

A Ação dos Gens Gametofíticos com referência especial ao Milho (*)

F. G. Brieger

*Escola Superior de Agricultura
"Luiz de Queiroz", Universidade
de S. Paulo*

INDICE

1 — Introdução.....	270	gens gametofíticos de competição	280
2 — A estrutura do ovário e o crescimento do tubo polínico em milho	274	6 — Os gens de competição gametofítica conheci- dos em milho	286
3 — Mecanismo da competi- ção entre os tubos polínicos	276	7 — O valor de fatores ga- metofíticos no melho- ramento	289
4 — Considerações fisio- lógicas sôbre o cres- cimento dos tubos..	279	8 — Discussão.....	290
5 — Análise genética dos		Abstract	290
		Literatura	294

(*) Recebido para publicação em 13-IX-1945.

I — INTRODUÇÃO

Nos trabalhos experimentais, desde os primeiros estudos de MENDEL até hoje, foram encontradas muitas aparentes exceções às regras que costumamos chamar "as leis de MENDEL" e de "MORGAN". Sabemos que estas exceções, quando completamente esclarecidas, tornam-se um forte suporte destas mesmas leis, porque explicam em detalhe os processos fundamentais e as suas possíveis alterações. Estas complicações podem ser resumidas em três classes: (BRIEGER 1937b).

- a) Inconstância dos gens;
- b) Segregação anormal;
- c) Segregação obscurecida.

Na primeira classe, **inconstância dos gens**, devemos incluir um número não muito pequeno de gens instáveis, especialmente estudados em plantas, como por exemplo, os fatores para variegação de côres.

Estamos acostumados a considerar a constância ou inconstância de um gen como um característico do mesmo, mas recentemente RHOADES (1938), mostrou num caso especial do milho, que a situação pode ser mais complicada. Um dos gens básicos A1, que provoca em conjunto com os gens. A2 C R a formação de antocianina na aleurona, a segunda camada dos grãos de milho, torna-se instável quando um outro gen, chamado dt, "dotted" ou manchado, está presente em forma homozigota.

Um outro caso muito interessante encontrei em *Mirabilis jalapa*, na qual dois gens não-aleles que controlam os contrastes: flores vermelhas ou brancas, com ou sem antocianina, e flores amarelas ou brancas, tornam-se simultaneamente instáveis, resultando flores manchadas de branco, amarelo, vermelho e laranja. Estamos estudando se se trata aqui de um só gen que torna simultaneamente os dois outros instáveis.

Na segunda classe, **segregação anormal**, incluímos todos os casos onde o processo citogenético da meiose e conseqüentemente o mecanismo básico da segregação genética não segue a sua marcha normal.

São bem conhecidos os casos de partenogênese diplóide na qual a oosfera é formada sem nenhuma divisão meiótica anterior, ou onde é intercalada uma anulação da divisão meiótica, devida a uma fusão de dois núcleos, em geral nos gonóci-

tos da primeira ordem, como no caso dos núcleos de restituição em *Hieracium* (Rosenberg 19).

Em outros casos ainda, temos uma segregação preferencial, isto é, a distribuição dos cromossômios na meiose não se dá de acaso, mas é dirigida. Tackholm (19) descreveu um caso interessante em híbridos interespecíficos do gênero *Rosa*, com $3 \times 7 = 21$ cromossômios. Aqui são formados 7 bivalentes e 7 univalentes. Em geral, em tais híbridos alotriplóides, as partes dos bivalentes são distribuídas regularmente aos dois polos da divisão, quando ao mesmo tempo a distribuição dos univalentes se dá por acaso, e qualquer número de zero até sete pode ser reunido em um ou outro polo da divisão meiótica. Na meiose dos megasporócitos nestas roseiras, sempre todos os 7 univalentes migram para um polo e nenhum para o outro polo, de tal modo que o megaspóro que funciona recebe sempre 14 cromossômios, sendo 7 derivados dos bivalentes e 7 dos univalentes.

Um caso de uma segregação preferencial de um cromossômio foi recentemente descrito por Rhoades (1942) em milho, devido a alterações na estrutura do cromossômio dez.

Podemos também incluir neste grupo de distúrbios da meiose a eliminação preferencial de cromossômios como descrito por exemplo para vespas por DREYFUSS e BREUER (1944).

E, interessante notar, que distúrbios da meiose podem ser o resultado da ação de gens específicos, quando homozigotos. Assim, conhecemos em milho um gen que impede todo o pareamento dos cromossômios (BEADLE AND MACCLINTOCK, 1928, BEADLE 1930) um outro que torna os cromossômios grudentos (BEADLE 1932) e um ainda que provoca o aparecimento de mais de duas divisões meióticas (BEADLE 1931). Talvez devemos incluir aqui o gen de GOWEN (1922) que, em *DROSOPHILA*, impede todo o "crossing-over" quando homozigoto, e que talvez causa como primeiro efeito distúrbios da meiose. Estes gens demonstram que não existe fase alguma que não seja controlada pela ação dos gens.

Os casos da terceira classe, **segregação obscurecida**, são os mais comuns e que mais complicações introduzem nos trabalhos dos geneticistas. Aqui as divisões meióticas se processam normalmente e a segregação nos quatro genes é completamente normal. Mas depois, processos de seleção entram em ação, seja durante a gonófase, seja na sigófase, e que alteram as proporções numéricas das diferentes classes de **segredos**

Podemos distinguir dois grupos de gens : os gens letais ou sub-letais que reduzem a viabilidade de certos genótipos, causando eliminação total ou parcial em homozigotos, e gens de competição, que agem apenas em heterozigotos. O númro de gens letais ou sub-letais, tanto em animais como em plantas, é tão grande hoje que nem é necessário citar exemplos. Os gens de competição, que agem apenas na gonófase podem sòmente ser estudados em plantas, pois é um fato geralmente bem conhecido que os gens são inativos na gonófase dos animais a qual é representada apenas pelos gâmetas.

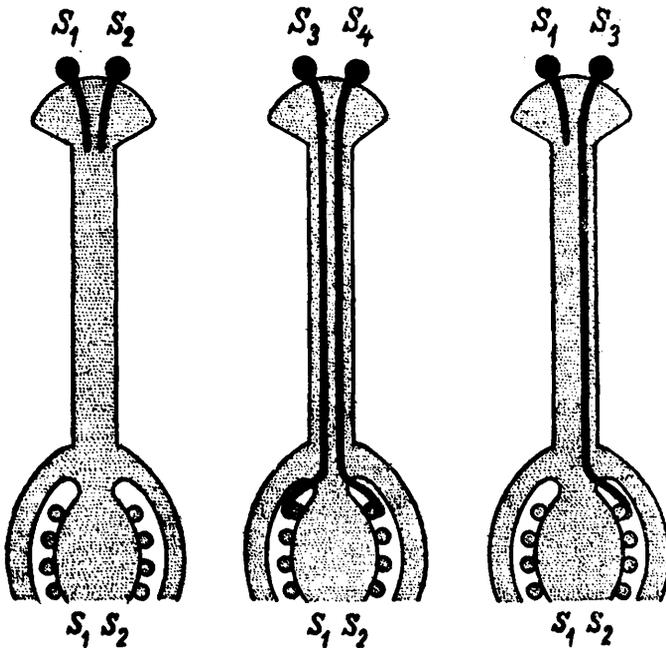
Uma vez que a gonófase das plantas superiores é representada pelo gametófito, os respectivos gens são frequentemente chamados gens gametofíticos sem que as duas expressões, gen gonofásico de competição e gen gametofítico sejam idênticas.

Assim, os gens do milho doce *su-1*, *su2*, *suX*, e do milho ceroso: *wx*, são gametofíticos, pois a sua ação é restrita ao gametófito no seu sentido botânico. Nos homozigotos *susu* e *wxwx* não se pode notar efeito algum na planta mesma ou no embrião, fases que representam o esporófito. Na presença do gen *wx*, sòmente no pólen e no endosperma, quando homozigoto, encontramos em lugar do amido um outro carboidrato, chamado eritro-dextrina que se colore de vermelho-marron com iôdo, em vez de azul. No caso dos gens *su1*, temos no endosperma um alto teor de açúcares em substituição a uma parte do amido.

A forma mais extrema de gens de competição gametofítica encontramos no caso de gens que causam a auto-esterilidade. O exemplo melhor estudado até hoje foi explicado por EAST AND MANGELSDORF (1925) em *Nicotiana Sandeera* e por FILZER (1926) em *Veronica Syriaca*, (adatan-do-se o esquema de sexualidade ou esterilidade em basidio-micetos, dado por KNILEP em 1920. Nestas espécies de *Nicotiana* e *Veronica* encontramos uma série de gens aleles denominados *S1*, *S2*, etc., que agem do seguinte modo: Os grãos de pólen germinam normalmente no estigma de qualquer indivíduo da espécie, mas os tubos polínicos sòmente se desenvolvem normalmente quando contêm fatores *S* não presentes no tecido condutor do estilo da planta usada como fêmea. Em plantas da constituição (*S1 S2*) quando autofecundadas, os tubos polínicos *S1* e *S2* não crescem normalmente (Fig 1) e assim não atingem as oosferas nos óvulos. Quando o pólen de outra planta, por exemplo (*S3 S4*) é aplicado no mesmo indivíduo (*S1 S2*) então tanto os tubos *S3* como *S4* funcionam normalmente. Se o pai tinha a constituição (*S1 S3*), e polinizamos

com este pólen plantas ($S_1 S_2$), apenas os tubos S_3 se desenvolvem normalmente. Todas estas combinações estão representadas esquematicamente, na Fig. 1.

Fig. 1 (sy. Brieger 1930)



Como consequência natural desta situação devemos encontrar também uma eliminação dos gens que são ligados geneticamente aos fatores S. Assim, BRIEGER AND MANGELSDORF (1926) verificaram uma segregação alterada para o gen *c* em *Nicotina Sanderæ* que provoca a cor branca das flores e que dá com os gens S cerca de 20% de crossing-over. Anormalidades da segregação do gen *c* para flores simétricas em *Antirrhinum* também são devidas a sua ligação com os fatores da auto-esterilidade (BRIEGER 1930, 1935).

O esquema dos fatores S não deve ser generalizado nem considerado como a única forma da determinação genética da auto-esterilidade. Segundo CORRENS (1912) a hereditariedade desta esterilidade é bem diferente em *Cardamine* (Crucifera),

quando em *Tolmiea* (Saxifragaceae) (CORRENS 1928a), a determinação é fenotípica, de modo que cada indivíduo é auto-estéril e fértil como todas as demais plantas da espécie.

A ação genética dos gens S da auto-esterilidade podia ser estudada diretamente em consequência da sua ação extrema que provoca a esterilidade em autofecundações ou em certos cruzamentos, como acabamos de explicar. O estudo dos gens ligados a eles deu uma comprovação adicional da fórmula genética da auto-esterilidade.

Quando estudamos, porém, a ação de gens de competição gametofítica que causam apenas um retardamento no desenvolvimento de tubos polínicos, a situação é bastante diferente, pois não encontramos mais esterilidade completa. Em plantas homozigotas para estes gens, varia apenas o tempo necessário para o crescimento dos tubos polínicos do estigma até os óvulos, mas sempre obtemos sementes, pois os tubos sempre chegam, mais cedo ou mais tarde, no ovário. Em heterozigotes temos uma eliminação parcial em consequência da competição dos tubos, porém sempre se formam sementes normais. Assim, a ação dos gens nunca é diretamente perceptível, e é necessária a presença de outros gens com efeito fenotípico visível, e que são afetados pela eliminação dos gens gametofíticos por serem ligados geneticamente a eles. Esses gens servem deste modo como gens indicadores indispensáveis.

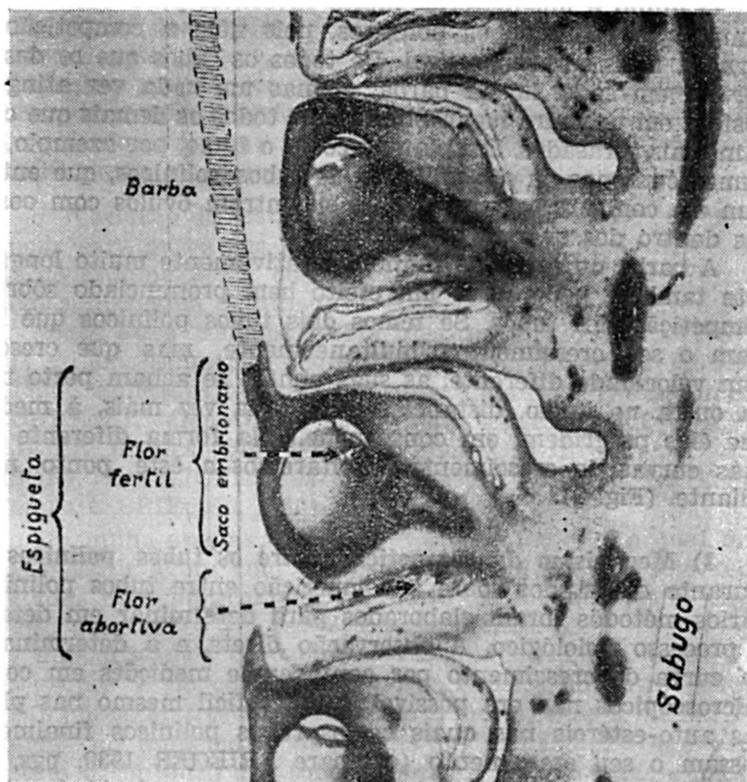
A descoberta dos primeiros casos desta natureza foi devida a uma ligação completa ou quase completa do gen gametofítico com um gen esporofítico. CORRENS, em *Melandrium* atribuiu as divergências na proporção dos sexos da razão 1:1 a uma competição entre os tubos polínicos. HERIBERT NILSON explicou segregações anômalas em *Oenothera* pelo mesmo modo. (Veja a discussão em BRIEGER 1930).

O primeiro caso de um gen de competição gametofítica ligado parcialmente a um outro gen foi descrito por MANGELSDORF AND JONES (1925). Tratou-se do gen denominado Ga-1, ligado ao gens Su 1, com o qual dá cerca de 36% de "crossing-over". Desde então o milho tornou-se o principal objeto para o estudo da competição de tubos polínicos e a análise da segregação anormal de outros gens ligados.

2) A estrutura do ovário e o crescimento do tubo polínico em milho — A espiga do milho é uma inflorescência compacta, na qual encontramos espiguetas arrançadas geralmente em fileiras regulares e longitudinais. Cada espiguetta contém na re-

gra uma só flor fértil e outra estéril, e a sua estrutura é bem visível na Fig. 2.

Fig. 2



Da figura 2, fica evidente o seguinte: os grãos de pólen, colocados na ponta das barbas, germinam e os tubos polínicos penetram nas mesmas para depois seguirem em direção longitudinal no tecido condutor até chegar à cavidade do ovário uni-ovular. Agora, atraído por qualquer substância quimiotrópica, eles penetram no óvulo até atingir uma das sinérgidas e a oosfera. O tempo normalmente necessário para este processo foi determinado para o milho norte-americano por RANDOLPH (1936), e observações em nosso laboratório confirmam estas informações. Assim, a germinação dos grãos se dá dentro

de alguns minutos e a ponta do tubo atinge o saco embrionário em cerca de 36 horas. Tendo a barba nestes experimentos tido um comprimento de cerca de 20 cms., temos um crescimento de cerca de 5,6 milímetros por hora ou 92 micras por minuto, ou 1 m/m em 11 minutos.

O milho é um material muito favorável para o estudo da competição entre tubos polínicos, pois nêle a competição se torna a mais severa possível. De todos os tubos que se desenvolvem em cada fio da barba, apenas um cada vez atinge a oosfera em primeiro lugar, eliminando todos os demais que chegam mais atrasados. Em plantas como o fumo, por exemplo, algumas centenas ou até milhares de tubos polínicos, que entram em competição num pistilo, encontram óvulos com oosferas dentro dos ovários multi-ovulares.

A barba ou estlo do milho é relativamente muito longa, e este também poderá ter um efeito bem pronunciado sobre a competição dos tubos. Se temos dois tubos polínicos que iniciam o seu crescimento simultaneamente, mas que crescem com velocidade diferente, as suas pontas se acham perto uma da outra no início, distanciando-se cada vez mais, à medida que elles progridem, em consequência da forma diferente das suas curvas de crescimento. Voltaremos a este ponto mais adiante. (Fig. 3).

3) Mecanismo da competição entre os tubos polínicos — Durante os estudos sobre a competição entre tubos polínicos, vários métodos foram elaborados para determinar em detalhe o processo fisiológico. A observação direta e a determinação da curva de crescimento por contagem e medições em cortes microscópicos não era possível, e era difícil mesmo nas plantas auto-estéreis nas quais certos tubos polínicos finalmente cessam o seu crescimento (compare BRIEGER 1930, pgs. 38-47). Porém, quando se trata apenas de uma velocidade maior ou menor do crescimento, a análise no microscópio fica impossibilitada pela grande variação entre os tubos polínicos; assim, era necessário recorrer a métodos indiretos.

Os diferentes métodos até hoje empregados foram discutidos em detalhes por BRIEGER (1930, pgs. 137-160).

a) Polinização com pouco pólen, em ovários com um número grande de óvulos — Neste caso, mesmo os tubos polínicos que chegam na cavidade do ovário por último, ainda encontram oosferas não fertilizadas. Dêste modo a competição entre os tubos polínicos torna-se sem efeito.

b) **Aplicação em tempos diferentes dos diferentes tipos de pólen** — Se somos capazes de separar os grãos de pólen, seria possível aplicar aqueles que darão tubos mais lentos, tanto tempo antes dos seus competidores que eles vencem a competição dos tubos mais velozes.

c) **Corte dos estilos** — Separando o estilo do ovário num momento determinado, deve ser possível obter o seguinte resultado: as pontas dos tubos mais velozes já passaram para dentro do ovário, quando os tubos mais lentos ainda se acham na parte do estilo que foi removido. Assim, o experimento resultará numa exclusão quase completa dos tubos lentos.

d) **Variação da distância** que os tubos polínicos têm que alcançar para que a sua ponta com os núcleos generativos chegue do estigma até a oosfera nos óvulos do ovário. (Veja em baixo a discussão detalhada).

Todos estes métodos foram idealizados por CORRENE nos seus estudos sobre a hereditariedade do sexo em *Melandrium*, e depois aplicados também em outras plantas: *Rumex acetosa* (CORRENS), *Oenothera Lamarkiana* (HERIBERT NILSON, RENNERT, Datura (SIRKS), *Gossypium* (KEARNEY AND HARRISON), *Zea* (JONES, MANGELSDORF, BRINK, BRIEGER). (Compare BRIEGER 1930).

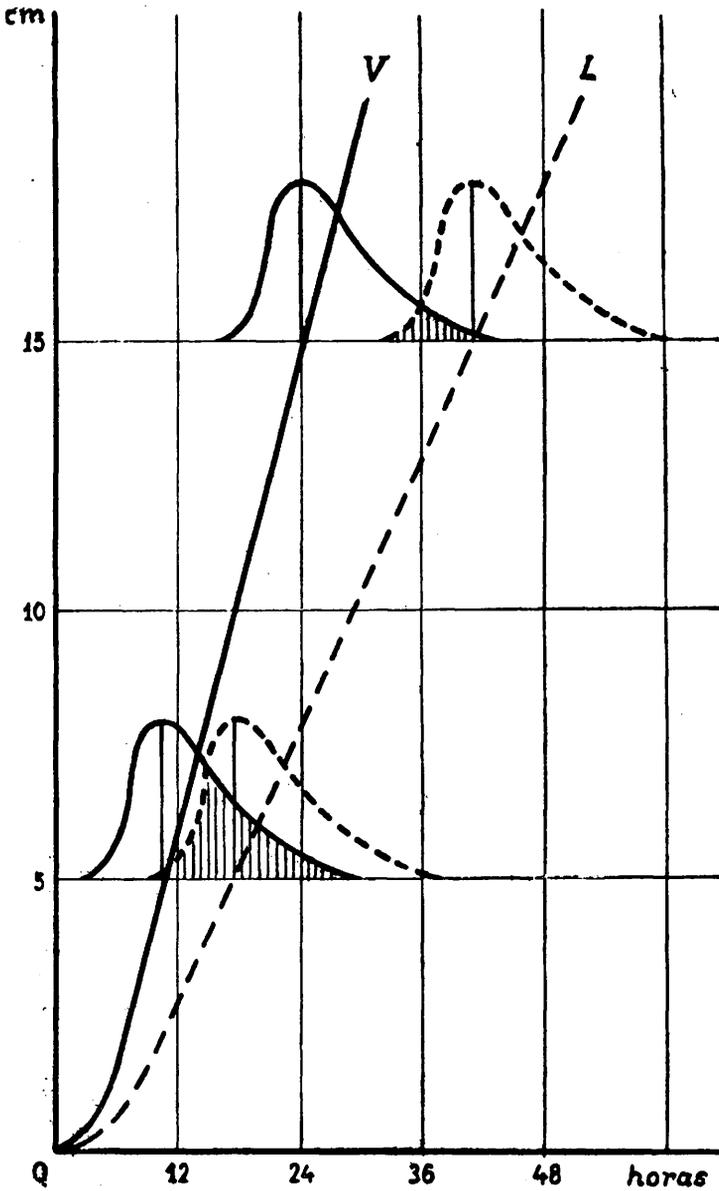
Em milho apenas foi usado o último método, o qual devemos discutir agora com mais detalhes. Na Fig. 3 estão representadas esquematicamente as duas curvas médias do crescimento para tubos velozes V e tubos lentos L.

Uma distância de 5 cms. é atingida na média pelos tubos dos grupos V em cerca de 10 horas e pelos do outro grupo L em 15 horas. Mas esta diferença se refere apenas à média, e incluímos no esquema duas curvas de distribuição que representam o conjunto dos tubos velozes e lentos. Estas duas distribuições são em parte transgressivas. Com outras palavras, há tubos polínicos do grupo lento que crescem mais depressa do que tubos do grupo veloz, ganhando assim na concorrência pelas oosferas.

Depois de ter crescido até uma distância maior, digamos de 15 cms., encontramos já uma situação diferente. A diferença entre as médias é maior e a transgressão das curvas é menor. São poucos os tubos polínicos do grupo lento que conseguem vencer a competição de tubos do outro grupo.

Finalmente, depois de 30 cms. não há mais transgressão das duas distribuições: nenhum tubo do grupo lento vence mais a competição e este grupo é completamente eliminado.

Fig. 3



*Duração de crescimento
dos tubos polínicos*

Se o nosso esquema representa fielmente a situação, devemos esperar que a competição entre os dois grupos de tubos polínicos torne-se cada vez mais forte à medida que a distância entre o lugar da polinização na barba e da fertilização das oosferas nos óvulos cresçam.

Em milho, existem duas possibilidades para estudar a competição em várias distâncias. BRINK (1925) e MANGELSDORF (1929) executaram a polinização, na ponta da espiga, depois de recortar quase toda a barba (Fig. 4a-a), seja nas pontas extremas dos fios da barba (Fig. 4, d). JONES (1922), MANGELSDORF (1929), BRIEGER, TIDBURY AND TSENG (1938) usaram o seguinte processo: a polinização foi feita, como é o costume geral em polinizações artificiais, a pouca distância da ponta da espiga, depois de cortar uma parte da barba (Fig. 4c-c). Porém, na contagem dos grãos da espiga, esta foi dividida em partes, por exemplo, em quartos. Os tubos tinham que crescer uma distância bem maior para alcançar as oosferas no último quarto da espiga do que os tubos que fertilizavam as oosferas nos outros três quartos superiores. Assim, a corrida entre os tubos polínicos se realizava sobre uma distância cada vez maior, do primeiro até o quarto quarto. Na maioria dos experimentos, o resultado obtido estava de acordo com o esquema explicado acima: a competição tornou-se de fato mais forte com o aumento da distância. Apenas MANGELSDORF achou exceções quando as distâncias eram excessivamente grandes.

BRIEGER, TIDBURY AND TSENG (1938) inverteram a situação e usaram a diferença da competição em quartos seguidos da espiga para descobrir a presença de gens gametofíticos.

4) Considerações fisiológicas sobre o crescimento dos tubos — Os nossos conhecimentos sobre a fisiologia do crescimento dos tubos polínicos, seja em culturas seja no tecido condutor do estilo, são ainda muito imperfeitas. Até hoje conhecemos apenas quatro categorias fisiologicamente diferentes e que descreverei rapidamente:

a) Na maioria dos casos analisados de gens causando uma competição entre tubos polínicos, notamos simplesmente que certos tubos crescem mais depressa do que outros. Parece não haver interação fisiológica de importância entre os dois tubos, ou entre o tecido do pistilo e os tubos. Em alguns casos foi constatado que a diferença de crescimento é maior nos estilos de algumas plantas do que em outras.

b) Nas plantas auto-estéreis encontramos uma relação es-

treita entre a constituição dos tecidos femininos e os tubos polínicos. Devemos supor que os primeiros produzem qualquer substância que inibe o crescimento de certos tubos, de acordo com a constituição genética de ambas as partes. Devemos notar que a reação é absolutamente individual para cada tubo polínico e podemos ter, lado a lado dentro do mesmo estilo, tubos que crescem normalmente e outros, de outra constituição genética, que são inibidos no seu desenvolvimento.

c) Em algumas espécies de orquídeas auto-estéreis a interação não é tão unilateral; não somente há uma inibição dos tubos polínicos depois da autofecundação, mas o tecido do estigma se decompõe também rapidamente. F. MÜLLER verificou, em polinizações mistas, que esta decomposição só é encontrada nas partes do estigma que estão em contato com o pólen da mesma planta.

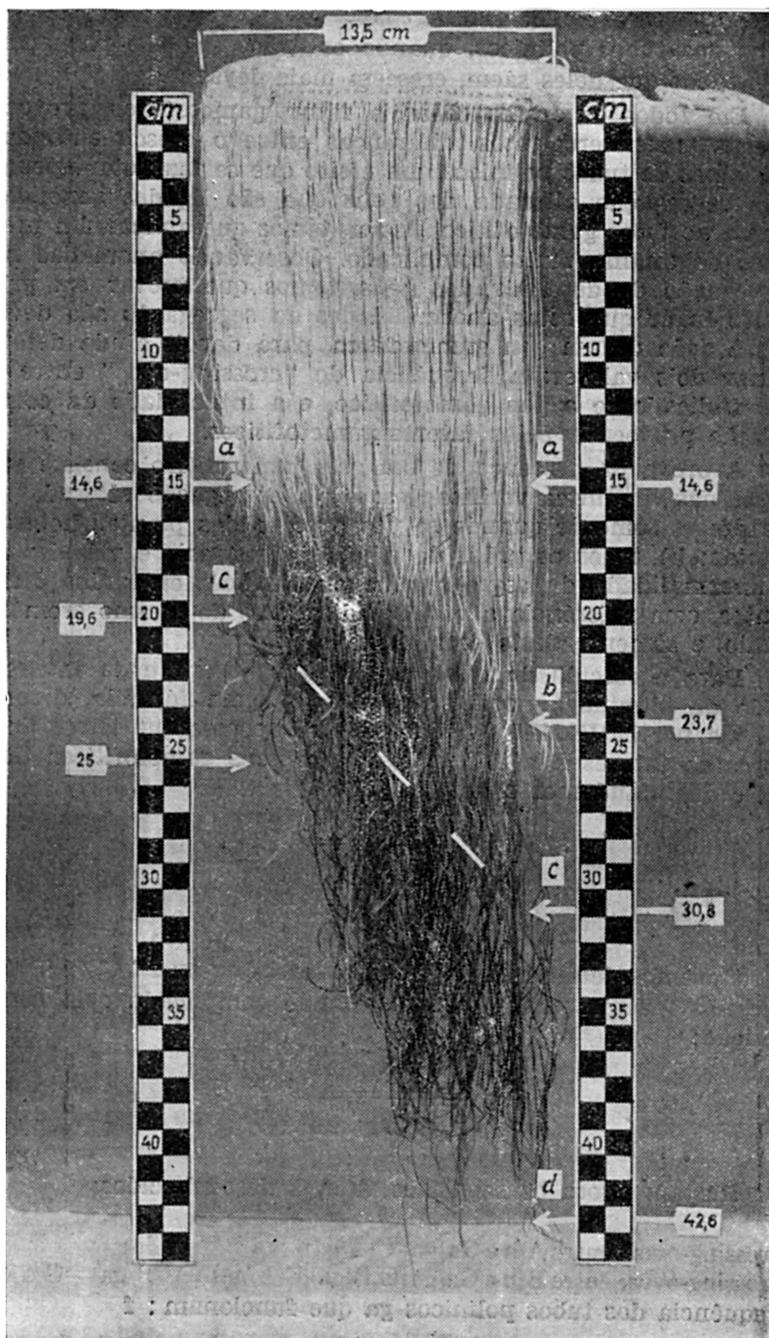
d) Existe um só caso onde há uma interação entre as três componentes: o tecido feminino e dois tipos de tubos polínicos que foram aplicados simultaneamente. BALLS (1941), KEARNEY (1923), KEARNEY AND HARRISON (1923), KEARNEY (1928, segundo BRIEGER 1930), polinizaram indivíduos de *Gossypium barbadense* e *G. hirsutum* com uma mistura do pólen de ambas as espécies e verificaram que o pólen alheio sempre tem menores possibilidades de fertilizar. Apenas 10 até 25% dos descendentes eram híbridos. Aplicando o pólen não em mistura, porém ao mesmo tempo em lados opostos do estigma, KEARNEY (1928, segundo BRIEGER 1930) verificou que a competição era menos forte. HARLAND (1943) corroborou as observações de BALLS, sem fazer referências às observações de KEARNEY.

Não darei aqui mais detalhes, e a literatura pode ser achada com uma discussão detalhada em outro lugar (BRIEGER, 1930). É perfeitamente claro que o mecanismo fisiológico da competição de tubos polínicos deve ser bastante complicado e não será o mesmo em todos os casos.

5 — Análise genética dos gens gametofíticos de competição — A principal dificuldade da análise genética dos fatores de competição gametofítica é causada pelo fato, já mencionado, de não podermos executar uma análise direta.

Somente conhecemos um caso em milho, o gen para pólen pequeno (sp, "small pollen"); descoberto por MANGELSDORF (1931), o qual causa, além da competição, diferenças visíveis do tamanho dos grãos de pólen. O alelo *Spl* determina o tamanho normal dos grãos e um crescimento normal e

Fig. 4



veloz dos tubos polínicos, quando os grãos *sp1* são pequenos, e os tubos que deles saem, crescem mais devagar.

Em todos os outros casos, o fator gametofítico provoca apenas em heterozigotos, diferenças entre o crescimento dos dois tipos de tubos polínicos, um efeito que se faz notar apenas pela segregação alterada dos gens que são ligados genéticamente ao fator gametofítico. Assim, temos que aplicar um processo de análise muito complicado. Observando anomalias na segregação de determinados gens, temos que provar em primeiro lugar que estas anormalidades da segregação são devidas à ação de um gen gametofítico, para depois ainda determinar dois valores: a frequência do "crossing-over" entre o gen indicador e o gen gametofítico, e a intensidade da competição provocada pelos fatores gametofíticos.

A prova da presença de um gen gametofítico consiste em geral nas seguintes verificações: a) a segregação alterada se manifesta somente quando se usa o pólen das plantas heterozigotas; b) todos os grãos de pólen são normais e viáveis; c) a anormalidade da segregação é encontrada, em grãos diferentes, com referência a vários indicadores do mesmo cromossômio, e somente deste cromossômio.

Para o cálculo do valor do "crossing-over" e da intensidade da eliminação podemos empregar uma fórmula, desenvolvida por BRIEGER (1937a, 1937b). Supomos que temos dois pares de fatores A/a e B/b, ligados a gens gametofíticos Ga/ga, e que estudamos o heterozigoto.

$$\frac{A \text{ Ga } B}{a \text{ ga } b}$$

Devemos determinar o valor de "crossing-over" C (A/B), o que nós fazemos num cruzamento não complicado pela competição:

$$\frac{A \text{ Ga } B \quad aB}{a \text{ ga } b \quad ab} \times$$

Restam agora os seguintes valores desconhecidos:

«crossing-over» entre A/a e Ga/ga: $C(A/ga)$ | sendo:
 «crossing-over» entre B/b e Ga/ga: $C(B/ga)$ | $C(A/ga) + C(B/ga) = C(A/B)$
 frequência dos tubos polínicos ga que funcionam: f

Podemos determinar as frequências dos diferentes gens, produzidos na meiose do heterozigoto mencionado, desprezando os "crossovers" duplos, para simplificar o cálculo. (Quadro 1).

QUADRO 1

Constituição dos genes	Frequência dos genes masculinos	Frequência dos genes femininos
A Ga B	$(1-f) \cdot (1-c_{A/B})$	$1/2(1 - c_{A/B})$
A Ga b A ga b	$(1-f) \cdot c_{B/ga} \left\{ \begin{array}{l} c_{B/ga} + f(c_{A/ga} - c_{B/ga}) \\ f \cdot c_{A/ga} \end{array} \right.$	$1/2 \cdot c_{A/B}$
a Ga B a ga B	$(1-f) \cdot c_{A/ga} \left\{ \begin{array}{l} c_{A/ga} + f(c_{B/ga} - c_{A/ga}) \\ f \cdot c_{B/ga} \end{array} \right.$	$1/2 \cdot c_{A/B}$
a ga b	$f \cdot (1-c_{A/B})$	$1/2(1-c_{A/B})$

Construindo um esquema xadrez ou simplesmente multiplicando as frequências, podemos calcular as frequências dos quatro fenótipos que devem aparecer quando autofecundamos os heterozigotos.

Por exemplo, teremos para a frequência dos descendentes (A—bb) o seguinte (Quadro 2):

QUADRO 2

Gâmetas ♀ ♂	Frequência dos zigotos A—bb
Ab x Ab	$\frac{c^A/B}{2} \times (c^B/ga + f \cdot c^A/ga - f \cdot c^B/ga)$
ab x Ab	$\frac{1-c^A/B}{2} \times (c^B/ga + f \cdot c^A/ga - f \cdot c^B/ga)$
Ab x ab	$\frac{c^A/B}{2} \times f(1-c^A/B) = (f \cdot c^A/B - f \cdot c^A/B^2) \cdot 1/2$
Total	$1/2 (c^B/ga + f(c^A/ga - c^B/ga + c^A/B) - f \cdot c^A/B^2)$ $= 1/2 (c^B/ga + f \cdot 2 c^A/ga - f c^A/B^2)$

Soma :

$$(c^B/ga + f \cdot c^A/ga - f c^B/ga) \cdot 1/2$$

Fazendo o cálculo completo para todos os quatro genótipos na planta autofecundada teremos:

Constituição dos zigotos	Frequência dos zigotos
A— B—	1 — (todos os restantes)
A— bb	$1/2 \cdot (c_{B/ga} + 2f \cdot c_{A/ga} - f c_{A/B}^2)$
aa B—	$1/2 \cdot (c_{A/ga} + 2f \cdot c_{B/ga} - f c_{A/B}^2)$
aa bb	$1/2 \cdot f \cdot (1 - 2 c_{A/B} + c_{A/B}^2)$

As frequências dos três genótipos: A—bb, aaB—, aabb nos dão três equações para calcular os três valores desconhecidos. Reunindo e simplificando temos:

$$f = \frac{2(Ab + aB + ab) - c_{A/B}}{1 - c_{A/B}^2}$$

$$C_{A/ga} = \frac{(aB + ab) - 0,5 f}{0,5 - f}; \text{ resp. } C_{A/ga} = C_{A/B} - C_{B/ga}$$

$$C_{B/ga} = \frac{(Ab + ab) - 0,5 f}{0,5 - f}; \text{ resp. } C_{B/ga} = C_{A/B} - C_{A/ga}$$

Fórmulas semelhantes podem facilmente ser derivadas para o "backcross" e para outros cruzamentos em geral. (BRIEGER 1930, 1937). Discuti nos trabalhos citados também outras fórmulas, que em certos casos têm que ser empregadas, apesar de serem menos satisfatórias do que as fórmulas explicadas acima em detalhe.

Para o uso das fórmulas é essencial que as segregações dos gens indicadores, A/a e B/b em nosso exemplo, sejam somente complicadas pela ação dos gens gametofíticos, e que não este-

jam presentes ainda outras complicações, como, por exemplo, uma eliminação de zigotos recessivos.

Se queremos analisar um conjunto de espigas com uma segregação alterada pela ação do gen gametofítico, é indispensável fazer um teste de homogeneidade, pois não é raro que o valor de f , isto é, a intensidade da competição, não é constante. Para dois gens gametofíticos (BRIEGER, 1937a, 1945) observei que existem famílias com eliminação mais forte e outras com uma eliminação apenas fraca.

Com referência aos valores de crossing-over entre os gens indicadores e o gen gametofítico, pode-se constatar que os valores calculados são extremamente variáveis. BRIEGER (1937a) verificou que esta variação pode ser até dez vezes maior do que a variação normal de valores de "crossing-over". Porém isto era até esperado em consequência do processo complicado e indireto da determinação. Porém, as médias calculadas em grupos homogêneos de espigas são relativamente constantes.

6 — Os gens de competição gametofítica conhecidos em milho — Em seguida damos uma lista dos gens gametofíticos até hoje localizados nos cromossômios de milho, usando como base na construção dos mapas as determinações da publicação de EMERSON, BEADLE AND FRASER 1935, apesar de que esta publicação é um pouco antiquada em certos detalhes (Fig. 5).

CROMOSSÓMIO IV

Ga 1 : JONES AND MANGELSDORF (1925), EMERSON (1934)

Ga 4 : BRIEGER (1945)

Sp 1 : MANGELSDORF (1931), SINGLETON AND MANGELSDORF (1940), BRIEGER (1945a)

CROMOSSÓMIO V

Ga 2 : BRIEGER (1937a)

CROMOSSÓMIO VI

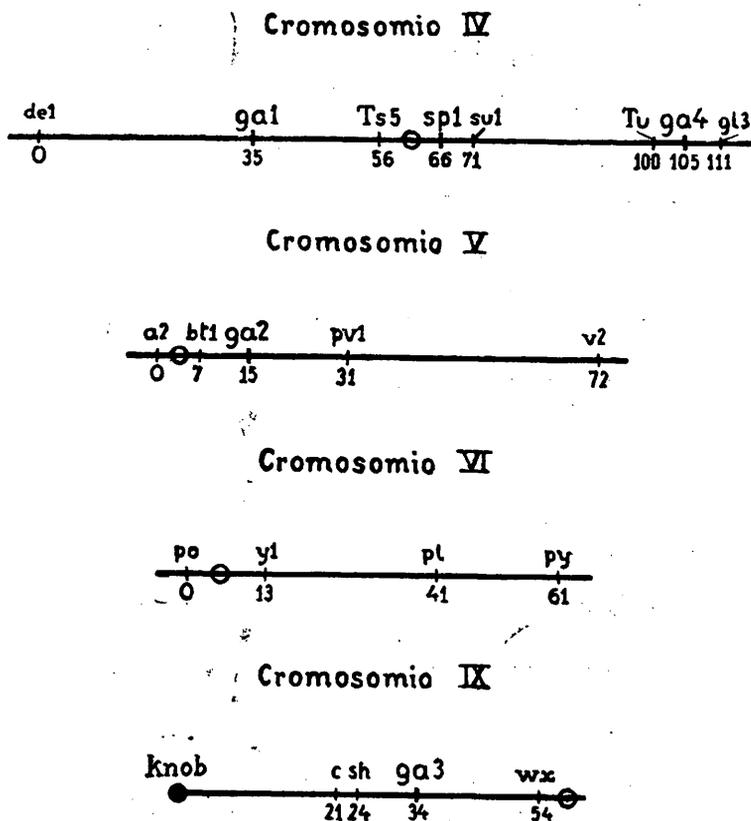
BRIEGER, TIDBURY AND TSENG (1938) acharam indicações da presença de um gen gametofítico, ligado ao gen básico para a cor amarela do endosperma, yl.

CROMOSSOMIO IX

Ga 3 : BRIEGER, TIDBURY AND TSENG (1938)

Do resumo dado acima podemos tirar a conclusão de que já são conhecidos e localizados seis fatores, causando uma competição entre tubos polínicos nas plantas heterozigotas do milho. É interessante notar que a metade, isto é, três, são localizados todos no mesmo cromossômio número IV. O resultado é de importância para considerações sobre a origem do milho. Tanto MANGELSDORF AND REEVES (1939) como BRIEGER (1944) atribuem a este cromossômio uma importância especial.

Fig. 5



supondo que êle ou contém regiões cromossômicas ou no mínimo certos gens de *Tripsacum*.

O número total de fatores de competição gametofítica deve ser muito maior ainda, e não é um acidente que em todos os casos até hoje bem analisados, os gens indicadores eram responsáveis por característicos fenotípicos das sementes, o que grandemente facilita a sua análise.

Nos casos referidos, a determinação genética da competição é monofatorial, mas ela naturalmente está sujeita também à ação de gens modificadores e de fatores do ambiente.

Mencionámos acima que a intensidade da competição não é constante, mas mostra diferenças se analisarmos um número maior de espigas. Esta heterogeneidade foi constatada para o fator Ga2 (BRIEGER 1937a), Ga4 (BRIEGER 1945a) e Sp (SINGLETON AND MANGELSDORF 1940, BRIEGER 1945b). Parece que esta inconstância depende em parte da ação de gens modificadores e em parte de fatores fisiológicos, em sua natureza desconhecidos. É interessante notar que um fator gametofítico, que altera a segregação do gen ceroso, "waxy", e que pode ser idêntico ao fator Ga3, causa uma competição mais forte em plantas de milho doce do que na ausência do gen su 1 (BRINK AND BUONHAM 1927).

Em outros casos ainda, a base genética da competição parece muito mais complicada e polifatorial.

Uma interação interessante entre a natureza das plantas usadas como fêmeas e a existência de uma competição entre tubos polínicos foi achada por JONES (1922) e analisada em detalhe por DEMEREC (1929). Numa família de milho pipoca "white rice pop corn", êste autor constatou que se pode obter nela sementes apenas com pólen da mesma família. Dividindo as barbas em duas metades, correspondendo às duas metades longitudinais da espiga, DEMEREC (1929) aplica numa metade pólen dêste milho pipoca e na outra metade pólen de qualquer outro milho. Empregando em 22 espigas sete diferentes variedades de milho duro (flint) como fornecedor de pólen para uma metade longitudinal das espigas, êle obteve apenas 31 ou 3% de grãos cruzados em mais de 3.000 óvulos. Na outra metade, polinizada com o pólen do próprio milho pipoca, êle observou um pagamento completo em cerca de 3.500 grãos.

BRIEGER (1936) relatou os resultados de experimentos nos quais diferentes linhagens de milho foram plantadas misturadas no campo para uma polinização natural pelas correntes do ar. Nestas condições cruzamentos dentro de linhagens eram bem mais frequentes e entre linhas não parentes mais raros

ção que o esperado se a polinização e fertilização dependessem apenas do acaso, e atribui o resultado a diferenças do crescimento dos tubos polínicos.

7) **O valor de fatores gametofíticos no melhoramento** — HARLAND (1943) formulou recentemente um plano muito interessante para o aproveitamento de fatores gametofíticos no melhoramento de plantas.

HARLAND baseia-se nas observações de BALLS em algodão que relatámos em parte no capítulo anterior. Em primeiro lugar, como já foi explicado, plantas das espécies puras *Gossypium barbadense* e *G. hirsutum*, quando polinizadas com misturas de pólen das duas espécies produzem sempre poucos híbridos, sendo assim claro que o pólen estranho sempre tem o seu desenvolvimento impedido: o pólen do barbadense no estilo de *hirsutum* e vice-versa. Em segundo lugar, BALLS descobriu que plantas das espécies puras, quando polinizadas com uma mistura do seu próprio pólen e de pólen do híbrido da primeira geração, dão preferência a este último.

Assim, no primeiro caso o pólen da própria planta tinha vantagens sobre o pólen de outra espécie e no segundo caso o pólen dos indivíduos F1 tinha vantagens sobre o pólen do indivíduo mesmo.

HARLAND tirou a conclusão seguinte: "This observation made me believe that in an interspecific cross there must be segregation for velocity of pollen tube growth conditioned by minor modifiers. If there were many minor genes for velocity it should be possible to concentrate them by stringent selection and produce new types in which self pollen grow so rapidly that no foreign pollen would grow fast enough to fertilize" (pg. 307). Infelizmente HARLAND não pôde concluir os seus experimentos que estavam em andamento de 1929 até 1935, e assim falta a comprovação experimental da sua hipótese.

Em milho seria teoricamente possível obter linhagens que quando combinadas, darão preferência ao cruzamento ou à autofecundação. Por exemplo, se plantarmos linhagens mistas da constituição seguinte:

- 1) Ga1 Ga1 Ga2 Ga2 Ga3 Ga3 ga4 ga4
- 2) Ga1 Ga1 Ga2 Ga2 ga3 ga3 Ga4 Ga4
- 3) Ga1 Ga1 ga2 ga2 Ga3 Ga3 Ga4 Ga4
- 4) ga1 ga1 Ga2 Ga2 Ga3 Ga3 Ga4 Ga4
- 5) Ga1 Ga1 Ga2 Ga2 Ga3 Ga3 Ga4 Ga4

então todos os indivíduos das famílias 1 até 4 serão cruzados preferivelmente com a linhagem 5 que contém todos os gens para o crescimento veloz dos tubos polínicos e as plantas desta linhagem serão cruzadas entre si.

Mas a execução prática dos cruzamentos e seleções necessárias para introduzir os gens gametofíticos em linhagens comerciais é tão complicada que o atual método de plantar linhagens misturadas e arrancar a flecha daquelas que devem ser cruzadas me parece muito mais fácil e eficiente.

8) **Discussão** — Relatamos acima os fatos conhecidos em milho sobre a natureza da competição entre tubos polínicos e a sua base genética. Além do seu interesse para a genética do milho, o assunto tem uma importância geral em relação a dois problemas.

As chamadas leis de MENDEL da segregação e recombinação baseiam-se na hipótese do procedimento normal de dois processos: da segregação e recombinação de gens na meiose, e da recombinação livre dos gametas. A ação dos gens da competição gametofítica alteram o último processo: a combinação dos gametas não é livre, e consequentemente o resultado observado nos estudos da segregação não está de acordo com a expectativa na base de uma simples segregação mendeliana.

Em segundo lugar, os fatos relatados ajudam compreender alguns problemas da evolução. Como discutido em outro lugar (BRIEGER 1937a, 1945) é importante constatar que existem ainda gens ativos no gametófito, a fase que foi tanto reduzida na evolução das plantas superiores. Também o problema de auto-esterilidade se apresenta um pouco diferente. Este caso de uma adaptação muito especial para a luta da vida que impede auto-fecundação e promove cruzamentos, aparece agora apenas como um caso especial de genética e fisiologia do pólen. (BRIEGER 1936).

Uma vez que discuti detalhadamente estes problemas em outras publicações, acho que estas referências são suficientes para acentuar o interesse geral do estudo dos fatores da competição gametofítica.

ABSTRACT

1) The first part deals with the different processes which may complicate Mendelian segregation and which may be classified into three groups, according to BRIEGER (1937b): a) Instability of genes, b) Abnormal segregation due to distur-

bances during the meiotic divisions, c) obscured segregation, after a perfectly normal meiosis, caused by elimination or during the gonophase (gametophyte in higher plants), or during zygotophase (sporophyte).

Without entering into detail, it is emphasized that all the above mentioned complications in the segregation of some genes may be caused by the action of other genes. Thus in maize, the instability of the A1 factor is observed only when the gene *dt* is present in the homozygous conditions (RHOADES 1938). In another case, still under observation in Piracicaba, an instability is observed in *Mirabilis* with regard to two pairs of alleles both controlling flower color.

Several cases are known, especially in corn, where recessive genes, when homozygous, affect the course of meiosis, causing asynapsis (asynesis) (BEADLE AND MC CLINTOCK 1928, BEADLE 1930), sticky chromosomes (BEADLE 1932), supernumerary divisions (BEADLE 1931).

The most extreme case of an obscured segregation is represented by the action of the S factors in self sterile plants. An additional proof of EAST AND MANGELSDORF (1925) genetic formula of self sterility has been contributed by the studies on linked factors in *Nicotina* (BRIEGER AND MANGELSDORF (1926) and *Antirrhinum* (BRIEGER 1930, 1935). In cases of an incomplete competition and selection between pollen tubes, studies of linked indicator-genes are indispensable in the genetic analysis, since it is impossible to analyse the factors for gametophyte competition by direct approach.

2) The flower structure of corn is explained, and stated that the particularities of floral biology make maize an excellent object for the study of gametophyte factors. Since only one pollen tube per ovule may accomplish fertilization, the competition is always extremely strong, as compared with other species possessing multi-ovulate ovaries. The length of the silk permits the study of pollen tube competitions over a varying distance. Finally the genetic analysis of grains characters (endosperm and aleuron) simplifies the experimental work considerably, by allowing the accumulation of large numbers for statistical treatment.

3) The four methods for analyzing the nature of pollen tube competition are discussed, following BRIEGER (1930). Of these the first three are: a) pollinization with a small number of pollen grains, b) pollinization at different times and c) cut-

ting the style after the faster tubes have passed before the slower tubes have reached the point where the stigma will be cut. d) The fourth method, alteration of the distance over which competition takes place, has been applied largely in corn. The basic conceptions underlying this process, are illustrated in Fig. 3. While BRINK (1925) and MANGELSDORF (1929) applied pollen at different levels on the silks, the remaining authors (JONES, 1922, MANGELSDORF 1929, BRIEGER, et al. 1938) have used a different process. The pollen was applied as usual, after removing the main part of the silks, but the ears were divided transversally into halves or quarters before counting. The experiments showed generally an increase in the intensity of competition when there was increase of the distance over which they had to travel. Only MANGELSDORF found an interesting exception. When the distance became extreme, the initially slower tubes seemed to become finally the faster ones.

4) Methods of genetic and statistical analysis are discussed, following chiefly BRIEGER (1937a and 1937b). A formula is given to determine the intensity of elimination in three point experiments.

5) The few facts are cited which give some indication about the physiological mechanism of gametophyte competition. They are four in number a) the growth rate depends only on the action of gametophyte factors; b) there is an interaction between the conductive tissue of the stigma or style and the pollen tubes, mainly in self-sterile plants; c) after self-pollination necrosis starts in the tissue of the stigma, in some orchids after F. MÜLLER (1867); d) in pollen mixtures there is an inhibitory interaction between two types of pollen and the female tissue; *Gossypium* according to BALLS (1911), KEARNEY 1923, 1928, KEARNEY AND HARRISON (1924). A more complete discussion is found in BRIEGER (1930).

6) A list of the gametophyte factors so far localized in corn is given.

CHROMOSOME IV

Ga 1 : MANGELSDORF AND JONES (1925), EMERSON (1934).

Ga 4 : BRIEGER (1945b).

Sp 1 : MANGELSDORF (1931), SINGLETON AND MANGELSDORF (1940), BRIEGER (1945a).

CHROMOSOME V

Ga 2 : BRIEGER (1937a).

CHROMOSOME VI

BRIEGER, TIDBURY AND TSENG (1938) found indications of a gametophyte factor altering the segregation of yellow endosperm *yl*.

CHROMOSOME IX

Ga 3 : BRIEGER, TIDBURY AND TSENG (1938).

While the competition in these six cases is essentially determined by one pair of factors, the degree of elimination may be variable, as shown for **Ga2** (BRIEGER, 1937), for **Ga4** (BRIEGER 1945a) and for **Sp1** (SINGLETON AND MANGELSDORF 1940, BRIEGER 1945b). The action of a gametophyte factor altering the segregation of waxy (perhaps **Ga3**) is increased by the presence of the *su1* factor which thus acts as a modifier (BRINCK AND BURNHAM 1927).

A polyfactorial case of gametophyte competition has been found by JONES (1922) and analysed by DEMEREC (1929) in rice pop corn which rejects the pollen tubes of other types of corn. Preference for selfing or for brothers-sister mating and partial elimination of other pollen tubes has been described by BRIEGER (1936).

7) HARLAND'S (1943) very ingenious idea is discussed to use pollen tube factors in applied genetics in order to build up an obstacle to natural crossing as a consequence of the rapid pollen tube growth after selfing. Unfortunately, HARLAND could not obtain the experimental proof of the practicability of his idea, during his experiments on selection for minor modifiers for pollen tube growth in cotton. In maize it should be possible to employ gametophyte factors to build up lines with preference for crossing, though the method should hardly be of any practical advantage.

LITERATURA

- 1 — BALLS, W. L. 1911 — Cotton investigations in 1909 and 1910. Cairo Sci. J. 5.
- 2 — BEADLE, G. W. 1931 — A gene in maize for supernumerary cell divisions following meiosis. Cornell Univ. Exp. Sta. Mem. 135: 12 pgs.
- 3 — BEADLE, G. W. 1930 — Genetical and cytological studies of Mendelian asynapsis in *Zea Mays*. Cornell Univ. Agr. Exp. Sta. Mem. 129: 23 pgs.
- 4 — BEADLE, G. W. 1932 — A gene for sticky chromosomes in *Zea Mays*. Zeitsch. f. Induct. Vererb. 63: 195-217.
- 5 — BEADLE, G. W. AND B. MC CLINTOCK 1928 — A genic disturbance of meiosis in *Zea Mays*. Science 68: 433.
- 6 — BRIEGER, F. G. 1930 — Sebsterilität und Kreuzungsterilität. Berlin. Springer. 395 pgs.
- 7 — BRIEGER, F. G. 1935 — The inheritance of self-sterility and the peloric flower shape in *Antirrhinum*. Genetic 10: 359-394.
- 8 — BRIEGER, F. G. 1936 — Self and cross polinization in *Zea Mays* and *Nicotiana tabacum*. 6th. Internat. Cong. Bot. 51-53.
- 9 — BRIEGER, F. G. 1937a — Genetic control of gametophyte development in maize. I. Gametophyte factors in chromosome five, Journal of Genetics. 34: 57-80.
- 10 — BRIEGER, F. G. 1937b. — Methoden der Erforschung der Verebnungsvorgänge bei Pflanzen. Handb. Biol. Methoden (Abderhalden) IX 3: 1183-1308.
- 11 — BRIEGER, F. G. 1944a — Considerações sobre o mecanismo da evolução. Anais da Escola Agr. "Luiz de Queiroz". 1: 177-211.

- 12 — BRIEGER, F. G. 1944b — Estudos experimentais sobre a origem do milho. Anais da Escola Agr. "Luiz de Queiroz". 2: 225-278.
- 13 — BRIEGER, F. G. 1945a — A hereditariedade do milho *tunicata* da América do Sul. Anais da Escola Agr. "Luiz de Queiroz". 2:.
- 14 — BRIEGER, F. G. 1945b — Competição entre megaspórios em milho. Anais da Escola Agr. "Luiz de Queiroz". 2:.
- 15 — BRIEGER, F. G., G. E. TIDBURY AND H. P. TSENG, 1938. — Genetic control of gametophyte development in maize. II. The quarter test. Journal of Genetics 36: 17-38.
- 16 — BRIEGER, F. G. AND A. J. MANGELSDORF 1926 — Linkage between a flower color factor and self sterility factors. Proc. Nat. Acad. Sc. (U.S.A.). 12: 248-255.
- 17 — BRINK, R. A. 1925 — Mendelian ratios and the gametophyte generation in Angiosperms. Genetics. 10: 359-394.
- 18 — BRINK, R. A. AND C. R. BURNHAM, 1927 — Differential action of the sugary gene in maize on two alternative classes of male gametophytes. Genetics. 12: 348-378.
- 19 — CORRENS, C. 1912 — Selbsterilität und Individualstoffe. Med. Nat. Ges. Munster. 84: 186-217. (Biol. Zentralblatt. 33: 389-423).
- 20 — CORRENS, C. 1928 — Neue Untersuchungen an selbststerilen Pflanzen: *Tolmiea Menziesii*. Biol. Centralbl. 48: 759-768.
- 21 — DEMEREC, M. 1929 — Cross-sterility in maize. Zeitschr. f. Indukt. Vererbl. 50: 281-291.
- 22 — DREYFUS, A. E MARTA ERPS BREUER 1944 — O sexo nos Himenópteros Arrenótocos. Bol. Fac. Fil. XI- 5: 103 pgs.
- 23 — EAST, E. M. AND A. J. MANGELSDORF 1927 — Heredity and selective pollen tube growth. Genetics. 11: 466-481.

-
- 24 — EAST, E. M. AND A. J. MANGELSDORF 1925 — A new interpretation of the hereditary behavior of self-sterile plants. Proc. Nat. Acad. (U.S.A.). 11: 166-171.
- 25 — EMERSON, R. A. 1934 — Relation of the differential fertilization genes, *Ga ga*, to certain other genes of the *Su - Tu* linkage group in maize. Genetics. 19: 137-156.
- 26 — FILZER, P. 1926 — Die Selbst-sterilität von *Veronica syriaca*. Zeitsch. Indukt. Vererb. 41: 137-197.
- 27 — GOWEN, U. S. AND G. W. GOWEN 1922 — Complete linkage in *Drosophila melanogaster*. Am. Nat. 56: 92
- 28 — HARLAND, S. C. 1943 — Breeding of a cotton immune from natural crossing. Nature. 151: 307.
- 29 — JONES, D. F. 1922 — Selective fertilization and the rate of pollen tube growth. Biol. Bull. (Woods Hole). 43: 167-174.
- 30 — KEARNEY, T. H. 1923 — Self-fertilization and cross-fertilization in Pima cotton. U. S. Dept. Agr. Bull. Nr. 1134.
- 31 — KEARNEY, T. H. AND G. J. HARRISON 1924 — Selective fertilization in cotton. J. Agricult. Res. 27.
- 32 — KNIEP, H. 1920 — Über morphologische und physiologische Geschlechtsdifferenzierung. Verh. Phys. Med. Ges. Wurzburg. 46: 18 pgs.
- 33 — MANGELSDORF, P. C. 1929 — The relation between length of style and Mendelian segregation in a maize cross. Am. Nat. 63: 139-150.
- 34 — MANGELSDORF, P. C. 1931 — Modification of Mendelian ratios in maize by mechanical separation of gametes. Proc. Nat. Acad. Sc. (U.S.A.). 17: 698-700.
- 35 — MANGELSDORF, P. C. AND D. F. JONES 1925 — The

- expression of Mendelian factors in the gametophyte of maize. *Genetics*. 11: 423-455.
- 36 — MANGELSDORF, P. C. AND REEVES 1939 — The origin of Indian Corn and its relatives. *Texas Agr. Sta. Bull.* 574: 1-315.
- 37 — RANDOLPH, L. F. 1936 — Developmental morphology of the caryopsis in maize. *Jour. Agr. Res.* 53: 881-916.
- 38 — RHOADES, M. M. 1938 — Effect of the *Dt* gene on the mutability of the *a 1* allele in maize. *Genetics*. 23: 377-388.
- 39 — ROSENBERG, O. 1927 — Die Semiheterotypische Teilung und ihre Bedeutung für die Entstehung verdoppelter Chromosomenzahlen. *Hereditas*. 8: 305-338.
- 40 — SINGLETON, W. R. AND P. C. MANGELSDORF, 1940 — Gametic lethals on the fourth chromosome of maize. *Genetics*. 25: 366-390.
- 41 — TACKOLM, G. 1922 — Zytologische Studie über die Gattung *Rosa*. *Acta. Hort. Berg.* 7: 97-381.