XXX: 199-207.
- HeslopHarrison, Y. et alii 1984 a. The pollen stigma interaction in the grasses. 5. Tissue organization and cytochemistry of stigma ("silk") of *Zea mays* L. *Acta Botanica Neerlandica* 33: 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 Botanica Neerlandia* 33: 205-227.

----- 1985. The pollen stigma interaction in the grasses. 7.
Pollen tube guidance and the regulation of tube number in *Zea*
mays L. *Acta Botanica Neerlandia* 34: 193-211.

Hofmeyr, J.D.J. 1961. The effect of silk length on pollen tube com-
petition in *Zea mays* L. *Maize Cooperation News Letter* 35: 118.

Holmes, R.M. e Robertson, G.W. 1959. Heat units and crop growth.
Canada Department of Agriculture, Publication 1042.

Iltis, H.H. et alii 1979. *Zea diploperennis* (Gramineae): A new teo-
sinte from México. *Science* 203 n° 4376: 186-188.

Iltis, H.H. 1983 - From teosinte to maize: The catastrophic sexual
transmutation. *Science* 222: 886-894.

Jones, D.M. e Newell, L.C. 1948. Longevity of pollen and stigmas of
grasses: Buffalo grass, *Buchloe dactyloides* (Nutt.) Engelm.,
and corn, *Zea mays* L. *Journal of the American Society of Agro-*
nomy 40: 195-204.

Kato, Y., T.A. 1975. Cytological studies of maize (*Zea mays* L.) and teosinte (*Zea mexicana*, Schrader Kuntze) in relation to their origin and evolution. Research Bulletin Number 635 published by The Mass. Agricultural Experimental Station.

Kato, Y., T.A. e Vargas, M.A.O. 1986. Photosynthetic pigments in maize and teosinte. Maize Genetic Cooperation News Letter 60: 37.

Kiniry, J.R. et alii 1983. The photoperiod sensitive interval in maize. Agronomy Journal 75: 687-690.

Kahler, A.L. et alii 1984. Nohradom Mating in Experimental Populations of Maize. Crop Science vol. 24.

Kroh, M. et alii 1979. Ultraestructural studies on styles and pollen tubes of *Zea mays* L. General survey on pollen tube growth in vivo. Acta Botanica Neerlandica 28: 513-518.

Kumar D. e Sarkar, K.R. 1975. pollen tube growth in vitro and in vivo. Maize Genetic Cooperation News Letter 49: 53.

----- 1980. Correlation between pollen diameter & rate of pollen tube growth in maize (*Zea mays* L.). Indian Journal of Experimental Biology 18: 1242-1244.

----- 1983. Factors affecting pollen grain diameter in maize. Indian Journal Genetics 43: 156-159.

1985. Inheritance of maize (*Zea mays* L.) pollen tube growth in vitro. *Indian Journal of Experimental Biology* 23: 110-111.

Landi, P. e Sanguinetti, 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* XXX: 421-426.

Langham, D.G. 1940. The inheritance of intergeneric differences in *Zea-Euchlaena* hybrids. *Genetics* 25: 88-107.

MacNeish, R.S. 1985. The archaeological record on the problem of domestication of corn. *Maydica* XXX: 171-178.

Magoja, J.L. et alii 1985. Evolution of *Zea*. *Maize Genetic Cooperation News Letter* 59: 61-67.

Magoja, L.M. e Pischedda, G. 1986. Introgression of teosinte germoplasm in maize: a method to improve heterosis and variability. *Maize Genetic Cooperation News Letter* 60: 82-83.

Mangelsdorf, P.C. 1961. Introgression in maize. *Euphytica* 10: 157-168.

Mangelsdorf, P.C. et alii 1978. Fossil pollen and the origin of corn. *Botanical Museum Leaflets* 26: 237-255.

- Mangelsdorf, P.C. 1984. The origin of maize. *Science* 225: 1093-1094.
- Mangelsdorf, P.C. 1986. The origin of corn. *Scientific American* 255: 72-78.
- Mastebroek, I. et alii 1981. Seed protein and seedling isozyme patterns of *Zea mays* and its closest relatives *Biochemical Systematics and Ecology* 9: 179-183.
- Mederski, H.J. et alii 1973. Accumulated heat units for classifying corn hybrid maturity. *Agronomy Journal* 65: 43-747.
- Melhus, I.E. e Ahrens, J.F. 1959. The effect of photoperiod on the growth and development of teosinte (*Euchlaena mexicana* Schrad). *CEIBA* 8: 1-17.
- Moss, I.G. e Heslop-Harrison, J. 1968. Photoperiod and pollen sterility in maize. *Annals of Botany* 32: 833-846.
- Nelson, O.E. 1981. A reexamination of the aberrant ratio phenomenon in maize. *Maydica* XXVI: 119-131.
- Ometto, J.C. 1981. *Bioclimatologia Vegetal*, pag. 290. Ed. Agronomica Ceres Ltda.

Pandey, K.K. 1977. Mentor pollen: possible of wall-held pollen growth promoting substances in overcoming intra and interespecific incompatibility. *Genetica* 47: 219-229.

Paterniani, E. 1963. Evidence of heterofertilization in maize. *Maize Genetic Cooperation News Letter* 37: 143-144.

Paterniani, E. 1983. Evolução do milho e implicações no melhoramento. *Tópicos de citogenética e evolução de plantas*. Piracicaba, Janeiro, 1984.

Peterson, P.A. 1976. Gene repression and the evolution of unisexuality in maize spikelet. *Maydica* XXI: 157-164.

Peterson, D.F. 1942. Duration of receptiveness in corn silks. *Journal of The American Society of Agronomy* pp 369-371.

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* 57: 513-531.

Pfahler, P.L. e Linskens, H.F. 1970. Biochemical composition of maize (*Zea mays* L.) pollen. I. Effects of the endosperm mutants, Waxy (wx), Shrunken (sh) and Sugary (su) on the amino acid content and fatty acid distribution. Theoretical and Applied Genetics 40: 6-10.

----- 1971. Biochemical composition of maize (*Zea mays* L.) pollen. II. Effects of the endosperm mutantes, Waxy (wx) Shrunken (sh) and Sugary (su) on the carbohydrate and lipid percentage. Theoretical and Applied Genetics 41: 2-4.

----- 1972. In vitro germination and pollen tube growth of maize (*Zea mays* L.) pollen. VI. Combined effects of storage and the alleles at the Waxy (wx), Sugary (su) and Shrunken (sh) loci. Theoretical and Applied Genetics 42: 136-140.

Randolph, L.F. 1976. Contributions of wild relatives of to the evolutionary history of domesticated maize: A synthesis of divergent hypotheses I. Economic Botany 30: 321-345.

Raynor, G.S. et alii 1972. Dispersion and deposition of corn pollen from experimental sources. Agronomy Journal 64: 420-427.

Robertson, D.S. 1984. A study of heterofertilization in diverse lines of maize. The Journal of Heredity 75: 457-462.

Rogers, J.S. 1950. The inheritance of photoperiodic response to tillering in maize teosinte hybrids. *Genetics* 35: 513-539.

Rood, B.S. e Major D.J. 1980. Responses of early corn inbreds to photoperiod. *Crop Science* 20: 679-682.

----- 1981. Inheritance of tillering and flowering-time in early maturing maize. *Euphytica* 30: 327-334.

Russel, W.K. e Stuber, C.W. 1983 a. Effects of photoperiod and temperatures on the duration of vegetative growth in maize. *Crop Science* 23: 847-850.

----- 1983 b. Inheritance of photosensitivity in maize. *Crop Science* 23 (5): 935-939.

----- 1984. Prediction of tassel initiation in corn. *Crop Science* 24: 507-510.

Sarkar, K.R. e Coe, Jr E.H. 1971. Analysis of events leading to heterofertilization in maize. *Journal of Heredity* 62: 118-

Shmaraev & Podolskaia 1981. Hybridization of maize with teosinte. *Vestnik Sel'skokhzyaistvennoi Nauki* 5: 46-52; Leningrado, USSR.

Smith, J.S.C. et alii 1985. Relationships between maize and teosinte of Mexico and Guatemala: Numerical analysis of allozyme data. *Economic Botany* 39: 12-24.

Sprague, G.F. 1929. Hetero-Fertilization in maize. *Science* 69: 526-527.

----- 1932. The nature and extension of hetero-fertilization in maize. *Genetics* 17: 358-368.

Ter-Avanesian, D.V. 1978. The effect of varying the number of pollen grains used in fertilization. *Theoretical and Applied Genetics* 52: 77-79.

Timothy, D.H. et alii 1979. Organelle DNA variation and systematic relationship in the genus *Zea*: Teosinte. *Proceeding of National Academy of Science, USA*. 76: 4220-4224.

Tollenaar, M. et alii 1979. Effect of temperature on rate of leaf appearance and flowering date in maize. *Crop Science* 19: 363-366.

Válio, I.F.M. 1979. *Reprodução em plantas superiores. Fisiologia Vegetal 2*. Mário G. Ferri, EPU.

Villa Nova, N.A. et alii 1972. Estimativa de Graus Dia acumulados acima de qualquer temperatura base, em função das temperaturas máxima e mínima. Caderno de Ciências da Terra, USP, Instituto de Geografia.

Warrington, I.J. e Kanemasu, E.T. 1983. Corn growth response to temperature and photoperiod I. Seedling emergence, tassel initiation, and anthesis. Agronomy Journal 75: 749-754.

Wellhausen, E.T. et alii, 1951. Razas de Maiz En Mexico. Oficina de Estudios Especiales. Secretaria de Agricultura Y Ganaderia. México, D.F.

Wellhausen, E.T. et alii 1958. Razas de Maiz En La America Central. Oficina de Estudios Especiales. Secretaria de Agricultura Y Ganaderia. México, D.F.

Milkes, H.G. 1967. Teosinte: The closest relative of maize. The Bussey Institution of Harvard University, Cambridge, Mass. iv + 159p.

----- 1977. Hybridization of maize and teosinte, in Mexico and Guatemala and the improvement of maize. Economic Botany 31: 254-293.

Wilson, D.R. e Larkins, B.A. 1984. Zein gene organization in maize and related grasses. Journal of Molecular Evolution 20: 330-340.