

BC/24488
IB/80756



**ALTERAÇÕES NAS FREQUÊNCIAS DE DIFERENTES
MUTANTES DE ENDOSPERMA EM POPULAÇÕES DE MILHO**

MARIA ELISA QUISSAK PEREIRA MARTINS

Orientador: PROF. DR. WILLIAM JOSÉ DA SILVA

3 exemplar corresponde à redação final
tese defendida pelo (a) candidato (a)
<i>Maria Elisa Quissak</i>
<i>Martins</i>
provada pela Comissão Julgadora.

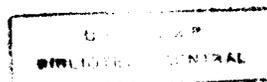
30/03/95

Tese apresentada ao Departamento de Genética e Evolução do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas para a obtenção do grau de Doutor na área de Genética Vegetal

Campinas, 1995

T/UNICAMP

M366_a



FICHA CATALOGRAFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA CENTRAL - UNICAMP

Martins, Maria Elisa Quissak Pereira

M366a Alteracoes nas frequencias de diferentes mutantes de endosperma em populacoes de milho / Maria Elisa Quissak Pereira Martins. - - Campinas, SP : [s.n.], 1995.

Orientador: William Jose da Silva.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia.

1. Milho. 2. Mutantes de endosperma. 3. Selecao natural.
4. Milho doce. 5. Milho opaco. 6. Milho ceroso. 7. Frequencia dos genes. I. Silva, William Jose da. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Titulo.

Ofereço este trabalho

a minha mãe, Aglaé,
que me deu condições para chegar até aqui
e com quem tive minhas primeiras
discussões sobre Biologia.

a meu marido, Francisco,
que sempre me apoiou.

a meus filhos, Patrícia e Luís Maurício,
pelo que são.

AGRADECIMENTOS

- Ao Prof. William José da Silva, pela orientação segura e sempre presente e por me ter propiciado a oportunidade de empreender outra etapa em minha vida profissional.
- Aos professores que fizeram a análise prévia deste trabalho, Prof. Paulo Soderó Martins, Prof. George John Shepherd e Prof. Louis Bernard Klaczko pelas sugestões valiosas e pela participação na Banca Avaliadora.
- À Profa. Catalina Romero Lopes, pela participação na Banca Avaliadora.
- Ao Dr. Osvaldo Paradela Filho, pela orientação e assistência nos trabalhos de laboratório.
- À Profa. Laudemir Maria Prioli, pelo apoio e pela permissão do uso dos equipamentos do Laboratório de Genética de Milho.
- À bióloga Fátima Sílvia Mendonça Ribeiro, por me ter iniciado nos segredos do milho no campo, pela ajuda nos trabalhos de campo e de laboratório e pela antiga amizade.
- À bióloga Rachel Carvalho Branquinho, pelo companheirismo e amizade e pelo apoio contínuo.
- À bióloga Patrícia Ramos Ferreira, pela ajuda nos trabalhos de campo e de laboratório e pela grande amizade.
- Aos biólogos Elizabeth Ribas Bilo e Olivete Bonfim, pelo preparo dos meios de cultura e pela amizade.
- Ao Sr Bento Libânio, cujo grande conhecimento sobre o milho e assistência contínua nos trabalhos de campo facilitou

grandemente este trabalho.

- A Dona Aparecida Libânio, pela amizade e pela contribuição nos trabalhos de campo.

- Aos estagiários Marcelo Puccetti, Marta Regina Ricoy Leite e Aparecida Donisete de Faria, pela ajuda nos trabalhos de campo e de laboratório.

- À Profa. Vera Nizaka Solferini, pelo apoio e amizade.

- A Dona Geraldina Pereira Bonfim, cujo otimismo e bom humor são um estímulo constante para todos do Barracão da Genética.

- Aos demais amigos do Barracão, pela amizade.

ÍNDICE

	P9
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVO	4
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
3.1. ESTUDOS SOBRE A OCORRÊNCIA DA SELEÇÃO NATURAL ...	5
3.2. COMPONENTES DE SELEÇÃO NO CICLO VITAL	9
3.3. SELEÇÃO NATURAL EM POPULAÇÕES VEGETAIS	10
3.4. O SISTEMA DE REPRODUÇÃO EM POPULAÇÕES VEGETAIS ..	14
3.5. SELEÇÃO GAMETOFÍTICA	19
3.6. OS MUTANTES DE ENDOSPERMA EM MILHO	22
4. MATERIAL E MÉTODOS	30
4.1. GERMOPLASMA	30
4.2. METODOLOGIA	31
4.2a. Estimativa das frequências gênicas e genotípicas nas populações	31
4.2b. Autofecundações para identificação dos genótipos das plantas nos campos isolados	42
4.2c. Estimativa da taxa de cruzamento nas populações.	43
4.2d. Estudo do efeito do endosperma normal ou mutante sobre características da planta	46
4.2d.1. Ensaio de competição de genótipos entre parcelas ..	46
4.2d.2. Ensaio de competição de genótipos dentro da parcela	49

4.2e. Taxas de germinação e de infestação de sementes por fungos avaliadas em experimentos de laboratório	52
4.2e.1. Ensaio com sementes F3	54
4.2e.2. Ensaio com sementes F4	54
4.2e.3. Ensaio com sementes produzidas no ensaio de campo com competição	55
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
5.1. TAXA DE CRUZAMENTO NAS POPULAÇÕES	58
5.2. ESTUDO DAS POPULAÇÕES NAS GERAÇÕES SUCESSIVAS COMPREENDIDAS ENTRE SEMENTES F2 E SEMENTES F7	68
5.2a. Frequências gênicas e genotípicas nas populações	79
5.2a.1. Tendências das frequências genotípicas na população o2	89
5.2a.2. Tendências das frequências genotípicas na população sh2	94
5.2a.3. Tendências das frequências genotípicas na população su	99
5.2a.4. Tendências das frequências genotípicas na população wx	103
5.3. FATORES QUE PODEM INFLUENCIAR AS FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS NAS POPULAÇÕES	107
5.3a. Segregação de sementes de endosperma normal e mutante em espigas de plantas heterozigotas autofecundadas	107

5.3a.1. Segregação em espigas de plantas O2o2	112
5.3a.2. Segregação em espigas de plantas Sh2sh2	116
5.3a.3. Segregação em espigas de plantas Susu	116
5.3a.4. Segregação em espigas de plantas Wxwx	119
5.3b. Características das plantas avaliadas em ensaios de campo	125
5.3b.1. Ensaio de competição entre parcelas	125
5.3b.2. Ensaio de competição dentro de parcelas	129
5.3c. Taxas de germinação e infestação por fungos nas sementes, estimadas em testes de laboratório	133
5.3c.1. Análises de correlação entre características estudadas nos testes de laboratório	174
5.4. ANÁLISE COMPARATIVA DO COMPORTAMENTO DOS QUATRO MUTANTES FRENTE À SELEÇÃO NATURAL	184
5.5. O EQUILÍBRIO DE HARDY-WEINBERG E DE WRIGHT NAS POPULAÇÕES	186
6. CONCLUSÕES	189
7. RESUMO/SUMMARY	191
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	197

1. INTRODUÇÃO

Apesar da seleção natural ser componente fundamental da teoria da evolução, ela é difícil de ser detectada e mensurada. Sua identificação e quantificação em populações naturais envolvem muitos fatores, não passíveis de controle, o que pode desencorajar a realização de trabalhos científicos nessa área.

Estas restrições, entretanto, podem ser amenizadas quando se estudam espécies de plantas cultivadas, que permitem controlar fatores importantes na dinâmica de populações. Entre as vantagens do uso destas espécies podem ser citadas a possibilidade de manter a densidade populacional constante, a não ocorrência de sobreposição de gerações, a ausência de fluxo gênico e o fato do tamanho da população poder ser controlado de modo a minimizar a deriva genética. Além disso, a possibilidade de se conhecer a estrutura genética inicial da população permite quantificar as alterações que podem ocorrer em uma seqüência de gerações

Entre as espécies cultivadas, o milho, além das vantagens mencionadas, acrescenta outras, resultantes do fato de ser amplamente explorado em grandes faixas de altitude e latitude, cujos efeitos sobre a planta são assim bem conhecidos. Isso ocorre em consequência dele ser uma espécie de grande interesse econômico, já que é uma das mais importantes fontes de alimento para o homem. Estudos acadêmicos utilizando

esse material podem gerar, assim, informações úteis para a melhor exploração econômica da espécie, criando um sistema de retroalimentação bastante interessante no campo da Genética Vegetal.

A planta de milho apresenta as flores masculinas separadas das femininas, o que facilita grandemente a realização de cruzamentos e de autofecundações artificiais, permitindo análises específicas e controles durante o trabalho científico. A anemofilia exclusiva é outro fator favorável, por não requerer do pesquisador conhecimentos sobre comportamento e alterações populacionais de polinizadores, que poderiam influir no sistema de reprodução da espécie estudada.

O milho oferece ainda as vantagens advindas do amplo conhecimento sobre o controle genético de suas características. Particularmente interessantes são os vários mutantes que afetam a morfologia, a fisiologia e a composição química do endosperma, cujos mecanismos de herança têm sido largamente estudados. Como esse tecido apresenta o efeito de xênia, permite a imediata verificação da proporção fenotípica obtida em um ciclo de reprodução, prescindindo do plantio e desenvolvimento dos indivíduos resultantes para a realização de análises genéticas.

Muitos trabalhos têm demonstrado como esses mutantes alteram a textura e o valor nutritivo da semente, o que se reflete em maior sensibilidade ao ataque por fungos e bactérias, maior atração de insetos e em alteração na taxa de

germinação e no vigor das sementes. Pouco se sabe, porém, sobre o comportamento desses mutantes frente à seleção natural.

Os conhecimentos citados, acumulados nesta espécie de grande interesse econômico, estimularam-nos a utilizar mutantes de endosperma como modelo para o estudo da ação da seleção natural em populações de milho especialmente sintetizadas para esse fim.

2. OBJETIVO

O presente trabalho teve por objetivo estudar a ação da seleção natural sobre a frequência de quatro mutantes de endosperma que alteram a morfologia, a fisiologia, a composição química e o valor nutritivo das sementes, em quatro populações de milho, ao longo de cinco gerações sucessivas.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. ESTUDOS SOBRE A OCORRÊNCIA DA SELEÇÃO NATURAL

Segundo a avaliação de Endler (1986), os estudos que demonstram a ação da seleção natural correspondem a uma pequena parcela dos que têm sido publicados sobre populações, pois, para serem assim considerados, devem envolver populações naturais, ou populações experimentais de campo, que tenham sido expostas a condições ambientais naturais e não controladas, por várias gerações, utilizar um método direto de detecção da seleção natural e fornecer evidência das condições para a ocorrência da seleção. Essas condições são a existência de variação hereditária, ou pelo menos parcialmente independente das condições ambientais, e de valor adaptativo da característica. Para aquele autor, "uma demonstração da seleção natural não é realmente completa a menos que as razões biológicas para a seleção sejam descobertas".

A natureza qualitativa da seleção natural pode ser deduzida a partir de descrições de propriedades fisiológicas de indivíduos de vários genótipos, mas a sua quantificação requer a verificação do desempenho dos genótipos em uma população no seu habitat natural (Ostergaard e Christiansen 1981). Com relação a populações vegetais, Dirzo e Harper (1982) comentam que informações definitivas a respeito

do comportamento de uma população frente à seleção dependem do acompanhamento detalhado dos indivíduos no campo, onde as forças seletivas, tais como fatores climáticos, predadores e patógenos, interagem determinando a sobrevivência e a fertilidade da população. Porém são escassas as informações disponíveis sobre o comportamento, no campo, de diferentes variantes de uma mesma espécie.

Como a adaptação depende de todas as características do organismo que de alguma forma influenciam seu valor adaptativo final, a natureza adaptativa de muitos caracteres diferenciais entre organismos é difícil de ser determinada. Stebbins (1950) adverte que "mesmo no caso de espécies bem conhecidas, nem a qualidade adaptativa nem a não adaptativa de um caráter particular devem ser admitidas, até que evidência definitiva relacionada àquele caráter esteja disponível". Entretanto, os geneticistas, ecologistas e evolucionistas têm preferido fazer inferências a respeito da ação da seleção natural a partir da existência de caracteres presumíveis de adaptação, em vez de medir diretamente o efeito da seleção (Solbrig 1980).

Só é possível entender bem as forças ou fatores que agem sobre as frequências gênicas através do estudo da ecologia das populações naturais e artificiais (Clarke 1975), com observações sobre as alterações contínuas das frequências ao longo das gerações (Mettler e Gregg 1973).

Segundo De Benedictis (1978), a genética de populações geralmente usa a distribuição de frequências alélicas para caracterizar populações, porém a descrição da dinâmica dos genes é mais completa quando se utiliza a frequência genotípica. Este autor demonstrou, em Drosophila, que populações com as mesmas frequências alélicas mas com diferentes frequências genotípicas diferem nas mudanças ao longo das gerações. A seleção natural age sobre genótipos, não sobre genes (Clegg, Allard e Kahler 1972). "Estudos que descrevem apenas mudanças na frequência alélica irão deixar de descrever a diversidade nos modos de seleção", segundo Clegg, Kahler e Allard (1978). Allard e Workman (1963) afirmam que as frequências gênicas e genotípicas, em conjunto, determinam a composição genética das populações e que mudanças nessas frequências são a base dos processos evolutivos.

Apesar do valor adaptativo dos diferentes genótipos depender da interação de todos os genes do indivíduo, a impossibilidade de se trabalhar, em condições controladas, com genótipos, faz com que os estudos sejam geralmente realizados levando-se em conta um ou poucos locos (Stebbins 1950). Porém Clarke (1975), apesar de não descartar a importância das interações entre locos, postula que em muitos casos há bastante evidência de que a seleção age diretamente sobre os alelos de um único loco. Para provar isso é necessário demonstrar não só que a seleção está realmente agindo mas também que ela está agindo diretamente naquele loco e não em um

outro ligado a ele.

Lewontin (1991), um dos pesquisadores que usaram pela primeira vez a técnica de eletroforese de proteínas para evidenciar variação em populações, comenta que a grande quantidade de dados de variação genética levantados por esta técnica causou um considerável empobrecimento da diversidade de trabalhos em genética evolutiva. Experimentos de variação de aptidão em populações naturais e artificiais, experimentos de seleção com caracteres morfológicos e fisiológicos, estudos de regulação do desenvolvimento e flexibilidade evolutiva, trabalhos com variação cromossômica e estudos de desvios de segregação em populações naturais quase desapareceram da literatura à medida que os pesquisadores passaram a se dedicar à eletroforese. Porém os problemas que estes estudos tentavam solucionar continuam sem solução, não tendo sido explicados também os dados resultantes do emprego daquela técnica.

Portanto é desejável que os trabalhos sobre alterações em populações, utilizando as técnicas que são ferramentas extremamente úteis, não se limitem ao levantamento de dados propiciado por elas e tenham sempre presente a preocupação em evidenciar como e porque surgem essas alterações. Estas questões, se respondidas, ajudarão a melhor entender a dinâmica das populações no espaço e no tempo.

3.2. COMPONENTES DE SELEÇÃO NO CICLO VITAL

A dinâmica das populações tem sido estudada segundo a análise de componentes de seleção. Este enfoque, que integra a genética e a demografia, considera que, se o sistema de reprodução for conhecido e os efeitos de mutação, migração e deriva genética puderem ser considerados desprezíveis, os valores seletivos dos genótipos podem ser estimados a partir de dados de frequência genotípica em diferentes estágios do ciclo de vida, no mesmo estágio em gerações sucessivas ou ainda pela determinação de um atributo demográfico, como viabilidade ou número de sementes, para cada classe genotípica (Brown 1979; Ennos 1990; Hamrick 1982; Workman e Jain 1966).

De acordo com Bundgaard e Christiansen (1972) e Ostergaard e Christiansen (1981), os componentes seletivos que agem ao longo do ciclo são: seleção zigótica, que atua da formação do zigoto até a maturidade sexual, seleção sexual, seleção por fecundidade e seleção gamética ou pré-zigótica, que atua na formação dos gametas, ou na união não aleatória dos gametas com respeito aos alelos que eles carregam. Porém, mesmo sob o enfoque de componentes de seleção no ciclo vital, as estimativas de aptidão ficarão comprometidas se, em duas gerações sucessivas, as observações, feitas no mesmo estágio do ciclo, ocorrerem em um momento em que a seleção não tenha ainda se completado (Christiansen, Bundgaard e Barker 1977; Prout 1965; Workman e Jain 1966).

A intensidade e a direção da seleção nas diferentes fases do ciclo podem ser diferentes, levando inclusive a uma manutenção do polimorfismo em determinados locos (Kojima 1971), como foi evidenciado por exemplo em Hordeum vulgare (Clegg, Kahler e Allard 1978; Jain e Marshall 1967) e em Peromyscus maniculatus (Nadeau e Baccus 1981). Nessa linha, Kojima (1971) afirma que "aptidão não constante é uma regra em estudos de população".

3.3. SELEÇÃO NATURAL EM POPULAÇÕES VEGETAIS

Para determinar a aptidão de diferentes genótipos em um ambiente particular, é necessário compará-los em uma mesma população, na qual as diferenças genéticas sejam tanto quanto possível distribuídas ao acaso e as correlações entre caracteres sejam minimizadas (Ennos 1990).

As populações de plantas autógamas mostram um grau elevado de associações entre locos (Allard 1975; Allard 1988; Allard, Babbel, Clegg e Kahler 1972; Brown 1979; Clegg, Allard e Kahler 1972), pois as autofecundações sucessivas propiciam um aumento constante das adaptações intra-genômicas (Brown 1979). Assim, as conclusões tiradas a partir de informações provindas de populações com este sistema de reprodução precisam ser analisadas levando-se em conta a sua organização multilocos. Apesar de comparar indivíduos que

diferem aparentemente apenas pelo genótipo do loco marcador, na realidade as diferenças de aptidão podem se referir a um número substancial de locos a ele ligados (Clegg e Allard 1973; Clegg, Allard e Kahler 1972; Ennos 1990).

Em contraposição, nas populações alógamas as correlações genéticas entre os locos devem ser mínimas (Ennos 1990). Nas plantas alógamas cultivadas, pelo modo característico de colheita e semeadura, a distribuição dos diferentes genótipos na população e também a distribuição das frequências alélicas no pólen são uniformes na área experimental (Brown 1979; Shaw, Kahler e Allard 1981). Essa situação de panmixia confere a este tipo de população vegetal características favoráveis para estudos populacionais.

Entretanto, mudanças nas frequências alélicas ao longo do tempo têm sido raramente registradas em populações com esse sistema de reprodução (Ennos 1990).

O estudo da dinâmica de populações segundo os componentes de seleção no ciclo vital, por outro lado, tem sido largamente aplicado, usando como marcadores locos controlando variação morfológica ou molecular (Ennos 1990).

No ciclo de vida dos vegetais podem ser considerados cinco estágios principais, que são 1) a fase de pré-dispersão, quando os novos indivíduos ainda são dependentes da planta mãe; 2) a fase de dispersão; 3) a fase de germinação e estabelecimento da nova planta, com a produção do primeiro par de folhas verdadeiras; 4) a fase adulta, com os estágios

pré reprodutivo e reprodutivo; e 5) florescimento, gametogênese e fertilização (Solbrig 1980). Porém muitos autores agrupam os componentes de seleção nas plantas em componentes de viabilidade, referindo-se à fase vegetativa do ciclo e componentes de fertilidade, relacionados à fase reprodutiva. Os componentes de viabilidade levam à sobrevivência diferencial entre zigoto e adulto. Os componentes de fertilidade irão influir no número médio de zigotos deixado por cada tipo materno (Brown 1979; Clegg e Allard 1973; Clegg, Kahler e Allard 1978; Jain e Marshall 1967).

Seleção diferencial com relação às fases do ciclo de vida tem sido frequentemente demonstrada em populações vegetais naturais e artificiais, porém sem esclarecer o estágio do ciclo no qual ela se manifesta e o modo de seleção (Clegg, Kahler e Allard 1978). Estes autores, trabalhando com populações experimentais de cevada (Hordeum vulgare), planta autógama, fizeram o censo dos indivíduos em duas fases, após a formação do zigoto e na fase adulta antes da reprodução. Concluíram que a seleção atua fortemente em todos os estágios do ciclo de vida, com diferentes intensidades e frequentemente em direções opostas.

Jain e Marshall (1967) analisaram também populações experimentais de cevada, mas contendo uma certa frequência de indivíduos com esterilidade masculina, visando o aumento da taxa de cruzamento. Monitorando a população por seis gerações, verificaram que, para determinado loco, a vantagem

seletiva conseguida pela maior taxa de germinação e fertilidade de um dos dois fenótipos possíveis era anulada e sobrepujada por sua reduzida fecundidade.

Outros estudos produziram estimativas de intensidade de seleção mantendo a variação genética (Workman e Jain 1966). Estes estudos têm sido realizados na sua maioria com plantas autógamas.

Os estudos de seleção dependem da disponibilidade de marcadores que possam ser acompanhados com facilidade durante o ciclo de vida. Porém a grande plasticidade fenotípica mostrada pelas plantas dificulta encontrar caracteres morfológicos com alta herdabilidade que permitam seu uso como marcadores (Endler 1986). Estes normalmente são escolhidos pela sua resolução genética e não por seu significado ecológico, que não é diretamente conhecido (Ennos 1990). A análise do efeito da seleção em diferentes etapas do ciclo de vida requer ainda o uso de locos que possam ser detectados nessas etapas (Workman e Jain 1966), porém esses locos raramente ocorrem (Jain e Marshall 1967). Grande parte dos trabalhos com plantas tem utilizado características isoenzimáticas como marcadoras.

3.4. O SISTEMA DE REPRODUÇÃO EM POPULAÇÕES VEGETAIS

Praticamente todas as investigações sobre a dinâmica das mudanças genéticas nas populações estão relacionadas, direta ou indiretamente, com o processo de reprodução (Clegg 1980; Sanders e Hamrick 1979), pois a reprodução é essencial para o estabelecimento e a perpetuação de uma população em um dado ambiente. A reprodução deve assegurar o aumento numérico dos genótipos individuais, e assim também da população, e permitir o aparecimento de genótipos novos e melhor adaptados (Brown e Burdon 1987).

O sistema reprodutivo é considerado o principal fator determinante da estrutura genética e das potencialidades evolutivas de uma população (Allard, Jain e Workman 1968). Poucas espécies de plantas são exclusivamente alógamas ou autógamas. É comum ocorrer cruzamento preferencial devido a diferentes graus de incompatibilidade e endogamia em consequência do agrupamento de indivíduos aparentados e de processos regulares de autofecundação, que fazem com que as proporções do equilíbrio de Hardy-Weinberg raramente sejam verificadas nessas populações (Clegg 1980).

O modelo de sistema de reprodução mais adequado para plantas polinizadas por insetos é o de doador único de pólen, que admite a ocorrência de cruzamentos com pólen vindo de um ou poucos pais (Schoen e Clegg 1984). Porém, para as espécies vegetais polinizadas pelo vento, o sistema

misto é o que melhor se aplica. Este modelo admite a ocorrência de cruzamentos juntamente com autofecundações e se apoia nas seguintes premissas básicas: a frequência gênica no conjunto do pólen é uniformemente distribuída em toda a população, a taxa de cruzamento não sofre interferência do genótipo materno e não ocorre seleção entre a fecundação e o momento do censo (Bijlsma, Allard e Kahler 1986; Clegg 1980; Clegg, Kahler e Allard 1978; Kahler, Gardner e Allard 1984).

Porém, na realidade, essas premissas são frequentemente transgredidas, levando a erros nas estimativas de taxa de cruzamento (Schoen e Clegg 1986). Por exemplo, a uniformidade nas frequências do pólen pode ser afetada pela variação microgeográfica, que é comum nas populações vegetais naturais (Clegg 1980; Ennos e Clegg 1982) e que, no entanto, não se verifica nas plantas cultivadas. Interferência do genótipo materno sobre a taxa de cruzamento pode ser devida a autocompatibilidade ou autoincompatibilidade genética (Brown, Matheson e Eldridge 1975), e a características da planta que favorecem ou dificultam o cruzamento. A ocorrência de seleção entre a fecundação e o momento do censo pode se dar através de produção diferencial de pólen entre os adultos, de diferenças na habilidade de fertilização do pólen, de sobrevivência ou funcionamento diferencial de gametófitos masculinos geneticamente diferentes e de letalidade zigótica precoce (Bijlsma, Allard e Kahler 1986; Brown, Matheson e Eldridge 1975; Pfahler 1965; Shaw, Kahler e Allard 1981).

O conhecimento sobre essas possíveis causas de desvio permitirá uma análise mais criteriosa das informações relacionadas ao sistema de reprodução da população.

O fator mais importante na definição do sistema de reprodução, em populações vegetais, é a taxa de cruzamento, que reconhecidamente está sujeita a controle genético (Hamrick 1982; Harding e Tucker 1964; Tucker e Harding 1965). Em cevada, por exemplo, Jain, Schaller e Jain (1979) verificaram que uma pequena variação genética no tempo de eliminação do pólen e de abertura da lema e da pálea podem alterar a regularidade da autofecundação e assim controlar a quantidade de cruzamento. Gutierrez e Sprague (1959), em milho, encontraram desvios no modelo de cruzamentos ao acaso, associados a diferenças na época de maturação de flores masculinas e femininas, duração do período de liberação de pólen e altura da planta. Apesar da existência de inúmeros trabalhos a respeito do sistema de reprodução, a variação genética nas taxas de cruzamento tem sido estudada em um número bastante pequeno de espécies (Jain 1983).

Tendo controle genético, a taxa de cruzamento responde à seleção (Holden e Bond 1960; Paterniani 1969), porém mostra grande plasticidade fenotípica. Esta plasticidade faz com que uma população geneticamente uniforme apresente variação entre uma parte e outra, respondendo a condições locais (Vasek 1964), propicia variação com o tempo (Harding e Tucker 1964; Jain 1983) e acentua diferenças entre

populações de uma espécie (Clegg 1980; Sanders e Hamrick 1979).

Os métodos tradicionais de determinação da taxa de cruzamento têm se baseado em observações de pares de cruzamento, no comportamento de polinizadores, na morfologia floral e nos resultados de experimentos controlados. Apesar de fornecerem informações importantes, são basicamente qualitativos (Clegg 1980; Shaw, Kahler e Allard 1981).

A partir da segunda metade deste século passaram a ser usados marcadores genéticos e modelos estatísticos para estimar os parâmetros do sistema de reprodução (Clegg 1980; Shaw, Kahler e Allard 1981). Na década de 60, com o desenvolvimento da técnica de eletroforese de proteínas, a variação aloenzimática passou a ser utilizada intensivamente para esse fim (Brown e Burdon 1987).

Porém o uso de marcadores, tanto morfológicos como bioquímicos, pode sofrer restrições. Marcadores morfológicos recessivos fornecem informação a respeito do comportamento de apenas um dos três genótipos possíveis para um loco dialélico (Kahler, Gardner e Allard, 1984). Esses marcadores frequentemente apresentam valor seletivo que pode afetar a viabilidade da planta que os carrega, produzindo desvios na proporção de genótipos e conseqüentemente causando erros na estimativa da taxa de cruzamento. Dependendo da fase em que se manifestam, a verificação dos resultados pode se tornar muito demorada, caso seja necessário esperar a geração seguinte para a identificação

dos genótipos produzidos. Outra dificuldade é a possibilidade de associação entre marcadores e caracteres relacionados a aspectos reprodutivos com efeito na taxa de cruzamento. Este problema, no entanto, é comum a marcadores morfológicos e bioquímicos (Brown e Allard 1970; Brown e Burdon 1987).

Os marcadores aloenzimáticos são bastante úteis e têm sido intensamente utilizados, pelas facilidades advindas de características como herança mendeliana simples, codominância, penetrância completa e ausência de pleiotropia e de interações epistáticas (Weeden e Wendel 1989). A codominância permite que as classes genotípicas sejam identificadas sem a necessidade de testes de progênie. Outra facilidade advém da existência de muitos locos polimórficos nas populações (Shaw, Kahler e Allard 1981).

Porém esses marcadores apresentam problemas diferentes quanto à sua utilização na determinação da taxa de cruzamento. Por exemplo, existe dificuldade de se trabalhar com a planta mãe e sua progênie, já que um alelo frequentemente se expressa apenas em certos estágios do ciclo de vida e ensaios com plântulas, se estas se perderem, inviabilizam a produção de sementes pelo indivíduo amostrado. Além disso, é necessário trabalhar com famílias suficientemente grandes para permitir deduzir quais os genótipos maternos, entre as várias possibilidades de segregação (Brown e Allard 1970).

O desconhecimento do valor adaptativo da maioria das aloenzimas, um problema ainda a requerer solução

(Stebbins 1989), é outro fator complicador. Tidas frequentemente como neutras, podem no entanto interferir no sistema reprodutivo e em outras características da planta que resultem em desvios espúrios na taxa de cruzamento (Bosbach e Hurka 1981; Clarke 1975; Futuyama 1992; Nevo 1978; Strickberger 1985). A seleção agindo, após a fecundação, sobre um loco utilizado como marcador ou sobre locos ligados a ele, inviabiliza tanto os métodos unilocos como os multilocos de medida da taxa de cruzamento, porém estes em menor grau (Kahler, Gardner e Allard 1984; Shaw, Kahler e Allard 1981).

A possibilidade de ocorrência de desvios na taxa de cruzamento deve, portanto, ser considerada, qualquer que seja o marcador utilizado.

3.5. SELEÇÃO GAMETOFÍTICA

A seleção gametofítica tem sido objeto de estudo de vários pesquisadores. Harding e Tucker (1969) distinguem a seleção gametofítica, propriamente dita, de diferenças no gametófito que resultam de influências do esporófito. Este, sendo diplóide, pode mascarar o efeito de alelos desfavoráveis, enquanto que no gametófito haplóide, a seleção pode agir livremente sobre alelos recessivos. Estes autores definem seleção gametofítica masculina como qualquer mudança dirigida na frequência gênica entre o esporófito e os

gametas masculinos na fertilização. Consideram-na causa importante das diferenças seletivas entre genótipos, mas comentam que os estudos realizados indicam que as frequências nos gametas não podem ser bem estimadas a partir da frequência no esporófito.

A seleção ocorre entre os grãos de pólen de diferentes constituições genéticas, podendo se dar ou na sua formação (estágio pré-polinização) ou no seu funcionamento (estágio pós-polinização), levando a desvios na segregação mendeliana de locos marcadores (Zamir, Tanksley e Jones 1982). Por exemplo, Radha, Vasudeva, Hedge, Ganeshaiah e Shaanker (1993) encontraram diferenças na capacidade de crescimento do tubo polínico em Vigna unguiculata, na dependência do genótipo do pólen e de seus competidores. Admitiram que esses efeitos podem ter implicações importantes na manutenção do polimorfismo de vários componentes de competição no gametófito masculino.

Já em 1920, Jones, considerando a possibilidade de crescimento mais lento do tubo polínico de acordo com o genótipo do pólen, chamou a atenção para o fato de este fenômeno ser mais evidente em milho, por causa do grande comprimento do estiloestigma.

Além desse fator, Sari Gorla, Ottaviano e Faini (1975) consideraram ainda, como causas possíveis de desvios na segregação, a variação no tempo necessário para a germinação do pólen, que causaria desvios na segregação das sementes de maneira uniforme na espiga, e os fatores

gametofíticos.

A seleção gametofítica só poderá se efetivar se fatores do genoma do grão de pólen, e conseqüentemente do gametófito masculino, tiverem expressão nessas estruturas, o que tem sido confirmado em milho (Sari Gorla, Pe, Mulcahy e Ottaviano 1992). Mulcahy (1971) e Ottaviano, Sari Gorla e Pé (1982) evidenciaram a expressão haplóide de genes relacionados ao controle do crescimento do tubo polínico, cuja expressão estava correlacionada positivamente com caracteres do esporófito, como o crescimento "in vitro" da ponta da raiz. Ottaviano, Petroni e Pé (1988) analisaram 34 mutantes relacionados ao desenvolvimento do endosperma, quanto à sua expressão no gametófito masculino e confirmaram essa expressão para 26 desses mutantes. Ottaviano e Mulcahy (1986) mencionam estudos indicando que 73% dos genes de milho se expressam tanto no pólen como no esporófito. Ottaviano, Sari Gorla e Villa (1988) submetem populações de milho a seleção sobre o gametófito, obtendo resposta positiva no crescimento do tubo polínico, resposta esta correlacionada com um caráter esporofítico, o peso médio do grão, concluindo que estas duas características são controladas em grande parte por fatores que se expressam em ambos os tecidos.

Em plantas cultivadas, a alta densidade populacional, o florescimento concentrado em um período curto e a ocorrência isolada das outras espécies tornam a seleção gametofítica muito intensa, pela grande quantidade de pólen que

atinge o estigma (Ottaviano e Mulcahy 1986).

Sari Gorla, Frova, Binelli e Ottaviano (1986) atribuem à seleção gametofítica papel importante na evolução das Angiospermas, o que seria facilitado pelo estado haplóide e pelo tamanho da população gametofítica. Porém a quantidade real desse tipo de seleção na natureza ainda não foi esclarecida, o que poderia inclusive permitir seu uso como ferramenta eficiente na manipulação do genoma de plantas cultivadas (Hormaza e Herrero 1992).

3.6. OS MUTANTES DE ENDOSPERMA EM MILHO

Os mutantes de endosperma em milho têm sido objeto de intensa investigação, tendo em vista que as alterações nas reservas nutritivas da semente determinam o seu valor econômico.

O grão de milho é um fruto tipo cariopse. A constituição química de uma amostra de milho normal, segundo Earle, Curtis e Hubbard (1946), é dada na tabela 1.

Tabela 1. Composição química média percentual do grão maduro de milho normal e de seus componentes principais (Earle, Curtis e Hubbard 1946)

Componentes	Grão	Amido	Proteína	Lipídeo	Açúcar	Cinza
Grão inteiro		71,5	10,3	4,8	2,0	1,4
Endosperma	82,3	86,4	9,4	0,8	0,6	0,3
Embrião	11,5	8,2	18,8	34,5	10,8	10,1
Pericarpo	5,3	7,3	3,7	1,0	0,3	0,8
Ponta	0,8	5,3	9,1	3,8	1,6	1,6

As frações proteicas são as albuminas, solúveis em água, as globulinas, solúveis em solução de cloreto de sódio, as prolaminas, solúveis em etanol a 80% e as glutelinas, solúveis em solução alcalina diluída. As prolaminas do milho, proteínas pobres em lisina e triptofano, são denominadas zeínas (Nelson 1967). A composição proteica de uma amostra de sementes de milho normal, da variedade tropical Maya, é dada na tabela 2 (Metivier e Monteiro 1981).

O endosperma do milho normal é constituído principalmente de amido, cuja composição usual é de 73% de amilopectina, com molécula de estrutura ramificada e 27% de amilose, de estrutura linear. Esse endosperma se cora em azul em contato com uma solução de KI (iodina). O embrião ou germe é constituído de um eixo embrionário central e do escutelo, que age como um órgão digestivo na germinação e no desenvolvimento da plântula (Goodman e Smith 1987).

Os mutantes de endosperma causam alterações nas reservas de proteínas e de carboidratos deste tecido.

O mutante **opaque 2** determina semente com endosperma opaco e farináceo, com textura de giz. As frações proteicas têm sua proporção alterada, reduzindo grandemente a quantidade de zeína e elevando a de albumina, globulina e glutelina, como é mostrado na tabela 2.

Tabela 2. Proporção das diferentes frações proteicas em relação à proteína total em endosperma normal e **opaque 2** na variedade Maya (Metivier e Monteiro 1981)

Fração proteica	Normal	opaque 2
Albumina	6,1	10,4
Globulina	5,8	19,6
Zeína	32,4	8,3
Glutelina 1	29,5	25,8
Glutelina 2	9,9	6,8
Glutelina 3	16,2	32,3
	55,6	64,9

As alterações nas frações proteicas causam um aumento no teor de lisina e triptofano do endosperma, que dessa maneira chega a apresentar 69% mais lisina que o grão normal (Li e Liu 1993; Mertz, Bates e Nelson 1964; Misra et al. 1972; Nelson 1969; Nelson, Mertz e Bates 1965), sendo que os demais aminoácidos se mostram também com proporções alteradas (Nelson 1969). Nos materiais analisados por Metivier e Monteiro (1981), a quantidade total de proteína no endosperma e no germe do grão mutante aumentou em relação ao tipo normal. No endosperma opaco a matéria seca é diminuída e ocorre maior retenção de umidade (Baenziger e Glover 1979). Os embriões do mutante são maiores que os normais (Nelson 1969) e o peso total do grão é menor, em função do menor peso específico do endosperma (Li e Liu 1993; Nass e Crane 1970 b; Nelson 1967). As taxas de germinação e de crescimento da plântula são reduzidas (Nass e Crane 1970 a; Paradela Filho 1982). O homozigoto recessivo é mais suscetível à infestação por Fusarium moniliforme (Paradela Filho 1982; Warren 1978) e ao ataque de insetos na espiga e no armazenamento (Tosello 1987).

O mutante **opaque 2** tem se revelado vantajoso na alimentação de animais monogástricos, como ratos (Nelson 1967; Mertz 1966) e porcos nas fases de crescimento e engorda (Nelson 1967; Pickett 1966) e também de crianças (Bressani 1966) e adultos da espécie humana (Clark 1966).

O mutante **shrunken 2**, determinando o fenótipo superdoce, causa forte bloqueio na síntese de amido,

reduzindo-o a níveis de 25 a 30% da quantidade encontrada no grão normal (Tsai e Nelson 1966). Aumenta assim no grão mutante o teor de açúcares solúveis, dos quais a sacarose é o principal componente (Laughnan 1953; Shannon e Creech 1972). Os açúcares chegam a aumentar 10 vezes em relação ao encontrado no milho normal (Styer e Cantliffe 1984). Dessa maneira, pelo maior teor de sólidos solúveis no grão, ocorre maior retenção de água nos estágios leitoso e pastoso, a qual é perdida no final do amadurecimento, fazendo com que o grão maduro se mostre fortemente enrugado. O conteúdo de proteínas do milho superdoce é maior que o do milho normal. A proporção das frações proteicas é alterada, ocorrendo redução da zeína, o que resulta em aumento dos teores de aminoácidos essenciais, principalmente lisina e triptofano, pelo aumento relativo das frações mais ricas nesses aminoácidos (Dalby e Tsai 1975; Laughnan 1953; Li e Liu 1993). Devido ao acúmulo de carboidratos precursores de lipídeos, estes se apresentam com teor cerca de quatro vezes maior que o de sementes normais. O teor de ácidos graxos livres chega a aumentar quase duas vezes (Laughnan 1953; Ratcliff, Wilson Junior, Knott e Mohan 1993). O peso do grão *shrunken 2* é cerca de 75% menor (Laughnan 1953; Li e Liu 1993) e a capacidade de germinação e o vigor das plântulas são bastante reduzidos em relação ao grão de endosperma normal. As sementes apresentam maior infestação por Fusarium moniliforme (Paradela Filho 1982; Styer e Cantliffe 1984). O conteúdo maior de açúcar no grão mutante tem sido associado ao aumento da podridão

causada por patógenos (Styer, Cantliffe e Hannah 1980).

O mutante **sugary**, chamado de milho doce, torna o grão maduro enrugado e com textura vítrea. O teor de açúcares não é tão alto como o encontrado no endosperma **sh2** mas chega a atingir de 2 a 3 vezes o do grão normal. Ocorre diminuição drástica da quantidade de amido do endosperma e aumento significativo do teor de fitoglicogênio, polissacarídeo solúvel em água, que chega a atingir mais de 1/3 do peso seco. Nesse mutante há aumento do conteúdo proteico, com redução da zeína e aumento de albumina, globulina e glutelina, resultando, em consequência, em aumento de lisina e triptofano (Laughnan 1953; Li e Liu 1993; Shannon e Creech 1972). O teor de lipídeos aumenta, como no grão **shrunken 2** (Laughnan 1953). A matéria seca é reduzida a 75% do normal, com maior retenção de água, em função da maior concentração de sólidos solúveis (Nass e Crane 1970 b). O grão **sugary** é mais sensível a fungos e bactérias e ao ataque por insetos (Paradela Filho 1982; Tosello 1987). A capacidade de germinação é reduzida em relação ao normal (Nass e Crane 1970 a; Paradela Filho 1982).

O mutante **waxy**, denominado milho ceroso, torna o endosperma opaco e duro. O amido ocorre na mesma proporção que no endosperma normal, mas com redução total da amilose, sendo portanto composto apenas por amilopectina. Na reação com iodina mostra cor castanha, em vez do azul característico do endosperma normal (Cameron 1947; Shannon e Creech 1972; Weatherwax 1922). Apesar de apresentar a enzima

relacionada à síntese de fitoglicogênio, não foram encontradas quantidades detectáveis deste polissacarídeo entre as reservas do endosperma (Shannon e Creech 1972). O teor de lisina é maior que no grão de endosperma normal (Dalby e Tsai 1975). O grão maduro apresenta menos matéria seca que o grão normal, com maior grau de umidade (Baenziger e Glover 1979; Nass e Crane 1970 b). O milho waxy apresenta igual ou maior produção que o milho de endosperma normal e igual ou maior concentração de nitrogênio no grão. Em alguns casos, sementes wxwx apresentaram maior concentração mineral que seu correspondente normal (Ahmadi, Wiebold e Beuerlein 1993). O milho ceroso parece ser mais vantajoso na alimentação de ruminantes (Alexander 1988) e outros animais (Watson 1988), porém este uso ainda é objeto de pesquisa. É bem estabelecida sua vantagem em relação a outros tipos de milho para fins industriais, por causa da qualidade do amido, que elimina a necessidade de processos de separação de diferentes componentes (Alexander 1988).

Os quatro mutantes estudados, o2, sh2, su e wx, são de herança monogênica e dominância completa do alelo para endosperma normal (Cameron 1947; Laughnan 1953; Neuffer, Jones e Zuber 1968; Sprague, Brimhall e Hixon 1943). As alterações que eles causam nas reservas do endosperma e suas conseqüências sobre o fenótipo do grão, sobre a taxa de germinação e de crescimento da plântula e sobre o comportamento frente a patógenos e insetos, são fatores que podem afetar sua freqüência em populações naturais.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. GERMOPLASMA

Foram estudadas quatro populações de milho contendo, cada uma, um dos seguintes mutantes de endosperma: **opaque 2** (o2), **shrunken 2** (sh2), **sugary** (su) e **waxy** (wx).

As quatro populações foram obtidas a partir dos mesmos parentais, através do cruzamento da linhagem pura L477 com a linhagem pura L902, desenvolvidas pelo Prof. William José da Silva no Banco de Germoplasma de Milho do Departamento de Genética e Evolução do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas. A linhagem L477 é de endosperma dentado e foi derivada da variedade Asteca, raça Tuxpeño. A linhagem L902 apresenta endosperma "flint" laranja e foi obtida da raça Cateto, variedade São Simão. Foram utilizadas quatro variantes da linhagem L902, cada uma homocigota para um dos mutantes mencionados.

Os mutantes foram escolhidos entre os vários que alteram a fração proteica e de carboidratos do endosperma, representando, cada um, um tipo de alteração. O **opaque 2** provoca alteração na composição proteica, determinando aumento da proporção de lisina e triptofano, como ocorre com os genes **floury 2**, **opaque 6** e **opaque 7**. O **shrunken 2** causa bloqueio na síntese de amido, acarretando conseqüentemente

aumento de açúcares simples, como fazem os genes **shrunken 1**, **shrunken 4**, **brittle 1**, **brittle 2** e **brittle 4**. O **sugary** determina a característica única de apresentar fitoglicogênio no endosperma. O **waxy** apresenta apenas amilopectina no amido.

Para maior facilidade de referência as populações serão denominadas de população **o2**, população **sh2**, população **su** e população **wx**, de acordo com os locos segregantes que encerram.

4.2. METODOLOGIA

4.2a. Estimativa das frequências gênicas e genotípicas nas populações

Os indivíduos F1 resultantes dos cruzamentos entre a linhagem L477 e as quatro variantes da L902 foram autofecundados manualmente. As figuras 1 a 4 mostram espigas F2 assim produzidas, segregando, cada uma delas, um dos mutantes de endosperma em estudo.

Figura 1. Espiga F2 produzida por autofecundação, com segregação de grãos normais e opaquos 2 na proporção de 3:1.



Figura 2. Espiga F2 produzida por autofecundação, com segregação de grãos normais e shrunken 2 na proporção de 3:1



Figura 3. Espiga F2 produzida por autofecundação, com segregação de grãos normais e sugary na proporção de 3:1



Figura 4. Espiga F2 produzida por autofecundação, com segregação de grãos normais e waxy na proporção de 3:1



As sementes F2 foram plantadas em lotes isolados para a obtenção de cinco gerações sucessivas de cada população, para verificar o comportamento das frequências gênicas e genotípicas nas fases de semente e de planta adulta.

A amostra plantada de sementes F2, isto é, de sementes obtidas em plantas F1, foi formada por cerca de 125 grãos da região central de 20 espigas, a fim de garantir uma boa representatividade. Isso porque as diferentes espigas, apesar de provindas de plantas F1 de mesmo genótipo, poderiam ter sofrido efeitos ambientais diferentes ao longo de sua formação, na forma de ataque por insetos, infestação por fungos, disponibilidade de água e nutrientes, competição com as plantas vizinhas, etc. Por outro lado, as sementes da região central da espiga têm forma mais semelhante entre si e com relação às provenientes dessa mesma região de diferentes espigas, garantindo aproximadamente a mesma relação germe/endosperma e portanto a mesma quantidade de reservas para os processos relacionados à germinação e estabelecimento da planta. Isso não seria verificado caso se utilizassem sementes das pontas da espiga, de forma tanto mais arredondada quanto mais próximas da ponta estiverem.

A partir de F3 as sementes usadas para o plantio foram obtidas de uma amostra constituída por 10 sub amostras, com cerca de 300 grãos cada uma e tomadas do total de sementes colhidas na geração anterior. Tal procedimento, realizado com o auxílio de 10 frascos de igual volume, visou

garantir a representatividade da amostra, ao impedir que as sementes proviessem de uma mesma parte do conjunto de sementes colhidas, o que poderia resultar em desvio da frequência de sementes de endosperma mutante. Ao se retirar as amostras não foi feita qualquer seleção consciente das sementes, com relação a forma, tamanho, textura, cor, sanidade, etc.

Nas espigas F2 da amostra, bem como nas 10 sub-amostras das outras gerações, foi estimada a frequência de sementes de endosperma normal e mutante em cada população.

O procedimento adotado para a obtenção das populações, com o número total de sementes nas amostras plantadas, está representado nos fluxogramas seguintes.

L477 x L902 o2o2



plantas F1 autofecundadas
2.403 sementes F2



plantas F2
3.771 sementes F3



plantas F3
2.999 sementes F4



plantas F4
2.818 sementes F5



plantas F5
3.200 sementes F6



plantas F6
3.640 sementes F7

L477 x L902 sh2sh2



plantas F1 autofecundadas
2.525 sementes F2



plantas F2
4.462 sementes F3



plantas F3
3.416 sementes F4



plantas F4
3.997 sementes F5



plantas F5
3.200 sementes F6



plantas F6
3.872 sementes F7

Os plantios foram feitos em campos distando no mínimo 150m um do outro e sem outras plantas de milho nas proximidades que pudessem florescer na mesma época, impedindo-se assim a ocorrência de cruzamentos indesejáveis. Outra garantia nesse sentido é dada pela grande produção de pólen em cada campo, concentrada em um período curto, o que minimiza ao extremo a possibilidade de fecundação por pólen estranho, pois este teria que vencer uma competição muito intensa para efetivar a fertilização.

Os plantios foram realizados em duas épocas bem distintas, em fevereiro e em fins de agosto, portanto em diferentes condições ambientais, permitindo uma ação mais ampla da seleção natural sobre as populações.

Os campos isolados constaram, de maneira geral, de 16 linhas de 20 m espaçadas de 1 m. No plantio foi aplicado no sulco adubo de fórmula $4\text{ N} : 14\text{ P}_2\text{O}_5 : 8\text{ K}_2\text{O}$ na base de 450 g por linha de 10 m. Foram semeadas 3 a 4 sementes por cova, com espaçamento de 40 cm entre as covas, deixando-se duas plantas por cova no desbaste. O desbaste foi executado 30 a 40 dias após o plantio, tomando-se o cuidado de não praticar qualquer tipo de seleção consciente nessa operação. Para tanto eram retiradas, independentemente de seu vigor, as plantas mais próximas ao lado direito do experimentador ao se deslocar entre as linhas de plantio. Imediatamente após o desbaste foi feita a cobertura com sulfato de amônia, na proporção de 350 g por linha de 10 m.

As populações isoladas sofreram polinização aberta, isto é, foram polinizadas naturalmente pelo vento.

A colheita foi realizada com colheitadeira mecânica de uma linha, quando os grãos já estavam bem secos, com 12 a 14% de umidade, permitindo, portanto, que a seleção natural agisse, através do ataque por insetos, fungos e outros microorganismos, e de fatores do meio físico, principalmete variação de temperatura e umidade. Tomou-se o cuidado de recolher do solo as espigas que não foram apanhadas pela colheitadeira e de juntá-las às demais. Apesar do isolamento genético das populações, como precaução foram desprezadas as linhas externas do campo, para eliminar qualquer possibilidade de contaminação por pólen estranho.

A fim de fornecer elementos que permitissem um melhor acompanhamento das gerações sucessivas, foram coletados os seguintes dados complementares nos campos isolados: taxa de germinação, data de início e fim do florescimento, porcentagem de plantas que formaram espiga e produção de grãos de cada campo.

As populações foram estudadas até a obtenção das sementes F7.

4.2b. Autofecundações para identificação dos genótipos das plantas nos campos isolados

Em cada uma das quatro populações, a cada geração, foram marcadas ao acaso 180 plantas adultas no campo. Estas plantas sofreram autofecundação manual, para a determinação de seu genótipo, através do tipo de espiga produzida. Plantas homozigotas dominantes foram identificadas por produzirem espigas apenas com grãos normais, plantas heterozigotas por produzirem espigas com grãos normais e mutantes e plantas homozigotas recessivas por produzirem espigas apenas com grãos mutantes.

Os objetivos da realização das autofecundações foram:

1. estimar a frequência genotípica das plantas, consideradas como amostra representativa da população, e, através dela, estimar a frequência gênica a cada geração.

2. estimar a frequência de grãos normais e mutantes nas espigas segregantes, produzidas nas plantas heterozigotas, para evidenciar possíveis desvios da proporção esperada de 3:1, evidenciados pelo teste de χ^2 , o que poderia sugerir a ocorrência de seleção gametofítica.

As espigas resultantes das autofecundações foram colhidas manualmente, antes da colheita geral.

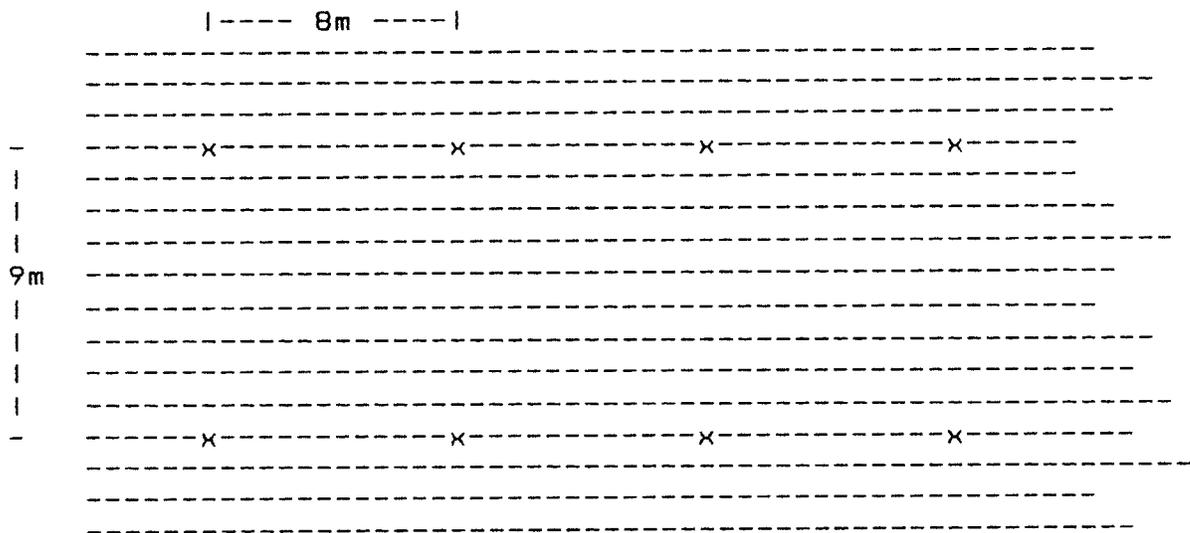
Além da verificação da frequência de sementes normais e mutantes nas espigas segregantes produzidas

por autofecundação em todas as gerações, foi feita também a verificação da frequência dos dois fenótipos na metade superior e inferior de 20 espigas F2, que foram todas resultantes de autofecundação, com a finalidade de evidenciar diferenças na velocidade de crescimento dos tubos polínicos carregando diferentes alelos. Essa diferença se manifestaria através de um número maior que o esperado do fenótipo resultante de fecundação pelo tubo polínico mais rápido. Isso seria mais evidente na metade inferior da espiga, dado que os estiloestigmas são tanto mais longos quanto mais próximo da base da espiga estiver o óvulo. Dessa maneira, esperar-se-ia que os óvulos da região basal fossem fecundados de preferência pelos tubos polínicos mais rápidos.

4.2c. Estimativa da taxa de cruzamento nas populações

As sementes F4, produzidas por autofecundação de plantas F3, foram usadas para a instalação de experimentos visando determinar a taxa de cruzamento das populações. Em cada uma delas foi utilizado como marcador genético o mutante de endosperma presente, partindo-se do pressuposto que não ocorre seleção entre o momento da fecundação e a colheita das sementes. Das espigas homozigotas dominantes (43 0202, 68 Sh2Sh2, 60 SuSu e 27 WxWx) foram retiradas as sementes para a formação de quatro compostos, cada um referente a uma população.

Essas sementes, de fenótipo normal, foram plantadas em lotes isolados, com plantadeira mecânica. Cada lote consistiu de 16 linhas de 48m, com espaçamento de 1m entre as linhas. Na 4ª e na 13ª linha de cada lote foram marcados 6 pontos distanciados 8m um do outro, onde foram plantadas as sementes provenientes de espigas de plantas homozigotas recessivas, em duas covas contíguas de onde foram previamente retiradas as sementes normais. No desbaste foram mantidas duas plantas em cada cova. Antes do florescimento foram eliminadas as plantas excedentes, mantendo-se apenas uma planta em cada um desses pontos. Parte do campo experimental está representado no esquema seguinte.



x = posição de plantio das sementes homozigotas recessivas
 --- linhas com sementes homozigotas dominantes

Os lotes experimentais assim construídos permitem o isolamento entre as diferentes plantas homozigotas recessivas de um mesmo campo por competição entre grãos de

pólen, pois a quantidade de pólen das plantas de endosperma normal próximas é tão grande que estabelece uma barreira com relação a pólen de fontes mais distantes (Loveless e Hamrick 1984). Bateman (1947) verificou que uma grande redução da contaminação por pólen estranho ocorre nos três a seis metros mais próximos, em plantas polinizadas pelo vento ou por insetos. Este autor não considera o milho como espécie anemófila típica, porque os grãos de pólen são muito grandes e menos flutuantes que os de outras plantas anemófilas, atingindo assim distâncias menores. Medindo a dispersão do pólen do milho em campos experimentais em Piracicaba, onde as condições climáticas são semelhantes às de Campinas, Paterniani e Stort (1974) usaram como marcador o loco Y, para endosperma amarelo ou branco. Verificaram que o número de plantas existentes entre a planta mãe e a doadora de pólen é mais importante na avaliação da dispersão que a distância em metros. Seus campos apresentavam 1m de distância entre as linhas e 20 ou 40cm entre covas, com apenas uma planta por cova. Nessas condições, verificaram, em campos medindo 15m x 20m e 21m x 22,6m que, com 15 plantas entre a mãe e a fonte de pólen, o que corresponde a 3m no campo de maior densidade e a 6m no de menor, o cruzamento ocorria com taxa de 0,03%. Além disso, constataram que essa taxa diminuía em campos de maiores dimensões por causa do aumento de competição entre os grãos de pólen. Comparando essas condições com as do experimento por nós instalado, onde a densidade de plantio foi maior e as dimensões foram de 15m x

48m, podemos concluir que o isolamento entre as plantas homozigotas recessivas no nosso trabalho foi realmente efetivo.

A taxa de cruzamento foi verificada a partir do número de sementes normais e mutantes formadas nas plantas homozigotas recessivas desenvolvidas no campo experimental. Este estudo foi complementado com uma análise de correlação entre o número de sementes mutantes na espiga e o número total de sementes na espiga, para verificar a possibilidade de plantas mais vigorosas, portanto com espigas maiores, terem taxa de autofecundação distinta das de espigas menores.

4.2d. Estudo do efeito do endosperma normal ou mutante sobre características da planta

Foram realizados ensaios de campo para contrastar características das plantas com diferentes genótipos para endosperma dentro de cada população. Os ensaios receberam os mesmos cuidados e tratamentos culturais que as populações em campos isolados.

4.2d.1. Ensaio de competição de genótipos entre parcelas

Neste ensaio as sementes de endosperma normal e de endosperma mutante foram semeadas em sub parcelas separadas. As plantas dentro de uma mesma sub parcela tinham,

portanto, o mesmo genótipo para endosperma, não havendo assim competição entre plantas providas de sementes de endosperma normal e providas de sementes de endosperma mutante. Discrepâncias entre as duas sub parcelas iriam refletir diferenças causadas pelos dois tipos de endosperma contrastantes. Este ensaio foi denominado Ensaio Sem Competição.

Foram estudadas as seguintes características:

- Taxa de germinação, avaliada cerca de 5 dias após o início da germinação.

- Data de florescimento, expressa em dias após plantio e se referindo à data em que cerca de 50% das plantas da linha já tinham iniciado a ântese.

- Altura das plantas, correspondendo à média de altura de 5 plantas por linha, tomadas ao acaso, uma semana após o florescimento.

Para o plantio do campo experimental foram utilizadas sementes sem escolha, provenientes de amostras formadas por 70 grãos normais e 70 grãos mutantes retirados de cada espiga, de um total de 100 espigas F2 de cada população.

O ensaio foi instalado segundo o delineamento de Blocos ao Acaso, com 10 repetições. A parcela experimental constou de duas linhas de cada população, com 10 m de comprimento e espaçamento de 1 m entre as linhas. Uma sub parcela era constituída de uma linha plantada com sementes de

endosperma normal, com linhas externas de mesmo genótipo como bordadura. A outra sub parcela foi constituída de uma linha plantada com sementes de endosperma mutante, com linhas externas de mesmo genótipo como bordadura.

Foram plantadas quatro sementes normais ou cinco mutantes por cova, espaçadas 40 cm entre si. No desbaste, realizado sem seleção, foram deixadas duas plantas por cova, perfazendo cerca de 45 a 50 plantas adultas por sub parcela.

Uma semana após a germinação, para evitar a falta de competição entre plantas na linha, nas covas em que não se desenvolveu nenhuma planta foram semeadas sementes com genótipo para produzir plantas com antocianina, portanto com fenótipo arroxeadado, e para precocidade. Assim, embora plantadas posteriormente, por causa de seu ciclo mais acelerado igualaram seu desenvolvimento ao das demais, propiciando a competição entre elas. Isso foi feito com a finalidade de manter o "stand" uniforme, permitindo que todas as plantas ficassem em igualdade de condições. As plantas arroxeadas foram etiquetadas quando adultas, para que após a secagem das folhas elas não fossem confundidas com as do corpo do experimento.

As plantas da primeira e da última cova da linha não foram consideradas para a coleta de dados por estarem isoladas em um dos lados.

O objetivo desse experimento foi contrastar as características das plantas provindas de sementes de endosperma normal com as provindas de sementes de endosperma

mutante através da comparação entre as duas sub parcelas de uma mesma população.

4.2d.2. Ensaio de competição de genótipos dentro da parcela

Neste ensaio as sementes de endosperma normal e mutante foram misturadas para o plantio, para propiciar a competição entre as plantas de diferentes genótipos na mesma linha. Os genótipos foram identificados através das espigas produzidas por autofecundação. Desta maneira, neste ensaio os dados foram levantados planta a planta e não como médias de sub parcelas, como no ensaio anterior, onde as sub parcelas foram formadas com sementes de mesmo fenótipo. Este ensaio foi designado Ensaio Com Competição.

As características analisadas foram as seguintes:

- Número de folhas 40 dias após o plantio.
- Data de início da ântese, expressa em dias após o plantio.
- Nível de protandria, correspondendo ao número de dias transcorridos entre o início da ântese e a data de polinização manual, que foi executada estando os estiloestigmas com 3 a 4 cm de comprimento, permitindo ter-se a informação a respeito do intervalo entre a liberação do pólen e a receptividade dos estiloestigmas.

- Altura das plantas, verificada após a polinização.

- índice de inserção da espiga, correspondendo à razão entre a altura da inserção da primeira espiga e a altura da planta.

- Número de grãos por planta, correspondendo à soma do número de grãos formados em todas as espigas de cada planta da parcela.

- Peso dos grãos, verificado em uma amostra constituída pela mistura de 10 grãos retirados da região central de cada uma das espigas principais formadas em cada planta da parcela. Das espigas segregantes foram tomados 10 grãos de endosperma normal e 10 grãos mutantes de cada, compondo duas amostras separadas.

- Número de espiguetas na panícula. As panículas foram retiradas após a polinização e a verificação da altura da planta. Em cada panícula foi verificado o comprimento da ráquis, o número de espiguetas contidas em 5 cm da região central da ráquis, o comprimento total das ramificações laterais e o número de espiguetas em 5 cm da região central de uma ramificação de comprimento médio, com o objetivo de estimar o número total de espiguetas na panícula, para dar uma idéia indireta da produção de pólen pela planta.

As sementes utilizadas nesse ensaio provieram da mesma amostra de sementes F2 utilizada no ensaio anterior. Foram usadas sementes de bom aspecto, que foram

banhadas com o fungicida Orthocide em suspensão, sendo secas imediatamente após esse tratamento. O uso do fungicida visou propiciar melhor comparação entre plantas providas de sementes de diferentes genótipos e não entre as providas de sementes com ou sem a presença de fungos.

Na população sh2, considerando a baixa taxa de germinação das sementes de endosperma mutante, foi aumentada a quantidade destas na amostra, atingindo a proporção de uma semente normal para uma de endosperma mutante. Além disso, foram semeados quatro grãos por cova e não três como nas demais populações.

O ensaio foi instalado em delineamento de Blocos ao Acaso, com três repetições. A parcela experimental constou de 5 linhas de 10 m, com espaçamento de 1 m x 0.40 m, perfazendo cerca de 45 a 50 plantas por linha após o desbaste. As duas linhas mais externas foram consideradas bordadura. Entre as três mais internas foi escolhida para estudo a que tinha melhor "stand".

As plantas foram autofecundadas manualmente, para permitir a identificação do seu genótipo, porém o saquinho de papel que envolve a espiga após a polinização foi retirado no dia seguinte, quando a fertilização já devia ter ocorrido, para favorecer a granação total da espiga e assim permitir boa avaliação do número de grãos formados pela planta. Sendo esta uma característica de herança materna, espera-se que não seja influenciada pelo tipo de pólen

responsável pela fecundação.

Foram contrastadas as características de plantas homozigotas dominantes, heterozigotas e homozigotas recessivas competindo dentro da linha.

4.2e. Taxas de germinação e de infestação de sementes por fungos avaliadas em experimentos de laboratório

Foram realizados três ensaios de laboratório, com sementes F3, com sementes F4 e com sementes do ensaio de campo com competição, para verificar a taxa de germinação e a taxa de infestação por fungos em sementes normais e de endosperma mutante das quatro populações. Não foram utilizadas sementes F2, como nos ensaios de campo, devido ao fato do fungo Fusarium moniliforme, importante patógeno do grão de milho, atingir as espigas principalmente através dos estiloestigmas expostos (Headrick e Pataky 1989; Headrick, Pataky e Juvik 1990; Paradela Filho 1982). Como as sementes F2 foram obtidas por autofecundação artificial, em que os estiloestigmas ficam protegidos por saquinhos de plástico antes e por saquinhos de papel depois da polinização, essa operação certamente iria restringir a infestação por aquele fungo.

As sementes foram colocadas para germinar em tubos de ensaio com meio preparado com 15 g agar/1 l de água destilada deionizada. Os tubos eram preenchidos com o meio até cerca de 4 cm de altura, fechados com tampão de algodão e gase

e em seguida autoclavados.

As sementes eram colocadas nos tubos (uma por tubo) em fluxo laminar, após lavagem com álcool e desinfestação superficial com hipoclorito de sódio comercial a 50% por 1 minuto. A seguir os tubos eram colocados em câmara de fotoperíodo, com 13 horas de luz e 11 horas de escuro, com temperatura de $27^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Uma semana depois era feita a avaliação da taxa de germinação, da altura da plântula, da ocorrência de fungos, da intensidade de infestação por fungos e do tipo de fungo. Para a avaliação da intensidade de infestação atribuiu-se nota 1 para sementes com colônia pequena e localizada, nota 2 para sementes com colônia em toda ou na maior parte da superfície e nota 3 para sementes totalmente envolvidas pelo fungo, a ponto de não poderem ser vistas. A altura da plântula foi verificada com o auxílio de uma régua milimetrada, estando a plântula dentro do tubo de ensaio e utilizando-se a aproximação de 0.5 cm.

A avaliação das três últimas características foi feita com a utilização de lupa binocular. A identificação do tipo de fungo se baseou no aspecto da colônia, segundo orientação do Dr Osvaldo Paradela Filho, da Secção de Fitopatologia do Instituto Agronômico de Campinas.

4.2e.1. Ensaio com sementes F3

As amostras foram tomadas do conjunto de sementes F3 produzidas em campo isolado plantado em fevereiro e colhido em junho, tendo se desenvolvido, portanto, em condições climáticas menos favoráveis para o cultivo do milho, por causa da baixa temperatura e umidade. As sementes foram tomadas ao acaso quanto ao tamanho, forma ou estado, já que essas características poderiam ser decorrentes do genótipo e assim uma escolha baseada nestes aspectos influenciaria a avaliação.

O ensaio foi instalado em delineamento de Blocos ao Acaso, com quatro repetições. A parcela experimental foi constituída por 100 sementes de cada população. As subparcelas continham 50 sementes normais ou 50 sementes mutantes.

4.2e.2. Ensaio com sementes F4

As sementes F4 foram colhidas em janeiro, resultando de plantio em agosto. Portanto se desenvolveram na época em que o milho é cultivado normalmente, com bom suprimento de água de chuvas. Para este ensaio foram adotados os mesmos procedimentos que para o ensaio com sementes F3.

4.2e.3. Ensaio com sementes produzidas no ensaio de campo com competição

Cada parcela deste ensaio correspondeu a uma parcela do ensaio de campo com competição, que foi instalado em outubro e colhido em fevereiro. Foram utilizadas as sementes que compuzeram a amostra para verificação do peso dos grãos.

Este ensaio foi instalado em delineamento de Blocos ao Acaso, com três repetições. A parcela experimental constou de 200 sementes por população, com exceção da população *shrunken 2*. As sub parcelas continham quatro tipos de tratamentos:

1) 50 sementes normais, produzidas em plantas homozigotas dominantes. Estas sementes eram homozigotas, já que as plantas mães foram autofecundadas.

2) 50 sementes normais, produzidas em plantas heterozigotas, as sementes podendo ser, portanto, tanto homozigotas, aproximadamente $1/3$, como heterozigotas, aproximadamente $2/3$.

3) 50 sementes mutantes, produzidas em plantas heterozigotas. As sementes eram homozigotas, já que o caráter mutante é recessivo.

4) 50 sementes mutantes, produzidas em plantas homozigotas recessivas. As sementes portanto eram homozigotas.

Na população shrunken 2, como não foram produzidas plantas homozigotas recessivas no ensaio de campo, a quarta sub parcela não pode ser instalada.

Os procedimentos de laboratório adotados foram os mesmos dos ensaios anteriormente citados.

Através da análise de variância foram estudados os seguintes contrastes, em cada população: sementes normais de plantas homozigotas dominantes X sementes normais de plantas heterozigotas, sementes normais de plantas heterozigotas X sementes mutantes de plantas heterozigotas e sementes mutantes de plantas heterozigotas X sementes mutantes de plantas homozigotas recessivas.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Atendendo às exigências preconizadas por Clarke (1975), Endler (1986) e Mettler e Gregg (1973), para que um estudo sobre seleção natural possa assim ser considerado, foram avaliados neste trabalho os efeitos da seleção natural sobre populações experimentais que foram sujeitas a condições naturais de campo por cinco gerações. As interferências sobre essas populações se restringiram ao mínimo requerido por uma planta altamente modelada pelo homem e dele dependente, como é o milho. Outra exigência, a existência de variação hereditária, com formas variantes revelando diferentes comportamentos (Endler 1986), foi satisfeita através do uso dos mutantes de endosperma, com herança bastante conhecida. Esses mutantes mostram comportamentos bem distintos frente às condições ambientais. O efeito da seleção foi avaliado diretamente através das alterações de frequência ocorridas. Procurou-se, por outro lado, determinar as "razões biológicas" dessas alterações, através do estudo, em ensaios com tratamento estatístico adequado, de várias características das plantas, que poderiam apresentar variações em decorrência do genótipo para um determinado tipo de endosperma. Finalmente, a utilização de uma espécie cultivada facilitou grandemente o trabalho, permitindo de antemão o conhecimento da estrutura genética das populações em estudo, como foi sugerido por Brown (1979) e Shaw, Kahler e Allard (1981), entre outros.

5.1. TAXA DE CRUZAMENTO NAS POPULAÇÕES

O milho é sabidamente uma espécie alógama com polinização pelo vento. As plantas, porém, são autocompatíveis, propiciando uma certa porcentagem de autofecundações nas populações de livre cruzamento. Como essa porcentagem sofre variação determinada por fatores ambientais e genéticos (Hamrick 1982; Harding e Tucker 1964; Holden e Bond 1960; Paterniani 1969; Tucker e Harding 1965; Vasek 1964), ela foi estimada em experimentos de campo para as quatro populações utilizadas neste estudo. Essas populações têm a grande vantagem de serem geneticamente semelhantes, pois todas são provenientes do cruzamento das mesmas duas linhagens isogênicas. O método utilizou plantas homozigotas recessivas isoladas uma das outras e cercadas por plantas homozigotas dominantes.

Essas características trouxeram inúmeros benefícios para a estimativa da taxa de cruzamento. Um deles é que todas as plantas de cada campo, assim como as das diferentes populações, têm o mesmo "background" genético. Outro é que as plantas utilizadas no experimento se originaram de sementes produzidas por autofecundação de plantas provenientes das populações de livre cruzamento. Com isso eliminou-se a possibilidade de ocorrência de valores adaptativos diferentes, que poderiam resultar da utilização de plantas obtidas por cruzamento juntamente com plantas obtidas por autofecundação (Ennos 1990). Outro benefício é que o genótipo das plantas para

o loco marcador é conhecido, não requerendo análises de progênies para a identificação dos genótipos parentais ou o uso de modelos para estimar a frequência genotípica materna, o que seria causa de erro (Schoen e Clegg 1986). Além disso, não é preciso considerar o cruzamento entre plantas de mesmo genótipo, uma vez que as plantas homozigotas recessivas estão isoladas umas das outras, portanto impedidas de efetuar cruzamentos entre si. Por outro lado, como as plantas doadoras de pólen para cruzamento são todas homozigotas dominantes no loco para endosperma, não há possibilidade de variação espacial na frequência gênica desse loco nos grãos de pólen, como comumente ocorre nas populações (Clegg 1980; Ennos e Clegg 1982) e de interferência de produção diferencial de tipos de grãos de pólen pelos progenitores masculinos.

Brown e Allard (1970) afirmam que a eficiência de estimativas de taxa de cruzamento a partir de pais homozigotos é alta em casos de dialelismo e quando as frequências gênicas não são muito discrepantes, como no presente trabalho.

O número de sementes produzidas nas plantas homozigotas recessivas é apresentado na tabela 3.

Tabela 3. Número de sementes de endosperma normal (Nor) e mutante (Mut) em espigas produzidas nas plantas homocigotas recessivas, valor do coeficiente de correlação (r) entre número total de sementes na espiga e número de sementes de endosperma mutante e nível de probabilidade (prob.), para $H_0: r = 0$, nas quatro populações (Pop)

Planta	Pop. o2		Pop. sh2		Pop. su		Pop. wx	
	Nor	Mut	Nor	Mut	Nor	Mut	Nor	Mut
1	143	2	450	7	234	2	324	35
2	161	0	220	2	163	12	168	42
3	213	21	93	5	225	2	342	6
4	204	3	322	1	96	3	331	1
5	155	1	58	1	179	3	256	59
6	266	4	85	0	47	0	290	5
7	63	0	179	39	215	13	457	7
8	14	0					390	40
9	222	11					*366	*11,5
r	0,57		0,13		0,38		-0,25	
Prob.	11%		79%		40%		51%	

* média entre as duas espigas formadas

Como houve grande variação no número de sementes produzidas nas espigas de plantas recessivas, pensou-se na possibilidade de plantas mais vigorosas, com espigas e panículas maiores, apresentarem maior frequência de autofecundações por causa da maior produção de pólen. Isso implicaria na violação de uma das premissas básicas do modelo misto de reprodução, relativa à interferência do genótipo materno sobre a taxa de cruzamento (Kahler, Gardner e Allard 1984). Por isso foi estudada a correlação entre número total de sementes e número de sementes mutantes na espiga. Os resultados, mostrados na parte inferior da tabela 3, foram todos não significativos, indicando a ausência de influência do tamanho da espiga, e possivelmente do vigor da planta, na taxa de cruzamento.

Os dados referentes ao número de grãos mutantes em relação ao total de grãos na espiga permitiram determinar diretamente a taxa de cruzamento de cada planta. As distribuições das taxas nas populações são mostradas nas figuras de número 5 a 8.

Figura 5. Distribuição da taxa de cruzamento na população o2

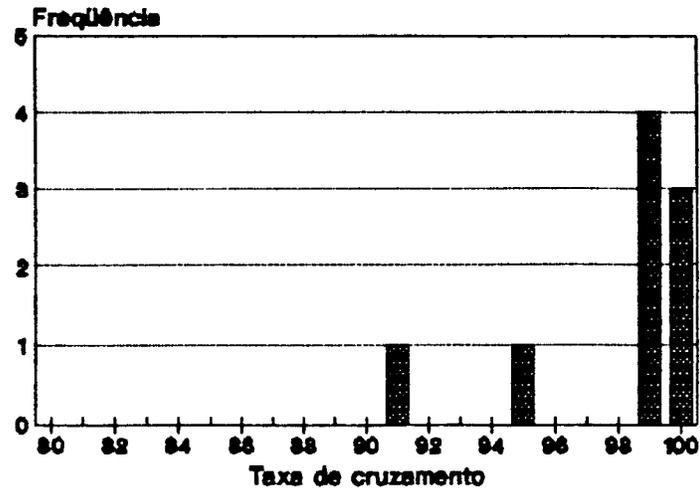


Figura 6. Distribuição da taxa de cruzamento na população sh2

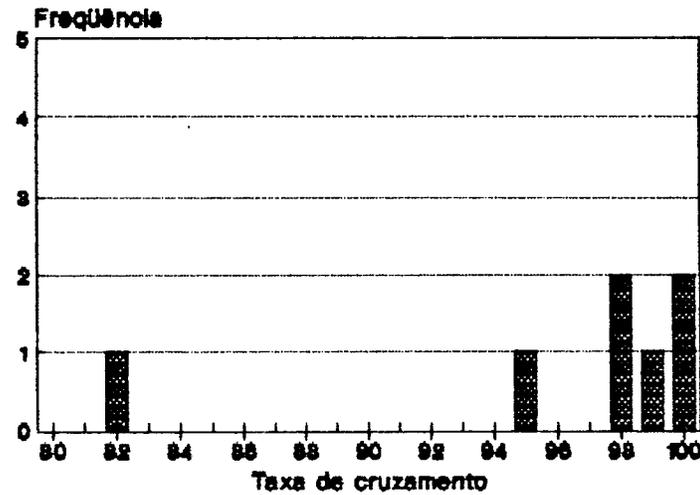


Figura 7. Distribuição da taxa de cruzamento na população su

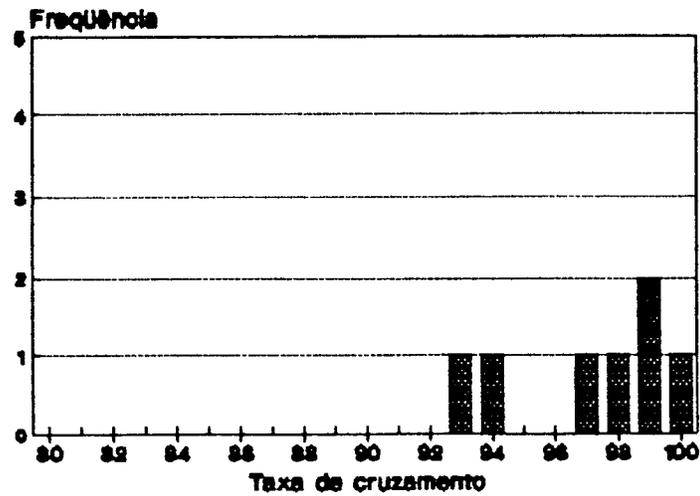
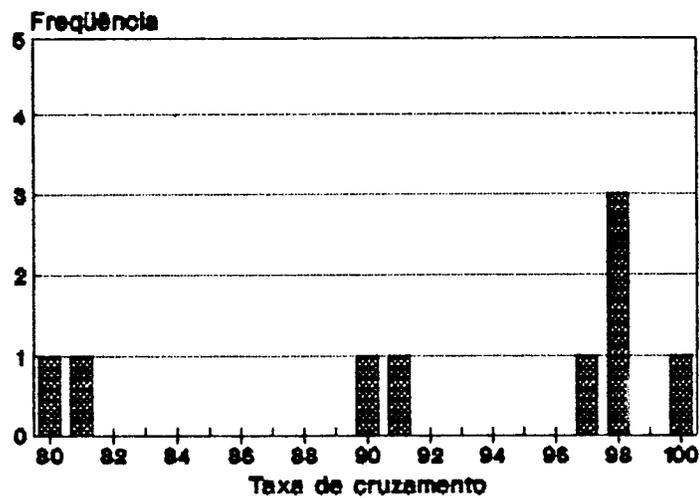


Figura 8. Distribuição da taxa de cruzamento na população wx



A partir das taxas de cruzamento de cada espiga foram determinadas as taxas relativas às quatro populações e a média geral ponderada pelo número de espigas. Os resultados são mostrados na tabela 4.

Tabela 4. Taxa de cruzamento nas quatro populações, mostrando a amplitude de variação e a média, desvio padrão, número de espigas analisadas e média geral ponderada

População	Nº de espigas	Mínima	Máxima	Média	Desvio padrão
o2	9	0,9103	1,0000	0,9793	0,0298
sh2	7	0,8211	1,0000	0,9609	0,0639
su	7	0,9314	1,0000	0,9730	0,0265
wx	9	0,8000	0,9970	0,9268	0,0762
Média geral				0,9591	

As taxas de cruzamento, bem como suas amplitudes, se mostraram semelhantes nas quatro populações, variando de 0,93, na população wx, a 0,98, na população o2, dados esses compatíveis com o que tem sido encontrado em espécies anemófilas, isto é, pequena variação da taxa de cruzamento ao nível populacional (Brown, Burdon e Jarosz 1989). As diferenças verificadas podem em parte ser devidas à variação que geralmente ocorre em estimativas unilocos (Shaw, Kahler e Allard 1981).

Os valores da taxa de cruzamento por nós determinados são semelhantes aos mencionados na literatura para o milho. Brown e Allard (1970), por exemplo, usando isoenzimas como marcadoras, encontraram taxa de 0,99. Por sua vez, Kahler, Gardner e Allard (1984), trabalhando com oito locos isoenzimáticos em quatro populações, verificaram variação relacionada ao loco marcador, com a média ponderada das populações indo de 0,82 a 0,94, com média geral igual a 0,89. Usando estimativas multilocos, as populações mostraram taxas de 0,81 a 1,00, com média geral de 0,90.

No entanto, apesar dos cuidados tomados em nossas estimativas, não pode ser totalmente descartada a possibilidade de interferência de forças seletivas na avaliação da taxa de cruzamento. Essa interferência, se presente, teria ocorrido em período restrito, entre a produção de pólen e o desenvolvimento das sementes, em uma única geração, o que aparentemente a minimiza. Nessa linha, Kahler, Gardner e Allard

(1984) fizeram determinações de taxa de cruzamento em populações de milho utilizando plântulas para a verificação dos genótipos nos locos marcadores. As plântulas foram tomadas como estágio "imediatamente após a reprodução", portanto os autores não consideraram a possibilidade de ocorrência de desvios devidos à seleção no período compreendido entre a fertilização e a verificação dos genótipos produzidos, período esse mais extenso que no trabalho por nós realizado.

Atualmente a maioria das estimativas de taxa de cruzamento, ao contrário do que foi feito neste trabalho, utiliza marcadores isoenzimáticos. Esses marcadores são frequentemente vistos como seletivamente neutros, porém gradativamente vem sendo demonstrado valor adaptativo para muitos deles (Futuyma 1992) ou ainda associações entre os marcadores e atributos do sistema reprodutor (Brown e Allard 1970). Nesse sentido, Bijlsma, Allard e Kahler (1986) encontraram, em populações de milho, interações significativas entre diferentes marcadores isoenzimáticos e concluíram ocorrer seleção gametofítica correlacionada com o marcador.

As taxas de cruzamento em milho, entretanto, estimadas em vários trabalhos usando diferentes técnicas, são de magnitude semelhante. Nos nossos experimentos, se ocorreram alterações nessas taxas devidas à seleção, devem ter sido de pequena intensidade, confundindo-se com a variação ao acaso que comumente ocorre nesse tipo de experimentação e não comprometendo, portanto, a estimativa realizada.

A média geral obtida para as nossas populações, de 0,96, confirma a alogamia da espécie. O modo de colheita e sementeira, aliado à polinização anemófila, permite considerá-las panmíticas. Levando em conta a ausência de fluxo gênico e o grande número de plantas nas populações adultas (cerca de 1.500), podemos dizer que as populações se aproximam do modelo de Hardy-Weinberg. Essas populações, portanto, se constituem em material excelente para estudo da seleção natural, através do acompanhamento das alterações das frequências gênicas e genotípicas ao longo das gerações.

5.2. ESTUDO DAS POPULAÇÕES NAS GERAÇÕES SUCESSIVAS COMPREENDIDAS ENTRE SEMENTES F2 E SEMENTES F7

A época mais favorável para o plantio do milho na região de Campinas, como em toda a região Centro-Sul do Brasil, é fim de inverno ou começo de primavera. Dessa maneira as plantas irão se desenvolver durante o período de temperatura mais elevada, com fotoperíodo mais adequado e com boa disponibilidade de chuvas, quando, então, mostram máxima produtividade. No entanto, para a obtenção de duas colheitas por ano, neste trabalho foi feito também um segundo plantio, no fim do verão, época mais desfavorável em consequência da redução da precipitação e da temperatura ao longo do ciclo. Essa segunda sementeira tem sido adotada regularmente no país

nos últimos anos, pelos agricultores do Oeste Paranaense, região do Paranapanema e da Mogiana em São Paulo, Triângulo Mineiro, Sudoeste de Goiás e Mato Grosso do Sul, regiões em que é chamada de "safrinha".

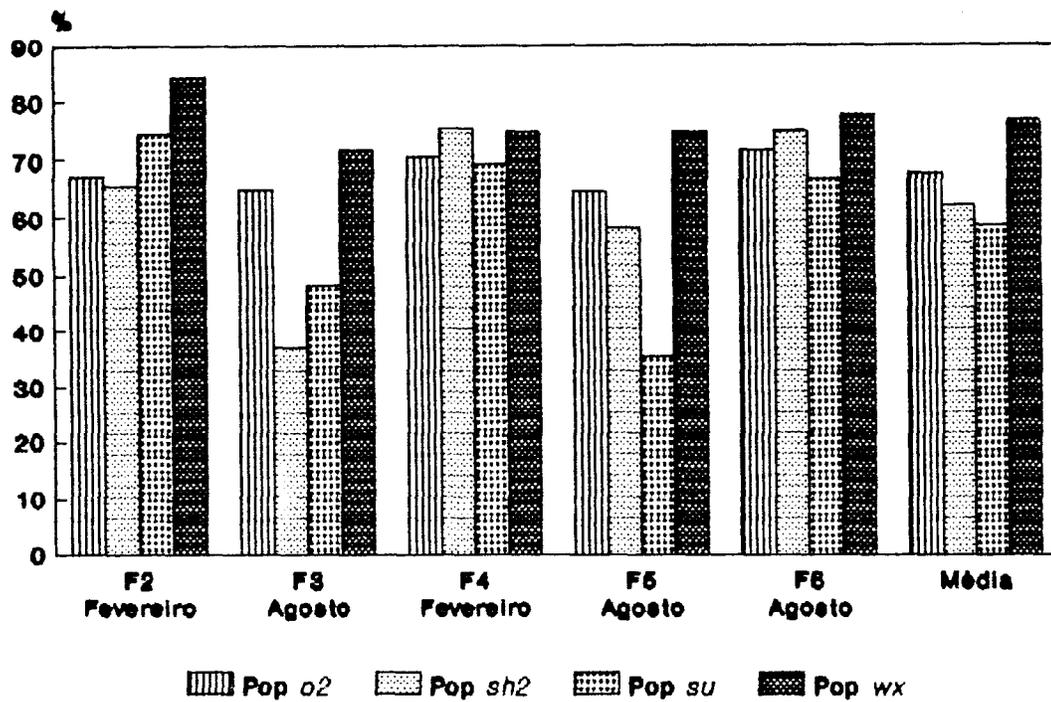
As populações em campos isolados foram desenvolvidas em um período de três anos, compreendidos entre o plantio de sementes F2 e a colheita de sementes F7.

Uma evidência clara de que ocorreu isolamento efetivo entre os diferentes campos foi dada pelo fato de não terem sido encontrados, ao longo das gerações sucessivas, nas quatro populações, mutantes de endosperma diferentes daquele que segregava em cada uma delas.

As raízes das plantas da geração F5 sofreram o ataque de larvas de Diabrotica (Coleoptera), que provavelmente já tinham se instalado nos campos na geração anterior. Esse problema se acentuou na geração seguinte, fazendo com que a produção das plantas F6, de plantio em fevereiro, ficasse seriamente comprometida. As poucas espigas produzidas, mal desenvolvidas, foram desprezadas e novas amostras de sementes F6 foram plantadas após o combate das larvas com inseticida. Assim, com relação a duas gerações sucessivas, as obtidas de sementes F5 e de sementes F6, não houve alternância de plantio entre a época favorável e a desfavorável, como nas demais.

A taxa de germinação, mostrada na figura 9, foi avaliada cerca de cinco dias após o início da emergência.

Figura 9. Porcentagem de germinação de sementes F2 a F6 em campos isolados, com média das quatro populações e indicação do mês de plantio



A variação da taxa de germinação nas cinco gerações indica que não houve mudanças sistemáticas nesse período. Porém a taxa de germinação de fevereiro tende a ser maior que a de agosto, provavelmente em vista das condições de seca e frio ainda persistentes em agosto. A alta taxa de germinação de sementes F6, plantadas também em agosto, provavelmente é devida à eliminação de predadores pela aplicação de inseticida no plantio.

Dentro das populações, as maiores variações ocorreram nas populações sh2 e su, o que pode ser atribuído ao fato de serem mais drásticas as alterações nas reservas nutritivas das sementes mutantes dessas populações do que nas das populações o2 e wx. Na população sh2 a taxa variou de 75,5%, em F4, a 37,1%, em F3. Na população su, de 74,2%, em F2, a 35,5%, em F5. Nas populações o2 e wx a variação foi pequena, indo de 71,4% a 64,6% na população o2 e de 84,4% a 71,7% na população wx. As sementes F5 da população sh2, plantadas em agosto, não mostraram redução muito acentuada na taxa de germinação (58,2%). Esse resultado pode ser explicado pelo fato de sementes sh2sh2, de baixa germinação, estarem com frequência bastante reduzida nessa geração (5%), como veremos adiante.

Os dados de florescimento apresentados na tabela 5, coletados nas plantas autofecundadas, se referem ao número de dias transcorridos do plantio até a primeira e a última polinizações manuais realizadas nos campos.

Tabela 5. Dias transcorridos até o início (I) e o fim (F) do florescimento, em plantas F2 a F6, amplitude (F-I) e mês do plantio, nas quatro populações (Pop)

Pop	F2		F3		F4		F5		F6		Média	
	Fevereiro I	Fevereiro F	Agosto I	Agosto F	Fevereiro I	Fevereiro F	Agosto I	Agosto F	Agosto I	Agosto F	I	F
o2	73	92	91	109	84	111	88	119	85	110	84,2	108,2
F-I	19		18		27		31		25		24,0	
sh2	73	92	90	107	84	114	83	113	82	103	82,4	105,8
F-I	19		17		30		30		21		23,4	
su	77	97	91	112	89	111	88	119	85	113	86,0	110,4
F-I	20		21		22		31		28		24,4	
wx	75	89	90	102	79	111	85	111	81	105	82,0	103,6
F-I	14		12		32		26		24		21,6	
Média	75	93	91	108	84	112	86	116	83	108		
F-I	18		17		28		30		25			

As épocas de florescimento das populações, para os plantios de agosto e fevereiro, mostram que o padrão de florescimento não é diferente entre elas. O florescimento ocorreu mais precocemente apenas na geração F2. Esse fato pode ser explicado pelo maior grau de heterose, que é máxima em F1 e se dissipa gradativamente nas gerações seguintes de cruzamentos livres (Falconer 1987). A heterose na geração F2, ainda em grau elevado, faz com que as plantas, mais vigorosas, floresçam mais precocemente.

Outro fato significativo é o aumento gradativo da amplitude de florescimento com a seqüência das gerações. Nas plantas F2, resultantes da autofecundação de plantas de genótipo uniforme dentro de cada população, o intervalo foi de 18 dias em média, atingindo 30 dias em F5, mas caindo para 25 dias em F6, provavelmente em decorrência das melhores condições de desenvolvimento desta última geração, que recebeu tratamento com inseticida para eliminação das larvas de Diabrotica. Estes dados sugerem ocorrer um aumento da variabilidade genética em decorrência de intercruzamentos dentro das populações, que propiciam a recombinação de fatores relacionados direta ou indiretamente com o sistema de reprodução. Um período mais longo de florescimento ofereceria maior oportunidade para a ocorrência de autofecundações e de cruzamentos preferenciais entre plantas mais precoces, uma vez que elas tenderiam a ficar isoladas, assim como as mais tardias. Esta situação levaria a um aumento do número de

indivíduos homozigotos nas populações. Se ocorrer associação entre mutantes de endosperma e fatores determinantes do nível de cruzamento, decorrente de ligação gênica ou de efeitos pleiotrópicos, isso poderia também determinar alterações das frequências nos locos para endosperma. Neste sentido Paterniani (1969), em populações de milho resultantes do plantio conjunto de uma variedade de endosperma branco e duro e outra de endosperma amarelo e **sugary**, selecionou contra intercruzamento por seis gerações. A seleção resultou em um isolamento considerável entre os indivíduos com diferentes origens, isolamento este baseado principalmente no número de dias até o florescimento, que diminuiu nos indivíduos provenientes de uma população e aumentou nos da outra. Entretanto, a multiplicidade de fatores relacionados à definição da frequência genotípica da próxima geração torna muito difícil estimar qual a contribuição deste possível efeito sobre a frequência de sementes homozigotas recessivas produzidas nas nossas populações.

A porcentagem de plantas com espigas foi avaliada nos campos isolados após o término das polinizações manuais. Os dados são apresentados na tabela 6.

Tabela 6. Porcentagem de plantas que formaram espigas, nas gerações F3 a F6, com média das quatro populações e média por geração, e indicação do mês de plantio

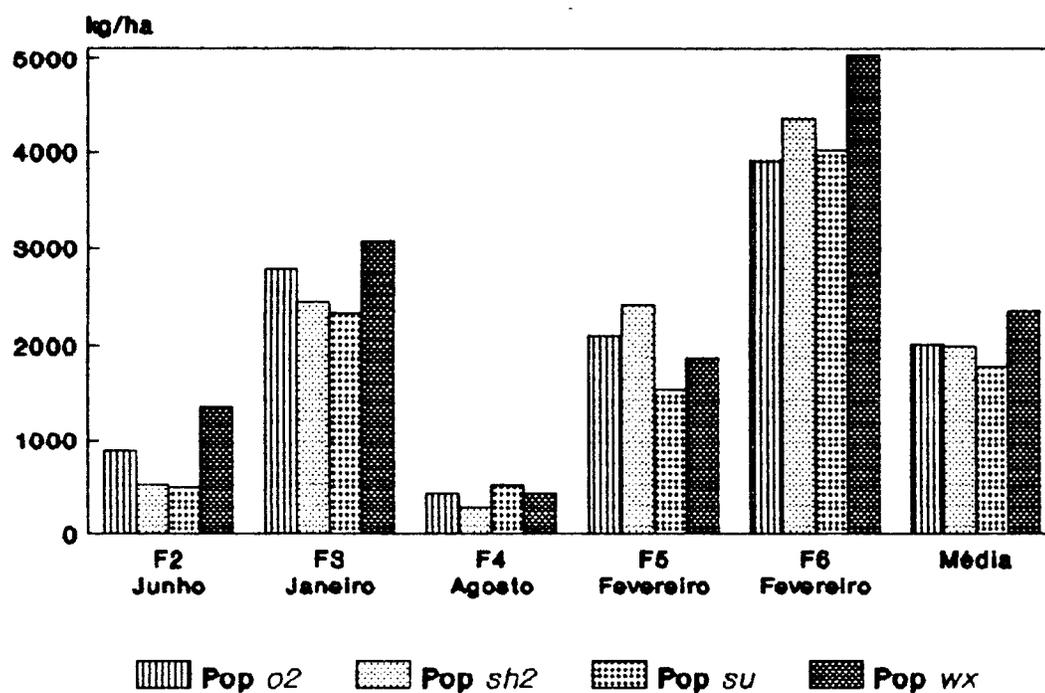
População	F3 Agosto	F4 Fevereiro	F5 Agosto	F6 Agosto	Média
o2	99,4	93,8	93,9	98,7	96,5
sh2	99,7	88,1	95,7	97,8	95,3
su	99,7	94,6	96,7	99,0	97,5
wx	100,0	92,5	94,8	98,9	96,6
Média	99,7	92,3	95,3	98,6	

Os dados indicam que houve pequena variação entre e dentro das quatro populações com relação ao número de plantas que formaram espigas, mostrando que essa característica aparentemente não foi afetada pela ação dos mutantes, pela época de plantio ou pela variabilidade genética nas várias gerações.

Como é difícil identificar o genótipo das plantas sem espigas pelos métodos disponíveis, fica em aberto a questão a respeito de serem elas preferentemente de um determinado genótipo. Isto poderia representar um fator seletivo com possibilidade de causar alteração nas frequências gênicas e genotípicas da população. Como, entretanto, as plantas sem espigas ocorreram em número muito baixo, sendo a média mais alta apenas 4,7%, a consequência sobre as frequências seria provavelmente desprezível.

Para se ter uma idéia do desempenho dos campos isolados, é mostrada na figura 10 a produção de sementes nas várias gerações das quatro populações. Do total de sementes colhidas no lote isolado foram excluídas as provenientes das espigas polinizadas manualmente e as das linhas externas de bordadura.

Figura 10. Produção total de sementes nos campos isolados, em kg/ha, provenientes das plantas F2 a F6 das quatro populações, com indicação do mês de colheita



Os dados de produção de sementes evidenciam claramente o efeito da época em que as plantas se desenvolveram. A produção da geração F2, 813 kg/ha em média, colhida em junho, e da geração F4, 418 kg/ha, colhida em agosto, é bastante baixa quando comparada com a das gerações desenvolvidas em período favorável. A geração F5, apesar de desenvolvida em período favorável, mostrou o efeito das condições fitossanitárias limitantes das plantas desta geração, pois a produção média foi de apenas 1.988 kg/ha, enquanto que a de sementes F3 foi de 2.650 kg/ha. A aplicação de inseticida para combater as larvas de Diabrotica na geração F6 deve ter favorecido essa geração, ao eliminar outros possíveis predadores e parasitas que ocorreriam nos campos. As plantas F6 apresentaram a maior produção, 4.321 kg/ha em média.

Os dados apresentados nas figuras 9 e 10 e nas tabelas 5 e 6 refletem a grande influência das condições ambientais sobre o desenvolvimento das plantas, sugerindo a possibilidade de ocorrência de pressões de seleção distintas sobre indivíduos de diferentes genótipos, o que potencialmente pode causar alterações na frequência alélica dos locos estudados.

Por outro lado, os dados relativos à produção de sementes ilustram como as plantas cultivadas reagem acentuadamente ao controle das condições ambientais. Isto sugere que podem ser facilmente simuladas diferentes situações de campo de maneira a permitir estudos comparativos de seleção

natural. Esta vantagem não é verificada em espécies selvagens, que em geral não respondem tão fortemente às alterações de fatores ambientais.

5.2a. Frequências gênicas e genotípicas nas populações

Na tabela 7 são apresentadas as frequências de sementes de endosperma mutante e o desvio padrão relativo às frequências das 20 sub amostras de F2 e das 10 de F3 a F7, bem como o total de sementes analisadas em cada amostra.

Tabela 7. Proporção de grãos com endosperma mutante nas amostras plantadas, desvio padrão (dp) das frequências nas sub amostras e total de grãos das amostras, da geração F2 à F7 (*) das quatro populações (Pop)

	Total	Mutantes	dp
Pop o2			
F2	2403	0,2272	0,0346
F3	3771	0,2479	0,0173
F4	2999	0,1981	0,0217
F5	2818	0,2076	0,0354
F6	3200	0,1994	0,0131
F7	3640	0,1720	0,0215
Pop sh2			
F2	2525	0,2392	0,0327
F3	4462	0,1219	0,0192
F4	3416	0,0726	0,0205
F5	3997	0,0535	0,0121
F6	3200	0,0247	0,0111
F7	3872	0,0170	0,0054
Pop su			
F2	2500	0,2312	0,0309
F3	3659	0,2282	0,0268
F4	3074	0,1314	0,0167
F5	3270	0,1232	0,0216
F6	3200	0,0872	0,0142
F7	4362	0,0752	0,0176
Pop wx			
F2	2500	0,2400	0,0405
F3	3476	0,2371	0,0359
F4	3179	0,2589	0,0262
F5	2988	0,2691	0,0274
F6	3200	0,2506	0,0195
F7	3985	0,2269	0,0249

* As sementes F7 foram utilizadas apenas para verificação da frequência de mutantes, não tendo sido plantadas.

Os desvios padrões das frequências de mutantes nas sub amostras foram bastante baixos, indicando a qualidade do método adotado para a amostragem.

Os dados relativos à frequência de sementes de endosperma mutante, quando analisados no conjunto das quatro populações, permitem identificar dois padrões de variação das frequências. Em um deles, nas populações *o2* e *wx*, elas se mantêm em oscilação, não se afastando muito do valor original. No outro, nas populações *sh2* e *su*, ocorre queda contínua. Na população *sh2* esta queda é bastante acentuada, chegando a frequência, na geração F7, a apenas 0,0170. Na população *su* o declínio foi menos acentuado, chegando a 0,0752.

As populações utilizadas neste trabalho têm, como já vimos, o mesmo "background" genético e se desenvolveram no mesmo ambiente, a partir das mesmas linhagens parentais. Portanto as alterações diferenciadas ocorridas nos locos determinantes do tipo de endosperma são específicas deles e não determinadas por outros fatores genéticos da população. Além disso, as populações em questão são de livre cruzamento, minimizando a possibilidade de associações entre locos (Ennos 1990), comuns nas espécies autógamas (Allard 1975; Allard 1988; Allard, Babbel, Clegg e Kahler 1972; Brown 1979; Clegg e Allard 1973; Clegg, Allard e Kahler 1972; Ennos 1990). Essa situação, que permite identificar a ação da seleção natural sobre um loco particular e não sobre locos a ele ligados, já tinha sido admitida por Clarke (1975). Os locos para tipo de endosperma

escolhidos, por outro lado, favoreceram grandemente o trabalho. Determinando caracteres monogênicos com dominância completa, como foi demonstrado por vários autores, entre os quais Cameron (1947), Laughnan (1953), Neuffer, Jones e Zuber (1968) e Sprague, Brimhall e Hixon (1943), não apresentam a plasticidade fenotípica comum à maioria das características vegetais (Endler 1986), o que dificultaria a verificação de sua frequência. Apresentam ainda a vantagem de ser bem conhecido o seu significado para as plantas que os apresentam (Ennos 1990), ao contrário de caracteres isoenzimáticos, geralmente com significado ecológico desconhecido (Stebbins 1989).

Porém as informações relativas a apenas um momento do ciclo vital não são completas, como já foi enfatizado principalmente por Prout (1965). As sementes representam uma etapa determinada do ciclo e sua frequência é resultado de fatores que agem ao longo de todo o ciclo e que podem ter intensidades e sentidos distintos nas diferentes fases, como foi evidenciado por Clegg, Kahler e Allard (1978), Jain e Marshall (1967), Kojima (1971) e Nadeau e Baccus (1981), entre outros. Dessa maneira, para melhor monitoramento desses fatores, as frequências referentes aos locos para endosperma foram estimadas também nos indivíduos adultos, através da determinação do genótipo das plantas das amostras autofecundadas, outra vantagem (Workman e Jain 1966; Jain e Marshall 1967) propiciada pelos locos escolhidos. Através dessas frequências genotípicas foram estimadas as frequências

alélicas. Assim, este trabalho permitiu acompanhar tanto as alterações das frequências gênicas como as das frequências genotípicas nas gerações sucessivas, o que é exigência de vários autores para os trabalhos sobre seleção natural, como Allard e Workman (1963), Clegg, Allard e Kahler (1972), Clegg, Kahler e Allard (1978) e De Benedictis (1978). A tabela 8 apresenta as frequências gênicas e genotípicas nas populações adultas e o número de plantas nas amostras utilizadas.

Tabela 8. Frequência genotípica, $f(xy)$, na população adulta, total de plantas avaliadas nas amostras e frequência gênica estimada, $f(y)$, nas gerações F2 a F6 das quatro populações. As letras x e y se referem aos alelos dos locos em estudo

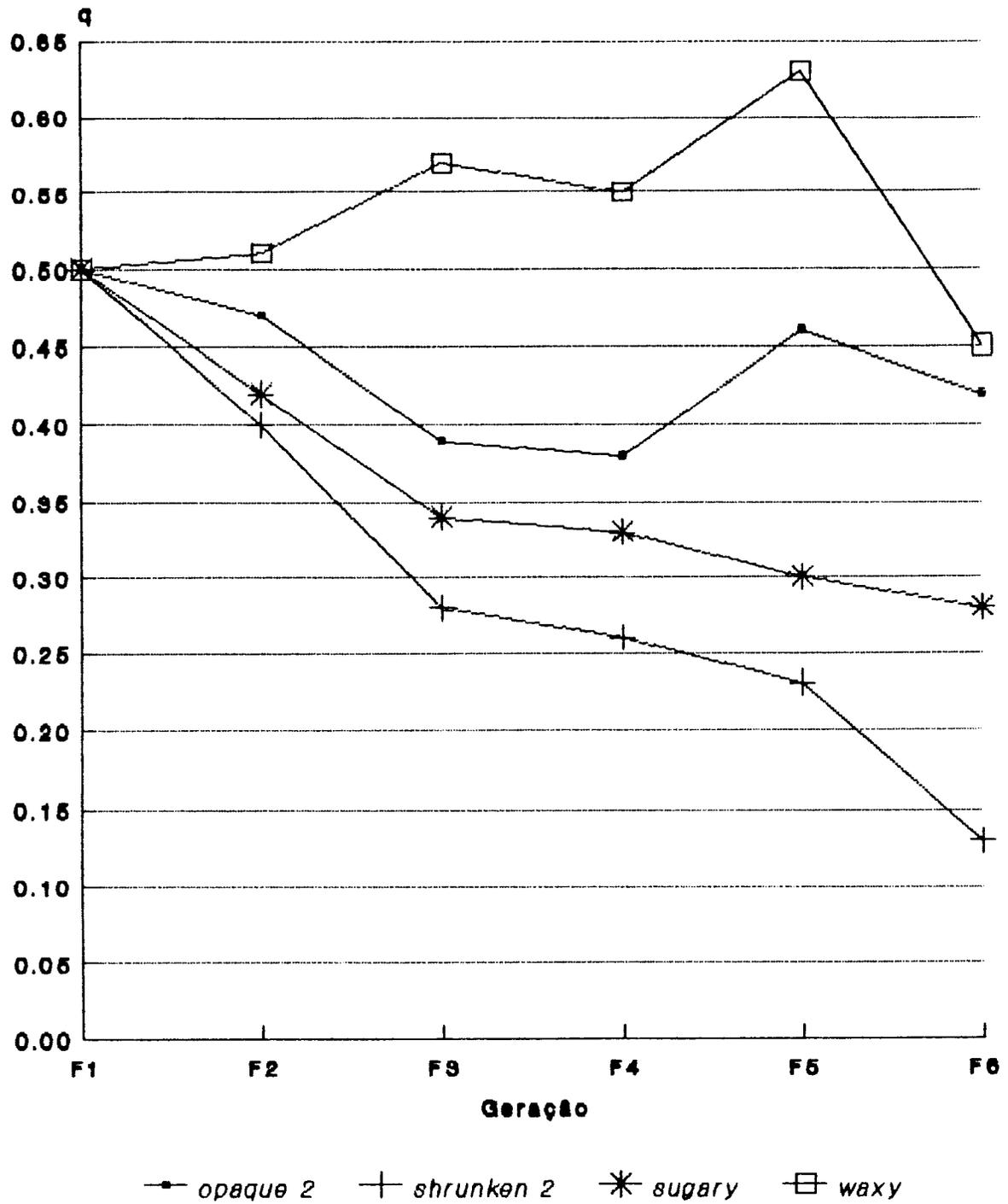
	F2	F3	F4	F5	F6
$f(O2O2)$	0,2621	0,3644	0,3908	0,2746	0,3102
$f(O2o2)$	0,5340	0,4831	0,4598	0,5282	0,5455
$f(o2o2)$	0,2039	0,1525	0,1494	0,1972	0,1444
Total	103	118	87	142	187
$f(o2)$	0,4709	0,3941	0,3793	0,4613	0,4172
$f(Sh2Sh2)$	0,2617	0,4503	0,4932	0,5492	0,7302
$f(Sh2sh2)$	0,6729	0,5364	0,4932	0,4508	0,2698
$f(sh2sh2)$	0,0654	0,0132	0,0137	0	0
Total	107	151	73	122	189
$f(sh2)$	0,4019	0,2815	0,2603	0,2254	0,1349
$f(SuSu)$	0,3429	0,4027	0,3846	0,4317	0,4884
$f(Susu)$	0,4762	0,5235	0,5692	0,5396	0,4535
$f(susu)$	0,1810	0,0738	0,0462	0,0288	0,0581
Total	105	149	65	139	172
$f(su)$	0,4190	0,3356	0,3308	0,2986	0,2849
$f(WxWx)$	0,1967	0,1776	0,2128	0,1930	0,3351
$f(Wxwx)$	0,5820	0,5000	0,4681	0,3596	0,4362
$f(wxwx)$	0,2213	0,3224	0,3191	0,4474	0,2287
Total	122	152	94	114	188
$f(Wx)$	0,5123	0,5724	0,5532	0,6272	0,4468

Uma análise global da tabela 8 permite notar a grande redução de plantas homozigotas recessivas nas populações **sh2** e **su**. Na população **sh2** nenhuma planta com esse genótipo se desenvolveu nas gerações F5 e F6.

Adiante as freqüências de homozigotos recessivos entre os adultos será analisada para cada população em separado.

Os dados de freqüência gênica da tabela 8 foram usados para a construção da figura 11, com o objetivo de melhor ilustrar as alterações das freqüências dos alelos **o2**, **sh2**, **su** e **wx** ao longo das gerações. Foi considerado como ponto de partida a freqüência 0.50, na geração F1, uma vez que ela resultou do cruzamento de linhagens homozigotas para os dois alelos contrastantes em cada população.

Figura 11. Freqüência (q) dos alelos *o2*, *sh2*, *su* e *wx* em plantas adultas das gerações F1 a F6



A figura 11 mostra que as alterações nas frequências gênicas, estimadas na população adulta, seguem os mesmos padrões já verificados na análise das frequências de sementes de endosperma mutante. As populações o2 e wx apresentam uma tendência de manutenção da frequência gênica inicial e as populações sh2 e su mostram queda acentuada, bastante mais drástica na população sh2, onde a frequência do alelo mutante atingiu 0,1349 nas plantas F6, enquanto que na população su chegou a 0,2849 nesta geração. Na população o2 o afastamento máximo da frequência em relação a seu valor inicial ocorreu nas plantas F4, com o valor 0,3793, diferindo por -0,1207 daquele valor. Na população wx, ocorreu na geração F5, com o valor de 0,6272, com diferença de 0,1272 sobre o valor inicial.

Os coeficientes de regressão estimados foram significativamente diferentes de zero nas populações sh2 e su, mostrando uma tendência de queda na frequência gênica de 5,9% e 3,1%, respectivamente, por geração. Esses coeficientes foram não diferentes de zero nas populações o2 e wx, com valores de -0,0040 ($0,70 < P < 0,80$) e -0,0077 ($P > 0,90$) respectivamente, concordando com a oscilação da frequência em relação ao valor inicial.

Na análise do comportamento das frequências gênicas e genotípicas nas gerações estudadas serão consideradas duas fases no ciclo vital, sendo uma a fase vegetativa, correspondendo aos componentes de viabilidade e outra a fase

reprodutiva, correspondendo aos componentes de fertilidade.

Para vários autores, entre os quais Brown (1979), Clegg e Allard (1973), Clegg, Kahler e Allard (1978) e Jain e Marshall (1967), os componentes de viabilidade, em populações vegetais, se referem a dormência, germinação, sobrevivência até a maturidade e longevidade. No caso do milho eles se reduziriam à germinação e sobrevivência até a maturidade, já que não ocorre dormência de sementes e a longevidade não é considerada, por se tratar de planta anual com um único florescimento. Solbrig (1980) argumenta que apenas na ausência de dormência é possível medir o transcorrer do tempo nos ciclos vitais utilizando-se uma geração como unidade.

Os componentes de fertilidade, para os autores citados acima, são idade de florescimento, produção de pólen e óvulo, desvios de segregação, seleção gametofítica, polinização e desenvolvimento da semente.

As alterações na frequência de homozigotos recessivos devidas a componentes de viabilidade serão estimadas pelo confronto das frequências genotípicas nas plantas adultas com as frequências nas sementes plantadas. Nas sementes, a frequência se refere aos dois fenótipos possíveis, isto é, sementes de endosperma normal e de endosperma mutante.

Os componentes de fertilidade do ciclo vital irão determinar alterações na frequência de sementes homozigotas recessivas produzidas. Essa frequência foi estimada nas amostras utilizadas para o plantio da geração seguinte.

Foram adotados como valores esperados os relativos ao equilíbrio de Wright, calculados a partir da frequência alélica nas plantas. Esses cálculos foram possíveis em decorrência das estimativas das taxas de cruzamento das populações. Foram adotados três valores de taxa de cruzamento, correspondendo, um, ao valor determinado experimentalmente e os outros a esse valor mais e menos o desvio padrão.

5.2a.1. Tendências das frequências genotípicas na população o2

As figuras 12.1 e 12.2 fornecem elementos para a compreensão do comportamento da frequência do alelo o2, apresentado na figura 11.

A figura 12.1 mostra a frequência de plantas homozigotas recessivas nas populações adultas e os valores esperados, representando os componentes de viabilidade do ciclo vital.

A figura 12.2 ilustra a ação dos componentes de fertilidade do ciclo. Apresenta a frequência de sementes de endosperma mutante formadas a cada geração e os valores esperados.

Figura 12.1. Valores esperados (frequência nas sementes plantadas) e observados para a frequência de plantas **o2o2** das gerações F2 a F6, com resultados dos testes de χ^2 (*)

Figura 12.2. Valores esperados (equilíbrio de Wright) e observados para a frequência de sementes **o2o2** das gerações F3 a F7, com resultados dos testes de χ^2 para a frequência esperada de valor intermediário em cada geração (*)

* Os valores abaixo do eixo horizontal correspondem à probabilidade nos testes.

Figura 12.1

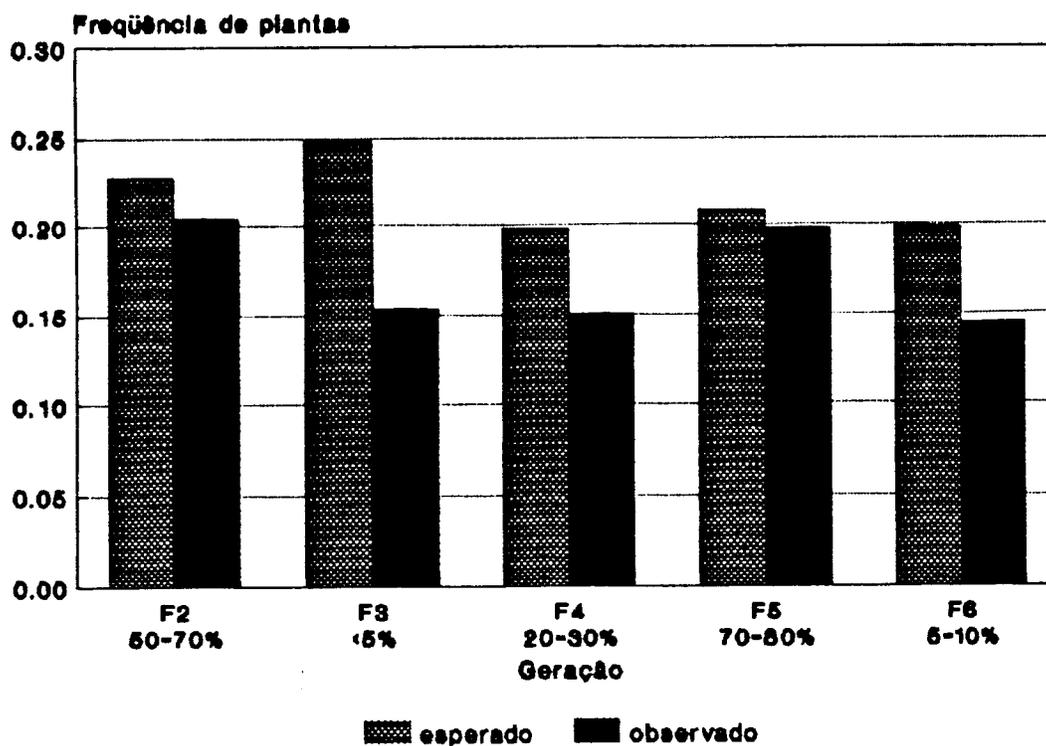
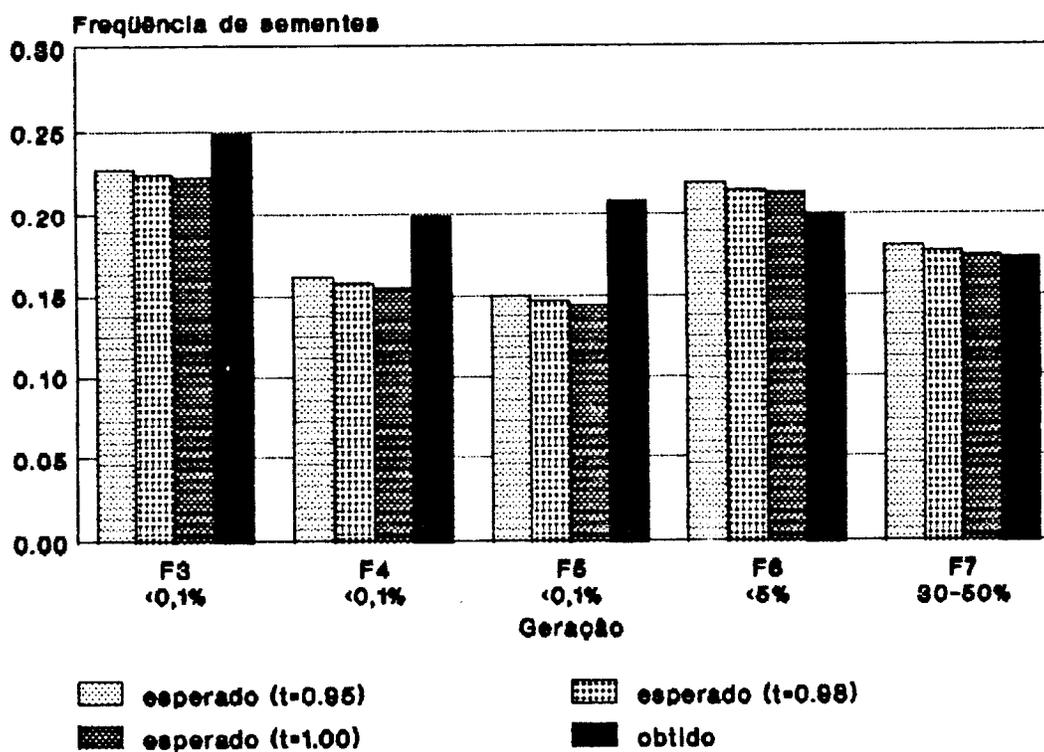


Figura 12.2

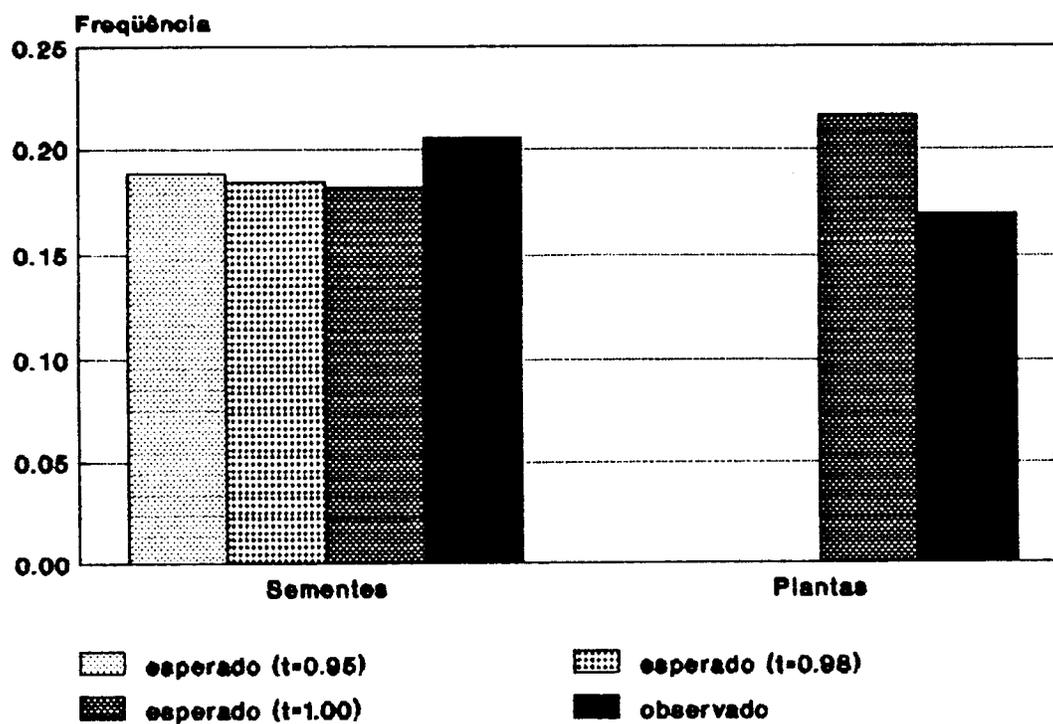


Na figura 12.1 vemos que a frequência das plantas homozigotas recessivas esteve sempre abaixo da esperada. O fato dos resultados dos testes de χ^2 serem na maioria não significativos pode ser atribuído em parte ao baixo número de plantas nas amostras (tabela 8), o que torna aquele teste pouco exigente. Porém a concordância dos resultados nas várias gerações sugere que as plantas originadas de sementes de endosperma mutante apresentam certa desvantagem em relação às sementes normais nos componentes de viabilidade do ciclo vital.

Por outro lado, as frequências de sementes de endosperma mutante formadas, apresentadas na figura 12.2, mostram uma tendência a serem maiores que os valores esperados. Nas três primeiras gerações essas diferenças foram marcantes, apesar de terem desaparecido nas duas últimas gerações. Esses resultados sugerem alguma vantagem dos homozigotos recessivos com relação aos componentes de fertilidade.

Para melhor ilustrar as tendências notadas em cada fase do ciclo vital, na figura 12.3 é apresentada a média das frequências de sementes mutantes nas amostras das gerações F3 a F7 e a média das frequências de plantas homozigotas recessivas nas amostras das gerações F2 a F6.

Figura 12.3. Médias dos valores esperados e observados, entre as gerações F2 e F7, para as frequências de sementes e de plantas o2o2. Os valores esperados para sementes se referem aos decorrentes do equilíbrio de Wright e para plantas, à frequência nas sementes plantadas.



O comportamento antagônico do homozigoto recessivo, apresentando vantagem com relação aos componentes de fertilidade e desvantagem ligeiramente mais intensa nos componentes de viabilidade, explica a tendência verificada na curva de frequência do alelo mostrada na figura 11. Essa curva se manteve abaixo do valor inicial, porém sem se afastar muito deste valor. Ao longo de um maior número de gerações a frequência do alelo **sh2** poderá cair, provavelmente de maneira gradativa. Nesse pequeno número de gerações analisadas, entretanto, tem-se uma aparente situação de polimorfismo transitório.

5.2a.2. Tendências das frequências genotípicas na população **sh2**

A tabela 8 e a figura 11 mostram que a frequência do alelo **sh2** teve queda acentuada e contínua, indo de 0.50 para 0.13 em apenas cinco gerações. A análise das frequências de homozigotos recessivos nas plantas adultas e entre as sementes produzidas, mostradas respectivamente nas figuras 13.1 e 13.2, fornece elementos para a compreensão da alteração da frequência do alelo.

Figura 13.1. Valores esperados (frequência nas sementes plantadas) e observados para a frequência de plantas sh^2sh^2 das gerações F2 a F6, com resultados dos testes de χ^2 (*)

Figura 13.2. Valores esperados (equilíbrio de Wright) e observados para a frequência de sementes sh^2sh^2 das gerações F3 a F7, com resultados dos testes de χ^2 para a frequência esperada de valor intermediário em cada geração (*)

* Os valores abaixo do eixo horizontal correspondem à probabilidade nos testes.

Figura 15.1

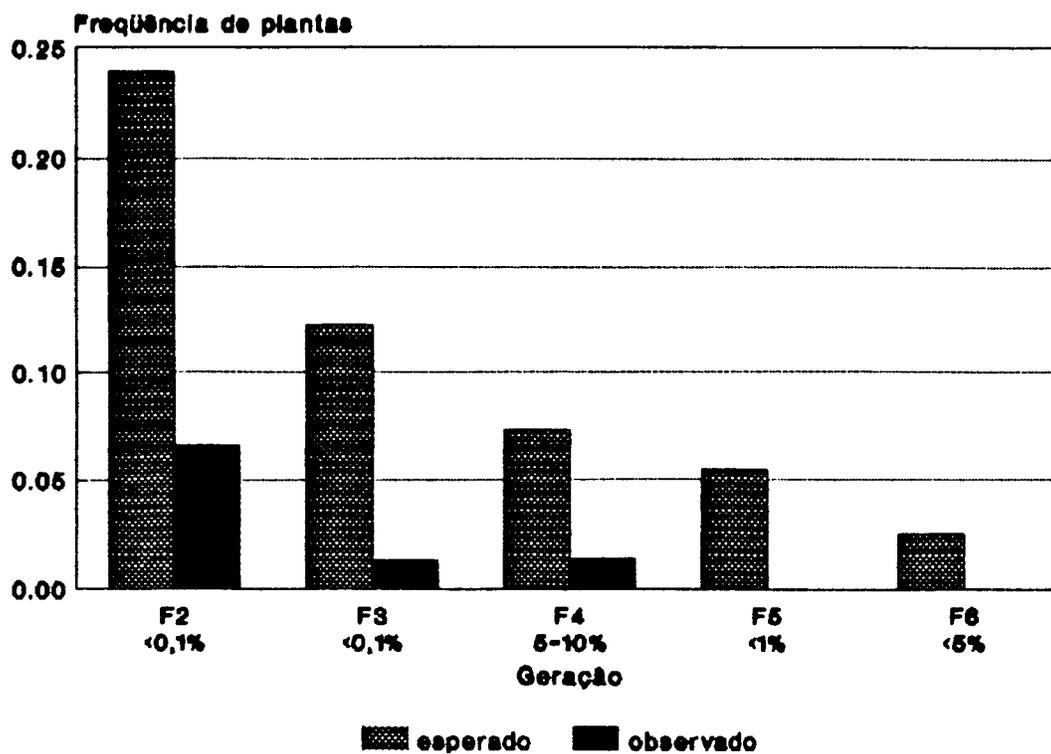
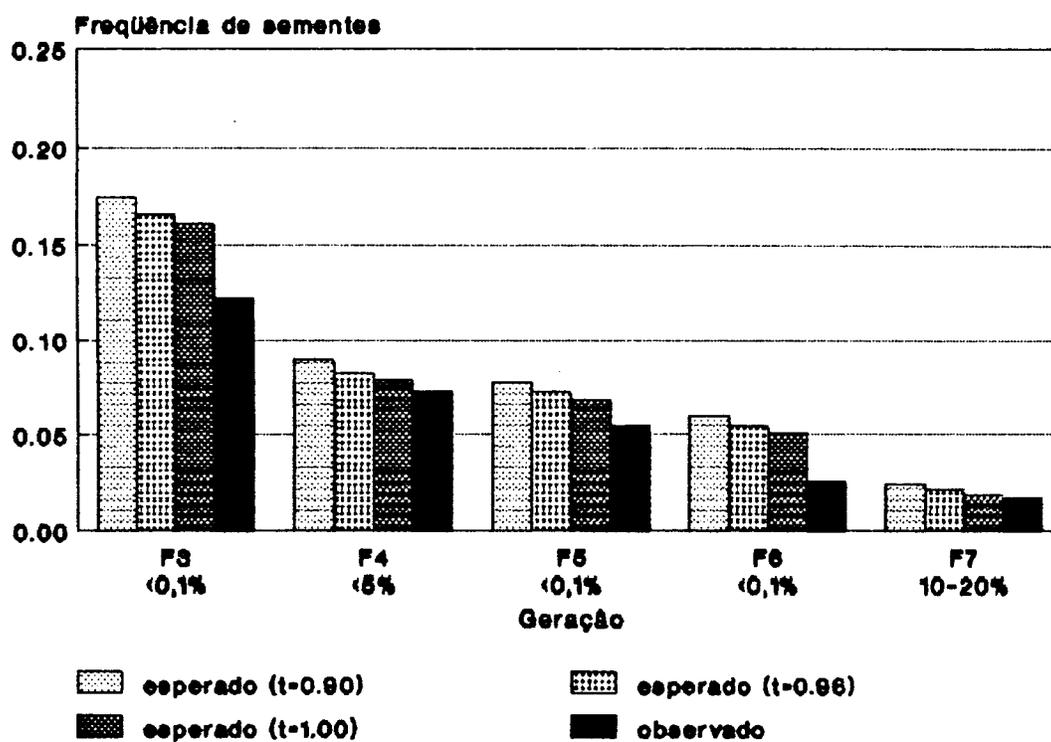


Figura 15.2



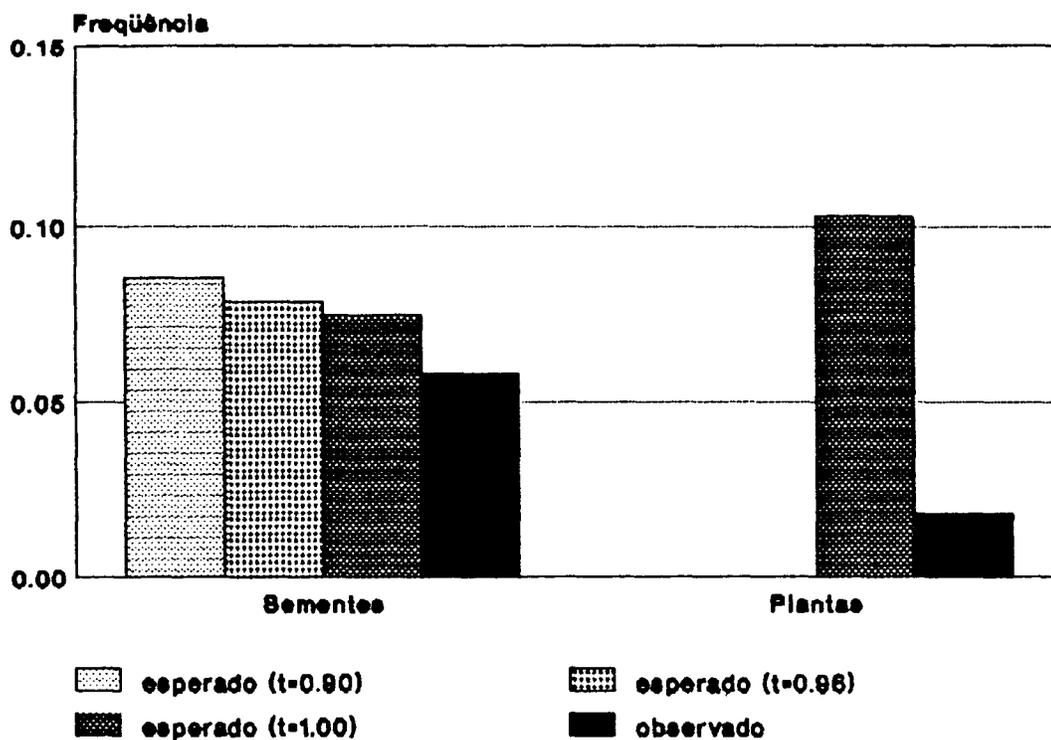
A figura 13.1 mostra que as plantas homozigotas recessivas acusaram uma frequência acentuadamente mais baixa que a frequência de sementes de endosperma mutante que lhes deram origem, em todas as gerações, indicando a grande importância dos componentes de viabilidade na determinação das frequências dos mutantes nessa população. O resultado não significativo para plantas F4 pode ser explicado pelo pequeno número de plantas na amostra, que nessa geração foi de 73 (tabela 8).

Na outra fase do ciclo de vida, referente aos componentes de fertilidade e representada na figura 13.2, ocorre também desvantagem dos indivíduos **sh2sh2**, evidenciada pela produção de sementes abaixo do valor esperado. Essa desvantagem, no entanto, não é tão acentuada como a mostrada nos componentes de viabilidade.

Ao longo do ciclo vital, portanto, a desvantagem nos componentes de viabilidade se soma à desvantagem nos componentes de fertilidade, provocando a queda do alelo **sh2** de maneira rápida como foi mostrado na figura 11.

A figura 13.3, que mostra as médias das frequências de plantas e de sementes **sh2sh2** nas várias gerações, ilustra bem o efeito da intensidade da seleção contra o homozigoto recessivo nas duas fases do ciclo de vida.

Figura 13.3. Médias dos valores esperados e observados, entre as gerações F2 e F7, para as freqüências de sementes e de plantas sh_2sh_2 . Os valores esperados para sementes se referem aos decorrentes do equilíbrio de Wright e para plantas, à freqüência nas sementes plantadas.



5.2a.3. Tendências das frequências genotípicas na população **su**

A frequência do alelo **su**, como foi mostrado na tabela 8 e na figura 11, apresentou queda contínua ao longo das gerações analisadas. A queda, entretanto, não foi tão drástica como a do outro mutante de milho doce estudado, o **sh2**, pois a frequência mais baixa desse último atingiu 0,13, em F6, enquanto o **su** chegou a 0,28 nessa geração.

Os gráficos dos valores esperados e observados para plantas e sementes homozigotas recessivas, de F2 a F7, são apresentados nas figuras 14.1 e 14.2.

Figura 14.1. Valores esperados (frequência nas sementes plantadas) e observados para a frequência de plantas **susu** das gerações F2 a F6, com resultados dos testes de χ^2 (*)

Figura 14.2. Valores esperados (equilíbrio de Wright) e observados para a frequência de sementes **susu** das gerações F3 a F7, com resultados dos testes de χ^2 para a frequência esperada de valor intermediário em cada geração (*)

* Os valores abaixo do eixo horizontal correspondem à probabilidade nos testes.

Figura 14.1

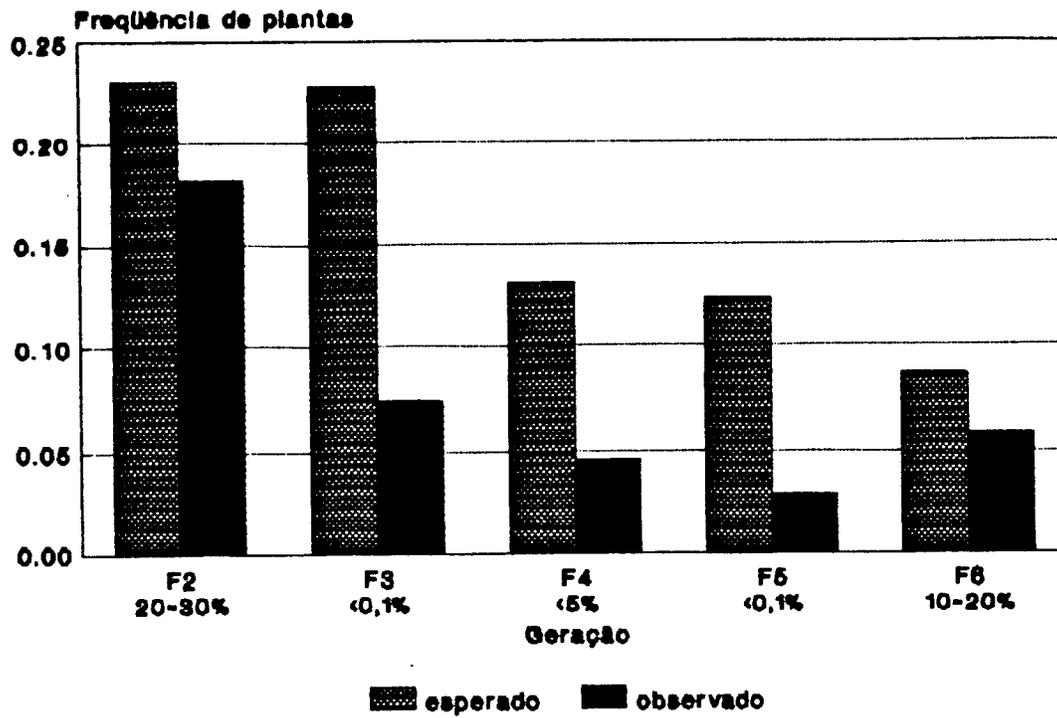
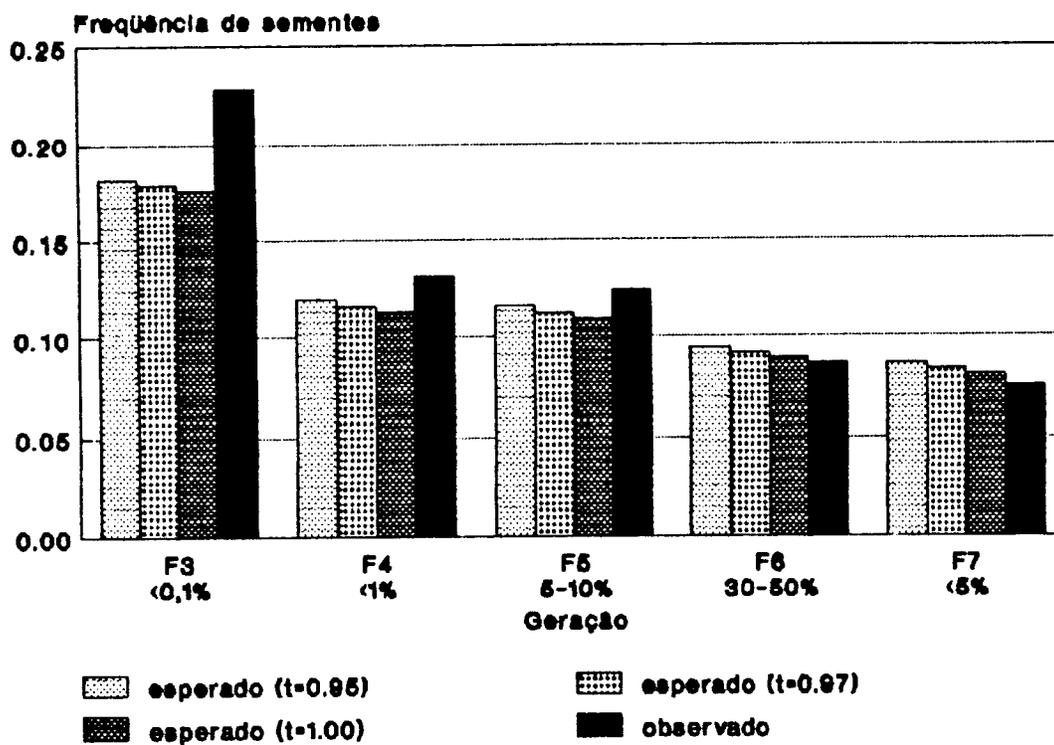


Figura 14.2

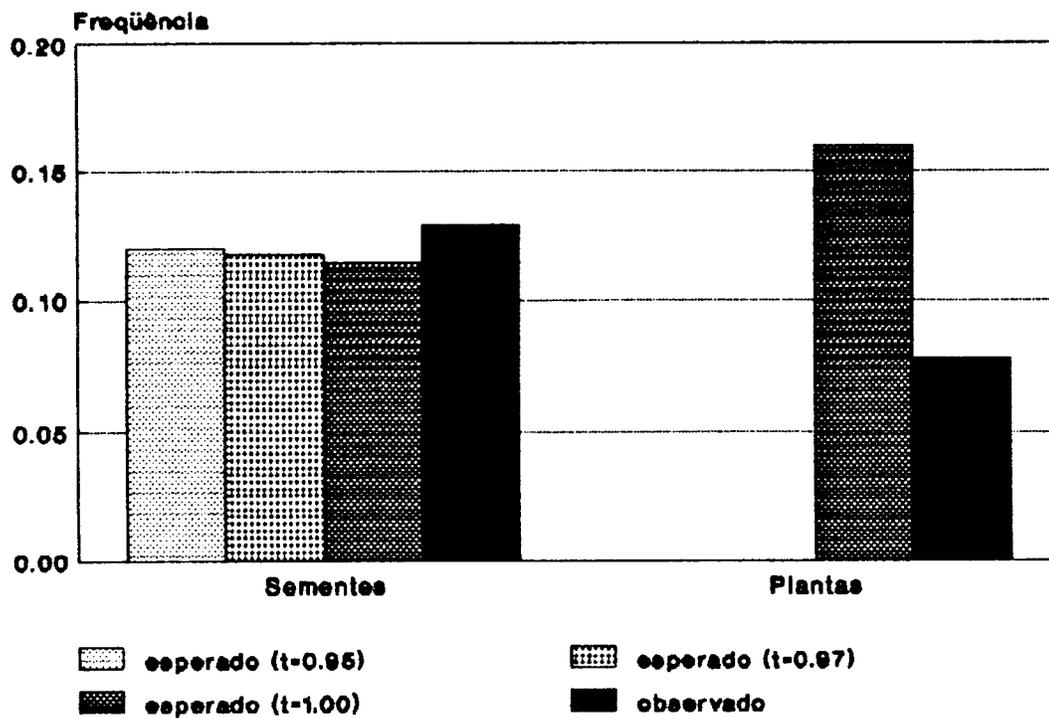


Na população *su* as frequências estimadas de plantas homozigotas recessivas (figura 14.1), se apresentaram bastante abaixo dos valores esperados, em todas as gerações. Os dois resultados não significativos para os testes de χ^2 , em F2 e F6, podem novamente ser explicados pelo pequeno tamanho da amostra. Porém a concordância dos resultados permite concluir que também nesta população os componentes de viabilidade são de grande importância na definição das frequências genotípicas das plantas.

Surpreendentemente, porém, as frequências das sementes de endosperma mutante produzidas ficaram acima dos valores esperados em F3 e F4 (figura 14.2). Assim, ficou caracterizada uma pequena vantagem do homozigoto recessivo com relação aos componentes de fertilidade do ciclo vital no período estudado. Repetiu-se aqui, portanto, um padrão já verificado para os indivíduos *o2o2*, isto é, a ocorrência de seleção com sentido positivo em uma fase e negativo em outra.

A figura 14.3, que mostra a média das frequências de homozigotos recessivos nas plantas adultas e nas sementes produzidas, nas várias gerações estudadas, permite uma melhor ilustração da ação das forças seletivas nas duas fases do ciclo.

Figura 14.3. Médias dos valores esperados e observados, entre as gerações F2 e F7, para as freqüências de sementes e de plantas susu. Os valores esperados para sementes se referem aos decorrentes do equilíbrio de Wright e para plantas, à freqüência nas sementes plantadas.



Pela análise da figura 14.3 vemos que, ao contrário da população o2, em que as diferenças determinadas por componentes de viabilidade e de fertilidade quase se anularam, na população su a redução em plantas sobrepujou grandemente o pequeno aumento em sementes, levando à redução sistemática da frequência do alelo su, de 0,50, valor inicial, para 0,28 em F6, como foi visto na tabela 8 e na figura 11.

5.2a.4. Tendências das frequências genotípicas na população wx

A frequência do alelo wx ao longo das gerações estudadas oscilou um pouco acima de 0,50, caindo abaixo desse valor apenas nas plantas F6. Os gráficos que representam os componentes de viabilidade e de fertilidade do ciclo vital são apresentados nas figuras 15.1 e 15.2 respectivamente.

Figura 15.1. Valores esperados (frequência nas sementes plantadas) e observados para a frequência de plantas wxwx das gerações F2 a F6, com resultados dos testes de χ^2 (*)

Figura 15.2. Valores esperados (equilíbrio de Wright) e observados para a frequência de sementes wxwx das gerações F3 a F7, com resultados dos testes de χ^2 para a frequência esperada de valor intermediário em cada geração (*)

* Os valores abaixo do eixo horizontal correspondem à probabilidade nos testes.

Figura 15.1

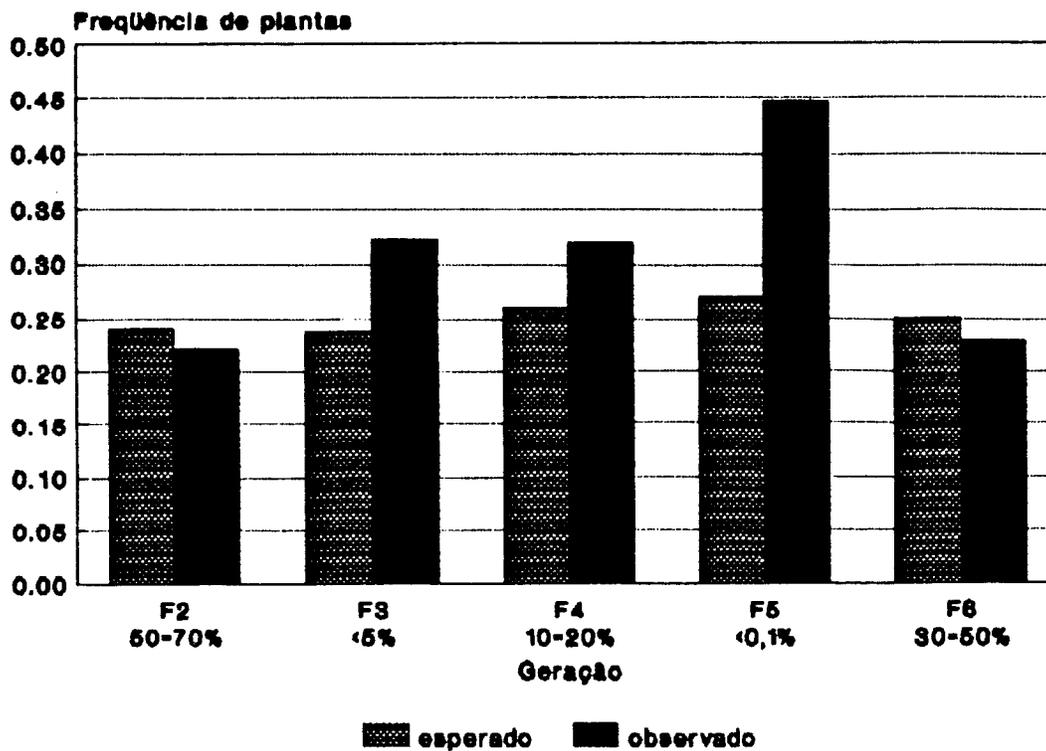
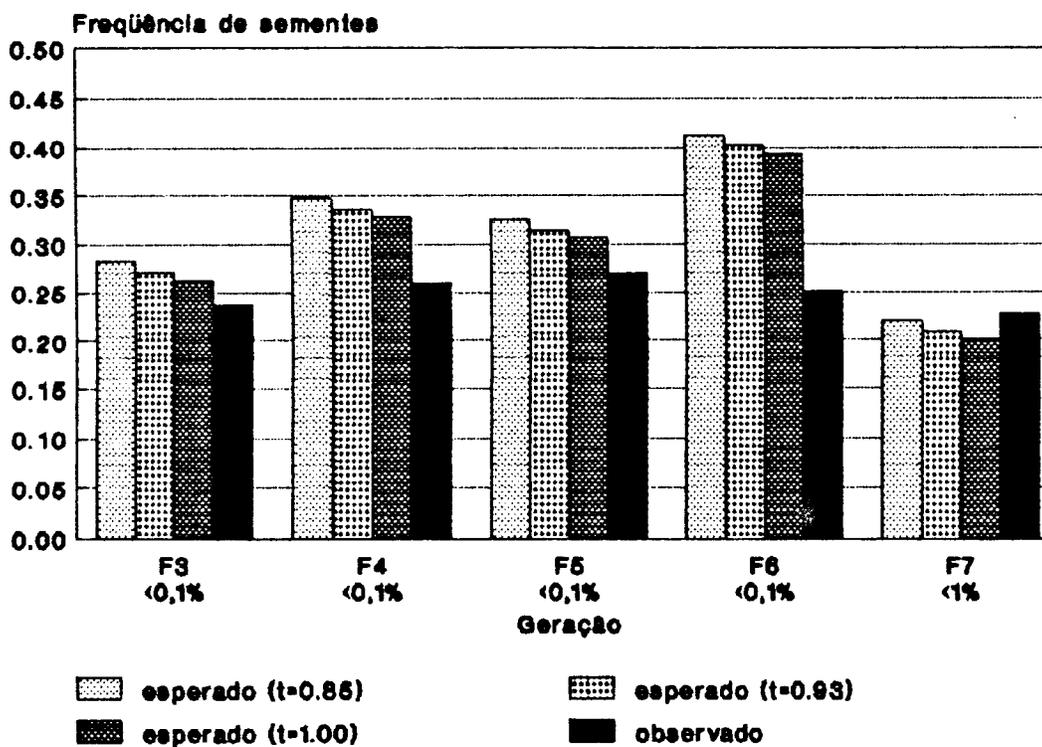


Figura 15.2

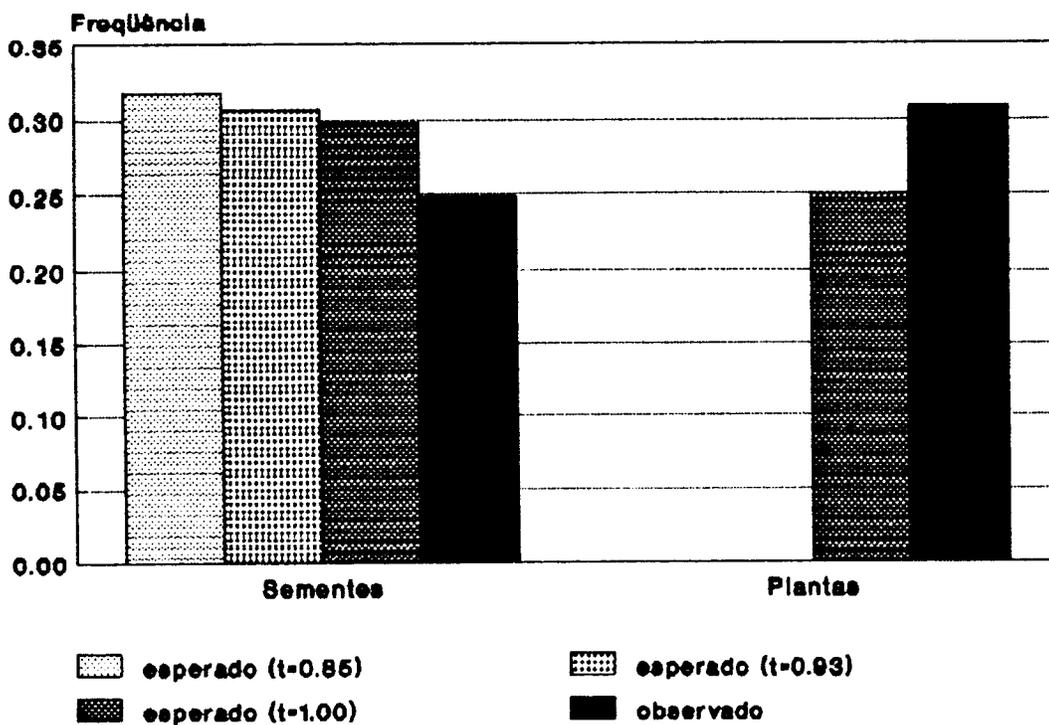


Na figura 15.1 vemos que, apesar das pequenas diferenças para menos registradas entre os valores esperados e observados em plantas F2 e F6, houve uma tendência nessa fase, relacionada com os componentes de viabilidade do ciclo, para aumento na freqüência de homozigotos recessivos. Em F5 esse aumento foi bastante acentuado, pois as plantas apresentaram freqüência de 0,45, enquanto o esperado era 0,27, correspondente à freqüência de sementes mutantes plantadas (tabela 7). Essa grande discrepância ocorreu na geração em que as plantas foram seriamente atacadas por larvas de Diabrotica, o que parece ter beneficiado as plantas provindas de sementes de endosperma mutante.

Com relação às sementes produzidas houve, inversamente, uma tendência para os homozigotos recessivos mostrarem freqüência abaixo da esperada, com exceção da geração F7. A maior discrepância entre valores observados e esperados ocorreu em sementes F6, em que a freqüência foi de 0,25 enquanto que o esperado estava entre 0,41 e 0,39. Isso ocorreu na geração afetada pelas larvas já citadas, com plantas mal desenvolvidas e produção de grãos prejudicada.

De maneira geral, vemos que a freqüência dos indivíduos wxwx mostrou tendências opostas às dos indivíduos oo2o2, isto é, aumento na fase entre semente e planta adulta e diminuição entre plantas e sementes por elas produzidas, como é visto na figura 15.3.

Figura 15.3. Médias dos valores esperados e observados, entre as gerações F2 e F7, para as frequências de sementes e de plantas $wxwx$. Os valores esperados para sementes se referem aos decorrentes do equilíbrio de Wright e para plantas, à frequência nas sementes plantadas.



5.3. FATORES QUE PODEM INFLUENCIAR AS FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS NAS POPULAÇÕES

As estimativas de frequência de indivíduos homozigotos recessivos para os mutantes de endosperma, nas duas fases do ciclo de vida, nas quatro populações estudadas, indicaram comportamentos diferenciados dessas frequências.

Na tentativa de identificar fatores que pudessem explicar esses comportamentos, foram estudados os padrões de segregação dos mutantes em espigas resultantes de plantas heterozigotas autofecundadas, bem como características de plantas em ensaios de campo e de laboratório.

5.3a. Segregação de sementes de endosperma normal e mutante em espigas de plantas heterozigotas autofecundadas

As frequências de sementes de endosperma mutante em espigas produzidas por plantas heterozigotas autofecundadas, por geração e no total de sementes analisadas das gerações F2 a F7, são mostradas na tabela 9. Testes de χ^2 foram aplicados sobre os resultados, tomando-se como valores esperados os decorrentes da proporção de 3:1.

Tabela 9. Total de grãos analisados em 50 espigas F2 e 20 espigas de F3 a F7, obtidas por autofecundação, mês do plantio, proporção de grãos de endosperma mutante e nível de probabilidade do teste de χ^2 para a segregação esperada de 3 grãos normais : 1 grão de endosperma mutante

	Total de grãos	Plantio	Grãos mutantes	χ^2
Pop. o2				
F2	21 658	Agosto	0,2476	0,30 < P < 0,50
F3	4 573	Fevereiro	0,2355	0,02 < P < 0,05 *
F4	7 157	Agosto	0,2437	0,20 < P < 0,30
F5	2 946	Fevereiro	0,2081	P < 0,001 ***
F6	6 542	Agosto	0,2524	0,50 < P < 0,70
F7	7 299	Agosto	0,2555	0,20 < P < 0,30
Total	50 175		0,2454	0,01 < P < 0,02 *
Pop. sh2				
F2	22 205	Agosto	0,2494	0,80 < P < 0,90
F3	5 152	Fevereiro	0,2440	0,30 < P < 0,50
F4	8 107	Agosto	0,2536	0,30 < P < 0,50
F5 (1)	1 853	Fevereiro	0,2342	0,10 < P < 0,20
F6	6 918	Agosto	0,2482	0,70 < P < 0,80
F7	7 207	Agosto	0,2518	0,70 < P < 0,80
Total	51 442		0,2491	0,50 < P < 0,70
Pop. su				
F2	19 943	Agosto	0,2390	P < 0,001 ***
F3	4 142	Fevereiro	0,2484	0,80 < P < 0,90
F4	7 081	Agosto	0,2553	0,30 < P < 0,50
F5 (1)	1 320	Fevereiro	0,2606	0,30 < P < 0,50
F6	6 511	Agosto	0,2394	0,02 < P < 0,05 *
F7	6 742	Agosto	0,2459	0,30 < P < 0,50
Total	45 739		0,2441	0,001 < P < 0,01 **
Pop. wx				
F2	20 445	Agosto	0,2382	P < 0,001 ***
F3	6 385	Fevereiro	0,2413	0,10 < P < 0,20
F4	6 765	Agosto	0,2619	0,02 < P < 0,05 *
F5 (2)	2 962	Fevereiro	0,2387	0,10 < P < 0,20
F6	5 400	Agosto	0,2383	0,02 < P < 0,05 *
F7	6 998	Agosto	0,2348	0,001 < P < 0,01 **
Total	48 955		0,2414	P < 0,001 ***
(1) 13 espigas			(2) 18 espigas	

Como o total de grãos das gerações F3 a F7 se referiu a 20 espigas, foi ajustado na geração F2 o número de grãos correspondentes a 20 espigas, a partir do total de 50, para facilitar a comparação do número de grãos produzidos nos períodos favorável e desfavorável. Os valores encontrados foram: 8.663 grãos na população o2, 8.882 na população sh2, 7.977 na população su e 8.178 na população wx. Quando comparamos os valores referentes às seis gerações vemos que o número de grãos nas espigas reflete as condições do período em que as plantas se desenvolveram. As espigas F2, F4, F6 e F7, produzidas em período com mais umidade e calor, apresentaram 379,5 grãos em média por espiga, enquanto que as espigas F3 e F5, produzidas em período mais seco e frio, mostraram a média de 203,7 grãos. Esses dados estão em concordância com os referentes à produção total de sementes nos campos isolados, que foram apresentados na figura 10.

A tabela 9 mostra alguns desvios da segregação esperada, que poderiam ser devidos ao funcionamento diferencial do pólen, como foi proposto por Zamir, Tanksley e Jones (1982). Por isso, foi determinada a frequência de sementes de endosperma mutante nas metades superiores e inferiores de 20 das 50 espigas da geração F2 analisadas, nas quatro populações. Frequências diferentes de sementes de endosperma mutante nas duas metades da espiga indicariam a ocorrência de seleção gametofítica por crescimento diferencial de tubos polínicos com diferentes constituições genéticas, como tinha sido admitido

por Jones (1920) e Sari Gorla, Ottaviano e Faini (1975) em milho e como foi também verificado por Radha, Vasudeva, Hedge, Ganeshaiyah e Shaanker (1993) em Vigna unguiculata. Foi aplicado o teste t para amostras pareadas para comparação dessas frequências e os resultados são apresentados na tabela 10.

Tabela 10. Número total de grãos em 20 espigas F2, proporção de mutantes nas metades superiores e inferiores das espigas, valor de t no teste para amostras pareadas e nível de probabilidade do teste

População	Grãos	Superior	Inferior	t	Probabilidade
o2	8 387	0,2548	0,2408	1,5977	0,10 < P < 0,20
sh2	7 848	0,2454	0,2432	0,5287	P > 0,50
su	7 096	0,2399	0,2431	0,4559	P > 0,50
wx	7 553	0,2315	0,2347	0,9786	0,30 < P < 0,40

O teste t mostrou não ocorrer nenhuma diferença significativa entre as frequências de sementes de endosperma mutante nas metades superiores e inferiores das espigas, nas quatro populações, indicando que o crescimento diferencial do tubo polínico não pode ser considerado aqui um fator causador dos desvios observados.

Uma discussão mais detalhada dos desvios na segregação de sementes de endosperma normal e mutante será feita a seguir para cada uma das populações em separado.

5.3a.1. Segregação em espigas de plantas 02o2

Na população o2 houve desvios estatisticamente significativos da segregação esperada nas gerações F3 e F5 (tabela 9). Na geração F3, onde a frequência de mutantes foi de 0,2355, a diferença em relação ao esperado, 0,2500, foi significativa ao nível de 5%. Na geração F5, com frequência de 0,2081, o desvio foi significativo ao nível de 0,1%. Esse desvio acentuado, em sementes F5, contribuiu muito para que a frequência no total de grãos das seis gerações fosse de 0,2454, valor esse significativamente diferente do esperado ao nível de 2%. Deve-se lembrar aqui que o número alto de sementes analisadas, 50.175, torna o teste de χ^2 bastante exigente, o que explica o resultado significativo para um desvio de apenas 0,0046.

Uma possível causa dos desvios verificados nessas duas gerações é a eventual dificuldade encontrada na identificação do fenótipo da semente homozigota recessiva, devida ao efeito de genes modificadores com ação conhecida sobre o alelo *o2*. Esses genes fazem com que ocasionalmente o grão mutante tenha aspecto semelhante ao grão de endosperma normal (Paez, Helm e Zuber 1969), com aspecto vítreo na parte superior, como o grão normal, restringindo o aspecto opaco apenas à região basal. Ou ainda pode apresentar a parte superior com aspecto vítreo com manchas opacas, semelhante ao fenótipo do milho tipo dente de endosperma normal. A ocorrência dessas variações no fenótipo pode fazer com que a frequência observada de sementes de endosperma mutante fique abaixo do seu valor real, o que pode ter sido o caso em nosso trabalho.

Na população *o2* foi notado o efeito de modificadores nas sementes F3 e, de maneira bastante acentuada, nas sementes F5, que apresentaram o maior desvio da segregação esperada. Esse efeito pode explicar, em parte, os desvios constatados na frequência de mutantes nessas gerações. Como ambas foram colhidas no inverno, podemos sugerir a ocorrência de um possível efeito das condições desfavoráveis na expressão dos modificadores do loco *o2*.

A dificuldade na identificação do fenótipo opaco das sementes, nas gerações F3 e F5, não deve ter influenciado a estimativa da frequência de sementes de endosperma mutante nas amostras para o plantio das populações.

Nessas amostras as sementes estavam debulhadas, condição que facilita a verificação do fenótipo do endosperma na sua parte basal, onde, mesmo em sementes mutantes modificadas, o aspecto opaco é sempre aparente. Além do mais, nas sementes que foram utilizadas para a obtenção das populações em campos isolados, as das gerações F3 e F5 apresentaram frequência acima da esperada, como foi mostrado na figura 12.2. O fenótipo modificado poderia explicar o número de sementes mutantes das gerações F6 e F7, que ficou abaixo do esperado, diferentemente das demais gerações. Porém nessas gerações não foi notado o efeito de modificadores. Por outro lado, uma estimativa do número de sementes mutantes abaixo do seu valor real, nas amostras para o plantio nas gerações F3 e F5, diminuiria o valor esperado de plantas adultas. A figura 12.1 mostrou, porém, que este valor está bastante acima do valor observado. O efeito dos fatores modificadores pode ter, no entanto, influência real sobre a frequência final dos alelos do loco o_2 , uma vez que esses fatores tendem a aproximar o fenótipo mutante do fenótipo normal das sementes, o que provavelmente tende a aproximar também seus valores adaptativos. Porém, como esse efeito ocorreu em um pequeno número de sementes, acreditamos que tenha sido desprezível com relação à frequência nas plantas resultantes.

Devemos lembrar ainda que a frequência gênica dos mutantes, apresentada na tabela 8 e na figura 11, foi estimada a partir da frequência genotípica nas plantas

adultas, evidenciada a partir do tipo de espiga produzida por autofecundação, não tendo sido, portanto, influenciada por eventuais problemas de identificação do fenótipo das sementes.

Trabalhando com o loco *o2*, Sari Gorla, Bellintani e Ottaviano (1976) usaram os alelos *O2* e *o2* como marcadores em misturas de pólen para estudar o efeito do genótipo da planta mãe sobre a taxa de crescimento do tubo polínico. Não encontraram diferenças entre tubos com alelos distintos em plantas com o mesmo genótipo. Mais tarde, Sari Gorla e Rovida (1980), usando também o loco *o2* como marcador, encontraram taxa de germinação mais baixa para o pólen *o2* na autofecundação de indivíduos heterozigotos, tendo as sementes opacas a frequência de 0,2278 em um total de 4.746 sementes, resultados esses semelhantes aos nossos achados. Assim, outra explicação para as frequências verificadas nas gerações F3 e F5 poderia ser a ocorrência de taxa de germinação mais baixa do pólen *o2*. Esta interpretação, entretanto, não é compatível com o fato das frequências se mostrarem de acordo com os valores esperados nas demais gerações. Esses autores não encontraram diferenças nas taxas de crescimento de tubos polínicos.

Portanto, no estudo da segregação de sementes de endosperma normal e mutante produzidas por plantas *O2o2* autofecundadas não foi evidenciado nenhum fator seletivo que afetasse de maneira efetiva essa segregação e que assim tivesse efeito sobre as alterações de frequência ocorridas no loco *o2* nas gerações sucessivas desenvolvidas nos campos

isolados. Considerando a frequência de mutantes no total de grãos das seis gerações (0,2454), vemos que o desvio foi bastante pequeno, provavelmente sem consequências no comportamento do alelo *o2* mostrado na figura 11.

5.3a.2. Segregação em espigas de plantas *Sh2sh2*

A segregação de sementes normais e mutantes para o loco *sh2* apresentou valores dentro do esperado em todas as gerações, como foi evidenciado na tabela 9. A frequência para o total de grãos das seis gerações analisadas foi de 0,2491, estatisticamente igual ao valor esperado de 0,2500. Portanto, a análise da segregação de sementes normais e mutantes em espigas de plantas *Sh2sh2* permite concluir que na população *sh2* não ocorrem desvios de segregação que possam influenciar as frequências gênicas e genotípicas ao longo das gerações.

5.3a.3. Segregação em espigas de plantas *Susu*

Na população *su* a frequência de sementes de endosperma mutante nas espigas resultantes de autofecundação de plantas heterozigotas (tabela 9) esteve abaixo do valor esperado apenas nas gerações F2 e F6.

O mutante *su*, como o mutante *o2* já discutido, sofre também a ação de fatores modificadores

(Cameron 1947). Sementes *susu* quando maduras se apresentam normalmente bastante contraídas por causa da redução do amido no endosperma. Sob o efeito de modificadores, entretanto, podem mostrar níveis variados de contração. Em alguns casos, a contração se torna muito leve e quase imperceptível. Nestes casos, a condição mutante é evidenciada mais pelo aspecto embaçado do grão do que pela contração, o que dificulta a classificação do fenótipo. Essa dificuldade teve ter ocorrido de maneira mais efetiva apenas nas gerações iniciais, tendo diminuído com a maior familiaridade com o material, nas gerações mais avançadas. Os modificadores nem sempre se manifestam nos materiais com o mutante *su*. Na população analisada, seu efeito foi verificado nas sementes F2, F4, F6 e F7, sendo que nas gerações F3 e F5 ele não foi notado. Aquelas gerações se desenvolveram todas no período mais favorável do ano, sugerindo também aqui a influência de componentes ambientais na expressão dos modificadores. A ocorrência do fenótipo modificado pode explicar, portanto, os desvios verificados nas gerações F2 e F6. Nessas duas gerações, a frequência de sementes mutantes foi 0,24, sendo a esperada 0,25 (tabela 9). Os desvios ocorridos portanto foram pequenos e não devem ter tido consequência considerável no comportamento da curva de frequência do alelo *su* mostrada na figura 11.

Os desvios devidos a dificuldades de identificação do fenótipo de sementes de endosperma mutante podem ter ocorrido também na estimativa de frequência das

sementes produzidas pelas plantas em campos isolados. As sementes F6, como mostra a figura 14.2, foram obtidas com frequência muito semelhante à esperada, ao contrário das gerações anteriores, onde a frequência de mutantes esteve acima da esperada. O mesmo ocorreu com as sementes F7, sendo que nesta geração também foi notado o efeito de modificadores. Podemos admitir, portanto, que a dificuldade na identificação do fenótipo **susu** pode ter sido um determinante importante da qualidade da estimativa da frequência de sementes mutantes obtidas nestas duas gerações, fazendo seu valor ficar um pouco abaixo do valor real.

As amostras em que foi verificada a frequência de sementes produzidas foram as utilizadas para o plantio da geração seguinte. Assim, a frequência de sementes mutantes nelas foi considerada como valor esperado para a frequência de plantas homozigotas recessivas resultantes. Tendo em vista os desvios verificados, nas gerações F2 e F6 os valores esperados podem, portanto, ter ficado um pouco abaixo do valor real. Em todas as gerações estudadas as plantas **susu** ocorreram com frequência abaixo da esperada, como mostrou a figura 14.1, porém nessas duas gerações as discrepâncias entre valores esperados e observados não foram tão acentuadas como nas demais, o que pode ser atribuído em parte à possibilidade dos valores esperados terem sofrido a interferência acima mencionada.

Por outro lado, considerando a frequência de mutantes no total das gerações (tabela 9), o desvio ocorrido, correspondente a uma frequência de 0,2441 para o valor esperado de 0,2500, representa apenas 2,4% desse valor. Além disso, esse desvio engloba os das gerações F2 e F6 que, como vimos, provavelmente são aparentes. Podemos concluir, portanto, que a segregação de sementes normais e mutantes na população su não tem efeito considerável na alteração de frequência do alelo ao longo das gerações.

5.3a.4. Segregação em espigas de plantas Wxwx

Os desvios de segregação verificados com relação a este alelo, nas diferentes gerações, foram freqüentes, como mostra a tabela 9, só não ocorrendo em F3 e F5. Eles foram na maioria negativos, excetuando-se apenas a geração F4, que apresentou frequência de mutantes de 0,2619. Mesmo as gerações F3 e F5, cujas frequências deram resultados não significativos no teste de χ^2 , apresentaram frequências de sementes mutantes menores que 0,25. Em F5 o número de grãos analisados foi bem menor que nas outras gerações, o que pode justificar o resultado não significativo do teste, para a frequência de 0,2387. Os desvios no total de grãos de cada geração não foram acentuados, sendo a frequência desviante mais baixa de valor 0,2348, em sementes F7.

Não é conhecida a ação de fatores modificadores sobre o fenótipo das sementes homozigotas para o mutante wx e são raros na literatura os trabalhos que discutem desvios de segregação neste loco. Brink e MacGillivray (1924), tendo determinado que uma planta $WXwx$ produz gametas Wx e wx em igual quantidade, tanto na micro como na megasporogênese, relataram desvantagem na fertilização por parte do pólen carregando o alelo wx . Esses autores, analisando dados de segregação observados por outros pesquisadores, verificaram desvios significativos no resultado da autofecundação de plantas $Wxwx$ e do cruzamento entre fêmea $wxwx$ e macho $Wxwx$, mas não do cruzamento recíproco. A deficiência na frequência média de sementes $wxwx$ que eles constataram resultou do acúmulo de deficiências nas espigas isoladas, que quando consideradas individualmente não acusaram desvios significativos da proporção esperada. Em seu trabalho, num total de 102.429 grãos resultantes da autofecundação, o mutante apresentou a frequência de 0,2392. No total de 26.653 grãos resultantes do cruzamento entre fêmea $wxwx$ e macho $Wxwx$, a frequência de grãos mutantes foi de 0,4924.

Esses desvios de pequena intensidade relatados por Brink e MacGillivray (1924) foram confirmados por Sprague (1933), que admitiu apenas duas hipóteses para explicá-los: taxa de crescimento diferencial do tubo polínico e diferenças no tempo requerido para germinação do grão de pólen. Este autor não observou diferenças na frequência de $wxwx$ na

parte superior e inferior da espiga e, analisando diretamente o crescimento de gametófitos Wx e wx , não encontrou diferenças entre suas taxas de crescimento. Porém verificou que o tempo requerido para germinação do pólen wx e estabelecimento do tubo polínico é consistentemente maior que para o pólen Wx , sendo essas diferenças aparentemente independentes do genótipo do estiloestigma.

Logo após o trabalho de Brink e MacGillivray (1924), Mangelsdorf e Jones (1926) admitiram a ação de um ou mais fatores gametofíticos ligados ao loco wx como causa possível dos desvios na frequência esperada de sementes $wxwx$. Porém Eyster e Robinson (1936) verificaram alterações profundas na segregação de locos do cromossoma 9 devidas ao fator gametofítico $ga8$ a eles ligado. O loco wx se localiza na posição 56 e o $ga8$ na posição 50 deste cromossoma (Maize Genetics Cooperation Newsletter, vol. 65, pp 129-144, 1991).

Como no nosso trabalho os desvios ocorridos foram de pequena intensidade, não se pode atribuir aos fatores gametofíticos papel importante nas discrepâncias encontradas. Portanto, a situação por nós estudada parece ser semelhante às analisadas por Brink e MacGillivray (1924) e por Sprague (1933). Desvios pequenos podem não ser significativos no teste de χ^2 em amostras pequenas, no entanto, se forem consistentes em todas as amostras, com o mesmo sentido, serão significativos no χ^2 do total, como no trabalho citado. No nosso material, o

χ^2 do total das gerações, com frequência de 0,2414, foi altamente significativo, apesar do desvio positivo observado na geração F4.

Esses resultados indicam a ocorrência de desvantagem do pólen wx, causando pequena diminuição na frequência de sementes wxwx. Dessa maneira, poderíamos ter aqui a ocorrência de seleção gametofítica propriamente dita, segundo o conceito de Harding e Tucker (1969) anteriormente exposto. É interessante lembrar que Sari Gorla, Pe, Mulcahy e Ottaviano (1992) condicionaram a ocorrência de seleção gametofítica à expressão de fatores do genoma do grão de pólen no gametófito masculino. No caso do loco wx, essa expressão é conhecida, sendo possível identificar os grãos de pólen com o alelo wx através do teste de iodina, que nesse caso mantém a cor castanha, como ocorre com o endosperma das sementes homozigotas para esse alelo.

O desvio da geração F4, entretanto, requer outra explicação. Nesta geração, quatro espigas apresentaram desvios, todos eles positivos, relativos às frequências de 0,3039 (com desvio significativo ao nível de 1%), 0,3042 (ao nível de 5%), 0,3324 (ao nível de 0,1%) e 0,3713 (ao nível de 0,1%). Estes desvios levaram a proporção média de mutantes na amostra para 0,2619, sendo esta a única geração em que esta proporção ficou acima do valor esperado. A proporção de sementes mutantes calculada nessa geração, com a exclusão dessas espigas é de 0,2423, semelhante à das demais gerações,

sugerindo que, excluído algum fator desconhecido que esporadicamente causa desvios acentuados em espigas individuais, nessa geração também ocorre a desvantagem do pólen com o alelo wx, determinando pequena diminuição na frequência de sementes wxwx.

Outra causa de desvio poderia ser a ocorrência de transposons no loco wx. Schwartz (1986) menciona o aparecimento de altas frequências de sementes com fenótipo completamente normal por excisão de elementos de transposição nesse loco. Porém é difícil notar a ocorrência de setores revertentes, devidos a eventos de transposição, no loco wx. Para isso é necessário lixar a semente, para expor o endosperma e fazer o teste de iodina na região lixada. Dessa maneira, setores revertentes no nosso material poderiam passar despercebidos. A ocorrência de elementos de transposição como possíveis causadores de alguns dos desvios verificados na segregação de espigas Wxwx não pode, portanto, ser descartada. Porém, por ocorrerem com frequência baixa e por provavelmente provocarem desvios tanto positivos como negativos, não causariam efeito significativo nas alterações da frequência gênica ao longo das gerações, nas populações em campos isolados.

A análise da segregação em espigas heterozigotas autofecundadas, nas quatro populações estudadas, mostrou, portanto, que a seleção gametofítica pode ter produzido desvios efetivos de segregação apenas na população

wx, devidos ao maior tempo requerido pelo pólen wx para germinar no estiloestigma.

Na figura 15.2 vimos que as sementes wxwx foram produzidas nas plantas dos campos isolados com frequência abaixo da esperada em todas as gerações, exceto em F7, o que pode ser atribuído, portanto, pelo menos em parte, à desvantagem do pólen portador do alelo wx, como ficou evidenciado.

Considerando essa informação com relação aos experimentos de determinação da taxa de cruzamento, vemos que a desvantagem evidenciada no pólen wx poderia resultar em um menor número de autofecundações, elevando o valor da taxa de cruzamento. Porém essa população mostrou a menor taxa, ou seja, 92,7%. Isso pode ser explicado pelo fato da desvantagem do pólen wx ser pequena e conseqüentemente ser evidenciada somente quando acumulada por várias gerações.

O valor de 0,2414 para a frequência de mutantes no total de grãos das seis gerações analisadas, incluindo o desvio positivo da geração F4, corresponde a 3,4% do valor esperado de 0,2500.

5.3b. Características das plantas avaliadas em ensaios de campo

A finalidade da realização dos ensaios, tanto de campo como de laboratório, foi obter elementos que permitissem explicar as alterações nas frequências gênicas e genotípicas dos mutantes de endosperma nas populações.

Os ensaios de campo, de competição entre parcelas e de competição dentro de parcelas, foram instalados em outubro e colhidos em fevereiro, período este considerado o mais favorável para o pleno desenvolvimento da planta, pelas condições mais adequadas de umidade, temperatura e fotoperíodo. O plantio em período menos favorável pode afetar negativamente as características das plantas, não só pelas condições climáticas marginais como também pela maior ocorrência de patógenos, parasitas e predadores.

5.3b.1. Ensaio de competição entre parcelas

Os resultados da comparação entre plantas provenientes de sementes de endosperma normal e de endosperma mutante neste ensaio, relativos às características taxa de germinação, data de florescimento e altura da planta são mostrados na tabela 11.

Tabela 11. Médias da taxa de germinação (em porcentagem), data de florescimento (em dias após o plantio) e altura (em cm), de plantas providas de sementes de endosperma normal e mutante, no ensaio de campo sem competição e coeficientes de variação do experimento (CV)

	Taxa de germinação	Data de florescimento	Altura das plantas
População o2			
Normal	82,6 a	78,3 a	187,82 a
Mutante	76,9 b	79,3 a	188,20 a
População sh2			
Normal	80,0 a	77,9 a	179,00 a
Mutante	15,1 b	81,6 b	164,34 b
População su			
Normal	77,7 a	77,5 a	193,68 a
Mutante	71,2 a	78,4 a	189,66 a
População wx			
Normal	83,1 a	78,1 a	182,66 a
Mutante	73,5 b	77,9 a	185,54 a
CV	9,10	2,17	13,02

Médias com letras iguais na mesma coluna, dentro da mesma população, não diferem entre si, ao nível de 5%, segundo o teste de Tukey

Nas populações **o2** e **wx** ocorreram diferenças significativas entre sementes de endosperma normal e mutante apenas com relação à taxa de germinação, tendo as sementes de endosperma mutante taxa menor. As diferenças, porém, não foram muito acentuadas. A taxa de sementes normais, na população **wx**, foi de 82,6%, contra 76,9% das sementes mutantes e 83,1% e 73,5%, respectivamente, na população **o2**. Essas diferenças pequenas sugerem que a taxa de germinação desses mutantes deve ter um efeito leve sobre a frequência desses alelos nas populações. Na população **o2** ocorreu pequena redução na frequência de homozigotos recessivos na fase compreendida entre sementes e plantas adultas (figura 12.1), o que poderia ser atribuído em parte à menor taxa de germinação das sementes mutantes, evidenciada nesse ensaio. Porém na população **wx** a frequência de mutantes aumentou nessa fase (figura 15.1), mostrando que a menor taxa de germinação verificada deve ter sido contrabalançada por um outro fator não identificado, atuando em sentido contrário.

Já a população **sh2** apresentou diferenças significativas entre as plantas originadas de sementes de endosperma normal e aquelas providas de sementes de endosperma mutante com relação às três características analisadas. A taxa de germinação extremamente baixa de sementes **sh²sh²** (15.1%) deve se constituir em fator importante nas alterações de frequência do alelo **sh2**. A figura 13.1 mostrou que ocorre redução drástica de homozigotos recessivos na fase do ciclo

vital relacionada aos componentes de viabilidade. Entre esses componentes, a taxa de germinação deve ser, portanto, um dos mais importantes para explicar essa redução. O genótipo homocigoto recessivo afeta também o desenvolvimento da planta, causando atraso na data de florescimento e uma redução na altura em relação às plantas originadas de sementes de endosperma normal. Assim, essas alterações se relacionariam aos componentes de fertilidade, pois as plantas sh_2sh_2 , já em menor frequência, sendo mais tardias teriam uma tendência a florescer mais isoladamente em relação às demais da população, o que poderia reduzir a contribuição de gametas sh_2 para a formação da geração seguinte. Por outro lado, o tempo requerido pelas plantas sh_2sh_2 para florescer, com um atraso de cerca de quatro dias (tabela 11), poderia levar a um aumento na frequência de homocigotos recessivos, pela endogamia assim propiciada. No entanto, um aumento efetivo seria muito pequeno em comparação com a diminuição na frequência de plantas recessivas determinada pela reduzida taxa de germinação da semente mutante. O porte das plantas homocigotas recessivas, cerca de 15cm mais baixas (tabela 11), poderia também, indiretamente, ter refletido em prejuízo na produção de gametas e de sementes, pelo maior sombreamento que sofrem por parte das plantas maiores de fenótipo dominante, com conseqüente diminuição da frequência do alelo na população. Esses fatores poderiam, portanto, ser responsáveis em parte pela redução no número de sementes de endosperma mutante produzidas, com foi mostrado na

figura 13.2.

Finalmente, na população *su* não foi verificada nenhuma diferença significativa com relação às características analisadas nesse experimento, de maneira a fornecer elementos que pudessem explicar a redução registrada na frequência do alelo *su* pelos componentes de viabilidade e aumento pelos de fertilidade, representados na figura 14.3.

5.3b.2. Ensaio de competição dentro de parcelas

Das características analisadas neste ensaio, chamado de Ensaio Com Competição, apenas o número de folhas 40 dias após o plantio e a altura da planta se referem aos componentes de viabilidade do ciclo vital. As demais características, como também indiretamente a altura, estão relacionadas aos componentes de fertilidade. O intervalo entre a polinização manual e o início da ântese, medindo o grau de protandria, poderia se relacionar à frequência dos tipos de sementes formadas, pois um intervalo menor poderia oferecer maior oportunidade para a ocorrência de autofecundações, favorecendo a formação de sementes de endosperma mutante.

Os resultados do teste de Tukey aplicado às médias das características de plantas homozigotas dominantes, heterozigotas e homozigotas recessivas de cada população, em competição na mesma parcela experimental, são apresentados na tabela 12.

Tabela 12. Médias e coeficiente de variação das características número de folhas 40 dias após o plantio (folhas), número de dias entre o plantio e o início da ântese (ântese), intervalo entre o início da ântese e a polinização manual (protandria), altura da planta no florescimento (altura), índice de inserção da espiga (inserção), número de grãos por planta (grãos) e número de espiguetas na panícula (espig.), em plantas com genótipo homozigoto dominante (D), heterozigoto (H) e homozigoto recessivo (R)

		Pop. o2		Pop. sh2		Pop. su		Pop. wx
		Média		Média		Média		Média
Folhas	R	11,26 a	H	12,19 a	H	11,93 a	D	11,31 a
	D	11,10 a	D	11,84 a	R	11,32 b	H	11,26 a
	H	11,05 a			D	11,19 b	R	10,93 a
C.V.		6,82		5,87		1,99		4,62
Ântese	H	73,27 a	D	72,99 a	D	72,93 a	D	72,93 a
	D	72,89 a	H	71,81 a	R	72,75 a	R	72,85 a
	R	72,77 a			H	71,78 a	H	72,76 a
C.V.		1,14		1,17		0,75		1,31
Protandria	H	3,83 a	D	3,52 a	H	4,39 a	D	4,17 a
	D	3,44 a	H	3,28 a	D	4,11 a	H	3,94 a
	R	3,06 a			R	3,76 a	R	3,74 a
C.V.		24,64		14,05		11,43		11,56
Altura	R	256,76 a	H	239,56 a	D	278,99 a	D	266,77 a
	H	255,59 a	D	239,44 a	H	270,80 a	H	260,51 a
	D	248,60 a			R	261,77 a	R	254,96 a
C.V.		2,45		4,98		2,88		2,05
Inserção	H	0,55 a	D	0,54 a	R	0,54 a	R	0,55 a
	D	0,54 a	H	0,54 a	H	0,54 a	H	0,54 a
	R	0,51 a			D	0,54 a	D	0,52 a
C.V.		4,07		3,03		2,15		3,64
Grãos	H	505,27 a	H	763,61 a	H	549,53 a	H	534,84 a
	D	481,77 a	D	667,78 a	R	541,27 a	D	496,11 a
	R	463,41 a			D	499,16 a	R	492,47 a
C.V.		7,32		6,73		6,39		9,87
Espig.	H	2221,7 a	D	2478,0 a	R	2624,4 a	H	2044,5 a
	R	2098,9 a	H	2472,9 a	D	2555,5 a	R	1948,4 a
	D	1937,2 a			H	2541,5 a	D	1887,6 a
C.V.		16,22		12,70		10,75		10,05

Médias com letras distintas na mesma coluna, para cada característica, diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey

Observa-se uma generalizada ausência de diferenças significativas, com relação às características analisadas, em todas as populações, com exceção de número de folhas 40 dias após o plantio, na população su. Embora esse resultado indique vantagem do heterozigoto, essa diferença é muito pequena para receber atenção neste estudo.

Os resultados deste ensaio, associados aos do ensaio de competição entre parcelas, sugerem que os diferentes genótipos para tipo de endosperma não têm efeito significativo sobre as características estudadas das plantas nas populações o2, su e wx.

Os dados referentes ao peso dos grãos são mostrados separadamente na tabela 13. Foram comparadas as sementes normais provindas de plantas homozigotas dominantes com as normais de plantas heterozigotas, e as sementes mutantes provindas de plantas heterozigotas com as mutantes de plantas homozigotas recessivas, dentro de cada população.

Tabela 13. Peso médio (em gramas) de grãos normais provindos de plantas homozigotas dominantes (D) e heterozigotas (H) e de grãos mutantes provindos de plantas heterozigotas e homozigotas recessivas (R)

População	Grãos normais		Grãos mutantes	
	Planta		Planta	
	D	H	H	R
o2	0,2702	0,2744	0,2347	0,2404
sh2	0,2343	0,2272	0,1093	-
su	0,2551	0,2505	0,2066	0,1963
wx	0,2594	0,2606	0,2509	0,2415

Não ocorreram diferenças significativas ao nível de 5%, pelo teste de Tukey, entre grãos de mesmo fenótipo dentro de populações.

Também com relação à característica peso dos grãos não foram verificadas diferenças significativas entre grãos de mesmo fenótipo provindos de plantas homozigotas ou heterozigotas.

No ensaio de competição dentro de parcelas, portanto, não foi possível demonstrar a existência de um só fator que pudesse explicar a pequena vantagem adaptativa com relação aos componentes de fertilidade mostrada pelos genótipos o2o2 e susu, nas populações em campos isolados (figuras 12.3 e 14.3).

5.3c. Taxas de germinação e infestação por fungos nas sementes, estimadas em testes de laboratório

Nos ensaios realizados em laboratório, procurou-se analisar a influência do tipo de endosperma sobre os eventos associados à germinação, bem como o efeito dos fungos sobre esses eventos, portanto referentes aos componentes de viabilidade do ciclo vital.

Nesses ensaios foram utilizadas sementes produzidas em épocas diferentes, logo em condições ambientais diferentes. As sementes F3 são resultantes de plantio realizado em fevereiro, com colheita em agosto. As plantas, como já vimos, se desenvolveram em período mais seco e frio, menos favorável para a cultura do milho. As sementes F4 resultaram de plantio em agosto, assim as plantas se desenvolveram em período mais

favorável por causa de maior umidade e calor. O ensaio de campo com competição foi instalado em outubro e colhido em fevereiro, sendo esta a época ideal para a cultura. O ensaio de laboratório realizado com as sementes produzidas neste ensaio de campo permitiu comparar sementes de endosperma normal produzidas por plantas homozigotas e heterozigotas, sementes de endosperma mutante produzidas por plantas heterozigotas e homozigotas, além da comparação entre sementes normais e mutantes.

Os resultados dos três ensaios, com sementes F3, com sementes F4 e com sementes do ensaio de campo com competição, foram agrupados para facilitar a análise. Os dados relativos à altura das plântulas provindas de sementes F3 e de sementes F4 são apresentados na tabela 14.

Tabela 14. Altura média das plântulas, desvio padrão (dp) e coeficiente de variação (CV) dos ensaios com sementes F3 e com sementes F4

Fenótipo da semente	F3		F4	
	Altura	dp	Altura	dp
Pop. o2				
Normal	7,44 a	2,54	7,46 a	2,60
Mutante	6,33 b	2,62	6,90 a	2,73
CV	6,38		5,52	
Pop. sh2				
Normal	8,19 a	2,93	7,79 a	2,64
Mutante	4,54 b	2,26	5,38 b	2,95
CV	8,17		12,53	
Pop. su				
Normal	7,59 a	3,06	7,91 a	2,56
Mutante	4,65 b	2,19	6,43 b	2,74
CV	7,82		4,90	
Pop. wx				
Normal	7,40 a	2,68	7,76 a	2,47
Mutante	7,14 a	2,52	7,39 a	2,30
CV	4,86		4,91	

Medias com letras iguais na mesma coluna, dentro de cada população, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey

A altura das plântulas originadas de sementes de endosperma normal mostrou uma tendência para ser maior que a das originadas de sementes mutantes em todas as populações, porém as diferenças foram não significativas para a população o2 no ensaio com sementes F4 e para a população wx, nos dois ensaios.

Comparando-se os resultados do ensaio de sementes F3 com o de sementes F4, vê-se que, excetuando-se as plântulas originadas de sementes normais da população sh2, todos os valores foram mais altos para as plântulas de sementes F4, portanto aquelas produzidas em período favorável. Além disso, a influência negativa do período em que as sementes foram produzidas se fez sentir mais intensamente sobre as sementes de endosperma mutante, pois as diferenças entre as alturas de plântulas provindas de sementes com os dois tipos de endosperma foram mais acentuadas no ensaio com sementes F3 do que no ensaio com sementes F4. Isso só não ocorreu na população wx, onde as diferenças entre normal e mutante foram bem pequenas, mas maiores em sementes F4. A altura das plântulas provindas de sementes F3 de endosperma mutante foram 85,1%, 55,4%, 61,3% e 96,5% das provindas de sementes normais, respectivamente para as populações o2, sh2, su e wx. Em F4 esses valores corresponderam a 92,5%, 69,1%, 81,3% e 95,2%.

Na tabela 15 são apresentados os resultados do ensaio com sementes do ensaio de campo relativos à característica altura da plântula.

Tabela 15. Altura média das plântulas originadas de sementes de endosperma normal (nor) e mutante (mut) de plantas homozigotas dominantes (D), heterozigotas (H) e homozigotas recessivas (R) das quatro populações (Pop.), desvio padrão e coeficiente de variação (CV) do ensaio com sementes do ensaio de campo com competição

Plantas	Sementes	Altura	Desvio padrão

Pop. o2			
D	nor	9,57 a	2,45
H	nor	9,36 a	2,55
H	mut	8,07 a	2,80
R	mut	8,56 a	2,68
CV		11,21	
Pop. sh2			
D	nor	9,64 a	2,42
H	nor	9,62 a	2,65
H	mut	3,90 b	2,93
R	mut	-	-
CV		9,41	
Pop. su			
D	nor	9,30 ab	2,53
H	nor	10,28 a	1,98
H	mut	8,17 ab	2,35
R	mut	7,82 b	2,71
CV		10,43	
Pop. wx			
D	nor	9,11 a	2,43
H	nor	9,19 a	2,43
H	mut	8,57 a	2,79
R	mut	8,92 a	2,67
CV		9,84	

Médias com letras iguais na mesma coluna, dentro de cada população, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

Com exceção da população *sh2*, não houve diferenças significativas entre plântulas de sementes normais e mutantes, assim como entre plântulas de sementes de mesmo fenótipo produzidas em plantas homozigotas ou heterozigotas. Este último resultado é compatível com os do ensaio de campo, que indicou não haver diferenças entre plantas homozigotas dominantes e heterozigotas e entre homozigotas recessivas e heterozigotas. Na população *su* ocorreu diferença significativa entre plântulas de sementes normais de mãe heterozigota e plântulas de sementes mutantes de mãe homozigota, porém sem um padrão que pudesse sugerir a presença de algum efeito devido aos diferentes genótipos das mães.

Comparando os resultados dos três ensaios de laboratório notamos que ocorre uma diminuição do número de diferenças significativas entre as alturas de plântulas de sementes normais e mutantes. Além disso, excetuando-se os valores relativos a sementes de endosperma normal da geração F3 e a sementes *sh2sh2* do ensaio de campo providas de mães heterozigotas, ocorre um gradiente de altura das plântulas, com os valores mais baixos no ensaio com sementes F3 e mais altos no ensaio com sementes do ensaio de campo. As médias gerais de altura de plântulas providas respectivamente de sementes normais e mutantes, foram, para sementes F3, 7,7cm e 5,7cm; para sementes F4, 7,7cm e 6,5cm; e para as sementes do ensaio de campo, 9,5cm e 7,7cm. Esse gradiente corresponde às condições ambientais de desenvolvimento das plantas que

produziram aquelas sementes, sendo as condições mais desfavoráveis as de sementes F3 e as mais favoráveis as de sementes do ensaio de campo.

No entanto, trabalhando com sementes **sh2sh2** e **susu**, Styer e Cantliffe (1984) concluíram que diferenças na altura da plântula não estão relacionadas com o vigor dos indivíduos resultantes. Esses autores verificaram que plântulas de sementes normais, no teste de rolo de tecido, atingem altura maior (21,4 cm), do que as de sementes **susu** (13,1cm), porém no solo as alturas das plântulas normais foram menores (18,7cm) do que as de plântulas **susu** (26,9cm), como é mostrado na tabela 16.

Tabela 16. Taxa de germinação e altura da plântula em híbridos com endosperma superdoce (sh2), doce (su) e normal, em teste de rolo de tecido (TRT) e em solo a 10°C por 7 dias seguidos de 4 dias a 25°C (Styer e Cantliffe 1984)

Endosperma	Germinação (%)		Plântula (cm)	
	TRT	solo	TRT	solo
sh2	70 ± 2	9 ± 2	12,0 ± 1,1	17,2 ± 2,5
su	97 ± 1	78 ± 5	13,1 ± 0,7	26,9 ± 1,0
Normal	100 ± 0	94 ± 3	21,4 ± 1,6	18,7 ± 0,6

Os dados desses autores, referentes a plântulas desenvolvidas no solo, são contrários às nossas verificações e parecem não concordar também com a experiência dos agricultores. Os produtores de milho doce com endosperma su nos Estados Unidos e os de milho super doce no Brasil são orientados para semear esses mutantes a pequenas profundidades (de 3 a 5cm) para que o "stand" não seja afetado (W. J. da Silva, informação pessoal). Isso obviamente decorre das reduzidas reservas de carboidratos dessas sementes, que limitam a emergência do epicótilo em plantios mais profundos.

Analisando as figuras 12.1, 13.1 e 14.1, que representam o comportamento da frequência de homozigotos recessivos entre semente e planta adulta, respectivamente nas populações sh , sh e su , vemos que a frequência de plantas foi menor que a esperada, nas três populações, nas gerações F3 e F4, porém as diferenças foram mais acentuadas na geração F3, o que pode ser explicado pelos dados dos ensaios, que sugerem que os mutantes foram mais prejudicados na geração F3, em consequência das sementes terem sido produzidas em período desfavorável.

Na população wx , a altura das plântulas não diferiu entre as originadas dos dois tipos de sementes, nos três ensaios, mostrando que o mutante aparentemente não tem desvantagem em relação à semente normal com relação a essa característica. Esses resultados, portanto, não permitem explicar a tendência de plantas $wxwx$ ocorrerem com frequência

acima da esperada, como é mostrado na figura 15.1.

Os dados relativos à intensidade de infestação por fungos e aos tipos de fungos desenvolvidos nas sementes F3 e nas sementes F4 são mostrados na tabela 17.

Tabela 17. Média das notas (1 = fraca; 2 = média; 3 = alta) atribuídas para intensidade de infestação por fungos (infest.), total de sementes infestadas (T), tipo de fungo desenvolvido (Fusarium sp (F), Cephalosporium sp (Ce) e outros(O)) e coeficiente de variação (CV) em sementes F3 e em sementes F4 das quatro populações

Fenótipo da semente	F3					F4				
	Infest.	Fungos				Infest.	Fungos			
		T*	F	Ce	O		T*	F	Ce	O
Pop. o2										
Normal	1,75 a	60	24	33	7	2,00 a	132	48	97	3
Mutante	1,65 a	48	21	28	5	1,90 a	134	45	100	1
CV	7,88					3,11				
Pop. sh2										
Normal	2,04 a	46	27	7	16	2,07 a	149	50	113	8
Mutante	2,43 b	103	76	25	25	2,49 b	162	92	100	5
CV	3,11					2,03				
Pop. su										
Normal	1,83 a	54	33	14	8	2,04 a	149	36	113	13
Mutante	2,15 a	94	72	18	10	2,23 a	170	73	111	12
CV	8,63					5,59				
Pop. wx										
Normal	1,55 a	40	28	12	1	2,07 a	107	44	62	5
Mutante	1,46 a	54	23	27	6	1,98 a	130	44	81	13
CV	11,48					5,46				

Médias com letras iguais na mesma coluna, dentro de cada população, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

* Algumas sementes desenvolveram mais de um tipo de fungo.

Comparando os dados relativos à intensidade da infestação por fungos em sementes F3 e em sementes F4, vemos que todos os valores são mais altos em sementes F4. A média geral das notas atribuídas a sementes F3 foi 1,86 e a sementes F4 foi 2,10. Esses resultados indicam que as sementes produzidas na época favorável sofrem mais intensamente o ataque de fungos. Isso provavelmente é devido à maior umidade ambiental nesse período, que favorece a proliferação desses organismos. Essa ideia é reforçada pelo número de sementes que apresentaram fungo, que foi bem maior em sementes F4. No total de sementes das quatro populações os fungos se desenvolveram em 31% delas na geração F3 e em 71% na geração F4.

Nas populações o2 e wx, cujas alterações nas reservas do endosperma são pouco relacionadas com açúcares solúveis, as diferenças entre sementes normais e mutantes quanto à intensidade de infestação por fungos foram não significativas.

Nas populações sh2 e su, ambas de milho doce, essas diferenças foram grandes, apesar de não significativas na população su, ao nível de 5%. Nessas populações, foram as sementes de endosperma mutante que apresentaram maior intensidade de infestação, o que era esperado, em vista do alto teor de carboidratos solúveis no endosperma, que deve favorecer o desenvolvimento dos fungos.

Analisando os dados da tabela 17 relativos ao tipo de fungo que se desenvolveu, vemos que nas sementes F3

houve uma tendência para o Fusarium ocorrer com maior frequência e na F4 para o Cephalosporium. Considerando o total de sementes infestadas por fungos, nas quatro populações, em F3 o Fusarium se desenvolveu em 61% delas e o Cephalosporium em 33%. Na geração F4 o Fusarium esteve presente em 38% das sementes e o Cephalosporium em 69%. Esses resultados parecem indicar que a época de cultivo, ou seja, em condições mais ou menos favoráveis, pode determinar uma diferente distribuição de agentes patogênicos nas sementes.

A tabela 18 apresenta os dados relativos a intensidade de infestação por fungos e tipos de fungos desenvolvidos nas sementes do ensaio de campo.

Tabela 18. Média das notas (1 = fraca; 2 = média; 3 = alta) para infestação (Infest), total de sementes infestadas (T), tipo de fungo desenvolvido (Fusarium sp (F), Cephalosporium sp (Ce) e Penicillium (Pe)) em sementes normais (nor) e mutantes (mut) de plantas homozigotas dominantes (D), heterozigotas (H) e homozigotas recessivas (R) e coeficiente de variação (CV), no ensaio com sementes do ensaio de campo

Plantas	Sementes	Infest*	Fungos			
			T**	F	Ce	Pe
Pop. o2						
D	nor	1,52	67	12	50	14
H	nor	1,52	71	17	50	7
H	mut	1,65	68	23	43	3
R	mut	1,50	90	31	57	16
	CV	22,48				
Pop. sh2						
D	nor	1,37	74	23	57	1
H	nor	1,63	88	26	64	13
H	mut	2,08	130	55	100	3
R	mut	-	-	-	-	-
	CV	22,58				
Pop. su						
D	nor	1,57	70	22	43	11
H	nor	1,28	94	15	81	-
H	mut	1,50	121	39	93	5
R	mut	1,58	132	53	85	12
	CV	13,65				
Pop. wx						
D	nor	1,37	62	21	44	-
H	nor	1,35	56	16	42	2
H	mut	1,35	62	18	45	7
R	mut	1,31	72	19	55	4
	CV	7,93				

* As médias de intensidade de infestação não diferiram entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

** Algumas sementes desenvolveram mais de um tipo de fungo.

Neste ensaio o número de sementes com fungos foi intermediário em relação aos ensaios anteriores, pois no total de sementes analisadas, 56% apresentaram fungos, enquanto que, nas sementes F3 e F4, respectivamente 31% e 71% os apresentaram. Por outro lado, a média geral das notas atribuídas para intensidade de infestação, 1,50, foi mais baixa que a de sementes F3 (1,86), apesar de em F3 um número menor de sementes apresentarem fungos. As sementes do ensaio de campo foram produzidas no período mais indicado para o cultivo do milho. O plantio em outubro, com temperatura mais elevada e com fotoperíodo mais adequado para o desenvolvimento das plantas, faz com que o ciclo se complete mais rapidamente. As melhores condições fitossanitárias, resultando em plantas mais saudias, com melhores condições de produção de sementes, podem explicar a menor quantidade de sementes com fungo, quando comparadas com sementes F4, e a intensidade de infestação mais baixa que a de sementes F3 e F4. Outro fator que pode ter influenciado nesse resultado foi o fato das espigas do ensaio de campo terem sido colhidas mais precocemente que as das populações em campos isolados, levando a um menor tempo de exposição aos patógenos no campo.

O Cephalosporium foi o fungo mais freqüente, estando presente em 72% do total de sementes com fungo, enquanto o Fusarium ocorreu em 31%, situação portanto semelhante à de sementes F4, também produzidas em período mais favorável. Estes dados sugerem mais uma vez uma possível

relação entre condições ambientais e tipo da infestação por fungos em sementes de milho. Ao contrário de nossas observações, vários trabalhos, realizados em diferentes regiões, apontam o Fusarium moniliforme como o fungo mais frequente nas sementes. Em Indiana (USA), em 95 amostras de milho coletadas em 20 localidades diferentes por Tuite e Caldwell (1971), o Fusarium foi o fungo que ocorreu com maior frequência. Em Kansas (USA) ele foi o mais prevalente em sementes de híbridos entre os anos de 1.952 e 1.954 (Melchers 1956). Na República Árabe Unida, Mohamed, Ashour, Sirry e Fathi (1967), em 42 amostras de diferentes regiões também o Fusarium moniliforme foi o mais frequente.

Na comparação entre sementes de mesmo fenótipo, mas com genótipo materno diferente, não foi verificada nenhuma diferença significativa, nas quatro populações, dados esses compatíveis com os resultados do ensaio de campo com competição que não acusou diferenças entre plantas de diferentes genótipos. Mesmo entre sementes normais e mutantes de cada população não ocorreram diferenças significativas, como já tinha sido verificado em sementes F4, com exceção da população sh2.

Os dados referentes às taxas de germinação e de infestação por fungos, estimadas nos ensaios de laboratório, serão apresentados para cada uma das populações em separado. A tabela 19 mostra os dados da população o2 obtidos nos ensaios com sementes F3 e com sementes F4.

Tabela 19. Porcentagem de germinação e de infestação por fungos em sementes normais e mutantes, com resultados dos testes de Tukey e coeficiente de variação (CV) dos ensaios com sementes F3 e com sementes F4 da população o2

Sementes F3

Frequência % na linha % na coluna	Germinação							
	Normal				Mutante			
	Não	Sim	Total	%	Não	Sim	Total	%
Ausente	15	125	140	70,0	24	128	152	76,0
	10,71 60,00	89,29 71,43			15,79 77,42	84,21 75,74		
Presente	10	50	60	30,0	7	41	48	24,0
	16,67 40,00	83,33 28,57		a	14,58 22,58	85,42 24,26		a
Total %	25 12,5	175 87,5 a	200		31 15,5	169 84,5 a	200	

CV - germinação - 3,91

CV - fungo - 28,69

Sementes F4

Frequência % na linha % na coluna	Germinação							
	Normal				Mutante			
	Não	Sim	Total	%	Não	Sim	Total	%
Ausente	11	57	68	34,0	23	43	66	33,0
	16,18 32,35	83,82 34,34			34,85 42,59	65,15 29,45		
Presente	23	109	132	66,0	31	103	134	67,0
	17,42 67,65	82,58 65,66		a	23,13 57,41	76,87 70,55		a
Total %	34 17,0	166 83,0 a	200		54 27,0	146 73,0 a	200	

CV - germinação - 13,81

CV - fungo - 21,79

Não ocorreram diferenças significativas entre as médias, ao nível de 5% de probabilidade.

Na população o2 as taxas de germinação e de infestação por fungos não diferiram entre sementes normais e mutantes nesses dois ensaios.

A tabela 20 apresenta os dados da população o2 obtidos no ensaio com sementes do ensaio de campo, para essas mesmas características.

Tabela 20. Porcentagem de germinação e de infestação por fungos, com resultados dos testes de Tukey e coeficiente de variação (CV) do ensaio com sementes do ensaio de campo da população o2

Sementes de endosperma normal

Frequência % na linha % na coluna		Germinação							
		Mãe homozigota				Mãe heterozigota			
		não	Sim	Total	%	não	Sim	Total	%
Fungo Ausente		3	80	83	55.3	10	69	79	52.7
		3.61	96.39			12.66	87.34		
Fungo Presente		27.27	57.55			41.67	54.76		
		8	59	67	44.7	14	57	71	47.3
Total		11	139	150		24	126	150	
	%	7.3	92.7	a		16.0	84.0	a	

Sementes de endosperma mutante

Frequência % na linha % na coluna		Germinação							
		Mãe heterozigota				Mãe homozigota			
		não	Sim	Total	%	não	Sim	Total	%
Fungo Ausente		18	64	82	54.7	14	46	60	40.0
		21.95	78.05			23.33	76.67		
Fungo Presente		56.25	54.24			58.33	36.51		
		14	54	68	45.3	10	80	90	60.0
Total		20.59	79.41			11.11	88.89		
	%	43.75	45.76			41.67	63.49		
Total		32	118	150		24	126	150	
	%	21.3	78.7	a		16.0	84.0	a	

CV - germ. - 16,49

CV - fungo - 39,57

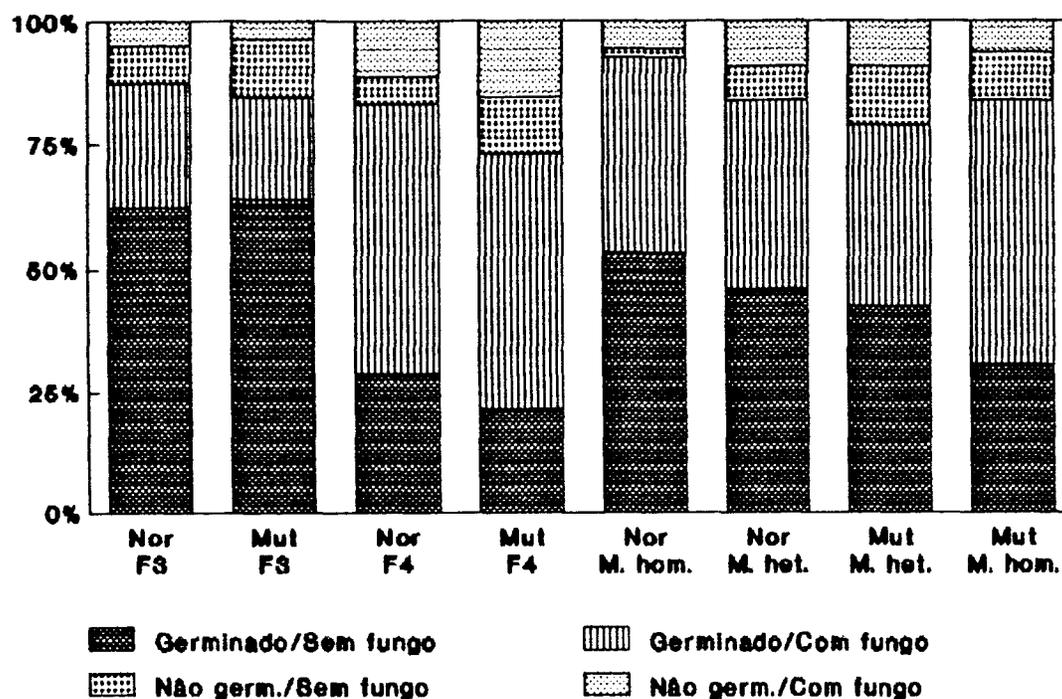
Os testes de Tukey analisaram conjuntamente sementes normais e mutantes e não revelaram diferenças significativas ao nível de 5% de probabilidade.

As diferenças entre as taxas de infestação por fungos, de sementes normais e mutantes, foram não significativas também neste ensaio, como nos ensaios com sementes F3 e F4. Isso parece indicar que a condição mutante não é importante na determinação do comportamento da semente em relação aos fungos, na população **o2**, conclusão que é reforçada pelo que foi verificado em relação à intensidade de infestação. Esses resultados se contrapõem aos dados de Paradela Filho (1982) e Warren (1978), que indicaram haver maior susceptibilidade de sementes **o2o2** a diferentes patógenos.

As taxas de germinação apresentaram diferenças não significativas entre sementes normais e mutantes, repetindo o verificado para sementes F3 e F4. Esses resultados divergem dos obtidos no ensaio de campo sem competição, que indicou taxa de germinação de 76,9% para as sementes mutantes, significativamente menor que a taxa para sementes normais, de 82,6%. Essa diferença pequena, entretanto, provavelmente é difícil de ser detectada nos ensaios de laboratório, em condições mais constantes de temperatura e umidade. Essa pequena redução na taxa de germinação de sementes **o2o2** pode ser uma das causas da pequena diminuição de indivíduos **o2o2** na fase entre semente e planta, mostrada na figura 12.3.

Na figura 16 foram reunidos os resultados dos três ensaios de laboratório para facilitar a comparação do comportamento de sementes normais e mutantes quanto às características taxa de germinação e de infestação por fungos.

Figura 16. Porcentagem de grãos normais (Nor) e mutantes (Mut) germinados, com e sem fungos, e não germinados, com e sem fungos, nos ensaios com sementes F3 (F3), com sementes F4 (F4) e com sementes do ensaio de campo (M. hom. = mãe homozigota; M. het. = mãe heterozigota) da população o2



Na tabela 21 são apresentados os dados relativos às taxas de germinação e infestação por fungos na população sh2, nos ensaios com sementes F3 e com sementes F4.

Tabela 21. Porcentagem de germinação e de infestação por fungos em sementes normais e mutantes, com resultados dos testes de Tukey e coeficiente de variação (CV) dos ensaios com sementes F3 e com sementes F4 da população sh2

Sementes F3

Frequência % na linha % na coluna		Germinação							
		Normal				Mutante			
		Não	Sim	Total	%	Não	Sim	Total	%
Ausente		14	140	154	77,0	78	19	97	48,5
		9,09	90,91			80,41	19,59		
		50,00	81,40			46,99	55,88		
Presente		14	32	46	23,0	88	15	103	51,5
		30,43	69,57		a	85,44	14,56		b
		50,00	18,60			53,01	44,12		
Total		28	172	200		166	34	200	
%		14,0	86,0	a		83,0	17,0	b	

CV - germinação - 5,26

CV - fungo - 28,98

Sementes F4

Frequência % na linha % na coluna		Germinação							
		Normal				Mutante			
		Não	Sim	Total	%	Não	Sim	Total	%
Ausente		13	38	51	25,5	34	4	38	19,0
		25,49	74,51			89,47	10,53		
		24,53	25,85			19,43	16,00		
Presente		40	109	149	74,5	141	21	162	81,0
		26,85	73,15		a	87,04	12,96		a
		75,47	74,15			80,57	84,00		
Total		53	147	200		175	25	200	
%		26,5	73,5	a		87,5	12,5	b	

CV - germ. - 21,57

CV - fungo - 9,67

Médias com letras iguais na mesma linha não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade.

As sementes sh2sh2 apresentaram taxa de germinação bastante baixa nesses ensaios, sendo 17,0% em sementes F3 e 12,5% em sementes F4, cerca de cinco vezes menor que a de sementes normais. Esses resultados repetem o verificado no ensaio de campo sem competição, que acusou taxa de 15,1% para esse tipo de semente. Concordam também com os verificados por Paradela Filho (1982) em sementes com esse genótipo.

As diferenças entre as taxas de infestação por fungos em sementes normais e mutantes são drásticas em sementes F3. Enquanto apenas 23,0% das sementes normais desenvolveram fungos, estes ocorreram em 51,5% das sementes de endosperma mutante. Nas sementes F4 as diferenças foram não significativas, provavelmente devido ao fato dos valores serem elevados para os dois tipos de sementes, isto é, 74,5% para as sementes normais e 81,0% para as mutantes. Esses resultados confirmam também a tendência já discutida de maior ocorrência de fungos em sementes F4, produzidas em período mais favorável.

Na tabela 22 são apresentados os dados do ensaio com sementes do ensaio de campo relativos à população sh2.

Tabela 22. Porcentagem de germinação e de infestação por fungos, com resultados dos testes de Tukey e coeficiente de variação (CV) do ensaio com sementes do ensaio de campo da população sh2

Sementes de endosperma normal

Frequência % na linha % na coluna		Germinação							
		Mãe homozigota				Mãe heterozigota			
		não	Sim	Total	%	não	Sim	Total	%
Ausente		12	64	76	50.7	11	51	62	41.3
		15.79	84.21			17.74	82.26		
		54.55	50.00			31.43	44.35		
Presente		10	64	74	49.3	24	64	88	58.7
		13.51	86.49		a	27.27	72.73		a
		45.45	50.00			68.57	55.65		
Total		22	128	150		35	115	150	
%		14.7	85.3	a		23.3	76.7	a	

Sementes de endosperma mutante

Frequência % na linha % na coluna		Germinação							
		Mãe heterozigota				Mãe homozigota			
		não	Sim	Total	%	não	Sim	Total	%
Ausente		12	8	20	13.3	-	-	-	-
		60.00	40.00			-	-		
		12.12	15.69			-	-		
Presente		87	43	130	86.7	-	-	-	-
		66.92	33.08		b	-	-		
		87.88	84.31			-	-		
Total		99	51	150		-	-	-	
%		66.0	34.0	b		-	-		

CV - germ. - 11,54

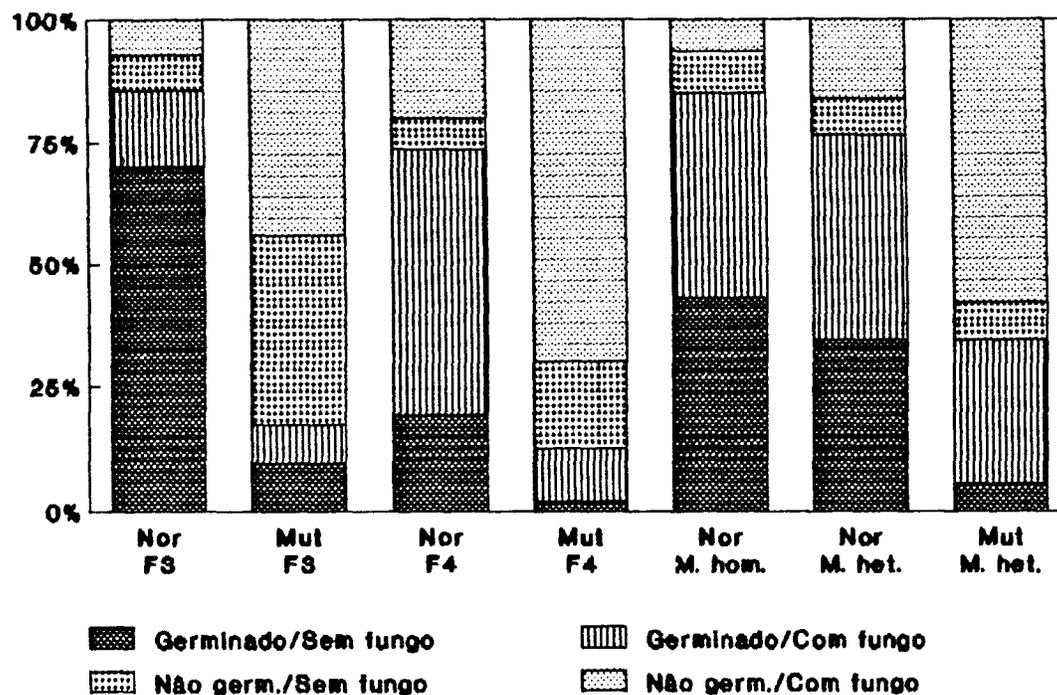
CV - fungo - 16,41

Os testes de Tukey analisaram conjuntamente sementes normais e mutantes. Médias com letras iguais não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade.

As taxas de germinação e de infestação por fungos não acusaram diferenças entre sementes normais de plantas homozigotas e heterozigotas da população *sh2*, mas diferiram significativamente entre sementes normais e mutantes, como já ocorreu nos outros ensaios.

Para uma análise conjunta dos resultados dos três ensaios de laboratório foi construído o gráfico da figura 17.

Figura 17. Porcentagem de grãos normais (Nor) e mutantes (Mut) germinados, com e sem fungos, e não germinados, com e sem fungos, nos ensaios com sementes F3 (F3), com sementes F4 (F4) e com sementes do ensaio de campo (M. hom. = mãe homocigota; M. het. = mãe heterocigota) da população sh2



Os resultados mostrados na figura 17, somados aos do ensaio de campo sem competição, indicam que a taxa de germinação é, sem dúvida, o principal fator de diminuição da frequência de indivíduos sh_2sh_2 , pois todos os ensaios acusaram uma taxa bastante baixa nessa população.

Portanto a grande redução de homocigotos recessivos entre sementes e plantas adultas, mostrada nas figuras 13.1 e 13.3 deve ser atribuída em grande parte à taxa de germinação extremamente baixa das sementes de endosperma mutante, associada aparentemente ao menor vigor das plântulas e agravada pela grande incidência de fungos patogênicos. A grande quantidade de fungos nas sementes de endosperma mutante pode agir também como um componente de fertilidade, já que os fungos, favorecendo o apodrecimento e a perda, antes da colheita, das espigas que apresentarem esse tipo de semente em maior número, contribuem para a redução da frequência de sh_2 na população, como provavelmente também a menor altura da planta e o atraso no florescimento, já discutidos.

Os dados dos ensaios de laboratório com sementes F3 e com sementes F4 da população su são apresentados na tabela 23.

A taxa de germinação de sementes **susu** foi significativamente inferior à de sementes normais, no ensaio com sementes F3, mas a diferença foi não significativa em F4. A taxa de incidência de fungos foi significativamente diferente nos dois ensaios, sendo maior para as sementes mutantes, o que está de acordo com a expectativa, por se tratar de milho doce.

Na tabela 24 aparecem os dados relativos a sementes da população **su** obtidas no ensaio de campo com competição.

Tabela 24. Porcentagem de germinação e de infestação por fungos, com resultados dos testes de Tukey e coeficiente de variação (CV) do ensaio com sementes do ensaio de campo da população su

Sementes de endosperma normal

Frequência % na linha % na coluna		Germinação							
		Mãe homozigota				Mãe heterozigota			
		não	Sim	Total	%	não	Sim	Total	%
Fungo Ausente		2	78	80	53.3	5	51	56	37.3
		2.50	97.50			8.93	91.07		
Fungo Presente		10	60	70	46.7	8	86	94	62.7
		14.29	85.71		a	8.51	91.49		ab
Total		12	138	150		13	137	150	
%		8.0	92.0	a		8.7	91.3	a	

Sementes de endosperma mutante

Frequência % na linha % na coluna		Germinação							
		Mãe heterozigota				Mãe homozigota			
		não	Sim	Total	%	não	Sim	Total	%
Fungo Ausente		2	27	29	19.3	0	18	18	12.0
		6.90	93.10			0.00	100.00		
Fungo Presente		12	109	121	80.7	21	111	132	88.0
		9.92	90.08		bc	15.91	84.09		c
Total		14	136	150		21	129	150	
%		9.3	90.7	a		14.0	86.0	a	

CV - germ. - 6,73

CV - fungo - 13,34

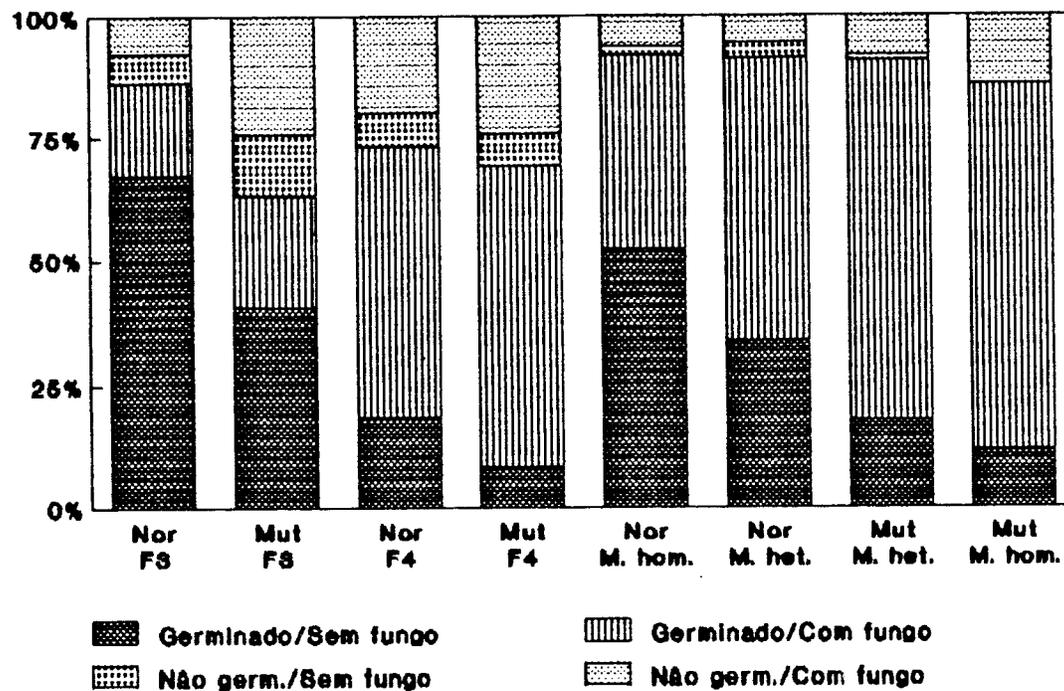
Os testes de Tukey analisaram conjuntamente sementes normais e mutantes. Médias com letras iguais não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade

As taxas de infestação por fungos foram significativamente diferentes entre sementes normais de mães homozigotas e sementes mutantes, e entre sementes mutantes de mães homozigotas e sementes normais. O valor mais alto dessa taxa em sementes de endosperma normal provindas de planta heterozigota, 62.7%, comparado com o de planta homozigota, 46.7%, apesar da diferença ser não significativa, provavelmente é devido ao fato de, havendo grande número de sementes mutantes com fungo na espiga segregante, ocorrer mais facilmente a infestação das sementes normais dessa mesma espiga.

Não ocorreram diferenças significativas entre as taxas de germinação de sementes normais e mutantes e entre as de sementes de mesmo fenótipo provindas de mãe homozigota ou heterozigota, sendo os valores elevados para todas elas. No ensaio de campo sem competição também não foram verificadas diferenças entre sementes normais e mutantes para essa característica (tabela 11).

A figura 18, que apresenta conjuntamente os resultados dos três ensaios de laboratório, evidencia a semelhança entre as taxas de germinação de sementes normais e mutantes na população su.

Figura 18. Porcentagem de grãos normais (Nor) e mutantes (Mut) germinados, com e sem fungos, e não germinados, com e sem fungos, nos ensaios com sementes F3 (F3), com sementes F4 (F4) e com sementes do ensaio de campo (M. hom. = mãe homocigota; M. het. = mãe heterocigota) da população su



Contrariamente aos nossos resultados, Paradela Filho (1982) encontrou diferenças altamente significativas entre as taxas de germinação de sementes **Su₁** e **susu**. Essa discrepância sugere que o comportamento do alelo **su** depende das interações com o "background" genético e das condições em que o teste é realizado. Em um "background" mais "flint", como o do material utilizado no presente estudo, as sementes são de tamanho menor e de textura mais dura. Conseqüentemente, têm menos tecido passível de enrugamento quando nas versões **susu**, **sh2sh2** ou com outro genótipo que bloqueie a síntese de amido, apresentando assim um fenótipo mais próximo ao da semente normal. Ao contrário, em "background" dentado, com sementes grandes, fortes constricções ocorrem na presença de genes que impedem a formação de amido, como o **sh2** e o **su**. Como consequência, essas sementes teriam maiores dificuldades para germinar.

As observações de Styer e Cantliffe (1984), realizadas com sementes **sh2sh2** e **susu** e mostradas na tabela 16, confirmam ainda a variação do comportamento dessas sementes conforme as condições do experimento. Estes autores encontraram taxa de germinação bastante diferente no teste em rolo de tecido e no solo. Para os indivíduos **susu** a diferença em relação aos normais no teste em rolo de tecido foi bastante pequena, tendo verificado 100% de germinação de sementes normais e 97% de sementes **susu**. No solo, porém, germinaram 94% das sementes normais e apenas 78% das sementes mutantes. Essas

informações podem explicar o fato da taxa de germinação diferir apenas no ensaio com sementes F3, de período desfavorável, o que acentuaria pequenas diferenças que poderiam existir entre sementes de endosperma normal e mutante quanto à capacidade de germinação.

Assim, no material por nós utilizado, a taxa de germinação não seria a principal responsável pela grande redução ocorrida na frequência de **susu** com relação aos componentes de viabilidade do ciclo vital (figura 14.1), porém pode ter contribuído em parte para essa redução.

Nesta população, tendo em vista as diferenças significativas para altura da plântula nos três ensaios de laboratório e a ausência de diferenças que prevaleceu em relação à taxa de germinação, o desenvolvimento da plântula parece ter um papel mais importante na redução da frequência de mutantes **susu**.

Os ensaios realizados, de campo e de laboratório, não permitiram explicar a pequena tendência de aumento no número de sementes de endosperma mutante em relação ao esperado, como mostrou a figura 14.3.

Os resultados dos ensaios de laboratório realizados com sementes F3 e com sementes F4 da população **wx** são apresentados na tabela 25.

Estes ensaios indicaram, na população wx, diferenças não significativas entre sementes normais e mutantes para todas as características analisadas.

A tabela 26 apresenta os resultados do ensaio realizado com sementes da população wx obtidas no ensaio de campo.

Tabela 26. Porcentagem de germinação e de infestação por fungos, com resultados dos testes de Tukey e coeficiente de variação (CV) do ensaio com sementes do ensaio de campo da população wx

Sementes de endosperma normal

Frequência % na linha % na coluna		Germinação							
		Mãe homozigota				Mãe heterozigota			
		não	Sim	Total	%	não	Sim	Total	%
F u n g o	Ausente	2 2.27 40.00	86 97.73 59.31	88	58.7	2 2.13 28.57	92 97.87 64.34	94	62.7
	Presente	3 4.84 60.00	59 95.16 40.69	62	41.3 a	5 8.93 71.43	51 91.07 35.66	56	37.3 a
Total %		5 3.3	145 96.7 a	150		7 4.7	143 95.3 a	150	

Sementes de endosperma mutante

Frequência % na linha % na coluna		Germinação							
		Mãe heterozigota				Mãe homozigota			
		não	Sim	Total	%	não	Sim	Total	%
F u n g o	Ausente	6 6.82 50.00	82 93.18 59.42	88	58.7	5 6.41 71.43	73 93.59 51.05	78	52.0
	Presente	6 9.68 50.00	56 90.32 40.58	62	41.3 a	2 2.78 28.57	70 97.22 48.95	72	48.0 a
Total %		12 8.0	138 92.0 a	150		7 4.7	143 95.3 a	150	

CV - germ. - 4,22

CV - fungo - 22,08

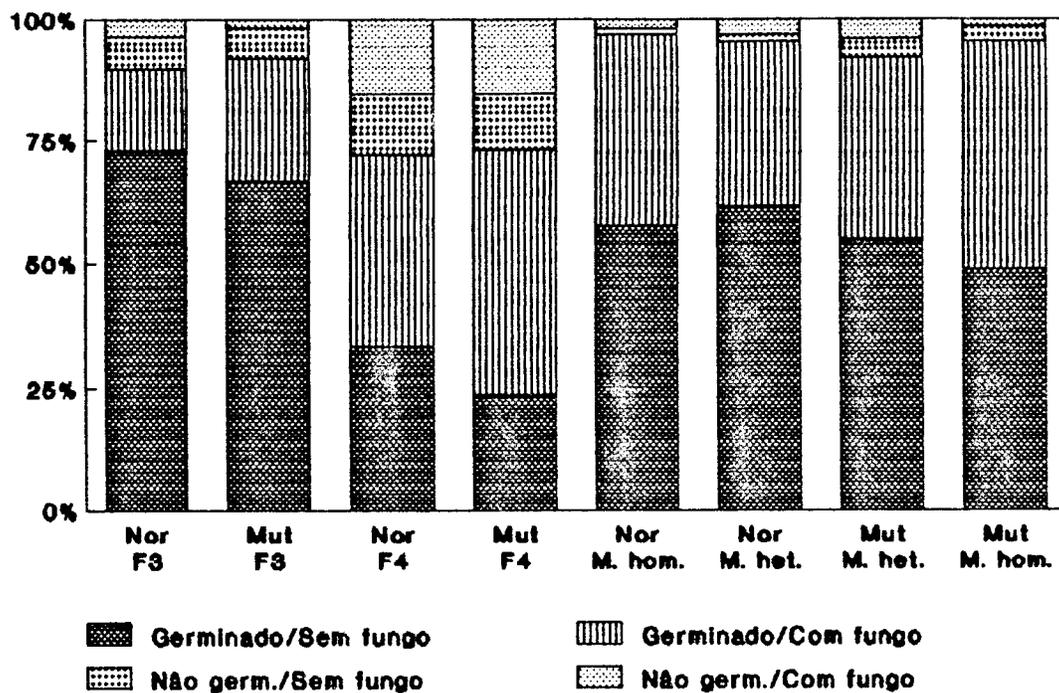
Os testes de Tukey analisaram conjuntamente sementes normais e mutantes e não revelaram diferenças significativas ao nível de 5% de probabilidade

Neste ensaio as taxas de germinação foram bastante semelhantes, sendo 96,7% e 95,3%, respectivamente para as sementes normais providas de plantas homozigotas e heterozigotas e 92,0% e 95,3% para as mutantes de plantas heterozigotas e homozigotas. Juntamente com os resultados dos ensaios com sementes F3 e com sementes F4, esses resultados parecem indicar ou que a condição mutante não interfere na taxa de germinação ou que essa taxa pode ser maior ou menor que a de sementes normais, conforme as condições em que ocorre a germinação. No ensaio de campo sem competição a taxa de germinação de sementes mutantes foi significativamente mais baixa, porém a diferença foi pequena, tendo as sementes normais taxa de 82,6% e as mutantes de 76,9% (tabela 11).

Os resultados relativos às taxas de infestação por fungos também foram não significativos neste último ensaio, com valores respectivamente de 41,3%, 37,3%, 41,3% e 48,0%.

A semelhança entre as taxas de germinação de sementes normais e mutantes, evidenciada nos três ensaios de laboratório, pode ser melhor avaliada na figura 19, que apresenta esses resultados conjuntamente.

Figura 19. Porcentagem de grãos normais (Nor) e mutantes (Mut) germinados, com e sem fungos, e não germinados, com e sem fungos, nos ensaios com sementes F3 (F3), com sementes F4 (F4) e com sementes do ensaio de campo (M. hom. = mãe homocigota; M. het. = mãe heterocigota) da população wx



Os ensaios, portanto, não forneceram informações que ajudassem a explicar a vantagem dos indivíduos $wxwx$ em relação aos componentes de viabilidade do ciclo vital, sugerida pela figura 15.1. Pelo contrário, o único resultado significativo dos ensaios para a população wx , referente à taxa de germinação no campo, mostrou desvantagem do mutante. Uma possível explicação para o ocorrido é sugerida por Solbrig (1980) que, baseado em trabalhos de outros pesquisadores, considera o ataque de herbívoros um dos principais responsáveis pela morte de plântulas. As sementes F6, como já foi mencionado, foram plantadas duas vezes. O primeiro plantio, realizado em fevereiro, foi desprezado, tendo em vista o prejuízo causado às plantas pelas larvas de Diabrotica. É razoável admitir que essas larvas já ocorressem nos campos nas gerações anteriores, tendo sua quantidade aumentado no primeiro plantio de sementes F6. Se, por algum motivo não conhecido, elas evitassem as plântulas $wxwx$, isso se constituiria em vantagem para esse genótipo, tanto maior quanto maior fosse a quantidade de larvas. Da mesma maneira, eliminados os predadores, a vantagem desapareceria. Os dados da figura 15.1 estão de acordo com essa hipótese. A vantagem do homozigoto recessivo foi manifestada nas gerações anteriores à aplicação de inseticida no plantio, e, de maneira mais intensa, em plantas F5, imediatamente antes da aplicação. A vantagem desapareceu após essa aplicação. Essa é portanto uma hipótese de trabalho que deve ser investigada no intuito de esclarecer o

comportamento do homozigoto recessivo na população wx.

Nessa linha, analisando o comportamento de formas cianogênicas e acianogênicas de Trifolium repens (trevo branco) em experimentos de campo Dirzo e Harper (1982) não conseguiram explicar a manutenção do polimorfismo através de fatores isolados como predação ou temperatura ambiente, admitindo que os eventos responsáveis por essa manutenção devem ser complexos. Tal situação provavelmente ocorre com os mutantes de endosperma por nós estudados.

5.3c.1. Análises de correlação entre características estudadas nos ensaios de laboratório

Para obter elementos que contribuíssem para explicar as variações nas características taxa de germinação e vigor das plântulas, e elucidar as possíveis dependências dessas características em relação à incidência de fungos e sua intensidade, foram realizadas análises de correlação entre as características estudadas nos ensaios de laboratório. Os resultados relativos aos ensaios com sementes F3 e com sementes F4 são mostrados na tabela 27. Os relativos ao ensaio com sementes do ensaio de campo são mostrados na tabela 28.

Tabela 27. Valores de r e níveis de probabilidade (P) das análises de correlação, para $H_0: r = 0$, do ensaio com sementes F3 e do ensaio com sementes F4 para as características taxa de germinação (germ), número de sementes que desenvolveram fungos (fungo), intensidade de infestação (infest) e altura da plântula (alt)

		germ/fungo		germ/infest		fungo/alt		infest/alt	
		F3	F4	F3	F4	F3	F4	F3	F4
O2-	r	-0,08	-0,02	-0,27	-0,37	-0,07	-0,12	-0,35	-0,02
	P	0,25	0,83	*	***	0,38	0,13	*	0,80
o2o2	r	0,01	0,12	-0,45	-0,26	0,07	0,26	-0,55	<0,01
	P	0,84	0,08	**	**	0,34	**	***	0,99
Sh2-	r	-0,26	-0,01	-0,65	-0,49	-0,09	-0,09	-0,15	<0,01
	P	***	0,85	***	***	0,22	0,28	0,40	0,98
sh2sh2	r	-0,07	0,03	-0,47	-0,38	-0,10	0,10	-0,10	-0,20
	P	0,35	0,68	***	***	0,58	0,65	0,73	0,38
Su-	r	-0,25	<0,01	-0,53	-0,34	-0,13	<0,01	-0,31	0,04
	P	***	0,93	***	***	0,08	0,99	0,06	0,68
susu	r	-0,30	0,11	-0,63	-0,46	-0,11	0,05	-0,22	-0,10
	P	***	0,11	***	***	0,21	0,56	0,15	0,25
Wx-	r	-0,11	-0,01	-0,14	-0,54	-0,13	0,07	0,13	-0,06
	P	0,11	0,87	0,39	***	0,08	0,39	0,47	0,63
wxwx	r	0,05	0,10	-0,35	-0,49	-0,18	0,08	-0,15	0,24
	P	0,44	0,17	**	***	*	0,32	0,29	*

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

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

*** $P < 0,001$

Tabela 28. Valores de r e níveis de probabilidade (P) das análises de correlação, para $H_0: r=0$, do ensaio com sementes do ensaio de campo com competição, para as características taxa de germinação (germ), número de sementes que desenvolveram fungos (fungo), intensidade de infestação (infest) e altura da plântula (alt), para sementes (sts) de endosperma normal (nor) e mutante (mut) providas de mães homozigotas dominantes (D), heterozigotas (H) e homozigotas recessivas (R)

mãe	sts	germ/fungo		germ/infest		fungo/alt		infest/alt		
		r	P	r	P	r	P	r	P	
Pop. o2										
D	nor	-0,16	0,06	-0,35	**	-0,11	0,18	0,29	*	
H	nor	-0,10	0,24	-0,69	***	0,06	0,48	-0,07	0,58	
H	mut	0,02	0,84	-0,51	***	-0,02	0,82	-0,52	***	
R	mut	0,16	*	-0,27	**	-0,25	**	-0,05	0,66	
Pop. sh2										
D	nor	0,03	0,70	-0,41	***	-0,06	0,54	-0,03	0,79	
H	nor	-0,11	0,18	-0,63	***	-0,08	0,39	<0,01	0,99	
H	mut	-0,05	0,55	-0,58	***	-0,14	0,32	0,15	0,34	
R	mut									
Pop. su										
D	nor	-0,22	**	-0,51	***	-0,14	0,10	-0,21	0,11	
H	nor	<0,01	0,93	-0,61	***	-0,07	0,44	0,05	0,63	
H	mut	-0,04	0,62	-0,39	***	-0,01	0,91	0,02	0,86	
R	mut	-0,15	0,07	-0,60	***	0,22	*	-0,21	*	
Pop. wx										
D	nor	-0,07	0,39	-0,40	**	<-0,01	0,96	0,14	0,28	
H	nor	-0,16	0,06	-0,56	***	-0,04	0,63	-0,05	0,71	
H	mut	-0,05	0,53	-0,49	***	-0,02	0,86	0,08	0,58	
R	mut	0,09	0,30	0,11	0,38	0,07	0,42	0,07	0,57	

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

Em uma avaliação global dos resultados das análises destaca-se a alta correlação existente entre taxa de germinação e intensidade de infestação e a quase total falta de correlação nas demais associações de características.

Comparando as taxas de germinação de sementes F3, normais e mutantes, com as de sementes F4, normais e mutantes, apresentadas nas tabelas 19, 21, 23 e 25, nota-se que, com exceção de sementes mutantes da população *su*, as taxas foram maiores para sementes F3, resultantes de plantio em fevereiro e colheita em agosto. Essas taxas foram 87,5 (F3) e 83,0 (F4), para sementes normais e 84,5 (F3) e 73,0 (F4) para sementes mutantes da população *o2*; 86,0 (F3) e 73,5 (F4) para sementes normais e 17,0 (F3) e 12,5 (F4) para sementes mutantes da população *sh2*; 86,5 (F3) e 73,0 (F4) para sementes normais e 63,0 (F3) e 69,0 (F4) para sementes mutantes da população *su*; e 89,5 (F3) e 71,5 (F4) para sementes normais e 92,0 (F3) e 73,0 (F4) para sementes mutantes da população *wx*. Nas sementes F3, a porcentagem de sementes com fungo foi 31%, enquanto que em sementes F4 essa porcentagem chegou a 71% do total de sementes, como foi evidenciado na discussão dos dados da tabela 17. As médias gerais de intensidade de infestação foram 1,86 para sementes F3 e 2,10 para sementes F4. Considerando esses resultados e os das análises de correlação, podemos concluir que a quantidade de fungos presentes nas sementes, e não sua simples presença, é fator importante na determinação da taxa de germinação. Esses dados explicam, também, o fato de sementes

com presença de fungos terem, muitas vezes, comportamento satisfatório no campo. A quantidade de fungos, por sua vez, parece estar associada à época do ano em que as sementes foram produzidas.

Porém os dados da figura 9, mostrando as taxas de germinação nos campos isolados, indicam resultados conflitantes com os dos ensaios, isto é, taxa de germinação de sementes F3 menor que de sementes F4, sugerindo que os fatores ambientais desfavoráveis em agosto (sementes F3), comparados com os de fevereiro (sementes F4), anulam as vantagens que as sementes possam apresentar na germinação em decorrência do menor número de fungos.

A correlação entre germinação e intensidade de infestação, por outro lado, pode significar também que os processos desencadeados com a germinação inibem o desenvolvimento do fungo. Nesta linha, Bemiller e Pappelis (1965) isolaram um glicosídeo de plântulas de milho que, quando hidrolisado, produz substâncias de efeito fungistático.

A quase geral ausência de correlações significativas entre taxa de germinação e presença de fungos chama a atenção para outros fatores que possam afetar a taxa de germinação dos mutantes de endosperma. Como esses mutantes têm bastante alterada a composição química deste tecido, principalmente nos milhos doces, esta alteração deve ser importante para a germinação, já que as reservas aí encontradas vão fornecer a energia e as substâncias necessárias para esse

processo.

Trabalhando com 11 diferentes linhagens de milho, Paradela Filho (1982) verificou que só duas delas apresentaram redução significativa da taxa de germinação quando inoculadas com Fusarium moniliforme. Porém as mesmas linhagens, apresentando agora cada uma um diferente mutante de endosperma em homozigose, tiveram redução maior das taxas de germinação quando em presença daquele fungo. As diferenças foram significativas em seis linhagens, entre as quais as contendo os alelos *su*, que apresentou redução de 41,0% e *o2*, com redução de 31,5%. O fato do alelo *sh2* ter sido introduzido em uma linhagem altamente resistente a fungos pode explicar o resultado não significativo para este mutante. Verificando a interferência das alterações de endosperma em sementes livres de fungo, aquele autor encontrou redução na germinação, em relação às sementes normais da mesma linhagem, de 47,4% na linhagem *su*, 16,4% na linhagem *o2* e 32,8% na linhagem *sh2*. Portanto, nas linhagens *su* e *sh2*, as alterações no endosperma foram mais importantes na redução da taxa de germinação do que a ação do fungo patogênico. Na linhagem *o2*, foi mais importante a presença do fungo. Na linhagem *wx* não ocorreram diferenças significativas devidas a alterações do endosperma ou à presença do fungo.

Nos milhos doce e superdoce as consequências das alterações das reservas são mais drásticas possivelmente porque nesses mutantes as alterações se referem

aos carboidratos, principais componentes de reserva na semente de milho. Os ensaios realizados comprovaram para o mutante **sh2sh2** a grande redução na taxa de germinação, entretanto isso não ocorreu com o mutante **susu**. Nestas sementes pode ter influência o grau de contração do endosperma, na dependência do "background" genético, determinando um grão tendendo mais para o "flint" ou para o dente, como já foi discutido.

Estudando a germinação em sementes **sh2sh2**, Wann (1980) concluiu que o baixo vigor está associado ao pequeno endosperma, incapaz de sustentar o crescimento vigoroso da plântula. O genótipo do embrião também deve contribuir, em menor grau, para esse baixo vigor. Styer, Cantliffe e Hannah (1980) verificaram que a quantidade total de polissacarídeos em sementes **sh2sh2** é cerca de 50%, ou mais, menor que a de sementes de endosperma normal e admitiram que a baixa germinação do milho superdoce é devida a fontes inadequadas de energia. Também trabalhando com sementes **sh2sh2**, Douglass, Juvik e Splittstoesser (1993) encontraram correlação negativa altamente significativa entre a concentração de açúcar e a emergência, e correlação positiva entre o conteúdo de amido e a emergência, em solos a baixas temperaturas.

Além dos problemas decorrentes das reservas alteradas, as sementes com pouco amido, como as do milho superdoce, tendem a sofrer, na dessecação, um processo de separação entre pericarpo e aleurona, criando espaços internos e provocando rupturas no pericarpo que facilitam a penetração

de patógenos (Douglass, Juvik e Splittstoesser 1993). Styer e Cantliffe (1984 a) verificaram que a infecção por Fusarium moniliforme reduz o crescimento de plântulas **sh2sh2**, a partir de sementes germinadas em condições ótimas, mas esta infecção não parece ser o fator primário envolvido na redução do vigor. A redução na emergência de sementes **sh2sh2** infectadas foi confirmada por Headrick e Pataky (1989), mas esses autores postulam que fatores fisiológicos são de maior importância na determinação do vigor das plântulas.

Apesar de admitida anteriormente, Headrick, Pataky e Juvik (1990) não puderam confirmar a correlação entre quantidade e concentração de carboidratos no grão e infecção por Fusarium moniliforme em linhagens **sh2sh2**. Admitiram que outras variáveis não identificadas, associadas ao genótipo **sh2sh2**, devem responder pela maior parte da variação na emergência. Baseados em experimentos de crescimento de embriões isolados, em meio de amido ou de endosperma triturado, Styer e Cantliffe (1984 b) sugeriram a ocorrência de algum tipo de disfunção do escutelo ou do eixo embrionário em relação ao metabolismo e/ou à utilização dos carboidratos, em sementes **sh2sh2**. Esse fator se associaria ao endosperma deficiente em amido, incapaz de manter satisfatoriamente o desenvolvimento inicial da plântula, e aos patógenos, levando ao baixo vigor das sementes. Estudando o metabolismo da semente na germinação, Harris e DeMason (1989) verificaram alteração no padrão de degradação do amido no endosperma adjacente à aleurona, que

apresenta reduzida secreção de hidrolases, em milho superdoce. Nessa linha, Martins (1983) observou que os gens *o2* e *sh2* condicionam uma utilização mais lenta das reservas do endosperma durante a germinação.

A redução do nível de proteína nos embriões *sh2sh2* também deve responder em parte pela redução do vigor das sementes, já que o crescimento inicial da plântula depende de açúcares solúveis, lipídeos e proteínas de reserva do escutelo. Nas sementes homozigotas recessivas para *sh2* ocorre também redução na razão endosperma/embrião e na extensão da interface escutelo/endosperma, além da redução das proteínas de reserva do endosperma (Harris e DeMason 1989).

Portanto, a ausência de correlação por nós encontrada entre as taxas de germinação e de incidência de fungos nas sementes de milho superdoce está de acordo com as informações da literatura, que indicam disfunções fisiológicas e deficiência nas reservas das sementes *sh2sh2* como principais fatores na diminuição da taxa de germinação. A infestação por fungos seria um fator secundário a agravar as deficiências.

Também na população *su* foi constatada a ausência de correlação entre as taxas de germinação e de incidência de fungos, apesar de ser um milho tipo doce. Ausência de correlação entre quantidade e concentração de carboidratos na semente e infecção por *Fusarium moniliforme* foi verificada por Headrick, Pataky e Juvik (1990) em sementes de linhagens *susu*. Trabalhando também com milho doce, Douglass,

Juvik e Splittstoesser (1993) verificaram que o conteúdo de amido está correlacionado positivamente, enquanto que a concentração de açúcar está correlacionada negativamente com a emergência de sementes homozigotas para *su*, em solos frios. A separação entre pericarpo e aleurona, provocada pela contração da semente no dessecamento e levando a rupturas no pericarpo, como em sementes *sh2sh2*, foi verificada por aqueles autores também em sementes *susu*, favorecendo a penetração de patógenos.

Apesar de constatarem que a infecção por *Fusarium moniliforme* aumenta o número de plântulas *susu* anormais, em sementes germinadas em condições favoráveis, Styer e Cantliffe (1984 a) admitiram que outros fatores devem ter maior efeito na redução do vigor das plântulas do milho doce, como também Headrick e Pataky (1989), que atribuíram maior importância a fatores fisiológicos, à semelhança do que postularam para o milho superdoce.

Também entre as características altura da plântula e taxa de infestação por fungos e entre altura da plântula e intensidade de infestação, a ausência de correlações significativas foi quase geral, mostrando que a presença de fungos e mesmo a sua quantidade não comprometeram o desenvolvimento da plântula em sementes *o2o2*, *sh2sh2*, *susu* e *wxwx* que conseguiram germinar.

5.4. ANÁLISE COMPARATIVA DO COMPORTAMENTO DOS QUATRO MUTANTES DE ENDOSPERMA FRENTE À SELEÇÃO NATURAL

As quatro populações, segregando cada uma um diferente mutante de endosperma, foram mantidas independentes e isoladas ao longo das gerações estudadas. No entanto, o fato de apresentarem todas o mesmo "background" genético e de terem se desenvolvido no mesmo ambiente e na mesma época, permite comparar as alterações de frequência provocadas pela seleção natural nos quatro locos monitorados.

Com relação aos componentes de viabilidade do ciclo vital vimos que para três dos mutantes, o2, sh2 e su, as alterações determinadas nas reservas do endosperma foram desvantajosas, o que parece estar relacionado à taxa de germinação, ao vigor da plântula e ao efeito da infestação por fungos. A intensidade desses efeitos foi bastante diferente para cada um daqueles mutantes, tendo sido mais acentuada para os que afetam a quantidade de amido na semente, o sh2 e o su, sugerindo que essa característica é importante na determinação do valor adaptativo, mais que alterações nas frações proteicas, como ocorre no o2. Por outro lado, alterações no tipo de amido, como no wx, podem se constituir em vantagem, dependendo provavelmente das condições ambientais na fase vegetativa do ciclo de vida da planta.

Os componentes de fertilidade parecem ter menos importância na determinação do valor adaptativo do

mutante, com exceção do wx. Os mutantes o2 e su mostraram uma tendência de aumento na frequência de sementes homozigotas recessivas produzidas, fato surpreendente, uma vez que afetam características importantes das sementes.

O comportamento geral das frequências permite portanto dizer que, dos quatro mutantes estudados, o sh2 foi o mais penalizado pela seleção natural, seguido do su. O o2 e o wx, considerando-se o ciclo vital completo, em um número pequeno de gerações, se comportam como seletivamente neutros.

5.5. O EQUILÍBRIO DE HARDY-WEINBERG E DE WRIGHT NAS POPULAÇÕES

Como foi evidenciado neste estudo, a seleção natural age de maneira acentuada e diferenciada na fase vegetativa e na fase reprodutiva do ciclo de vida, aumentando ou diminuindo a frequência de indivíduos homozigotos recessivos para os alelos estudados, nas quatro populações. A ação da seleção pode ocorrer com o mesmo sentido nas duas fases do ciclo, como na população *sh2*, ou com sentidos opostos, como nas demais populações. Pode ter intensidade semelhante, como nas populaçãoe *o2* e *wx*, ou diversa, como nas populações *sh2* e *su*. Em consequência disso, em cada fase do ciclo vital, a frequência gênica é alterada.

Este aspecto dinâmico do comportamento das frequências, detectado claramente nesse trabalho, pode, no entanto, passar despercebido em situações onde um aparente equilíbrio é resultante da ação da seleção natural em sentidos opostos e com intensidades semelhantes nas duas fases do ciclo.

A tabela 29 apresenta os resultados dos testes de χ^2 aplicados sobre os números observados e esperados de plantas dos três genótipos, da geração F2 à F6, nas amostras de plantas autofecundadas. Os valores esperados foram calculados pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg, em F2, e de Wright, de F3 a F6, tomando-se como valor da taxa de cruzamento apenas o determinado experimentalmente neste trabalho.

Tabela 29. Número de plantas obtidas (O) e esperadas (E) de cada genótipo calculado pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg (em F2) e de Wright (em F3 a F6), nas amostras de plantas autofecundadas e testes de χ^2 para hipóteses de equilíbrio das populações (1)

	F2		F3		F4		F5		F6	
	O	E	O	E	O	E	O	E	O	E
O2O2	27	29	43	44	34	34	39	42	58	64
O2o2	55	51	57	56	40	40	75	70	102	90
o2o2	21	23	18	18	13	13	28	30	27	33
χ^2	NS		NS		NS		NS		NS	
Sh2Sh2	28	38	68	78	36	40	67	74	138	142
Sh2sh2	72	52	81	60	36	28	55	42	51	43
sh2sh2	7	17	2	13	1	5	-	6	-	4
χ^2	***		***		*		***		*	
SuSu	36	36	60	66	25	29	60	69	84	88
Susu	50	51	78	66	37	29	75	57	78	69
susu	19	18	11	17	3	7	4	13	10	15
χ^2	NS		*		*		***		NS	
WxWx	24	29	27	29	20	20	22	17	63	59
Wxwx	71	61	76	72	44	45	41	51	82	90
wxwx	27	32	49	51	30	29	51	46	43	39
χ^2	NS		NS		NS		*		NS	

(1) NS = não significativo

* = significativo ao nível de 5%

** = significativo ao nível de 1%

*** = significativo ao nível de 0.1%

Nas populações em que a seleção natural agiu no mesmo sentido nas duas fases do ciclo, como na população **sh2**, ou em sentidos opostos, mas com intensidades diferenciadas, como na população **su**, os testes de χ^2 apresentaram, na sua maioria, resultados significativos, indicando a ausência de equilíbrio nas populações. Porém, nas populações **o2** e **wx**, em que os sentidos da seleção sobre o homocigoto recessivo foram opostos e suas intensidades equivalentes, o teste de χ^2 apontou a quase totalidade de resultados não significativos. Essa situação, além de sugerir que os locos em questão são seletivamente neutros, mascara o comportamento diverso dos locos **o2** e **wx**, pois na fase em que um mostrou desvantagem o outro mostrou vantagem.

A possibilidade da ocorrência de situação semelhante já tinha sido aventada por Wallace (1958) e Lewontin e Cockerham (1959), que mostraram teoricamente a possibilidade de ocorrência do equilíbrio de Hardy-Weinberg mesmo sob forte seleção, quando o produto dos valores adaptativos dos homocigotos é igual ao quadrado do valor do heterocigoto. Também mostraram que se o produto dos valores adaptativos dos homocigotos for menor que o quadrado do valor do heterocigoto, haverá um excesso de heterocigotos, mesmo que a seleção discrimine fortemente esse genótipo. Essas considerações e os resultados do presente trabalho indicam a necessidade de estudos genéticos mais detalhados sobre as populações antes que conclusões sejam tiradas sobre a sua dinâmica.

6. CONCLUSÕES

A análise do comportamento de indivíduos homocigotos para os alelos mutantes *o2*, *sh2*, *su* e *wx*, que condicionam alterações físicas, químicas e nutricionais do endosperma, em populações de milho sob a ação da seleção natural, permite as seguintes conclusões:

1. A seleção natural agiu de maneira diferenciada, nas fases vegetativa e reprodutiva do ciclo de vida da planta, sobre os alelos *opaque 2* (*o2*), *shrunken 2* (*sh2*), *sugary* (*su*) e *waxy* (*wx*).

2. Os indivíduos *o2o2* revelaram desvantagem em relação aos componentes de viabilidade do ciclo vital, que pode ser atribuída em parte à menor taxa de germinação e ao menor vigor das plântulas homocigotas recessivas. Essa desvantagem, aparentemente, foi neutralizada parcialmente por vantagens com relação a componentes de fertilidade que não puderam ser aqui identificados.

3. Os indivíduos *sh2sh2* têm desvantagem nas duas fases do ciclo de vida, o que provoca queda acentuada da frequência do alelo *sh2*, de cerca de 5,9% por geração, no período estudado. Foi constatada uma grande redução na taxa de germinação, que aparentemente é o componente de viabilidade mais importante na redução de homocigotos recessivos. Além disso constatou-se menor vigor das plântulas, maior infestação por fungos, menor porte da planta e aumento no período até o

florescimento, que indiretamente devem ter contribuído para a redução de sua frequência.

4. Os indivíduos *susu* têm desvantagem acentuada nos componentes de viabilidade, que pode ser atribuída em parte ao menor vigor da plântula, agravada pela maior incidência de fungos e por pequena desvantagem na germinação. Componentes de fertilidade, que também aqui não puderam ser identificados, aparentemente propiciaram uma pequena vantagem. Em consequência, ocorreu uma queda da frequência do alelo *su* de cerca de 3,1% por geração no período estudado.

5. Os indivíduos *wxwx*, nas populações em campos isolados, apresentaram vantagem em relação a componentes de viabilidade que não foram comprovados ou identificados nos ensaios de campo e de laboratório. Essa desvantagem foi de intensidade semelhante à desvantagem nos componentes de fertilidade, devida provavelmente à menor capacidade competitiva do pólen *wx*.

6. A seleção natural, agindo em sentidos opostos e com intensidades semelhantes nas fases vegetativa e reprodutiva do ciclo de vida, pode favorecer a manutenção do polimorfismo.

7. RESUMO

O milho é uma planta bastante adequada para estudos de genética e evolução, tendo em vista o amplo conhecimento existente sobre a espécie. Particularmente conhecidos são os vários mutantes de endosperma, que condicionam alterações nas reservas nutritivas da semente, com implicações no ataque por parasitas e no processo de germinação. Esses mutantes têm sido bastante estudados sob aspectos genéticos, bioquímicos, fisiológicos e nutricionais. O seu comportamento frente à seleção natural, entretanto, não tem merecido a atenção dos pesquisadores.

No presente trabalho foram estimadas as freqüência alélicas de quatro mutantes recessivos de endosperma de milho, submetidos à seleção natural ao longo de cinco gerações sucessivas (F2 a F7), em populações sintetizadas a partir do cruzamento de duas linhagens contrastantes. Foram utilizadas quatro versões de uma das linhagens, cada uma homocigota para um dos mutantes, obtendo-se portanto quatro populações independentes, segregando cada uma um dos alelos monitorados. Os mutantes analisados foram: **opaque 2** (**o2**), com composição proteica alterada e aumento de lisina e triptofano; **shrunken 2** (**sh2**), com bloqueio na síntese de amido e conseqüente aumento de açúcares simples; **sugary** (**su**), com redução do amido e presença significativa de fitoglicogênio; e **waxy** (**wx**), cujo amido não apresenta amilose, sendo constituído

apenas por amilopectina.

Nas cinco gerações estudadas foram determinadas as freqüências nos locos para endosperma em consideração, na fase vegetativa e na fase reprodutiva do ciclo de vida. Nas sementes foi verificada a freqüência de mutantes, portanto homozigotos recessivos. Na fase adulta foi verificada a freqüência genotípica através da identificação do genótipo das plantas segundo o tipo de espiga produzida em amostras autofecundadas.

A análise das freqüências genotípicas evidenciou que o mutante **opaque 2** apresenta vantagem seletiva em componentes de fertilidade do ciclo vital, aparentemente anulada por desvantagem um pouco maior em componentes de viabilidade. O **shrunken 2** mostra desvantagem nas duas fases do ciclo, bastante acentuada nos componentes de viabilidade. O **sugary** apresenta desvantagem acentuada quanto à viabilidade e provavelmente pequena vantagem nos componentes de fertilidade. No **waxy** a situação é inversa à do **opaque 2**, ocorrendo vantagem com relação aos componentes de viabilidade e desvantagem nos de fertilidade.

Na tentativa de identificar os componentes responsáveis pelas alterações verificadas nas freqüências foram realizados ensaios de campo e de laboratório, estudando características das plantas de diferentes genótipos, e análises de segregação em plantas autofecundadas nas cinco gerações sucessivas. Nas populações **o₂** e **su** foi notada menor taxa de

germinação e menor vigor das plântulas homozigotas recessivas. Na população **sh2** houve desvantagem do mutante em diferentes componentes, como taxa de germinação, vigor da plântula, infestação por fungos, altura da planta e início do florescimento. Na população **wx** foi evidenciada desvantagem do pólen carregando o alelo mutante.

As frequências genotípicas permitiram estimar as frequências gênicas dos diferentes alelos ao longo das gerações estudadas. O **o2** e o **wx** mostraram tendência a manter a frequência inicial, enquanto que os mutantes **sh2** e **su** apresentaram queda contínua em suas frequências.

Portanto, o efeito da seleção natural sobre os mutantes de endosperma se manifestou através de um comportamento diferenciado dos indivíduos homozigotos recessivos, nas fases vegetativa e reprodutiva do ciclo de vida, em cada população, resultando em comportamento também diferenciado das frequências dos diferentes alelos.

SUMMARY

Maize is a plant which is quite appropriate for genetic and evolutionary studies, since so much is known about the species. The particularly well known endosperm mutants, conditioning changes in the nutritive reserves of the seeds, have implications in the attraction of parasites and in the process of germination. The genetic, biochemical, physiological and nutritional aspects of these mutants have been widely studied, although the effects of natural selection have never received much attention from research workers

Four recessive maize endosperm mutants were submitted to natural selection for five successive generations (F₂ to F₇), in populations synthesized from the crossing of two inbred lines. Four variants of one inbred line, each a homozygote for one of the mutations, were crossed with an inbred with normal endosperm. Thus four independent populations, with the same genetic background were obtained, each segregating for the following alleles: **opaque 2** (**o2**), with an altered protein composition, resulting in an increase in lysine and tryptophan, **shrunken 2** (**sh2**), with a lack of starch synthesis and a consequent increase in sugar content; **sugary** (**su**), with starch reduction and the presence of a significant amount of phytoglicogen; and **waxy** (**wx**), whose starch is constituted only of amylopectin

The frequency of alleles controlling the four types of endosperm was estimated at two stages of the life-cycle, the vegetative and the reproductive stages, in the five successive generations. The frequency of mutant seeds, i.e., recessive homozygotes, was determined, and, during the adult phase, the genotypic frequency was verified by means of the identification of plant genotypes according to the ear produced in self-pollinated samples.

An analysis of the genotypic frequency indicated that **o2o2** showed a selective advantage for the fertility components, although this was apparently annulled by a slightly greater disadvantage for viability components. The **sh2sh2** shows a disadvantage in both phases of the cycle, quite clear for the viability components. The **susu** showed a strong disadvantage for the viability components and an apparent slight advantage for the fertility components. For the **wxwx** the situation was the opposite of that found for the **o2o2**, with an advantage for the viability components but a disadvantage for the fertility components.

In an attempt to identify the components responsible for the changes verified in frequencies, various field and laboratory experiments were carried out to study the characteristics of the plants of the different genotypes, followed by analysis of segregation patterns in self-pollinated plants of the five successive generations. In the **o2** and **su** populations was found a lower germination rate and seedling

vigor for the recessive homozygote. A disadvantage for the mutants in the *sh2* population was found in relation to various components, such as germination rate, seedling vigor, fungus infection, plant height and flowering initiation. In the *wx* population, there was a disadvantage for the pollen carrying the mutant allele.

The genotypic frequencies allowed the determination of the gene frequencies for the different alleles. The *o2* and *wx* mutants showed a tendency to maintain the initial frequencies, whereas the *sh2* and *su* mutants showed a continuous decrease in their frequencies.

Therefore the effect of natural selection over the endosperm mutants was expressed through distinct behaviours of the recessive homozygotes during the vegetative and the reproductive phases of the life-cycle, resulting in different patterns of changes in gene frequencies.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahmadi, M., W. J. Wiebold and J. E. Beuerlein. 1993. Grain yield and mineral composition of corn as influenced by endosperm type and nitrogen. **Communications in Soil Science and Plant Analysis** 24 (17-18): 2409-2426.
- Alexander, D. E. 1988. Breeding special nutritional and industrial types. In G. F. Sprague and J. W. Dudley, eds, **Corn and Corn Improvement**, third edition. American Society of Agronomy, Inc. Publisher. Madison.
- Allard, R. W. 1975. The mating system and microevolution. **Genetics** 79: 115-126 (Suppl.).
- Allard, R. W. 1988. Genetic changes associated with the evolution of adaptedness in cultivated plants and their wild progenitors. **The Journal of Heredity** 79 (4): 225-238.
- Allard, R. W., G. R. Babbel, M. T. Clegg and A. L. Kahler. 1972. Evidence for coadaptation in Avena barbata. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA** 69: 3043-3048.
- Allard, R. W., S. K. Jain and P. L. Workman. 1968. The genetics of inbreeding populations. **Advances in Genetics** 14: 55-131

- Allard, R. W. and P. L. Workman. 1963. Populations studies in predominantly self-pollinated species. IV. Seasonal fluctuations in estimated values of genetic parameters in lima bean populations. *Evolution* 17: 470-480.
- Baenziger, P. S. and D. V. Glover. 1979. Dry matter accumulation in maize hybrids near isogenic for endosperm mutants conditioning protein quality. *Crop Science* 19 (3): 345-349.
- Bateman, A. J. 1947. Contamination in seed crops. II. Wind pollination. *Heredity* 1: 235-241.
- Bemiler, J. N. and A. J. Pappelis. 1965. 2,4 - dihydroxy - 7 - methoxy - 1,4 - benzoxazin - 3 - one glucoside in corn. I. Relation of water-soluble, 1 - butanol - soluble glycoside fraction content of pith cores and stalk rot resistance. *Phytopathology* 55: 1237-1240.
- Bijlsma, R., R. W. Allard and A. L. Kahler. 1986. Nonrandom mating in an open-pollinated maize population. *Genetics* 112 (3): 669-680.

- Bosbach, K. and H. Hurka. 1981. Biosystematic studies on Capsella bursa-pastoris (Brassicaceae): enzyme polymorphism in natural populations. **Plant Systematics and Evolution** 137: 73-94.
- Bressani, R. 1966. Protein quality of opaque-2 maize in children. In E. T. Mertz and O. E. Nelson, eds, **Proceedings of the high lysine corn conference**. Corn Industries Research Foundation, Washington, D. C.
- Brink, R. A. and J. H. MacGillivray. 1924. Segregation for the waxy character in maize pollen and differential development of the male gametophyte. **American Journal of Botany** 11: 465-469.
- Brown, A. H. D. 1979. Enzyme polymorphism in plant populations. **Theoretical Population Biology** 15: 1-42.
- Brown, A. H. D. and R. W. Allard. 1970. Estimation of the mating system in open-pollinated maize populations using isozyme polymorphisms. **Genetics** 66: 133-145.
- Brown, A. H. D. and J. J. Burdon. 1987. Mating systems and colonizing success in plants. In A. J. Gray, M. J. Crawley and P. J. Edwards, eds, **Colonization, Succession and Stability**. Blackwell Scientific Publications, Oxford.

- Brown, A. H. D., J. J. Burdon and A. M. Jarosz. 1989. Isozyme analysis of plant mating systems. In D. E. Soltis and P. M. Soltis, eds, **Isozymes in plant biology**. Dioscorides Press, Portland.
- Brown, A. H. D., A. C. Matheson and K. G. Eldridge. 1975. Estimation of the mating system of Eucalyptus obliqua L'Hérit by using allozyme polymorphisms. **Australian Journal of Botany** 23 (6): 931-949.
- Bundgaard, J. and F. B. Christiansen. 1972. Dynamics of polymorphisms: I. Selection components in an experimental population of Drosophila melanogaster. **Genetics** 71 (3): 439-460.
- Cameron, J. W. 1947. Chemico-genetic bases for the reserve carbohydrates in maize endosperm. **Genetics** 32: 459-485.
- Christiansen, F. B., J. Bundgaard and J. S. F. Barker. 1977. On the structure of fitness estimates under post observational selection. **Evolution** 31 (4): 843-853.
- Clark, H. E. 1966. Opaque-2 corn as a source of protein for adult human subjects. In E. T. Mertz and O. E. Nelson, eds, **Proceedings of the high lysine corn conference**. Corn Industries Research Foundation, Washington, D. C.

- Clarke, B. 1975. The contribution of ecological genetics to evolutionary theory: detecting the direct effects of natural selection on particular polymorphic loci. **Genetics** 79 (Suppl.): 101-113.
- Clegg, M. T. 1980. Measuring plant mating systems. **Bioscience** 30 (12): 814-818.
- Clegg, M. T. and R. W. Allard. 1973. Viability versus fecundity selection in the slender wild oat, Avena barbata L. **Science** 181: 667-668.
- Clegg, M. T., R. W. Allard and A. L. Kahler. 1972. Is the gene the unit of selection? Evidence from two experimental plant populations. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA** 69 (9): 2474-2478.
- Clegg, M. T., A. L. Kahler and R. W. Allard. 1978. Estimation of life cycle components of selection in an experimental plant population. **Genetics** 89: 765-792.
- Dalby, A. and C. Y. Tsai. 1975. Comparisons of lysine and zein and nonzein protein contents in immature and mature maize endosperm mutants. **Crop Science** 15 (4): 513-515.

- De Benedictis, P. A. 1978. Are populations characterized by their genes or by their genotypes? *The American Naturalist* 112: 155-175.
- Dirzo, R. and J. L. Harper. 1982. Experimental studies on slug-plant interactions. IV. The performance of cyanogenic and acyanogenic morphs of *Trifolium repens* in the field. *Journal of Ecology* 70: 119-138.
- Douglass, S. K., J. A. Juvik and W. E. Splittstoesser. 1993. Sweet corn seedling emergence and variation in kernel carbohydrate reserves. *Seed Science and Technology* 21 (2): 33-445.
- Earle, F. R., J. J. Curtis and J. E. Hubbard. 1946. Composition of the component parts of the corn kernel. *Cereal Chemistry* 23: 504-511.
- Endler, J. A. 1986. *Natural selection in the wild*. Princeton University Press. Princeton, New York.
- Ennos, R. A. 1990. Detection and measurement of selection: genetic and ecological approaches. In A. H. D. Brown, M. T. Clegg, A. L. Kahler and B. S. Weir, eds, *Plant population genetics, breeding and genetic resources*, 200-214.

- Ennos, R. A. and M. T. Clegg. 1982. Effect of population substructuring on estimates of outcrossing rate in plant populations. *Heredity* 48 (2): 283-292.
- Eyster, W. H. and B. A. Robinson. 1936. Gametophytic genes in relation to modified ratios. *American Naturalist* 70: 50
- Falconer, D. S. 1987. *Introdução à Genética Quantitativa*. Imprensa Universitária da Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, Minas Gerais.
- Futuyma, D. J. 1992. *Biologia Evolutiva*. Sociedade Brasileira de Genética/CNPq. Ribeirão Preto, São Paulo.
- Goodman, M. M. and J. S. C. Smith. 1987. Botânica. In *Melhoramento e Produção do Milho*, v. 1. Fundação Cargill. Campinas, São Paulo.
- Gutierrez, M. G. and G. F. Sprague. 1959. Randomness of mating in isolated polycross plantings of maize. *Genetics* 44: 1075-1082.
- Hamrick, J. L. 1982. Plant population genetics and evolution. *American Journal of Botany* 69 (10): 1685-1693.

- Harding, J. and C. L. Tucker. 1964. Quantitative studies on mating systems. I. Evidence for the non-randomness of outcrossing in Phaseolus lunatus. *Heredity* 19 (3): 369-381
- Harding, J. and C. L. Tucker. 1969. Quantitative studies on mating systems. III. Methods for the estimation of male gametophytic selective values and differential outcrossing rates. *Evolution* 23: 85-95.
- Harris, M. J. and D. A. DeMason. 1989. Comparative kernel structure of three endosperm mutant of Zea mays relating to seed viability and seedling vigor. *Botanical Gazette* 150: 50-62.
- Headrick, J. M. and J. K. Pataky. 1989. Resistance to kernel infection by Fusarium moniliforme in inbred lines of sweet corn and the effect of infection on emergence. *Plant Disease* 73: 887-892.
- Headrick, J. M., J. K. Pataky and J. A. Juvik. 1990. Relationships among carbohydrate content of kernels, condition of silks after pollination, and the response of sweet corn inbred lines to infection of kernels by Fusarium moniliforme. *Phytopathology* 80 (5): 487-494.

- Holden, J. H. W. and D. A. Bond. 1960. Studies on the breeding system of the field bean Vicia faba L. **Heredity** 15: 175-192.
- Hormaza, J. I. and M. Herrero. 1992. Pollen selection. **Theoretical and Applied Genetics** 83 (6-7): 663-672.
- Jain, S. 1983. Breeding systems and the dynamics of plant populations. **Proceedings of the XV International Congress of Genetics**. Oxford & IBH Publishing Co. New Delhi.
- Jain, S. K. and D. R. Marshall. 1967. Genetic changes in a barley population analysed in terms of some life cycle components of selection. **Genetica** 38: 355-374.
- Jain, K. B. L., C. W. Schaller and S. K. Jain. 1979. Genetic variation in the outcrossing rates in barley. **Genetica** 50: 41-49.
- Jones, D. F. 1920. Selective fertilization in pollen mixtures. **Biological Bulletin** 38 (5): 251-289.
- Kahler, A. L., C. D. Gardner and R. W. Allard. 1984. Nonrandom mating in experimental populations of maize. **Crop Science** 24 (2): 350-354.

- Kojima, K. 1971. Is there a constant fitness value for a given genotype? No! **Evolution** 25: 281-285.
- Laughnan, J. R. 1953. The effect of the sh2 factor on carbohydrate reserves in the mature endosperm of maize. **Genetics** 38: 485-499.
- Lewontin, R. C. 1991. Electrophoresis in the development of evolutionary genetics: milestone or millstone? **Genetics** 128: 657-662.
- Lewontin, R. C. and C. C. Cockerham. 1959. The goodness-of-fit test for detecting natural selection in random mating populations. **Evolution** 13: 561-564.
- Li, Xue-Yuan and Ji-Lin Liu. 1993. The effects of maize endosperm mutant genes and gene interactions on kernel components: I. The effects on kernel weight, protein content and protein fractions. **Acta Agron. Sin.** 19 (3): 218-226.
- Loveless, M. D. and J. L. Hamrick 1984. Ecological determinants of genetic structure in plant populations. **Ann. Rev. Ecol. Syst.** 15: 65-95.

- Mangelsdorf, P. C. and D. F. Jones. 1926. The expression of mendelian factors in the gametophyte of maize. **Genetics** 11: 423-455.
- Martins, C. M. de C. 1983. **Estudo de efeitos dos genes opaque-2, shrunken e shrunken-2 durante a germinação do milho** Tese de Mestrado. Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas. Campinas, São Paulo.
- Melchers, L. E. 1956. Fungi associated with Kansas hybrid seed corn. **Plant Dis. Reprtr.** 40: 500-506.
- Mertz, E. T. 1966. Growth of rats on opaque-2 maize. In E. T. Mertz and O. E. Nelson, eds, **Proceedings of the high lysine corn conference**. Corn Industries Research Foundation. Washington, D. C.
- Mertz, E. T., L. S. Bates and O. E. Nelson. 1964. Mutant gene that changes protein composition and increases lysine content of maize endosperm. **Science** 145: 279-280.
- Metivier, J. and A. M. Monteiro. 1981. Early seedling growth in normal and opaque-2 Zea mays L. cv Maya. 1. Composition and mobilization of the endosperm protein reserve. **Journal of Experimental Botany** 32 (131): 1321-1332.

- Mettler, L. E. e T. G. Gregg. 1973. **Genética de População e Evolução**. Ed. Polígono e Ed. da Universidade de São Paulo. São Paulo.
- Misra, P. S., R. Jambunathan, E. T. Mertz, D. V. Glover, H. M. Barbosa and K. S. Mc Whirter. 1972. Endosperm protein synthesis in maize mutants with increased lysine content. **Science** 176: 1425-1427.
- Mohamed, H. A., W. E. Ashour, A. R. Sirry and S. M. Fathi. 1967. Fungi carried by corn seed and their importance in causing corn diseases in the United Arab Republic. **Plant Dis. Repr.** 51: 53-56.
- Mulcahy, D. L. 1971. A correlation between gametophytic and sporophytic characteristics in *Zea mays* L. **Science** 171: 1155-1156.
- Nadeau, J. H. and R. Baccus. 1981. Selection components of four allozymes in natural populations of *Peromyscus maniculatus*. **Evolution** 35: 11-20.
- Nass, H. G. and P. L. Crane. 1970 a. Effect of endosperm mutants on germination and early seedling growth rate in maize (*Zea mays* L.). **Crop Science** 10: 139-140.

- Nass, H. G. and P. L. Crane. 1970 b. Effect of endosperm genes on dry matter accumulation and moisture loss in corn (Zea mays L.). **Crop Science** 10: 276-280.
- Nelson, O. E. 1967. Un gene mutante che influenza la sintesi delle proteine nell'endosperma del mais. **Maydica** 12: 81-96.
- Nelson, O. E. 1969. Genetic modification of protein quality in plants. **Advances in Agronomy** 21: 171-193.
- Nelson, O. E., E. T. Mertz and L. S. Bates. 1965. Second mutant gene affecting the aminoacid pattern of maize endosperm proteins. **Science** 150: 1469-1470.
- Neuffer, M. G., L. Jones and M. S. Zuber. 1968. **The mutants of maize**. The Crop Science Society of America. Madison, Wisconsin.
- Nevo, E. 1978. Genetic variation in natural populations: patterns and theory. **Theoretical Population Biology** 13: 121-177.

- Ostergaard, H. and F. B. Christiansen. 1981. Selection component analyses of natural populations using population samples including mother-offspring combinations, II. **Theoretical Population Biology** 19 (3): 378-419.
- Ottaviano, E. and D. L. Mulcahy. 1986. Gametophytic selection as a factor of crop plant evolution. In C. Barigozzi (ed): **The origin and domestication of cultivated plants**. Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam.
- Ottaviano, E., D. Petroni and M. E. Pé. 1988. Gametophytic expression of genes controlling endosperm development in maize. **Theoretical and Applied Genetics** 75 (2): 252-258.
- Ottaviano, E., M. Sari Gorla and E. Pé. 1982. Male gametophytic selection in maize. **Theoretical and Applied Genetics** 63 (3): 249-254.
- Ottaviano, E., M. Sari Gorla and M. Villa. 1988. Pollen competitive ability in maize: within population variability and response to selection. **Theoretical and Applied Genetics** 76 (4): 601-608.
- Paez, A. V., J. L. Helm and M. S. Zuber. 1969. Lysine content of opaque-2 maize kernels having different phenotypes. **Crop Science** 9: 251-252.

- Paradela Filho, O. 1982. Comportamento de mutantes de endosperma de milho (Zea mays L.) em relação ao Fusarium moniliforme Sheld. Tese de doutorado. Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas. Campinas, São Paulo.
- Paterniani, E. 1969. Selection for reproductive isolation between two populations of maize, Zea mays L. *Evolution* 23: 534-547.
- Paterniani, E. and A. C. Stort. 1974. Effective maize pollen dispersal in the field. *Euphytica* 23: 129-134.
- Pfahler, P. L. 1965. Fertilization ability of maize pollen grains. I. Pollen sources. *Genetics* 52: 513-520.
- Pickett, R. A. 1966. Opaque-2 corn in swine nutrition. In E. T. Mertz and O. E. Nelson, eds, **Proceedings of the high lysine corn conference**. Corn Industries Research Foundation. Washington, D. C.
- Prout, T. 1965. The estimation of fitnesses from genotypic frequencies. *Evolution* 19: 546-551.

- Radha, M. R., R. Vasudeva, S. G. Hedge, K. N. Ganeshaiah and R. Uma Shaanker. 1993. Components of male gametophytic competition in Vigna unguiculata L. (Walp.). **Evol. Trends in Plants** 7 (1): 29-36.
- Ratcliff, S. L., D. O. Wilson Jr, E. A. Knott and S. K. Mohan. 1993. Free fatty acids in shrunken-2 sweet corn seed. **Crop Science** 33 (4): 871-873.
- Sanders, T. B. and J. L. Hamrick. 1980. Variation in the breeding system of Elymus canadensis. **Evolution** 34 (1): 117-122.
- Sari Gorla, M., R. Bellintani and E. Ottaviano. 1976. Competitive ability of maize pollen. Interaction between genotypes of pollen and stylar tissues. **Maydica** 21: 77-88.
- Sari Gorla, M., C. Frova, G. Binelli and E. Ottaviano. 1986. The extend of gametophytic-sporophytic gene expression in maize. **Theoretical and Applied Genetics** 72 (1): 42-47.
- Sari Gorla, M., E. Ottaviano and D. Faini. 1975. Genetic variability of gametophyte growth rate in maize. **Theoretical and Applied Genetics** 46: 289-294.

- Sari Gorla, M., M. E. Pe, D. L. Mulcahy and E. Ottaviano. 1992. Genetic dissection of pollen competitive ability in maize. *Heredity* 69 (5): 423-430.
- Sari Gorla, M. and E. Rovida. 1980. Competitive ability of maize pollen. Intergametophytic effects. *Theoretical and Applied Genetics* 57 (1): 37-41.
- Schoen, D. J. and M. T. Clegg. 1984. Estimation of mating system parameters when outcrossing events are correlated. *Proc. Nat. Acad. Sci USA* 81 (16): 5258-5262.
- Schoen, D. J. and M. T. Clegg. 1986. Monte Carlo studies of plant mating system estimation models: the one-pollen parent and mixed mating models. *Genetics* 112 (4): 927-945.
- Schwartz, D. 1986. Analysis of the autonomous wx-m7 transposable element mutant of maize. *Maydica* 31: 123-129.
- Shannon, Y. C. and R. G. Creech. 1972. Genetics of storage polyglucosides in Zea mays L. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 210: 279-289.
- Shaw, D. V., A. L. Kahler and R. W. Allard. 1981. A multilocus estimator of mating system parameters in plant populations. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 78 (2): 1298-1302.

- Solbrig, O. T. 1980. Demography and Natural Selection. In **Demography and evolution in plant population**, pp 1-20. Blackwell Sci. Publ. Berkeley.
- Sprague, G. F. 1933. Pollen tube establishment and the deficiency of waxy seeds in certain maize crosses. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**. 19: 838-841.
- Sprague, G. F., B. Brimhall and R. M. Hixon. 1943. Some effects of the waxy gene in corn on properties of the endosperm starch. **J. Amer. Soc. Agron.** 35: 817-822.
- Stebbins Jr, G. L. 1950. **Variation and evolution in plants**. Columbia University Press.
- Stebbins, G. L. 1989. Introduction. In D. E. Soltis and P. S. Soltis, eds, **Isozymes in Plant Biology**. Dioscorides Press, Portland, Oregon.
- Strickberger, M. W. 1985. **Genetics**. Macmillan Publishing Co. New York.
- Styer, R. C. and D. J. Catliffe. 1984 a. Infection of two endosperm mutants of sweet corn by Fusarium moniliforme and its effect on seedling vigor. **Phytopathology** 74: 189-194

- Styer, R. C. and D. J. Cantliffe. 1984 b. Dependence of seed vigor during germination on carbohydrate source in endosperm mutants of maize. *Plant Physiology* 76: 196-200.
- Styer, R.C., D. J. Cantliffe and L. C. Hannah. 1980. Differential seed and seedling vigor in shrunken-2 compared to three other genotypes of corn at various stages of development. *J. American Soc. Hort. Sci* 105 (3): 329-332.
- Tosello, G. A. 1987. Milhos especiais e seu valor nutritivo. In *Melhoramento e Produção do Milho*, v. 1. Fundação Cargill. Campinas, São Paulo.
- Tsai, C. Y. and O. E. Nelson. 1966. Starch deficient maize mutants lacking adenosine diphosphate glucose pyrophosphorylase activity. *Science* 151: 341-343.
- Tucker, C. L. and J. Harding. 1965. Quantitative studies on mating systems. II. Estimation of fitness parametes in a population of Phaseolus lunatus. *Heredity* 20: 393-402.
- Tuite, J. and R. W. Caldwell. 1971. Infection of corn seed with Helminthosporium maydis and other fungi in 1970. *Plant Dis. Repr.* 55: 387-389.

- Vasek, F. C. 1964. Outcrossing in natural populations. I. The Breckinridge Mountain population of Clarkia exilis. *Evolution* 18: 213-218.
- Wallace, B. 1958. The comparison of observed and calculated zygotic distributions. *Evolution* 12: 113-115
- Wann, E. W. 1980. Seed vigor and respiration of maize kernels with different endosperm genotypes. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 105 (1): 31-34.
- Warren, H. L. 1978. Comparison of normal and high-lysine maize inbreeds for resistance to kernel rot caused by Fusarium moniliforme. *Phytopathology* 68 (9): 1331-1335.
- Watson, S. A. 1988. Corn marketing, processing and utilization. In G. F. Sprague and J. W. Dudley, eds, **Corn and Corn Improvement**, third edition. American Society of Agronomy, Inc. Publisher. Madison.
- Weatherwax, P. 1922. A rare carbohydrate in waxy maize. *Genetics* 7: 568-572.
- Weeden, N. F. and J. F. Wendel. 1989. Genetics of plant isozymes. In D. E. Soltis and P. S. Soltis, eds, **Isozymes in Plant Biology**. Dioscorides Press, Portland, Oregon.

Workman, P. L. and S. K. Jain. 1966. Zygotic selection under mixed random mating and self-fertilization: theory and problems of estimation. *Genetics* 54: 159-171.

Zamir, D., S. D. Tanksley and R. A. Jones. 1982. Haploid selection for low temperature tolerance of tomato pollen. *Genetics* 101: 129-137.