ANÁLISE DA SEGREGAÇÃO DE KNOBS EM PROGÊNIES F_2 E DE
DE RETROCRUZAMENTO DERIVADAS DE UMA VARIEDADE DE MILHO

MARIA JULIANA USBERTI DECICO
Engenheira Agrônoma

Orientadora: Profa. Dra. MARGARIDA L.R. DE AGUIAR-PERECIN

Dissertação apresentada à Escola
Superior de Agricultura "Luiz de
Queiroz", da Universidade de São
Paulo, para obtenção do título de
Mestre em Agronomia. Área de
Concentração: Genética e
Melhoramento de Plantas

PIRACICABA

Estado de São Paulo - Brasil

Novembro 1991

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Livros da
Divisão de Biblioteca e Documentação - PCAP/USP

Decico, Maria Juliana Usberti

D294a Análise da segregação de Knobs em progenies F2 e
de retrocruzamento derivadas de uma variedade de mi
lho. Piracicaba, 1991.
134p. ilustr.

Diss. (Mestre) - ESALQ
Bibliografia.

1. Citogenética 2. Milho - Citogenética 3. Milho -
Cromossomo - Heterocromatina 4. Milho - Retrocruza
mento 1. Escola Superior de Agricultura Luiz de Quei
roz, Piracicaba

CDD 633.15

ANÁLISE DA SEGREGAÇÃO DE KNOBS EM PROGENIES F_2 E DE
DE RETROCRUZAMENTO DERIVADAS DE UMA VARIEDADE DE MILHO

MARIA JULIANA USBERTI DECICO

Aprovada em: 07.02.92

Comissão Julgadora:

Prof^a. Dr^a. Margarida L. R. de Aguiar-Perecin ESALQ/USP

Prof. Dr. Akihiko Ando ESALQ/USP

Prof^a. Dr^a. Catarina Satie Takahashi FMRB/USP

Prof^a. Dr^a. Margarida Lopes Rodrigues de Aguiar-Perecin
Orientadora

Aos meus pais

e ao Pedro

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradecemos a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, de maneira especial:

. À Profa. Dra. **Margarida L. R. de Aguiar-Perecin** pela orientação e assistência durante o Curso de Pós-Graduação.

. À amiga **Mônica Rosa Bertão** pelo incentivo e sugestões durante a elaboração deste trabalho.

. Aos meus irmãos **Afonso** e **Helena** pelo carinho e apoio.

. Aos funcionários do Laboratório de Citologia: **Sílvia Molina** e **Carlos Veríssimo** pela colaboração durante o desenvolvimento prático deste trabalho.

. Aos professores do Curso de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas.

. Aos colegas do Curso de Pós-Graduação pelo apoio em todos os momentos.

. À FAPESP pela concessão da bolsa de estudo.

SUMÁRIO

	página
RESUMO.....	vii
SUMMARY	x
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1. Knobs e conceito de heterocromatina....	4
2.2. Uso de knobs para caracterização de raças e estudos da origem do milho.....	11
2.3. Knobs e características morfológicas e fisiológicas das plantas.....	17
2.4. Obtenção de linhagens de milho e estudo da composição de knobs das mesmas.....	20
2.5. Mecanismos que afetam a herança mendeliana.....	22
2.5.1. Estudo da segregação preferencial dos cromossomos não homólogos na meiose feminina.....	23
2.5.2. Capacidade de competição do grão de pólen.....	26
2.6. Estudo do polimorfismo de segmentos cromossômicos e evolução através da metodologia de bandamento-C.....	33
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	40
3.1. Materiais.....	40

3.2. Métodos.....	48
3.2.1. Metodologia de bandamento-C.....	48
3.3. Análise do material.....	49
3.3.1. Análise de bandas-C em metáfases mitóticas.....	49
3.3.2. Análise estatística.....	50
4. RESULTADOS.....	51
4.1. Constituição de bandas-C, correspondente aos knobs, nas progêneses S_5 , S_6 , S_7 , S_8 e S_9 para seleção de linhagens isogênicas	51
4.2. Análise da frequência de bandas-C de progêneses F_2 , derivadas de heterozigoto para dois knobs.....	69
4.3. Análise da frequência de bandas-C de progêneses de retrocruzamento.....	74
4.3.1. Análise da frequência de bandas-C de progêneses RC do grupo 1.....	74
4.3.2. Análise da frequência de bandas-C de progêneses do grupo 2.....	100
4.3.3. Análise da frequência de bandas-C de progêneses do grupo 3.....	107
DISCUSSÃO.....	114
5.1. Análise da frequência de bandas-C de progêneses F_2 de um heterozigoto para dois locos e RC onde o híbrido foi o parental feminino.....	114

5.2. Análise da frequência de bandas-C de progênies RC onde o híbrido foi usado como doador de pólen.....	117
5.2.1. Análise da frequência de bandas-C de progênies RC com dois locos segregando.....	119
5.2.2. Análise da frequência de bandas-C de progênies RC com um maior número de locos segregando.....	122
6. CONCLUSÕES.....	124
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	126

ANÁLISE DA SEGREGAÇÃO DE KNOBS EM PROGÊNIES F_2 E DE RETROCRUZAMENTO DE UMA VARIEDADE DE MILHO

Autor: Maria Juliana Usberti Decico

Orientadora: Profa. Dra. Margarida L. R. de Aguiar-Perecin

RESUMO

O presente trabalho se iniciou como parte de uma linha de pesquisa, que vem se desenvolvendo no Departamento de Genética da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"- USP, desde a década de 80, e tem como objetivo principal estudar a influência de regiões heterocromáticas, como knobs, no desenvolvimento da planta de milho.

Foi delineado um experimento para avaliar a possível ocorrência de transmissão preferencial dos cromossomos com knobs na megasporogênese ou através do grão de pólen, em híbridos heterozigóticos para determinados knobs.

Foram analisadas as composições de bandas-C, correspondente aos knobs, em células meristemáticas de raiz, de progênies F_2 e de retrocruzamento, derivadas de três tipos de híbridos que segregavam respectivamente para dois, três e quatro knobs: K2L, K3L, K7S e K9S. As progênies RC analisadas foram de dois tipos: RC_1 obtidas de cruzamentos onde o híbrido foi o parental masculino e RC_2 que derivaram de cruzamentos onde o híbrido foi o parental feminino.

Os resultados obtidos da análise da segregação de bandas-C de progênies F_2 e de RC_2 mostraram que as frequências estavam de acordo com a esperada pela herança mendeliana. Deste modo, não foi constatada a ocorrência de a transmissão preferencial dos cromossomos através da meiose feminina dessas plantas.

Para estudar a capacidade de competição de grãos de pólen, cinco progênies RC_1 , com dois locos segregando: K3L e K7S, foram avaliadas. Foram analisadas amostras do ápice e da base das espigas investigadas para verificar a taxa de desenvolvimento de grãos de pólen com diferentes composições de knobs (adaptação de OTTAVIANO et alii, 1982). Em duas progênies, nas amostra da base, as frequências de bandas-C diferiram significativamente da esperada segundo a segregação mendeliana. Isto pode sugerir que estaria ocorrendo diferenças na taxa de desenvolvimento do grão de pólen com diferentes composições de knobs. Foram analisadas então somente amostras da base para mais seis progênies RC_1 sendo que duas dessas progênies mostraram desvios.

Por outro lado, em progênies $RC-1$ segregando para três knobs (K2L, K3L e K7S), e para quatro knobs (K2L, K3L, K7S e K9S). não foram constatadas diferenças entre as frequências observadas e as esperadas pela herança mendeliana, indicando que não ocorreu seleção gamética.

Com base nesses estudos foi sugerido que o conteúdo de

heterocromatina não influencia, *per se*, a capacidade de competição do grão de pólen, que por outro lado, poderia ser afetada por uma interação deste conteúdo com o genótipo da planta.

ANALYSIS OF KNOB SEGREGATION IN THE F_2 AND BACKCROSS
PROGENIES OF A MAIZE VARIETY

Author: Maria Juliana Usberti Decico

Advisor: Dr. Margarida L. R. de Aguiar-Perecin

SUMMARY

The present work is part of a research line of which the main purpose has been to study the effect of heterochromatic knob in the development of maize plants.

The inheritance of knobbed chromosomes was analyzed in heterozygote in order to investigate the occurrence of preferential transmission through the egg and the pollen.

C-bands correspondent to K2L, K3L, K7S and K9S were analyzed in meristematic cells of root tips of F_2 and BC progenies derived from hybrids heterozygous for two, three or four knobs. The BC progenies were from two types: BC_1 was obtained from crosses where the hybrid was used as a male parent, and BC_2 came from crosses where the hybrid was as a female.

In F_2 and backcrosses between heterozygotes and male homozygotes there were not deviation from expectation. So preferential transmission through the egg was not detected.

For the study of pollen competitive ability, five BC_1 progenies segregating for two knobs (K3L and K7S) were evaluated. Samples from the apex and the basis of the ear were analyzed to verify the rate of development of pollen

grains containing different knob contents (adapted from OTTAVIANO et alii, 1982). Deviation from the expectation was detected in two progenies. This may suggest that differences occur in the rate of development of pollen grains containing different knob composition. Samples of the basis of additional six BC₁ progenies, were studied and two of them also showed deviations.

The evaluation of BC progenies segregating for three knobs (K2L, K3L and K9S) and four knobs (K2L, K3L, K7S and K9S) did not show deviation from mendelian inheritance, indicanting no gametic selection.

The data suggest that the content of heterocromatin do not influence, *per se* the polen competitive ability, that might be affected by interaction between genotype and knobs composition.

1. INTRODUÇÃO

Os estudos dos cromossomos do milho começaram com McCLINTOCK (1929), demonstrando pela primeira vez que os dez cromossomos de milho, que compõem o número haplóide, podiam ser identificados citologicamente através da observação destes na primeira divisão meiótica em micrósporos e mencionou também pela primeira vez a presença de knobs nos cromossomos.

Os knobs têm sido descritos como estruturas de natureza heterocromática e, dados da literatura relatam que knobs de diferentes tamanhos podem estar em mais de 20 diferentes posições nos dez cromossomos de milho (LONGLEY, 1938; VACCHANI, 1951; RHOADES, 1955). Há também um polimorfismo entre espécies correlacionadas, indicando um valor adaptativo dos mesmos, e isso tem sido usado para caracterização de diferentes raças de milho e para estudos de evolução.

Estudos envolvendo knobs cromossômicos de milho vêm se desenvolvendo no Departamento de Genética da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" (ESALQ/USP) desde

os anos 60 e, na década de 70 iniciou-se uma linha de pesquisa com o objetivo de se analisar aspectos da estrutura dos knobs e outras regiões heterocromáticas dos cromossomos de milho, e entender o papel das referidas estruturas no funcionamento celular e desenvolvimento da planta. Destes estudos resultou principalmente a padronização de uma metodologia de bandamento-C que identificou diferenças entre diversos tipos de heterocromatina de milho e mostrou-se útil para o estudo de knobs em diferentes estoques de milho, através da análise de cromossomos metafásicos (VOSA e AGUIAR, 1972; AGUIAR-PERECIN, 1979, 1985,a,b e AGUIAR-PERECIN e VOSA, 1985).

O presente estudo surgiu como parte de um programa mais amplo, cujo objetivo era selecionar linhagens isogênicas para estudo do efeito dos knobs. Inicialmente foram analisadas as frequência de bandas-C, correspondentes aos knobs, em uma família de progênies S_2 e duas S_3 derivadas da variedade comercial JAC-DURO (endosperma tipo Flint) que revelaram que os mesmos apresentavam bandas nas posições K2L, K3L, K6L (correspondente a $K6L_2$ e $K6L_3$) K7S, K7L, K8L (denominação provisória) e K9S, sendo S referente ao braço curto e L ao braço longo e, os números , referentes ao par de cromossomo. As bandas correspondentes às posições K6L, K7L e K8L são homozigóticas e constantes para todos os materiais e as demais segregantes. Em seguida

foram analisadas progênies S_4 e S_5 , e os resultados revelaram que em duas famílias de linhagens, derivadas de S_2 que segregava para os quatro locos, aparentemente havia um número maior do que o esperado de progênies segregando para as respectivas gerações, após quatro ou cinco ciclos de autofecundação.

Apesar do tamanho destas amostras ter sido relativamente pequeno, em termos do número de progênies analisadas, os dados sugeriram que esses' desvios poderiam ser devidos a autofecundação preferencial dos heterozigotos ou transmissão preferencial de determinadas composições de knobs através da megasporogênese ou pelo grão de pólen.

Em vista disso, foi delineado um experimento para analisar a herança dos knobs através do estudo das frequências de bandas-C de progênies F_2 e de retrocruzamento e verificar se as frequências observadas estavam de acordo com as proporções mendelianas esperadas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Knobs e conceito de heterocromatina

O termo heterocromatina foi criado por Heitz (citado por AGUIAR-PERECIN, 1979), para designar as regiões dos cromossomos que permaneciam condensadas durante a intérfase e estariam localizadas em locais definidos dos cromossomos homólogos. A partir disto muitos estudos foram realizados em diferentes organismos e hoje, a heterocromatina é caracterizada como regiões que permanecem condensadas durante todo ciclo celular, possuem replicação tardia do DNA na fase S e são geneticamente inativas, parcial ou totalmente, sendo este, um ponto ainda em aberto para investigações. A literatura tem constatado também polimorfismo cromossômico em relação a estas regiões em populações naturais de plantas, sugerindo que a heterocromatina pode ter um valor adaptativo nos organismos (Stebbins citado por AGUIAR-PERECIN, 1979).

Há duas classes de heterocromatina na natureza: facultativa e constitutiva. A heterocromatina facultativa é

transitória, ou seja, a cromatina assume estágios alternados de eucromatina e heterocromatina, não sendo parte permanente do genoma. Seu papel no ciclo de vida dos organismos já foi claramente definido e existe como um mecanismo para inativação de grupos de genes. Um exemplo é um dos cromossomos X das fêmeas de mamíferos, que segundo OHNO (1964), torna-se heterocromático nas células somáticas após certo estágio do desenvolvimento do embrião, formando o chamado corpúsculo de Barr, permanecendo nesta forma durante todo o ciclo de vida, inativando os genes estruturais deste cromossomo.

A heterocromatina constitutiva é um elemento permanente no genoma e não sofre conversão ao estado de eucromatina no sentido genético, sendo geralmente formada de DNA altamente repetitivo. Seu papel no ciclo de vida dos organismos ainda é objeto de intensos estudos e algumas de suas possíveis influências serão discutidas no decorrer desta revisão.

Em cromossomos de milho, a heterocromatina encontrada é do tipo constitutiva e pode ser classificada em vários subgrupos de acordo com a literatura clássica e os métodos recentes de bandamento (CARLSON, 1988). Os cromossomos padrões, cromossomos A, contêm três tipos de heterocromatina: a heterocromatina cêntrica ou centromérica, que ladeia o centrômero; a heterocromatina da região organizadora do nucléolo, que tem como única função

a organização do mesmo; e o terceiro tipo que são os knobs localizados a uma certa distância do centrômero. Outro dois tipos são encontrados nos cromossomos B e são: a heterocromatina cêntrica e a heterocromatina distal do cromossomo B.

A partir do surgimento e uso da técnica de bandamento-C, foi possível caracterizar citologicamente esses diferentes tipos de heterocromatina. O método de bandamento-C surgiu na década de 70, a partir de experimentos de hibridação *in situ*, que tinham por objetivo localizar DNA altamente repetitivo nos cromossomos de camundongo (PARDUE & GALL, 1970). Os experimentos mostraram que este DNA hibridizava com o DNA da região pericentromérica, e quando se utilizava o corante Giemsa para visualização dos cromossomos, essas regiões se coravam intensamente. Da mesma forma Arrighi et alii (citados por AGUIAR-PERECIN, 1979), em experimentos de hibridação *in situ* para localizar DNA repetitivo em cromossomos humanos, observaram áreas intensamente coradas nas regiões centroméricas e no segmento distal do cromossomo Y, concluindo serem estas as regiões do complemento cromossômico humano que possuíam heterocromatina constitutiva. A partir desses resultados ARRIGHI & HSU (1971), descreveram um método que evidenciava a heterocromatina constitutiva e que passou a ser chamado de bandamento-C pela CONFERÊNCIA DE PARIS (1971).

A aplicação desta técnica em cromossomos metafásicos de milho mostrou que os knobs aparecem intensamente corados nos cromossomos metafásicos. Portanto as bandas-C observadas correspondem aos knobs detectados no paquíteno. A heterocromatina da região organizadora do nucléolo mostra-se menos corada que os knobs e, a pericentromérica não apresenta coloração diferencial, a não ser pequenos grânulos observáveis em pró-metáfases. Segundo AGUIAR-PERECIN (1985a), esses dados evidenciam que há diversos tipos de heterocromatina, consistentes com a observação de que essas diferentes regiões podem ser diferenciadas pelo padrão de replicação durante o ciclo mitótico (PRYOR et alii, 1980) e quanto à presença de diferentes tipos de DNA repetitivo (PEACOCK et alii, 1981).

Em milho as primeiras observações foram feitas em cromossomos metafásicos de células meristemáticas de pontas de raiz por VOSA & AGUIAR (1972), aplicando o método de bandamento-C descrito por VOSA & MARCHI (1972), para a análise de variedades de milho do Brasil e de teosinte da Guatemala, México e Honduras. Os autores constataram bandas intensamente coradas próximas às extremidades dos braços cromossômicos, que deveriam corresponder aos knobs.

Trabalhos posteriores realizados por HADLAZKY & KALMAN (1975), caracterizaram a constituição de knobs através do método de bandamento-C, de três estoques de linhagens autofecundadas e seus híbridos e comprovaram que o método

era útil para caracterização de diferentes estoques de milho, e que bandas-C correspondiam aos knobs. A mesma conclusão foi obtida por WARD (1980), que estudou estoques de milho com composição de knobs conhecidas para demonstrar que as regiões coradas diferencialmente pelo referido método correspondiam aos knobs observados no paquíteno.

Estudos realizados por AGUIAR-PERECIN (1985b) e AGUIAR-PERECIN & VOSA (1985), para estudo de identificação dos cromossomos em milho, utilizando a metodologia de bandamento-C, caracterizaram estoques autofecundados da raça mexicana Zapalote Chico, onde pôde-se observar que os pares de homólogos eram homozigóticos para as seguintes posições: 1S, 2S, 2L, 3S, 3L, 4S, 5S, 5L, 6L₂, 6L₃, 7S, 7L, 8L₁, 8L₂, e 9S e estoques autofecundados de milho da raça cerimonial (raça Avati-Moroti) que era heterozigoto para as posições 2S e 7L. O estudo do híbrido entre esses dois estoques mostrou que todos os homólogos eram heterozigotos para as bandas em questão, e que estas modificavam o comprimento do braço cromossômico quando correspondiam a knobs de tamanho médio ou grande. Com base nesses dados foi possível elaborar o idiograma representativo do cariótipo somático do estoque de Zapalote Chico e do cariótipo básico de milho sem bandas. Este diagrama pode ser considerado ilustrativo do cariótipo somático de milho tornando-se importante para estudos citogenéticos de células somáticas de milho (AGUIAR-PERECIN, 1987).

A influência da heterocromatina no ciclo vital de plantas é ainda uma questão bastante controvertida e uma série de estudos têm mostrado atividades relacionados aos knobs, independentes de seu valor adaptativo.

Os knobs têm sido descritos como estruturas de natureza heterocromáticas, localizadas em posições fixas nos cromossomos. Eles podem variar em número e tamanho, de planta para planta, dentro de uma determinada raça, e quando presente em um cromossomo é uma característica constante e sua herança é tão precisa quanto a de um gene (RHOADES, 1955).

Até o presente momento foram encontrados knobs nas seguintes posições: 1S, 1L, 2S, 2L, 3S, 3L, 4S, 4L, 5S, 5L, 6L₁, 6L₂, 6L₃, 7S, 7L, 8L₁, 8L₂, 9S, 9L, 10L₁, 10L₂. Os números de 1 a 10 designam o par cromossômico, S o braço curto e L o braço longo (McCLINTOCK et alii, 1981).

No início dos estudos da natureza dos knobs surgiram algumas controvérsias: LONGLEY (1937), estudando características morfológicas de cromossomos de teosinte, sugeriu que os knobs seriam cromômeros grandes e quando presentes, aumentariam o comprimento dos cromossomos paquitênicos. MORGAN (1943) por outro lado, encontrou diferenças quantitativas e qualitativas entre knobs e cromômeros, sendo estes menores e mais numerosos que os knobs. Este autor sugeriu também uma possível correlação entre cromôcentros nos núcleos interfásicos e os knobs

paquitênicos. Com relação ao comprimento dos cromossomos, MAGUIRE (1962) comparando braços cromossômicos com e sem knobs, na fase de paquíteno, concluiu que estes não têm influência sobre o comprimento dos mesmos.

Foram também realizados estudos para caracterizar a heterocromatina dos knobs e compará-la à outras regiões heterocromáticas do milho (PEACOCK et alii, 1981). Para isso foram usados estoques com diferentes números de knobs e com cromossomos B. A hibridação *in situ* mostrou que a sequência de DNA de 185pb, que é isolada como um satélite em gradiente de CsCl\actinomicina D está localizada nos knobs e não em outra região heterocromática de milho, como heterocromatina centromérica, região organizadora do nucléolo e blocos de heterocromatina de cromossomos B. Quantificações para densidade de flotação e análise de renaturação, indicaram que esta sequência é o principal componente dos knobs nos cromossomos A de milho, e que há uma correlação entre tamanho deste e frequência de reiteração da unidade de 185pb.

Em relação ao seu papel, a literatura menciona que esta heterocromatina seria geneticamente inativa, problema que na realidade continua em aberto. De outra forma, vários estudos têm demonstrado que raças de milho podem ser caracterizadas por sua composição de knobs, fato que levou os autores a considerar que estes possuem valor adaptativo. Um efeito conhecido dos knobs é a formação de fibras

cromossômicas nas anáfases da meiose feminina, quando o cromossomo 10 anormal está presente. O estudo sobre este papel e também correlações entre knobs e características morfológicas e fisiológicas das plantas, serão discutidos em itens a seguir.

2.2 Uso de knobs para caracterização de raças e estudo da origem do milho

O primeiro trabalho que mostrou o valor dos knobs como característica geográfica de uma certa variedade foi o de LONGLEY (1938) em seu estudo sobre variedades indígenas norte-americanas, onde observou uma maior frequência de knobs em plantas do sudoeste dos Estados Unidos e poucos ou nenhum, em plantas do norte ou nordeste daquele país.

WELLHAUSEN et alii (1954) encontraram baixa frequência de knobs nas raças mais antigas do México. Afirmaram também que a seleção natural parece ter favorecido um aumento no número desses marcadores durante o desenvolvimento das raças de milho no México. Segundo estes autores, há uma indicação de que quando duas raças se cruzam, há uma tendência dos knobs se acumularem nas progênies do híbrido.

Apenas para citar alguns aspectos da utilização dos knobs em relação à distribuição geográfica das diferentes raças de milho McClintock (cit. por AGUIAR-PERECIN, 1987),

relacionou ausência e presença de knobs, tamanho, e frequência relativa dos mesmos com a distribuição geográfica de raças da Bolívia, Chile e Equador, onde essas características haviam sido previamente determinadas. A partir desses resultados a autora chegou a conclusão que muitas raças tiveram origem independente a partir de diferentes centros. Através de imigração e introdução em novas regiões, provavelmente em épocas diferentes, raças de diversas origens teriam se hibridizado, originando novos tipos raciais. Então o conhecimento dos complexos de knobs existentes nos diferentes germoplasmas originais permitiria conhecer as direções de migração seguidas por cada um deles.

O uso de knobs para caracterizar raças, observar padrões de variação segundo a origem e determinar direções de migração, continua sendo objeto de estudos atuais.

BIRD (1980), fez uma análise de trabalhos previamente desenvolvidos por diversos autores que forneciam dados sobre frequência de knobs de milho e teosinte originários de muitas regiões. O objetivo foi observar o padrão de variação do gênero *Zea* baseado na análise de todos os dados, e foi possível descrever grupamentos de taxa (coleções e raças) de acordo com sua composição de knobs. O autor verificou que em milho havia grande contraste entre raças Andinas-Amazônicas e do Caribe. As raças Andinas-Amazônicas possuíam alta frequência de knobs nas

posições 7L e 6L₃ (knobs subterminais), enquanto as raças do Caribe apresentaram, geralmente, maior número de knobs: são quatro conjuntos que variam conforme as subdivisões regionais. Em relação ao teosinte anual, a maior variação apareceu entre os da Guatemala, com muitos knobs terminais nos braços curtos e longos dos cromossomos e, os do México, com poucos terminais e muitos intermediários, sendo mais semelhantes aos padrões de milho. Segundo o autor, pelo fato de que, durante a domesticação das espécies, não ter sido realizada seleção direta para os knobs, eles são importantes na elaboração de modelos taxonômicos e evolutivos.

Em relação à origem do milho, várias investigações envolvendo a análise de diferentes complexos de knobs, seus centros de origem e direção de migração, através da análise de raças de milho das Américas e também populações de teosinte, contribuíram para importantes informações sobre a origem do mesmo.

A primeira teoria sobre a origem do milho cultivado que considerou os knobs como elementos importantes, foi desenvolvida por Mangelsdorf & Reeves e posteriormente discutido por Mangelsdorf & Camerom e Reeves & Mangelsdorf (cit. por AGRUIAR-PERECIN, 1987). Esta teoria postulava que o milho selvagem original era desprovido de knobs, sendo domesticado na América do Sul. Depois foi espalhado até a América Central onde se hibridizou com o *Tripsacum* que

possue vários knobs terminais. O híbrido resultante teria retrocruzado com o milho dando origem a novas variedades de milho e ao gênero *Euchlaena* (teosinte). Assim os knobs encontrados no milho e no teosinte seriam originários do *Tripsacum*. Esta teoria foi refutada por vários autores em função da maioria dos knobs de milho e teosinte serem intercalados, e os do *Tripsacum* terminais.

Recentemente, há uma tendência de se aceitar a idéia de que os knobs do milho moderno não se originaram do *Tripsacum* e sim do teosinte ou de um ancestral semelhante ao mesmo.

Estudos mais recentes de taxa do gênero *Zea* e de evolução têm usado o método de bandamento-C. MASTENBROEK & WET (1983), utilizaram o método de bandamento-C para visualizar o padrão heterocromático das taxa do gênero *Zea* e usaram estes padrões para estudo de relação evolutiva. Os padrões de bandas-C concordaram, na maioria das vezes, com as posições dos knobs conhecidos através de estudos anteriores de paquíteno. Os grupos estudados foram: *Zea mays* spp *parviglumis* var. *huehuetenangensis*, *Zea diploperennis*, *Zea perennis*, *Zea luxurians*, onde foram encontradas regiões heterocromáticas que não haviam sido descritas, *Zea mays* spp *mexicana* e *Zea mays* spp *parviglumis*.

Através de dados obtidos, os autores puderam fazer algumas considerações sobre certas raças do gênero *Zea*.

Havia uma questão: se o teosinte Chalco era realmente tão relacionado ao milho cultivado, como sugerido por seu status taxonômico e, se as duas taxa de *Zea perenes* deviam ser tratadas como espécies separadas. Considerando-se o tamanho das bandas-C e outras características descritas previamente, os autores afirmaram que provavelmente *Zea perennis* era um autotetraplóide derivado de *Z. diploperennis*. Outra questão levantada foi a de que o reconhecimento de teosinte de Huehuetenango como subespécie *parviglumis* não estava de acordo com os dados obtidos, pois o padrão heterocromático deste diferia dos demais teosintes. Contrastando com isto, taxa que diferiam relativamente menos no padrão heterocromático, estavam incluídas em diferentes espécies. As questões evolutivas, segundo os autores, não poderiam ser julgadas somente com base neste padrão, embora sua importância não devesse ser minimizada. Os dados do estudo indicaram que a taxonomia sugerida para o gênero *Zea* não refletia adequadamente as relações evolutivas. A posição do teosinte Huehuetenango, como uma variedade da subespécie *parviglumis* e a classificação dos dois teosintes perenes como espécies diferentes, precisariam ser reconsideradas.

Ainda, com o objetivo de obter mais informações a respeito da origem do milho e suas relações com teosinte e *Tripsacum*, DENNIS & PEACOCK (1984), fizeram um estudo para verificar se a unidade repetitiva, componente da

heterocromatina do knob do milho, era a mesma para as outras duas espécies. Em um estudo anterior, PEACOCK et alii (1981), havia caracterizado a sequência e comprimento do DNA do knob de milho. Para isto, foram extraídos sequências de DNA heterocromático de milho, teosinte e *Tripsacum* e foram clonados, sequenciados e realizada hibridação *in situ* da unidade clonada do milho em teosinte e *Tripsacum*. O resultado dessa técnica mostrou que esta sequência estava presente nos knobs das outras espécies, assim também, como na heterocromatina do knob de *Zea diploperennis*.

As conclusões do trabalho relatam que *Tripsacum* tem uma história filogenética em comum com milho e teosinte. Em todas as três taxa, o comprimento do "repeat" é de 180pb e a sequência de nucleotídeos é mais que 95% conservada. No entanto, *Tripsacum* é diferenciado por outras características do DNA do knob: as variantes de 202 e 235pb encontradas no milho e teosinte não ocorrem em *Tripsacum* que possui uma variante de 280pb. A variante de 202pb fornece uma forte evidência de que o milho deriva diretamente do teosinte mexicano.

Desta forma é importante destacar o quanto a análise da composição de knobs tem contribuído para elucidar a origem do milho, bem como, a análise de interrelação entre suas raças.

2.3 Knobs e características morfológicas e fisiológicas das plantas

Desde o início do estudo dos knobs, várias pesquisas têm procurado correlacionar a presença de determinados knobs com características morfológicas e fisiológicas da planta, como: características da espiga, altura de plantas e capacidade de combinação entre linhagens com composição de knobs diferentes.

BROWN (1949), um dos pioneiros neste tipo de estudo, observando variedades e linhagens autofecundadas dos Estados Unidos, relatou que elevado número de knobs apresentava correlação positiva com características externas da espiga, como o número de fileiras por espiga. Ele considerou que os genes que controlam essas características deviam estar localizados próximos aos knobs, e como estes reduzem a taxa de permuta em regiões adjacentes, os referidos genes permaneciam ligados aos knobs.

BLUMENSCHHEIN (1964), chegou a esta mesma conclusão, ao estudar associações entre dez posições de knobs e 15 características morfológicas em plantas F_2 , oriundas do cruzamento entre plantas da raça mexicana Zapalote Chico (elevada frequência de knobs) e da raça Knobless Flint (não possuem knobs). Das 150 associações analisadas, 48 foram estatisticamente significativas.

Em relação à frequência de knobs em linhagens de milho e capacidade de combinação, MOHAMED & SHOEIB (1965), ao determinarem a número de knobs de linhagens egípcias e avaliarem os híbridos entre elas, encontraram que a melhor capacidade de combinação existia entre linhagens com elevada frequência de knobs e aquelas com baixa frequência, e propuseram que os melhoristas poderiam selecionar as linhagens antes de chegar a homozigose, pelo exame dos knobs, e isto economizaria tempo durante o programa de melhoramento.

Da mesma forma, KALSY & SHARMA (1970), em um estudo para verificar capacidade de combinação e vigor híbrido, encontraram que híbridos com maiores efeitos heteróticos eram os oriundos de cruzamento entre linhagens com grande números de knobs e linhagens com poucos knobs.

CHUGHtai & STEFFENSEN (1987), apresentaram uma hipótese para explicar o papel da heterozigose dos knobs nos híbridos: considerando que a replicação e expressão dos genes são eventos associados, a replicação e expressão precoce de genes em cromossomo sem knobs, associada a replicação tardia dos genes próximos aos knobs, promoveriam um período de sobreposição da atividade gênica em cruzamentos entre linhagens com poucos, ou sem knobs, e outras com muitos knobs. Os autores propõem, também, que o polimorfismo dos knobs em variedades de polinização cruzada é esperado e, em parte, responsável pelo sucesso das

mesmas. Apesar da importância prática este polimorfismo não tem sido considerado diretamente nos programas de melhoramento. Isto pode mudar e informações da composição de knobs em linhagens comerciais serão úteis no futuro, para os programas de melhoramento de milho

Há também estudos mostrando que existe uma correlação entre latitude e número de knobs em milho. Foram iniciados por Longley e Brown (citados por PORTER & RAYBURN, 1990), que observaram uma graduação do número dos mesmos com respeito à latitude: populações de milho situadas mais ao norte dos Estados Unidos, tinham menos knobs que populações situadas mais ao sul. O mesmo resultado foi observado por RAYBURN et alii (1985), quando determinaram a composição de bandas-C em linhagens adaptadas à várias latitudes.

A correlação entre altitude e número de knobs também tem sido observada por diversos autores: Bennett e McClintok e colaboradores (citados por PORTER & RAYBURN, 1990). Foi mostrado que populações de maior altitude têm um número menor de knobs que populações de baixa altitude. Um resultado contrastante a este foi encontrado por RAYBURN & AUGER (1990), ao estudarem 12 populações de milho do Arizona, e foi posteriormente confirmado por PORTER & RAYBURN (1990), e propõem que esta correlação inesperada possa existir apenas nestas populações estudadas.

2.4 Obtenção de linhagens de milho e estudo da composição de knobs das mesmas

Os knobs têm sido utilizados para caracterização de linhagens em uma escala menor que para caracterização de diferentes raças de milho.

TAVCAR (1957), estudando linhagens autofecundadas provenientes da variedade nativa Rostrata (cultivada na parte norte da Iugoslávia), encontrou uma variação de 11 a 20 knobs nas linhagens, concluindo que havia variação entre elas, quanto ao número dos mesmos. BIANCHI et alii (1958), estudaram a composição de knobs de 79 populações de polinização aberta, coletadas ao longo da Itália, e encontraram um pequeno número desses marcadores citológicos, não excedendo a quatro. VETTURINI (1969) usou a constituição de knobs para caracterizar citologicamente 31 linhagens de milho que estavam sendo usadas para produção de milho híbrido, sendo possível caracterizá-las e reconhecê-las através desses estudos citológicos.

Dentro dessa linha de pesquisa, BIANCHI & VETTURINI (1969) observaram os knobs de linhagens selecionadas, usadas para a produção de híbridos. Foram estudadas 64 linhagens obtidas por autofecundação, por um período de 12 anos, a partir de variedades de milho italianas e também foram estudadas linhagens americanas. Os resultados dos dois grupos mostraram inúmeras diferenças e também

similaridades: a presença de knobs específicos é claramente observada nos dois grupos. O braço longo do cromossomo três possui um knob nas linhagens italianas, mas no cromossomo quatro geralmente não, e ocorre o inverso para as linhagens americanas. Por outro lado, o knob localizado no braço longo do cromossomo cinco está presente nas linhagens de ambos os grupos. Um fato interessante foi encontrado pelos autores nessas linhagens italianas, onde as autofecundações foram realizadas por 12 gerações: ainda havia muitas plantas heterozigóticas para certos knobs (principalmente para o loco K3L), indicando que apesar de alto grau de endogamia, estes ainda segregavam.

PASUPULETI (1986) fez estudos citológicos comparativos em duas linhagens denominadas Mol17 e B73, visando a caracterização cromossômica das mesmas. O significado deste estudo foi enfatizar a importância do uso da análise cromossômica, especialmente no paquíteno, com especial referências aos knobs, para identificar linhagens individuais usadas nos programas de melhoramento.

Todos esses estudos foram realizados através da análise de cromossomos paquitênicos. O presente trabalho representa o emprego da metodologia de bandamento-C em estudos de genealogia e caracterização de linhagens, e dados preliminares desta análise aparecem em AGUIAR-PERECIN & DECICO (1988).

Todos esses resultados mostraram aspectos de grande

interesse para o nosso trabalho: 1) que a identificação de linhagens, com base nesses marcadores é quase sempre possível, mesmo quando materiais de origens diferentes são considerados; 2) a presença de certa frequência de heterozigotos para determinados knobs em linhagens que parecem fenotipicamente uniformes, mostra que a seleção para uniformidade de um caráter visível, não é necessariamente acompanhada por um grau correspondente de homozigose para caracteres correlacionados.

2.5 Mecanismos que afetam a herança mendeliana

Conforme descrito anteriormente, quando um knob está presente em determinado cromossomo, representa uma característica constante, sua herança é tão precisa quanto a de um gene, e sua segregação ocorre da mesma maneira que a cromossômica ou gênica, obedecendo as Leis de Mendel (RHOADES, 1955). Entretanto dados da literatura mostram que existem alterações na segregação dos knobs, que podem ser causadas por uma transmissão preferencial dos cromossomos com knobs através da megasporogênese. Transmissão preferencial de certos locos pelo grão de pólen, tem também sido descrito na literatura, conforme será discutido a seguir.

2.5.1 Estudo da segregação preferencial dos cromossomos não homólogos na meiose feminina

Extensivos estudos em milho têm mostrado, que a segregação de cromossomos e genes está de acordo com as Leis de Mendel. No entanto existem alguns mecanismos que podem alterar essas proporções mendelianas e um desses mecanismos é a segregação preferencial dos cromossomos não homólogos na meiose feminina.

Um dos primeiros trabalhos realizados nesta área foi desenvolvido por RHOADES (1942), e segundo ele a segregação preferencial, que é a passagem de um cromossomo específico para um polo específico, durante a meiose, pode ser detectada geneticamente na oogênese e megasporogênese onde só um dos quatro núcleos, derivados da divisão meiótica, sobrevive. Deste modo a segregação preferencial origina proporções genéticas distorcidas.

Este estudo foi realizado com linhagens de milho que possuíam o cromossomo 10 anormal, que difere do normal por possuir um segmento extra distal, contendo um bloco de heterocromatina, além de três pequenos knobs. Foi utilizada uma linhagem homozigótica para este cromossomo e com um gene marcador no estado recessivo (*r*). O gene marcador usado foi o gene da série R ("colored aleurone"), sendo R dominante sobre *r*. Esta linhagem foi cruzada com uma outra, homozigótica para o cromossomo 10 normal e com o gene

marcador no estado dominante (R). A seguir o híbrido (F_1), heterozigótico para o cromossomo 10 anormal e para o loco R foi cruzado com linhagens apresentando cromossomo 10 normal, possuindo o alelo recessivo (r) e também homozigóticas dominantes para outros locos relacionados com cor do aleurona. No híbrido, o cromossomo 10 anormal possuía o alelo r, e o 10 normal, o alelo R e a proporção esperada na progênie de retrocruzamento seria 1:1 (R/r). A proporção encontrada foi 188Rr:444rr (29,8%:70,2%) e o esperado seria que plantas rr possuissem um cromossomo 10 anormal, caso não houvesse crossing-over entre o loco R e o segmento extra do cromossomo anormal. Para verificar a frequência de crossing-over, a constituição cromossômica de 100 plantas com genótipos Rr e rr foi observada e a frequência encontrada foi igual a um. Devido a proximidade do loco R e do segmento extra, não havia crossing-over entre essas regiões, e a proporção R:r encontrada era devida à ação do cromossomo 10 anormal, que deveria estar incluído em mais de 50% dos óvulos funcionais.

Os mecanismos para explicar a segregação preferencial, de homólogos heterozigóticos para knobs, foram propostos por RHOADES (1952) e RHOADES & DEMPSEY (1966), e para que isto ocorra alguns fenômenos são fundamentais:

1) para a segregação preferencial da cromátide com knob do heterozigoto, é necessário que ocorra um quiasma entre o centrômero e o knob, para a formação de um

cromossomo heteromórfico em relação a sua cromátide;

2) presença de fibrilas do fuso extras na região dos knobs são necessárias para a orientação das cromátides, de uma maneira não ao acaso na anáfase I;

3) manutenção da segregação preferencial até a segunda divisão meiótica para possibilitar a ida da cromátide com knob para o megásporo da base do saco embrionário que originará o megásporo viável. Paralelamente a isso, os autores mencionam, que para que os fatores 2 e 3 ocorram é necessária a presença do cromossomo 10 anormal, pois é o responsável pela formação de sítios secundários de atividade cêntrica ou neocentromérica, durante a anáfase I e anáfase II, sendo um fator importante para o movimento precoce dos cromossomos com knobs, em direção ao polo da célula, durante estas fases da divisão (RHOADES & DEMPSEY, 1990).

Um estudo isolado foi realizado por LONGLEY (1945), com objetivo de verificar se outros cromossomos, além do 10 anormal, possuíam essa capacidade de segregação preferencial. Para isso testou-se a segregação preferencial em plantas heterozigóticas (F_1) para vários knobs, em um total de 12 locos, na presença ou ausência do cromossomo 10 anormal, através do estudo de progênies de retrocruzamento entre o híbrido e linhagens sem knobs. O autor considerou que qualquer desvio no número de knobs nesta população seria resultado de uma segregação não ao acaso, ocorrida

nas plantas F_1 na megasporogênese. Considerando a segregação de cada knob separadamente, o autor observou que todos estavam presentes em mais de 50% das plantas originadas do retrocruzamento, indicando uma segregação preferencial dos cromossomos com knobs sobre os sem knobs na megasporogênese. O estudo mostrou também que mesmo em plantas sem cromossomo 10 anormal havia a segregação preferencial dos cromossomos com knobs, isto é, em uma frequência muito maior que 50% os óvulos viáveis apresentaram cromossomos com knobs. Apesar desse resultado, o autor menciona, que outros estudos precisam ser realizados para uma conclusão do mecanismo de segregação dos cromossomos com knobs na ausência do 10 anormal.

Como podemos observar, a maioria dos estudos tem mostrado como de importância fundamental, a presença do cromossomo 10 anormal, porém tais estudos observaram o efeito do cromossomo 10 anormal apenas sobre a segregação de um cromossomo em particular: 3 ou 9, que apresentam ou não knobs.

2.5.2 Capacidade de competição do grão de pólen

Segundo PFAHLER (1967), o gameta masculino tem uma função vital na transmissão de material genético para gerações posteriores. Em plantas superiores um grande

número de grãos de pólen de diferentes genótipos competem para fertilizar um pequeno número de óvulos. Tem-se assumido que a capacidade de fertilização é independente de sua constituição genética. Isto é reforçado pelo fato de que na maioria dos locos estudados, as proporções mendelianas clássicas, resultantes dessa independência, têm sido obtidas. No entanto, para um número pequeno de locos, segregações aberrantes têm sido encontradas, aparentemente resultado de diferenças na transmissão do pólen.

Se a transmissão do pólen e seu genótipo estão correlacionados, um mecanismo seletivo pode estar presente e alterar as frequências gênicas e zigóticas em gerações sucessivas. Deste modo, diversos autores passaram a assumir que a constituição genética do grão de pólen tem um papel sob sua capacidade de fertilização, e ocorre uma seleção pré-zigótica resultante de uma competição gametofítica (SARI GORLA et alii, 1975).

Em alguns casos a capacidade de fertilização é influenciada pela ação de um único gene, o fator gametofítico Ga, mas em outros pode ser devido a um "background" genético.

O principal fator dessa capacidade de competição é a taxa de crescimento do tubo polínico. SARI GORLA et alii (1975), fizeram um estudo para medir o valor dessa característica, e para isso, foram estudados o crescimento do tubo polínico *in vitro* e *in vivo*, sendo este último para

testar a capacidade de competição de pólen de diferentes genótipos sobre um mesmo estigma.

No estudo *in vitro*, a taxa de crescimento do tubo polínico de 20 linhagens e sete híbridos foram medidas através do crescimento dos mesmos em meio sintético. O resultado obtido foi uma grande variação na taxa de crescimento dos diferentes genótipos, e nos híbridos houve segregação desse caráter, o que segundo os autores pode indicar o papel do componente gametofítico no controle genético do crescimento do tubo polínico.

No estudo *in vivo*, a capacidade de competição foi medida como um aumento da frequência de fertilização relativa, a partir do ápice para a base da espiga. Para isso, foram misturadas quantidades iguais de dois tipos diferentes de pólen, marcados com a presença do alelo selvagem (+) ou mutante (o_2) do gene opaco-2 e aplicados sobre os estigmas de plantas conhecidas geneticamente e possuindo os alelos o_2o_2 (o gene opaco-2 afeta a estrutura do endosperma e pode ser visualizado na semente). Dois tipos de resultados foram encontrados: quando foi usado um tipo de mistura de pólen, não houve uma diferença significativa entre os setores da espiga, mas foi encontrado um número muito diferente de sementes vítreas (normal) e opacas por toda a espiga. Isto indica que um tipo de pólen cresce muito mais rápido que outro e, assim, poucos óvulos, em todos os setores, podem ser fertilizados

pelo pólen que germina mais lentamente. Este tipo de resultado é esperado quando os fatores gametofíticos estão presentes. O outro resultado foi que a frequência de sementes normais e opacas variavam de acordo com um gradiente, do ápice para a base. Os autores concluíram que diferentes taxas de fertilização ocorrem devido à diferentes tempos de germinação ou velocidades diferentes do crescimento do tubo polínico e esses fatores podiam ser diferenciados. Concluíram, também, que o estudo do crescimento *in vitro* reflete a eficiência do pólen *per se*, mas não a interação com tecidos do estilete, que é também um fator importante na capacidade de competição do tubo polínico.

Para estudar este fator, capacidade de competição do pólen relacionada à interação com esporófito feminino, SARI GORLA et alii (1976), estudaram a capacidade de competição do pólen de quatro linhagens, com diferenças conhecidas a esse respeito, quando cresciam em plantas diferentes (usadas como fêmea). Como resultado dessa interação, a capacidade relativa de competição pode variar de acordo com o genótipo do tecido do estilete, o que gera, mesmo em espécies que não revelam auto-incompatibilidade, um mecanismo de seleção por parte do esporófito feminino, na transmissão do pólen. Para o estudo, a capacidade de competição foi medida *in vivo*, pelo aumento da frequência relativa de fertilização do ápice para a base da espiga.

Para isso como no trabalho anterior, misturas de quantidades iguais de pólen geneticamente diferentes, marcados com a presença do alelo selvagem ou mutante do gene opaco-2 foram usados para polinizar plantas femininas homozigóticas e recessivas para o gene O_2 (o_2o_2). Na ausência de competição, seria esperado um número igual dos dois tipos de sementes. enquanto um aumento na frequência relativa de um tipo, do ápice para a base, indicaria uma maior velocidade de crescimento desse tipo de pólen.

Os resultados indicaram que as linhagens eram claramente diferentes quanto à capacidade de competição e foi possível classificá-las de acordo com este caráter, que não se alterou quando plantas diferentes foram usadas como fêmea. O que mudou foi a vantagem relativa de uma linhagem sobre outra.

Os autores concluíram que a capacidade de interação polén-estigma mostrou que a habilidade de fertilização do tubo polínico depende também do tecido da planta feminina, mas apesar disso podem ser verificadas diferenças entre a capacidade de fertilização dos diferentes genótipos. Através desses trabalhos, fica evidente que há uma seleção gametofítica resultante de diferentes capacidades de competição do grão de pólen, cujo principal componente é a taxa de crescimento do tubo polínico, apesar desse fenômeno ser afetado também pela interação entre pólen e tecido estilar.

Para testar o efeito de seleção que age diretamente na geração gametofítica de uma população de polinização aberta, OTTAVIANO et alii (1982), realizaram um estudo considerando o principal componente da capacidade de competição gametofítica e respostas relacionadas a essa competição. Para isso, usaram uma espiga de uma população de polinização aberta e tomaram 40 sementes do ápice e 40 sementes da base, separando-as em dois grupos. A partir dessas sementes foram obtidas as gerações S_3 , que foram avaliadas para capacidade de competição do pólen. Para isso foi usada a técnica de mistura de pólen, onde o pólen de cada grupo de linhagem foi misturada com igual volume de outra linhagem qualquer (padrão) que possuía aleurona colorido (sendo este caráter usado como marcador). Essa mistura de pólen foi usada para polinizar um híbrido não correlacionado e que possuía aleurona incolor.

Para medir a capacidade de competição foi avaliada a frequência de sementes com aleurona incolor nas espigas obtidas. Os resultados mostraram uma maior capacidade de competição do pólen das linhagens selecionadas que a padrão: a maioria das linhagens S_3 obtidas da base da espiga inicial foi mais competitiva que a usada como padrão, e o inverso ocorreu com as linhagens de sementes do ápice da espiga inicial. Foram avaliados também alguns caracteres esporofíticos na progênie híbrida (cruzamento entre linhagens S_3 do grupo de sementes da base ou S_4 do

grupo de sementes do ápice e o F_1). Os resultados mostraram que a progênie híbrida entre linhagens S_3 e o híbrido tinham sementes maiores e maior peso seco de "seedling". Isto, segundo os autores, indica uma associação positiva entre capacidade de competição gametofítica e diferenças em características esporofíticas. Os autores concluíram que seleção para maior capacidade de competição é efetiva e que a seleção afeta principalmente a taxa de crescimento do tubo polínico, que juntamente com o tempo de germinação do pólen são os principais fatores da capacidade de competição do mesmo.

Com o estudo desses diferentes trabalhos pode-se perceber como ocorre a capacidade de competição do grão de pólen e que um fator importante dessa competição é a velocidade de crescimento do tubo polínico.

Por outro lado, o desenvolvimento do grão de pólen está diretamente relacionado com a divisão celular, que por sua vez está relacionada com a duração do ciclo mitótico. Uma questão levantada na literatura tem mostrado que blocos heterocromáticos podem afetar a duração do ciclo mitótico. NAGL (1974), realizou um estudo da duração de ciclo mitótico em plantas anuais e perenes em três gêneros de plantas, encontrando menor ciclo mitótico em plantas anuais. O autor demonstrou que mesmo em espécies anuais com maior conteúdo de DNA, devido a presença de heterocromatina, estas também se desenvolviam mais

rapidamente, e que os segmentos heterocromáticos tenderiam a encurtar o ciclo mitótico.

Pesquisas com milho têm demonstrado que os knobs apresentam síntese tardia, sendo o último componente do complemento cromossômico a completar a replicação do DNA (PRIOR et alii, 1980), mas ainda não foi mostrado seu efeito sobre o ciclo mitótico, sendo sugerido que podem aumentar a duração do mesmo.

Como pode-se observar o papel da heterocromatina na duração do ciclo mitótico ainda é bastante controverso, sendo necessárias mais pesquisas nesta área.

2.6 Estudos de polimorfismo de segmentos cromossômicos e evolução através da metodologia de bandamento-C

Os métodos de bandamento surgiram na década de 70 e foram inicialmente usados no estudo de populações humanas, mostrando-se adequados para estudos de segregação de regiões heterocromáticas. Ao mesmo tempo, esses métodos beneficiaram estudos de citogenética vegetal, pois foram reveladas diferenças estruturais ao longo dos cromossomos, permitindo a identificação dos mesmos. Atualmente estes métodos são úteis para a caracterização de materiais, como linhagens e raças de milho, conforme citado anteriormente, estudos de polimorfismo intra e interespecíficos das

regiões heterocromáticas, e também para estudos de relações evolutivas entre diferentes espécies. Um exemplo do uso do bandamento-C em relação à evolução é o estudo da origem do trigo tetraplóide e hexaplóide cultivado, a partir de seus ancestrais diplóides (GILL & KIMBER, 1974). Os resultados apresentaram que o genoma B tem mais bandas-C que os outros envolvidos. O *Triticum speltoides* tem sido considerado possível doador desse genoma, e foi revelado que apresenta grande similaridade de padrão de banda-C ao genoma B. No entanto outras duas espécies relacionadas ao trigo selvagem também possuem padrões de banda semelhante: *T. sharonensis* e *T. altissimum*. Este fato pode indicar que o *T. speltoides* pode não ser o único doador do genoma B, e a origem do *T. aestivum* e outras espécies de trigo cultivada pode ser polifilética.

Também no gênero *Allium*, os padrões de bandamento são importantes para a classificação do mesmo, pois são altamente espécie-específico (Vosa, citado por VOSA, 1985). Dois grupos de espécies podem ser facilmente distinguidas: *cepa* e *paniculatum* por possuírem padrões de bandas altamente específicas.

Estudos de origem e evolução também têm sido realizados na gênero *Avena* e o bandamento-C tem sido usado para identificação de cromossomos somáticos das diferentes espécies (FOMINAYA et alii 1988). Há dois tipos de genoma conhecidos entre as espécies de aveia: o genoma A e o

genoma C, que podem ser subdivididos, dando um total de quatro cariótipos bem definidos. Isto sugere divergência evolutiva através de rearranjo estrutural e pode-se esperar a existência de barreiras de isolamento entre os cariótipos. O bandamento-C fornece informações extras, úteis no conhecimento do genomas e as divergências evolutivas também podem ser demonstradas, bem como torna-se possível a identificação dos genomas A e C em alopoliplóides. Os autores concluem que com o estabelecimento de cariótipos bandados de mais espécies diplóides é possível estudar a evolução do gênero *Avena* e ajudar a elucidar as diferenças acumuladas durante a especiação de espécies diplóides.

O bandamento-C também tem sido usado para estudo de similaridades e diferenças cromossômicas entre espécies usadas na formação de híbridos interespecíficos, e as consequências dessas diferenças no comportamento meiótico do híbrido. Um exemplo é o estudo de cromossomos de centeio e suas implicações na obtenção de triticales. FOMINAYA & ORELLAN (1988), observaram o comportamento meiótico de três triticales octaplóides derivados de três cruzamentos entre linhagens de centeio com diferentes quantidades de heterocromatina e trigo com mesmo "background". A literatura tem mencionado que a instabilidade meiótica encontrada em triticales deve-se à heterocromatina telomérica que pode reduzir o pareamento não só em

cromossomos com heterocromarina mas também em outros que não contêm heterocromatina. É mencionado também, que a heterocromatina afeta os cromossomos de centeio em um grau maior que os de trigo, e a intensidade deste efeito está relacionada com o tamanho do bloco heterocromático (Gupta & Pryadanslan, citados por FOMINAYA & ORELLANA, 1988). No entanto, neste trabalho surgiram algumas evidências indicando que o papel da heterocromatina no pareamento cromossômico não segue um modelo simples, e os autores não encontraram nenhuma diferença no comportamento meiótico dos três triticales com diferentes conteúdos de heterocromatina, indicando que o aumento do conteúdo da mesma não necessariamente afeta o pareamento meiótico.

Apenas como ilustração do uso de bandamento no estudo do polimorfismo de regiões heterocromáticas, são relacionados a seguir dois trabalhos em populações humanas e um em milho.

BUCKTON et al. (1976), estudaram o polimorfismo de três populações da Escócia, sendo duas da ilha principal e uma terceira de uma ilha distante. O principal objetivo desse estudo foi determinar a distribuição de várias classes de bandas-C e bandas-Q dentro das três populações e determinar se a população da ilha isolada diferia na frequência e distribuição em relação às outras duas. Foram verificadas as posições e tamanho das bandas dos cromossomos 1, 9 e 16, sendo o tamanho classificado em

cinco categorias. O trabalho mostrou que quanto ao tamanho não houve diferenças das quatro classes de bandas-C, exceto para uma classe onde houve diferença na população da ilha isolada.

Outros trabalhos nesta linha foram realizados por um grupo de pesquisadores russos durante vários anos (IBRAÏNOV 1983), e foi estudado o polimorfismo cromossômico através de bandas-Q em treze populações humanas, representando diferentes grupos raciais, nacionais e étnicos, vivendo em diferentes zonas ecológicas da Eurásia e África. Os objetivos destes estudos foram o de discutir a possibilidade do valor seletivo da heterocromatina cromossômica a certos fatores ambientais extremos, a possível existência de heterogeneidade interpopulacional ao nível cromossômico e o valor taxônomico do polimorfismo da heterocromatina na antropologia.

Os resultados mostraram que dentro das populações a distribuição de pares homozigóticos e heterozigóticos para bandas-Q está em completo acordo com a Lei de Hardy-Weinberg. Em relação ao valor seletivo da heterocromatina foi formulada a hipótese da diminuição do conteúdo da mesma com o aumento da latitude, confirmada pelos dados obtidos. Em relação à heterogeneidade interpopulacional, resultados da frequência do polimorfismo de bandas-Q foram avaliados e a conclusão é de que esta heterogeneidade existe. No entanto, as seguintes questões

permaneciam não resolvidas: em quais parâmetros quantitativo do polimorfismo a população diferia. Os seguintes parâmetros foram investigados: número médio de bandas-Q por indivíduo; frequência de bandas-Q em doze locos em sete autossomos; frequência de homozigotos e heterozigotos e frequência de cromossomo três invertido, na população.

Os resultados da análise comparativa da frequência de bandas-Q em doze locos polimórficos de autossomos das populações representando diferentes grupos ecológicos, mostraram uma heterogeneidade interpopulacional. Um outro parâmetro: frequência de bandas-Q em percentagem, dos doze locos nos sete autossomos (e não em percentagem do número de cromossomos analisados), mostrou que as populações eram homogêneas. Foi feita comparação entre sexos com base nos quatro parâmetros e não foram encontradas diferenças dentro da mesma população, exceto com relação ao número médio de bandas-Q por indivíduo, mostrando que há uma tendência de aumento nas fêmeas. A explicação é que há algum mecanismo nas fêmeas que pode compensar, por diferente dosagem de heterocromatina Q, a ausência nestas da grande banda-Q no cromossomo Y presente somente nos machos.

Um estudo da variação da quantidade de heterocromatina e tamanho de genoma em milho foi realizado por RAYBURN et alii (1985) que caracterizaram 22 populações norte-americanas e mexicanas em diferentes latitudes. Os

cromossomos foram corados pelo método de bandamento-C e a percentagem de heterocromatina, determinada pela medida do comprimento total do cariótipo dividido pelo comprimento total do cariótipo com bandas-C. O conteúdo de DNA foi medido por citofotometria.

Os resultados mostraram que há uma correlação positiva entre número de bandas-C, percentagem do cariótipo com bandas-C e tamanho do genoma. Com relação ao conteúdo de DNA e latitude houve uma correlação negativa, o inverso do que acontece com outras espécies, o que indica uma pressão de seleção imposta pelo homem.

Como pode ser observado, através de métodos de bandamento, pode-se estudar não só o polimorfismo cromossômico mas a existência ou não de valor seletivo da heterocromatina entre populações.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

Como dito anteriormente, o presente trabalho iniciou-se com a análise da composição de knobs de uma família de progênies S_2 e dois grupos de famílias S_3 , derivadas da variedade comercial Jac-Duro (endosperma tipo Flint) com o objetivo de se selecionarem linhagens isogênicas com diferenças em seus conteúdos de knobs. As etapas desse processo de seleção de linhagens isogênicas através de autofecundações sucessivas são apresentadas a seguir para ilustração. A **Tabela 1** apresenta a composição de bandas-C das linhagens S_2 e S_3 e pode-se observar que as linhagens S_3 da família 240-14-1, segregavam para duas posições de knobs: K3L e K9S; as da família 240-14-2 para um loco: K9S; e as linhagens S_2 da família 240-14-4, para os quatro locos: K2L, K3L, K7S e K9S. Todas elas eram homozigóticas para presença de knobs em K6L ($K6L_1$ e $K6L_2$), K7L e K8L.

Tabela 1. Composição de bandas-C, correspondentes aos knobs knobs, de linhagens S_2 e S_3 derivadas da variedade comercial Jac-Duro.

Materiais	Composição de bandas-C **											
	K2L			K3L			K6L			K7S		
	++	+0	00	++	+0	00	++	+0	00	++	+0	00
240-14-1			21	4	15	2	21			21		
240-14-2			15	15			15			15	15	
240-14-4*	1	5	2	4	4		10			8	2	10

*A análise está incompleta para duas plantas para os locos: K2L e K3L

**

++: par cromossômico homozigótico para presença de knobs;

+0: par cromossômico heterozigótico para knobs;

00: par cromossômico homozigótico para ausência de knobs.

A partir dessas progênies foram obtidas linhagens S_4 e S_5 , derivadas de dois ciclos de autofecundação que passaram a receber a denominação de 300-14-1-3 (S_5), 301-14-2-1 (S_5), 303-14-4-1 (S_4) e 303-14-4-4 (S_4). Esta designação foi abreviada para 1-3, 2-1, 4-1 e 4-4, para simplificação. As Tabelas 5, 7, 8 e 10, na seção de resultados, apresentam a designação e a composição de bandas-C das linhagens S_4 , S_5 , S_6 , S_7 , S_8 e S_9 analisadas no decorrer deste processo.

Conforme descrito anteriormente, o objetivo deste trabalho foi verificar a ocorrência ou não da transmissão preferencial de cromossomos com knobs durante a megasporogênese ou pelo grão de pólen. Para o estudo desses aspectos, o experimento foi delineado de maneira a se analisar a frequência de bandas-C de progênies F_2 e de retrocruzamento (RC).

Para isso, durante o processo de seleção de linhagens, foram obtidos híbridos (F_1) heterozigóticos para dois, três e quatro locos, a partir de linhagens homozigóticas das famílias 1-3-1, 2-1-1 e 4-4-4, relacionadas na Tabela 2. Esses híbridos foram então usados para a produção de progênies F_2 e RC e as progênies analisadas estão apresentadas nas Tabelas 3 e 4 e são descritas a seguir:

Progênies F_2 : derivadas de híbridos (F_1), obtidos do cruzamento entre linhagens homozigóticas previamente selecionadas, ou seja, dois grupos de linhagens S_7 : 300-14-1-3 e 301-14-2-1, que em S_5 já se apresentavam

homozigóticas e diferiam quanto à composição de knobs para as posições K3L e K7S. As progênes F_2 analisadas estão na **tabela 5**, e foram obtidas a partir da autofecundação desse material F_1 , no ano agrícola de 1989. A análise dessas progênes foi realizada para verificar principalmente a ocorrência ou não de segregação preferencial dos não homólogos com knobs, na meiose feminina.

Progênes de retrocruzamento: as progênes RC analisadas são apresentadas na **tabela 6a**. Para a realização do estudo, dois tipos de progênes RC foram necessárias: um primeiro, onde o híbrido foi usado como doador de pólen. A análise destas progênes foi realizada para verificar a ocorrência ou não de seleção gamética, via diferentes capacidades de competição de grãos de pólen com diferentes composições de knobs. O segundo tipo os híbridos foram os parentais femininos e a análise dessas progênes foi feita para o estudo da segregação preferencial dos cromossomos não homólogos na meiose feminina. Além disso foram separadas em grupos, de acordo com o número de locos segregando. A maior parte dos materiais estudados segregava para dois locos e foi derivado do cruzamento entre as famílias 300-14-1-3 e 301-14-2-1, e a respectiva linhagem parental da família 301-14-2-1. Essas progênes pertencem ao grupo 1 (Tabela 4b) e analisou-se um total de 14 progênes, demonimadas como: RC-1, RC-2, RC-3, RC-4, RC-5, RC-6, RC-7, RC-8, RC-9, RC-10, RC-11, RC-12, RC-13 e RC-14,

sendo que, para as progênies RC-1 a RC-11 o híbrido foi usado como parental doador de pólen, e nas demais como o parental feminino. Pode-se observar que esses materiais são semelhantes, pois foram usadas linhagens irmãs nos diferentes cruzamentos, sendo no entanto, possível pequenas diferenças gênicas entre eles.

Em seguida, foram analisadas também progênies segregando para três e quatro locos. Para se obterem progênies segregando para três locos (grupo 2) foram utilizados híbridos entre linhagens homozigóticas das famílias 301-14-2-1 e 303-14-4-4-4/3, que diferem quanto à composição de knobs para as posições: K2L, K3L e K9S (tabela 4). Foram analisadas três progênies, denominadas: RC-A, RC-B e RC-C, onde em RC-A o híbrido foi o parental feminino e, em RC-B e RC-C o parental masculino.

Para a produção de híbridos heterozigóticos para quatro knobs foram feitos cruzamentos entre linhagens das famílias 301-14-2-1 e 303-14-4-4-4/5, que diferem para os locos: K2L, K3L, K7S e K9S, ou seja, todos os locos em estudo na população. Esses híbridos foram usados para obtenção de progênies RC do grupo 3 e foi analisada uma progênie, denominada RC-D, onde o híbrido foi o doador de pólen.

Essas progênies RC, assim como os híbridos, foram obtidos no campo experimental do Departamento de Genética, ESALQ/USP, Piracicaba, nos anos agrícolas de 1990 e 1991.

Tabela 2. Híbridos obtidos para produção de progênes RC

Linhagens parentais	Genótipos			
	K2L	K3L	K7S	K9S
Linhagens S ₇				
300-14-1-3-1-1/1	00	00	++	++
300-14-1-3-2-1/1	00	00	++	++
300-14-1-3-1-3/2	00	00	++	++
300-14-1-3-1-4/2	00	00	++	++
300-14-1-3-1-4/3	00	00	++	++
301-14-2-1-1-1/3	00	++	00	++
301-14-2-1-1-4/1	00	++	00	++
301-14-2-1-2-4/1	00	++	00	++
301-14-2-1-2-4/2	00	++	00	++
301-14-2-1-3-1/1	00	++	00	++
301-14-2-1-3-3/1	00	++	00	++
301-14-2-1-3-4/2	00	++	00	++
Linhagens S ₅				
303-14-4-4-4/3	++	00	00	00
303-14-4-4-4/5	++	00	++	00
Híbridos				
(1-3-1-1/1 87 x 2-1-1-1/3 87)*	00	+0	+0	++
(1-3-2-1/1 87 x 2-1-2-4/1 87)	00	+0	+0	++
(1-3-2-1/1 87 x 2-1-3-3/1 87)	00	+0	+0	++
(2-1-2-4/2 87 x 1-3-1-3/2 87)	00	+0	+0	++
(2-1-3-1/1 87 x 1-3-1-4/2 87)	00	+0	+0	++
(2-1-3-3/1 87 x 1-3-1-4/3 87)	00	+0	+0	++
(2-1-1-4/1 87 x 4-4-4/3 86)	+0	+0	00	+0
(2-1-3-4/2 87 x 4-4-4/3 86)	+0	+0	00	+0
(2-1-3-4/2 87 x 4-4-4/5 86)	+0	+0	+0	+0

*Os números 86 e 87 representam o ano de obtenção das linhagens.

Tabela 3. Híbridos cujas progênes F_2 foram analisadas.

material	locos segregando	tam. da amostra (n° de sementes)
(1-3-1-1/1 87 x 2-1-1-1/3 87)	K3L, K7S	102
(2-1-2-4/1 87 x 1-3-1-3/2 87)	K3L, K7S	101

Tabela 4a. Designação das progênes RC analisadas.

material	designação
[2-1-1-5/1# 88 x (2-1-2-4/1 x 1-3-1-3/2)88]	RC-1
[2-1-1-5/1# 88 x (1-3-2-1/1 x 2-1-2-4/1)88]	RC-2
[2-1-2-4/2# 88 x (2-1-2-4/2 x 1-3-1-3/2)88]/1	RC-3
[2-1-2-4/3# 88 x (1-3-2-1/1 x 2-1-2-4/1)88]	RC-4
[2-1-3-3/1# 88 x (2-1-3-3/1 x 1-3-1-4/3)88]	RC-5
[2-1-1-4/4# 88 x (1-3-2-1/1 x 2-1-2-4/1)88]	RC-6
[2-1-1-4/4# 88 x (1-3-1-1/1 x 2-1-1-1/3)88]	RC-7
[2-1-2-4/2# 88 x (2-1-2-4/2 x 1-3-1-3/2)88]/2	RC-8
[2-1-3-1/1# 88 x (2-1-3-1/1 x 1-3-1-4/2)88]	RC-9
[2-1-3-3/1# 88 x (2-1-3-3/1 x 1-3-1-4/3)88]	RC-10
[2-1-3-3/1# 88 x (1-3-2-1/1 x 2-1-3-3/1)88]	RC-11
[(1-3-2-1/1 x 2-1-2-4/1)88 x 2-1-2-4/2# 88]	RC-12
[(1-3-2-1/1 x 2-1-3-3/1)88 x 2-1-3-3/1# 88]	RC-13
[(2-1-3-3/1 x 1-3-1-4/3)88 x 2-1-3-3/1# 88]	RC-14
[(2-1-3-4/2 x 4-4-4/3)88 x 2-1-3-4/2# 88]	RC-A
[2-1-1-4-2/2 88/89 x (2-1-1-4/1 x 4-4-4/3)89]	RC-B
[2-1-1-2-1/1 88/89 x (2-1-3-4/2 x 4-4-4/3)89]	RC-C
[2-1-2-4-3-1/1 90/91 x (2-1-3-4/2 x 4-4-4/5)89]	RC-D

Tabela 4b. Locos segregando e tamanho de amostra das progênies RC

materialais (designação)	grupo	locos segregando	tam. da amostra (n ^o de plantas)
RC-1	1	K3L, K7S	99
RC-2	1	K3L, K7S	100
RC-3	1	K3L, K7S	103
RC-4	1	K3L, K7S	100
RC-4	1	K3L, K7S	100
RC-5	1	K3L, K7S	101
RC-6	1	K3L, K7S	33
RC-7	1	K3L, K7S	32
RC-8	1	K3L, K7S	27
RC-9	1	K3L, K7S	33
RC-10	1	K3L, K7S	21
RC-11	1	K3L, K7S	22
RC-12	1	K3L, K7S	21
RC-13	1	K3L, K7S	20
RC-14	1	K3L, K7S	52
RC-A	2	K2L, K3L, K9S	45
RC-B	2	K2L, K3L, K9S	36
RC-C	2	K2L, K3L, K9S	41
RC-D	3	K2L, K3L, K7S, K9S	70

3.2. Métodos

A análise da composição de knobs das referidas linhagens e progênies F_2 e RC foi realizada através da observação de metáfases mitóticas dos materiais coradas pelo método de bandamento-C. Para isso, foram seguidos os procedimentos descritos a seguir.

3.2.1. Metodologia de Bandamento-C

A metodologia de bandamento-C utilizada foi a descrita por AGUIAR-PERECIN (1985a) com algumas modificações.

Inicialmente as sementes foram colocadas para germinar em *Sphagnum* em banho-maria a 28°C. Após dois dias, em média, as raízes apresentavam de 2 a 3 cm. de comprimento e foram coletadas em Hidroxiquinolina 0,03% (0,002M), permanecendo de duas horas e meia a três nesta solução.

Após o pré-tratamento, as raízes foram transferidas para fixador Carnoy (3partes de álcool etílico : 1 parte de ácido acético) e depois de 12 horas em temperatura ambiente, foram transferidas para geladeira.

Após 48 horas de fixação, as raízes foram retiradas da geladeira, e depois de atingirem temperatura ambiente, maceradas por cerca de cinco minutos em ácido acético 45%. O esmagamento também foi realizado em ácido acético 45% e as lâminas obtidas, observadas em microscópio de contraste

de fase. As lâminas que apresentaram um bom número de metáfases foram guardadas em álcool absoluto, em geladeira, para posteriormente serem coradas.

Para a coloração, lâminas e lamínulas foram retiradas do álcool e secas ao ar, para em seguida serem incubadas em solução saturada de hidróxido de bário, a 37°C por 25 minutos. O material foi então lavado duas vezes em água desmineralizada e transferido para solução salina 2xSSC fria (cloreto de sódio 0,3M mais citrato de sódio 0,03M) por cinco minutos, e em seguida para a mesma solução à 60°C, onde permaneceu por 60 minutos. Após esse tempo, as lâminas foram novamente lavadas em água desmineralizada, imersas em álcool 70%, 95% e absoluto e secas ao ar.

A coloração foi feita com solução Giemsa 1%, preparada a partir de solução estoque R66 em solução tampão pH 6,8, pelo tempo de três minutos, e depois de lavadas e secas, lâmina e lamínula foram montadas em bálsamo do Canadá.

3.3. Análise do material

3.3.1. Análise de bandas-C em metáfases mitóticas

Após a preparação e coloração das lâminas, foram selecionadas as metáfases, onde foram identificados os cromossomos e as posições das bandas, e os resultados anotados.

As melhores metáfases foram fotografadas para montagem de cariótipos, com o uso do fotomicroscópio Zeiss, empregando-se objetiva de imersão 100x, fator de projetiva 3,2x e optovar 1,25x. Os filmes utilizados foram o IMAGE CAPTURE (Kodak) e Agfa COPEXPAN A.H.U. TRI 13.

3.3.2. Análise estatística

As frequências de bandas-C das progênies F_2 e RC foram analisadas para se avaliar se correspondiam às esperadas segundo a herança mendeliana. Para isso, foram realizados, para cada progênie, testes de χ^2 para segregação de cada loco individual, teste de independência e teste de χ^2 para segregação independente dos cromossomos não homólogos que transportam os knobs estudados. Foram realizados também testes de heterogeneidade para comparar as progênies RC, dentro de cada grupo.

4. RESULTADOS

4.1. Constituição de bandas-C, correspondente aos knobs, nas progênies S_5 , S_6 , S_7 , S_8 e S_9 , para seleção de linhagens isogênicas

Conforme mencionado anteriormente, são apresentados a seguir, os resultados de todas as etapas do processo de obtenção e seleção de linhagens isogênicas, de onde foram extraídas as linhagens homozigóticas utilizadas no presente trabalho. As progênies analisadas foram divididas em grupos, de acordo com sua genealogia.

A Tabela 5, apresenta a frequência de bandas-C das progênies S_5 , S_6 , S_7 , S_8 e S_9 da família 300-14-1-3, derivadas de 240-14-1 (S_3) que segregava para dois locos: K3L e K9S.

Tabela 5. Frequência de genótipos na família 300-14-1-3, em progênies S_5 , S_6 , S_7 , S_8 e S_9 .

material	composição de knobs											
	K2L			K3L			K7S			K9S		
	++	+0	00	++	+0	00	++	+0	00	++	+0	00
240-14-1			21	2	15	4	21			5	12	4
Progênies S_5												
300-14-1-3/1			6			6	6			6		
300-14-1-3/2			4			4	4			4		
300-14-1-3/3			5		3	2	5			5		
Progênies S_6												
1-3-1/1			4			4	4			4		
1-3-1/2			5			5	5			5		
1-3-1/3			5			5	5			5		
1-3-1/4			6			6	6			6		
1-3-1/5			5			6	5			5		
1-3-2/2			5			5	5			5		
1-3-2/3			2			2	2			2		
1-3-2/4			4			4	4			4		
1-3-3/2			5			5	5					5
1-3-3/3			4		2	2	4					4
1-3-3/4			5		3	2	5					5
1-3-3/5			2			2	2					2
1-3-3/7			3	3			3					3
Progênies S_7												
1-3-3-4/1			8	1	2	5	8					8
1-3-3-4/2			3		1	2	3					3
1-3-3-4/3			4	2		2	4					4
1-3-3-4/4			3	2	1		3					3
Progênies S_8												
1-3-3-2-2/1			7			7	7					7
1-3-3-2-3/1			5			5	5					5
1-3-3-3-3/1			5	5			5					5
1-3-3-4-2/2			7	7			7					7
1-3-3-4-2/3			2		2		2					2
1-3-3-4-2/5			6	1	4	1	6					6
1-3-3-4-2/7			8			8	8					8
1-3-3-5-1/2			6			6	6					6

continua

continuação da Tabela 5.

material	composição de knobs											
	K2L			K3L			K7S			K9S		
	++	+0	00	++	+0	00	++	+0	00	++	+0	00
Progenies S ₉												
1-3-3-1-1-2/1			8			8			8			8
1-3-3-1-1-2/2			9			9			9			9
1-3-3-1-1-2/3			7			7			7			7
1-3-3-1-3-1/1			8	2	4	2			8			8
1-3-3-1-3-1/2			4	2	2				4			4
1-3-3-1-3-1/3			6	6					6			6
1-3-3-1-3-1/4			6		6				6			6
1-3-3-1-3-2/1			6			6			6			6
1-3-3-2-1-3/1			5			5			5			5
1-3-3-2-1-3/2			8			8			8			8

Pode-se observar através dos resultados que em S_5 foi possível selecionar progênies homozigóticas em dois grupos: 1-3-1 e 1-3-2, mas um terceiro continuava segregando: 1-3-3. A análise de progênies S_6 confirmou esses resultados e a partir disso, foram analisadas progênies S_7 , S_8 e S_9 pertencentes ao grupo 1-3-3, onde algumas progênies continuavam segregando. É interessante notar que quatro progênies S_7 1-3-3/4, escolhidas ao acaso entre 15 plantas, continuavam segregando para o loco K3L. A análise de linhagens S_8 e S_9 deste grupo, 1-3-3, confirmou a homozigose de alguns subgrupos, mas mostrou que outros continuavam segregando. O número de progênies segregando e não segregando, na amostra estudada, para os diferentes graus de endogamia, na família 300-14-1-3 é apresentado na **Tabela 6**.

A **Tabela 7** apresenta a composição de bandas-C das progênies S_5 e S_6 da família 301-14-2-1, derivadas de 240-14-2 (S_3), que segregava para o loco K9S. Foram analisadas três progênies S_5 que se apresentaram homozigóticas para o loco em questão, resultado que foi confirmado pela análise de 14 progênies S_6 .

Tabela 6. Número de progênies segregantes para diferentes números de locos na família 300-14-1-3.

Progênies (grau de endogamia)	número de locos					Total de progênies
	0	1	2	3	4	
S_3			1			1
S_5	2	1				3
S_6						
grupo 1-3-1	5					5
grupo 1-3-2	3					3
grupo 1-3-3	3	2				5
S_7						
grupo 1-3-3-4		4				4
S_8						
grupo 1-3-3-2-2	1					1
grupo 1-3-3-2-3	1					1
grupo 1-3-3-3-3	1					1
grupo 1-3-3-4-2	2	2				4
grupo 1-3-3-5-1	1					1
S_9						
grupo 1-3-3-1-1-2	3					3
grupo 1-3-3-1-3-1	1	3				4
grupo 1-3-3-1-3-2	1					1
grupo 1-3-3-2-1-3	2					2

Tabela 7. Frequência de genótipos na família 301-14-2-1,
nas progênies S_5 e S_6 .

material	composição de knobs											
	K2L			K3L			K7S			K9S		
	++	+0	00	++	+0	00	++	+0	00	++	+0	00
240-14-2(S_3)			15			15			15			15
Progênies S_5												
301-14-2-1/1			4			4			4			4
301-14-2-1/2			5			5			5			5
301-14-2-1/3			5			5			5			5
Progênies S_6												
2-1-1/1			2			2			2			2
2-1-1/2			5			5			5			5
2-1-1/3			5			5			5			5
2-1-1/4			5			5			5			5
2-1-1/5			5			5			5			5
2-1-2/1			3			3			3			3
2-1-2/2			3			3			3			3
2-1-2/3			5			5			5			5
2-1-2/4			4			4			4			4
2-1-2/5			5			5			5			5
2-1-3/1			4			4			4			4
2-1-3/3			5			5			5			5
2-1-3/4			5			5			5			5
2-1-3/5			3			3			3			3

A Tabela 8 mostra a composição de knobs das progênies S_4 , S_5 e S_6 da família 303-14-4-1, derivadas de 240-14-4 (S_2) que segregava para os quatro locos em estudo. Foram analisadas duas progênies S_4 : 303-14-4-1/1, que segregou para dois locos: K3L e K9S; e 303-14-4-1/2, que segregou para um loco: K9S.

As progênies S_5 e S_6 foram divididas em grupos, a partir de S_4 .

Para o grupo 4-1-1 (derivado de 303-14-4-1/1), os resultados mostram que as progênies S_5 continuavam segregando e somente em S_6 foi possível selecionar linhagens homozigóticas. Entretanto havia algumas progênies segregando.

Para o grupo 4-1-2 (derivado de 303-14-4-1/2), foram analisadas três progênies S_5 , sendo que todas estavam segregando, e uma delas para os locos: K2L, K3L e K9S. No entanto, pode-se verificar que a análise de linhagens S_4 não apresentou segregação para K2L e K7S. Isto indica que a amostra em S_4 foi pequena e não representativa para o grupo, considerando-se sobretudo que essas progênies eram derivadas de S_2 que segregavam para quatro locos. A análise de S_6 apresentou seis progênies aparentemente homozigóticas e uma segregando para o loco K2L. Para termos certeza desse resultado, um número maior de progênies precisa ser verificado, bem como progênies S_7 e S_8 , o que deverá ser realizado no futuro. Este tipo de análise foi feito para

família 4-4, como é mostrado a seguir.

Para o grupo 4-1-3 (derivado de 303-14-4-1/3, que não foi analisado), os resultados mostram três progênies S_5 segregando e uma aparentemente homozigótica.

O número de progênies segregando para diferentes números de locos, na família 303-14-4-1, está apresentado na **Tabela 9**.

A **Tabela 10** apresenta a frequência de bandas-C de progênies S_4 , S_5 , S_6 , S_7 e S_8 da família 303-14-4-4, derivada de 240-14-4 (S_2) que segregava para os quatro locos em estudo na população.

Foram analisadas quatro progênies S_4 , sendo que duas delas: 303-14-4-4/1 e 303-14-4-4/2 apresentaram segregação para os quatro locos, e as outras duas: 303-14-4-4/4 e 303-14-4-4/6, apenas para K7S e K9S, embora a amostra tenha sido pequena.

A partir disso, as progênies foram divididas em grupos. Para o grupo 4-4-1 (derivado de 303-14-4-4/1), foram analisadas 5 progênies S_5 e todas elas segregaram para pelo menos um loco. A análise de S_6 apresentou progênies homozigóticas, principalmente as derivadas de S_5 que segregavam somente para um loco, mas ainda houve progênies segregando. Os resultados da análise de progênies S_8 mostrou progênies homozigóticas, a maioria derivadas de S_6 homozigóticas, e também progênies segregando.

Para o grupo 4-4-2 (derivado de 303-14-4-4/2), foram

analisados dois grupos de linhagens S_5 , sendo que um deles apresentou segregação para os quatro locos, embora isto não tenha sido detectado em linhagens S_4 . A análise de 11 progênies S_6 apresentou somente quatro homozigóticas. A análise de 15 progênies S_8 , derivadas de S_6 que segregavam, apresentou algumas progênies ainda segregando.

Para o grupo 4-4-4 (derivado de 303-14-4-4/4), foram analisadas cinco progênies S_5 , onde três eram homozigóticas e duas estavam segregando. A análise de quatro S_6 , mostrou que as derivadas de S_5 segregando não chegaram a homozigose. Todas as progênies S_7 analisadas apresentaram-se homozigóticas.

Para o grupo 4-4-6 (derivado de 303-14-4-4/6), foram verificadas apenas progênies S_6 e S_8 , sendo que em S_6 algumas segregavam para pelo menos um loco e em S_8 todas apresentaram-se homozigóticas.

O número de progênies segregando, para diferentes locos, na família 303-14-4-4, é apresentado na **tabela 11**.

Pode-se observar que esta família foi a que teve o maior número de progênies analisadas. Deste modo foi possível obter grupos isogênicos nas etapas de S_6 e S_8 , e somente um contraste foi obtido: grupo 4-4-2, progênies S_8 : 4-4-2-2-1-3/1 e 4-4-2-2-1-3/2, que diferem para o loco K3L.

Tabela 8. Frequência de genótipos na família 303-14-4-1,
nas progênies S_4 , S_5 e S_6 .

material	composição de knobs								
	K2L			K3L			K7S		
	++	+0	00	++	+0	00	++	+0	00
240-14-4(S_2)	1	5	2	4	4		8	2	
Progênies S_4									
303-14-4-1/1	4				1	3		4	
303-14-4-1/2	4			2	1	1		4	
Grupo 4-1-1									
Progênies S_5									
4-1-1/2	7			7			7	6	1
4-1-1/3	5			5			5	1	3
Progênies S_6									
4-1-1-1/2	5				5		5	2	2
4-1-1-1/3	5					5	5		5
4-1-1-2/1	4			4			4	4	
4-1-1-2/2	6			6			6	6	
4-1-1-2/3	10			10			10	10	
4-1-1-3/1	8			8			8	1	4
4-1-1-3/2	3			3			3	2	1
Grupo 4-1-2									
Progênies S_5									
4-1-2/2	3	1	1	5			5	5	
4-1-2/3	3	2		5			5	3	2
4-1-2/4	3	1		2	1	1	4	3	1
Progênies S_6									
4-1-2-3/2	5			5			5	5	
4-1-2-3/3	5			5			5	5	
4-1-2-3/4	3	2		5			5	5	
4-1-2-3/5	4			4			4	4	
4-1-2-4/1	5				5		5	5	
4-1-2-4/2	7				7		7	7	
4-1-2-4/3	5				5		5	5	

continua

Tabela 9. Número de progênies segregantes para diferentes números de locos na família 303-14-4-1.

Progênies (grau de endogamia)	número de locos					Total de progênies
	0	1	2	3	4	
S_2					1	1
S_4		1	1			2
S_5						
grupo 4-1-1		2				2
grupo 4-1-2	1	1	1			3
grupo 4-1-3	1	1	2			4
S_6						
grupo 4-1-1-1	1	1				2
grupo 4-1-1-2	3					3
grupo 4-1-1-3		2				2
grupo 4-1-2-3	3	1				4
grupo 4-1-2-4	3					3

Tabela 10. Frequência de genótipos na família 303-14-4-4, nas progênies S_4, S_5, S_6, S_7 e S_8 .

material	composição de knobs								
	K2L			K3L			K7S		
	++	+0	00	++	+0	00	++	+0	00
240-14-4(S_2)	1	5	2	4	4		8	2	
Progênies S_4									
303-14-4-4/1	9		1	6	3	1	5	4	1
303-14-4-4/2	4	1	2	6	1		4		3
303-14-4-4/3	3					3	1	2	
303-14-4-4/6	5					5	1	2	2
Grupo 4-4-1									
Progênies S_5									
4-4-1/1	2	1		3			3		
4-4-1/2	6			6				4	2
4-4-1/3	5			5			2	2	1
4-4-1/4	6	1		7			2	4	1
4-4-1/5	3			3				2	1
Progênies S_6									
4-4-1-1/1	7			7			7		
4-4-1-1/2	7			7			7		
4-4-1-1/3	7			7			7		
4-4-1-2/1	4			4			2	1	1
4-4-1-3/1	3			3			2		1
4-4-1-3/2	4			4			2	1	1
4-4-1-3/3	6			6					6
4-4-1-3/4	4			4					4
4-4-1-3/5	4			4				3	1
4-4-1-4/3	4			4				2	2
4-4-1-4/4	5			5			1	4	
4-4-1-5/1	1			1				1	
4-4-1-5/2	3			3			2	1	

continua

continuação da Tabela 10.

material	composição de knobs											
	K2L			K3L			K7S			K9S		
	++	+0	00	++	+0	00	++	+0	00	++	+0	00
Progenies S ₈												
4-4-1-1-3-1/2	2			2			2			2		
4-4-1-1-3-2/1	4			4			4			4		
4-4-1-1-3-2/2	2			2			2			2		
4-4-1-1-3-3/1	2			2			2			2		
4-4-1-1-5-2/1	6			6			6			6		
4-4-1-1-5-2/2	6			6			6			6		
4-4-1-1-5-4/2	1			1			1			1		
4-4-1-3-1-1/1	8			8			5	2	1	8		
4-4-1-3-1-1/2	5			5			2	3	1	5		
4-4-1-3-2-2/1	8			8			1	3	4	8		
4-4-1-3-2-2/2	11			11					11	11		
4-4-1-3-2-2/3	11			11					11	11		
4-4-1-3-2-2/5	11			11					11	11		
4-4-1-3-2-3/1	8			8			1	4	3	8		
4-4-1-3-2-3/3	9			9					9	9		
4-4-1-3-2-3/4	5			5				3	2	5		
4-4-1-3-2-4/1	8			8			8			8		
4-4-1-3-2-4/2	7			7				3	4	7		
4-4-1-3-3-1/1	7			7					7	7		
4-4-1-3-3-1/2	8			8					8	8		
4-4-1-3-3-1/3	8			8					8	8		
4-4-1-3-3-4/1	8			8					8	8		
4-4-1-3-3-4/2	8			8					8	8		
4-4-1-3-4-1/2	6			6					6	6		
4-4-1-3-4-1/3	3			3					3	3		

continua

continuação da tabela 10.

material	composição de knobs											
	K2L			K3L			K7S			K9S		
	++	+0	00	++	+0	00	++	+0	00	++	+0	00

Grupo 4-4-2												
Progênes S ₅												
4-4-2/1	5	1	1	1	3	3	6	1		1	5	1
4-4-2/2	2	1			3		1	1	1	3		
Progênes S ₆												
4-4-2-1/1	3			3			3			1	2	
4-4-2-1/2	2	1		1		2	3					3
4-4-2-1/4	5					5	5				4	1
4-4-2-2/2	4			4				2	2	4		
4-4-2-2/3	5			5			2	3		5		
4-4-2-2/4	4	2		1	4	1			6	6		
4-4-2-3/1	5			5					5			5
4-4-2-3/2	5			5					5			5
4-4-2-3/3	5			5					5			5
4-4-2-6/1	5			5			5					5
4-4-2-6/2	3					3	3			1	2	
Progênes S ₈												
4-4-2-1-4-1/2	7					7	7			7		
4-4-2-1-4-1/3	1				1		1			1		
4-4-2-1-4-2/1	6					6	6			6		
4-4-2-2-1-3/1	6			6			6			6		
4-4-2-2-1-3/2	5					5	5			5		
4-4-2-2-1-4/1	2			2			2			2		
4-4-2-2-1-4/2	7			7			7			7		
4-4-2-2-1-4/3	4			4			4			4		
4-4-2-2-4-2/1	8					8		1	7	8		
4-4-2-2-4-2/2	4					4			4	4		
4-4-2-2-4-4/1	5					5			5	5		
4-4-2-6-1-2/1	8					8	8					8
4-4-2-6-1-3/1	7			7			7					7
4-4-2-6-1-3/2	7			7			7					7
4-4-2-6-1-3/3	7			7			7					7

continua

continuação da Tabela 10.

material	composição de knobs											
	K2L			K3L			K7S			K9S		
	++	+0	00	++	+0	00	++	+0	00	++	+0	00
Grupo 4-4-4												
Progênie S ₅												
4-4-4/1	6			1	5				6	6		
4-4-4/2	6				6		6					6
4-4-4/3	3				3				3			3
4-4-4/4	4	1			5				5			5
4-4-4/5	5				5		5					5
Progênie S ₆												
4-4-4-1/1	3				3		2	1				3
4-4-4-1/3	8				8		4	4				8
4-4-4-3/1	3				3				3			3
4-4-4-3/2	6				6				6			6
Progênie S ₇												
4-4-4-3-1/1	7				7				7			7
4-4-4-3-3/1	5				5				5			5
4-4-4-3-3/2	2				2				2			2
4-4-4-5-2/1	3				3		3					3
Grupo 4-4-6												
Progênie S ₆												
4-4-6-1/1	5				5		3	2		1	2	2
4-4-6-1/2	8				8				8	3	2	3
4-4-6-1/3	4				4		2	2		4		
4-4-6-2/1	8				8				8	8		
4-4-6-2/2	13				13				13	13		
Progênie S ₈												
4-4-6-2-3-1/2	8				8				8	8		
4-4-6-2-3-1/3	3				3				3	3		
4-4-6-2-3-1/4	2				2				2	2		

Tabela 11. Número de progênies segregantes para diferentes locos na família 303-14-4-4.

Progênies (grau de endogamia)	número de locos					Total de progênies
	0	1	2	3	4	
S ₂					1	1
S ₄			2		2	4
S ₅						
grupo 4-4-1		2	2	1		5
grupo 4-4-2			1		1	2
grupo 4-4-4	3	2				5
S ₆						
grupo 4-4-1-1	3					3
grupo 4-4-1-2		1				1
grupo 4-4-1-3	2	2	1			5
grupo 4-4-1-4		2				2
grupo 4-4-1-5		1				1
grupo 4-4-2-1		3				3
grupo 4-4-2-2		2	1			3
grupo 4-4-2-3	3					3
grupo 4-4-2-6	1	1				2
grupo 4-4-4-1		2				2
grupo 4-4-4-3	2					2
grupo 4-4-6-1		2	1			3
grupo 4-4-6-2	2					2
S ₇						
grupo 4-4-4-3-1	1					1
grupo 4-4-4-3-3	2					2
grupo 4-4-4-5-2	1					1
S ₈						
grupo 4-4-1-1-3-1	1					1
grupo 4-4-1-1-3-2	2					2
grupo 4-4-1-1-3-3	1					1
grupo 4-4-1-1-5-2	2					2
grupo 4-4-1-1-5-4	1					1

continua

continuação da Tabela 11.

Progênies (grau de endogamia)	número de locos					Total de progênies
	0	1	2	3	4	
S ₈						
grupo 4-4-1-3-1-1		2				2
grupo 4-4-1-3-2-2	3	1				4
grupo 4-4-1-3-2-3	1	2				3
grupo 4-4-1-3-2-4	1	1				2
grupo 4-4-1-3-3-1	3					3
grupo 4-4-1-3-3-4	2					2
grupo 4-4-1-3-4-1	2					2
grupo 4-4-2-1-4-1	1	1				2
grupo 4-4-2-1-4-2	1					1
grupo 4-4-2-2-1-3	2					2
grupo 4-4-2-2-1-4	3					3
grupo 4-4-2-2-4-2	1	1				2
grupo 4-4-2-2-4-4	1					1
grupo 4-4-2-6-1-2	1					1
grupo 4-4-2-6-1-3	3					3
grupo 4-4-6-2-3-1	3					3

4.2. Análise da frequência de bandas-C de progênies F_2 , derivadas de heterozigoto para dois knobs.

A composição de bandas-C das progênies F_2 estudadas é apresentada na Tabela 12, sendo cada progênie representada por uma espiga, dividida em amostras do ápice e base da espiga.

Os resultados do teste de χ^2 para segregação de cada loco individual: K3L ou K7S, são apresentados na tabela 13 para a progênie F_2 derivada do híbrido (1-3-1-1/1 87 x 2-1-1-1/3 87) e na Tabela 14 para a progênie F_2 derivada do híbrido (2-1-2-4/1 87 x 1-3-1-3/2 87). Pode-se observar que os resultados foram não significativos, exceto para o loco K7S da amostra do ápice da progênie F_2 derivada de (2-1-2-4/1 87 x 1-3-1-3/2 87), que foi significativo ao nível de 5% de probabilidade. Este resultado significativo indica um desvio para a segregação monogênica do referido loco, que pode ser devido a uma transmissão preferencial pela megasporogênese ou pelo grão de pólen.

A Tabela 15 mostra os resultados do teste de independência para as duas progênies F_2 , e os resultados mostraram-se não significativos tanto para amostra do ápice como da base, indicando que não devem ter ocorrido alterações na segregação independente dos cromossomos com knobs. No caso da progênie F_2 derivada de (1-3-1-1/1 87 x 2-1-1-1/3 87), onde a segregação monogênica não apresentou

desvios, foi aplicado o teste de χ^2 para avaliar as proporções mendelianas esperadas, considerando os dois locos. Os resultados estão na **Tabela 16** e foram não significativos.

Tabela 12. Composição de knobs de duas progênies F_2 derivadas de híbridos segregando para dois locos (K3L e K7S).

material	amostra	composição de knob									
		K3L K7S ++ ++	K3L K7S ++ +0	K3L K7S ++ 00	K3L K7S +0 ++	K3L K7S +0 +0	K3L K7S +0 00	K3L K7S 00 ++	K3L K7S 00 +0	K3L K7S 00 00	
1-3-1-1/1 87	ápice	fo	8	3	5	5	9	7	4	5	4
		fe	3,125	6,25	3,125	6,25	12,5	6,25	3,125	6,25	3,125
2-1-1-1/3 87)	base	fo	5	3	4	11	15	4	3	4	3
		fe	3,25	6,5	3,25	6,5	12	6,5	3,25	6,5	3,5
(2-1-2-4/1 87	ápice	fo	4	8	2	4	20	1	4	5	2
		fe	3,125	6,25	3,125	6,25	12,5	6,25	3,125	6,25	3,125
1-3-1-3/2 87)	base	fo	2	5	4	8	15	7	0	9	1
		fe	3,187	6,375	3,187	6,375	12,75	6,375	3,187	6,375	3,187

Tabela 13. Análise da segregação de locos individuais da progênie F_2 derivada do híbrido (1-3-1-1/1 87 x 2-1-1-1/3 87).

loco	amostra	genótipo	f_o	f_e	GL	χ^2
K3L	ápice	++	16	12,5	2	1,64ns
		+0	21	25		
		00	13	12,5		
	base	++	12	13	2	1,38ns
		+0	30	26		
		00	10	13		
K7S	ápice	++	17	12,5	2	5,16ns
		+0	17	25		
		00	16	12,5		
	base	++	19	13	2	3,69ns
		+0	22	26		
		00	11	13		

Tabela 14. Análise da segregação de locos individuais da progênie F_2 derivada do híbrido (2-1-2-4/1 87 x 1-3-1-3/2 87).

loco	amostra	genótipo	f_o	f_e	GL	χ^2
K3L	ápice	++	14	12,5	2	0,36ns
		+0	25	25		
		00	11	12,5		
	base	++	11	12,75	2	1,63ns
		+0	30	25,5		
		00	10	12,75		
K7S	ápice	++	12	12,5	2	7,08*
		+0	33	25		
		00	5	12,5		
	base	++	10	12,75	2	1,12ns
		+0	29	25,5		
		00	12	12,7		

4.3. Análise da frequência de bandas-C de progênies de retrocruzamento.

4.3.1. Análise da frequência de bandas-C de progênies RC do grupo 1.

As progênies RC do grupo 1 são aquelas que apresentam segregação para dois locos : K3L e K7S e foram analisadas 14 progênies (Tabela 4b).

A Figura 1 apresenta os cariótipos dos quatro tipos de genótipos possíveis para essas progênies.

Os materiais RC-1 a RC-5 foram os primeiros analisados e foram divididos em amostras do ápice e da base da espiga e os resultados da composição de knobs estão na tabela 17.

Figura 1. Cariótipo representativo dos genótipos das progênes RC com dois locos segregando: K3L e K7S.

a) genótipo: K3L ++, K7S +o

b) genótipo: K3L ++, K7S oo

c) genótipo: K3L +o, K7S +o

d) genótipo: K3L +o, K7S oo

Todos os genótipos são homozigóticos para presença de knobs em K6L, K7L e K8L e K9S.

Tabela 17. Composição de knobs das progênies RC-1, RC-2, RC-3, RC-4 e RC-5.

		composição de knobs							
gametas do F ₁		K3L	K7S	K3L	K7S	K3L	K7S	K3L	K7S
testados		+	+	+	0	0	+	0	0
genótipo das progênies		++	+0	++	00	+0	+0	+0	00
RC-1	ápice		9		17		9		14
	base		11		12		8		19
RC-2	ápice		16		11		6		16
	base		14		16		12		9
RC-3	ápice		10		6		14		20
	base		8		30		5		10
RC-4	ápice		13		13		9		20
	base		11		9		23		8
RC-5	ápice		15		12		11		13
	base		13		15		14		8

Os resultados do teste de χ^2 para segregação dos locos individuais desses materiais estão nas Tabelas 18, 19, 20, 21 e 22, divididas em amostras do ápice e da base. Para as progênies RC-1 (Tabela 18), RC-2 (Tabela 19) e RC-5 (Tabela 22) todos os resultados foram não significativos. No entanto é interessante destacar um desvio não significativos para $0,05 < p < 0,1$ na tabela 18, ou seja, loco K7S das amostras do ápice e da base da progênie RC-1. Para os genótipos RC-3 (Tabela 20) os resultados apresentaram-se significativos para o loco K3L, ao nível de 5% de probabilidade na amostra do ápice, e 1% de probabilidade na amostra da base, sendo que para amostra do ápice houve um excesso de gametas sem o referido knob e ocorreu o inverso para a base. Quanto ao loco K7S, o resultado foi significativo ao nível de 1% de probabilidade na amostra da base, havendo um excesso de gameta sem o knob em questão. Para a progênie RC-4 (Tabela 21) o resultado foi significativo para o loco K7S da amostra da base ao nível de 5% de probabilidade, mostrando um aumento de gametas com um knob. Deste modo, pode-se observar que foram encontrados desvios em duas progênies: RC-3 e RC-4, principalmente nas amostras da base, indicando que poderia estar ocorrendo seleção gamética e que haviam diferenças entre as amostras dos dois locais da espiga, para as duas progênies.

Tabela 18. Teste de χ^2 para a segregação de locos individuais da progênie RC-1.

loco	amostra	genótipo	f _o	f _e	GL	χ^2
K3L	ápice	++	26	24,5	1	0,18ns
		+0	23	24,5		
	base	++	23	25,0	1	0,32ns
		+0	27	25,0		
K7S	ápice	+0	18	24,5	1	3,45ns
		00	31	24,5		
	base	+0	19	25,0	1	2,88ns
		00	31	25,0		

Tabela 19. Teste de χ^2 para a segregação de locos individuais da progênie RC-2.

loco	amostra	genótipo	f _o	f _e	GL	χ^2
K3L	ápice	++	27	24,5	1	0,51ns
		+0	22	24,5		
	base	++	30	25,5	1	1,59ns
		+0	21	25,5		
K7S	ápice	+0	22	24,5	1	0,51ns
		00	27	24,5		
	base	+0	26	25,5	1	0,02ns
		00	25	25,5		

Tabela 20. Teste de χ^2 para a segregação de locos individuais da progênie RC-3.

loco	amostra	genótipo	f_o	f_e	GL	χ^2
K3L	ápice	++	16	25,0	1	6,48*
		+0	34	25,0		
	base	++	38	26,5	1	9,98**
		+0	15	26,5		
K7S	ápice	+0	24	25,0	1	0,08ns
		00	26	25		
	base	+0	13	26,5	1	13,75**
		00	40	26,5		

Tabela 21. Teste de χ^2 para a segregação de locos individuais da progênie RC-4.

loco	amostra	genótipo	f_o	f_e	GL	χ^2
K3L	ápice	++	26	24,5	1	0,18ns
		+0	23	24,5		
	base	++	20	25,5	1	2,37ns
		+0	31	25,5		
K7S	ápice	+0	22	24,5	1	0,51ns
		00	27	24,5		
	base	+0	34	25,5	1	5,66*
		00	17	25,5		

Tabela 22. Teste de χ^2 para a segregação de locos individuais da progênie RC-5.

loco	amostra	genótipo	f _o	f _e	GL	χ^2
K3L	ápice	++	27	25,5	1	0,176ns
		+0	24	25,5		
	base	++	28	25,0	1	0,72ns
		+0	22	25,0		
K7S	ápice	+0	26	25,5	1	0,019ns
		00	25	25,5		
	base	+0	27	25,0	1	0,32ns
		00	23	25,0		

Para melhor comprovação desse resultado, foi aplicado o teste de heterogeneidade para amostras do ápice e da base da espiga para as cinco progênies. Os resultados são apresentados nas Tabelas 23, 24, 25, 26 e 27 e foi significativo apenas para a progênie RC-3 ao nível de 1% para o loco K3L e 5% de probabilidade para o loco K7S, e para a progênie RC-4, ao nível de 5% de probabilidade para o loco K7S. Isto confirma que há diferenças em relação a composição de knobs entre as amostras do ápice e da base da espiga nas progênies RC-3 e RC-4.

Foi também feita a comparação entre as cinco progênies, mantendo a separação entre base e ápice, e foi aplicado o teste de heterogeneidade. A Tabela 28 apresenta os resultados deste teste, que foram significativos para as amostras da base, ao nível de 5% de probabilidade para o loco K3L e 1% para K7S, indicando que as progênies são heterogêneas em relação à composição de knobs da base da espiga.

Em seguida realizou-se o teste de independência, usando a correção de continuidade ou Yates (PIMENTEL GOMES, 1976) e os resultados são apresentados nas Tabelas 29. Todos eles foram não significativos, indicando que os knobs não interferem na segregação independente dos cromossomos não homólogos.

Para as progênies RC-1, RC-2 e RC-5, que não apresentaram desvios significativos nas segregações

monogênicas , foi aplicado o teste de χ^2 para testar a proporção mendeliana esperada de 1:1:1:1, considerando os dois locos em estudo. Os resultados estão na **Tabela 30** e foram não significativos, confirmando desta forma as conclusões obtidas pelo teste de independência.

Tabela 23. Frequência de genótipos e taxa de transmissão do gameta com knob (k) para amostra do ápice e da base para a progênie RC-1.

	K3L		k	χ^2		K7S		k	χ^2
	++	+0				++	+0		
ápice	26	23	0,53	0,18ns		18	31	0,36	3,45ns
base	23	27	0,46	0,32ns		19	31	0,38	2,88ns

$$\chi^2_{\text{heterogeneidade}} = 1,19\text{ns}$$

$$GL=1$$

$$\chi^2_{\text{heterogeneidade}} = 0,17\text{ns}$$

$$GL=1$$

Tabela 24. Frequência de genótipos e taxa de transmissão do gameta com knob (k) para amostra do ápice e da base para a progênie RC-2.

	K3L		k	χ^2		K7S		k	χ^2
	++	+0				++	+0		
ápice	27	22	0,55	0,51ns		22	27	0,44	0,51ns
base	30	21	0,58	1,59ns		26	25	0,51	0,02ns

$$\chi^2_{\text{heterogeneidade}} = 0,14\text{ns}$$

$$GL=1$$

$$\chi^2_{\text{heterogeneidade}} = 0,37\text{ns}$$

$$GL=1$$

Tabela 25. Frequência de genótipos e taxa de transmissão do gameta com knob (k) para amostra do ápice e da base para a progênie RC-3.

	K3L		k	χ^2		K7S		k	χ^2
	++	+0				++	+0		
ápice	16	34	0,32	6,48*		24	26	0,48	0,08ns
base	38	15	0,71	9,98**		13	40	0,24	13,75***

$$\chi^2_{\text{heterogeneidade}} = 16,22^{**}$$

GL=1

$$\chi^2_{\text{heterogeneidade}} = 5,66^*$$

GL=1

Tabela 26. Frequência de genótipos e taxa de transmissão do gameta com knob (k) para amostra do ápice e da base para a progênie RC-4.

	K3L		k	χ^2		K7S		k	χ^2
	++	+0				++	+0		
ápice	26	23	0,53	0,18ns		22	27	0,44	0,51ns
base	20	31	0,39	2,37ns		34	17	0,66	5,66**

$$\chi^2_{\text{heterogeneidade}} = 1,19\text{ns}$$

GL=1

$$\chi^2_{\text{heterogeneidade}} = 4,73^*$$

GL=1

Tabela 27. Frequência de genótipos e taxa de transmissão do gameta com knob (k) para amostra do ápice e da base para a progênie RC-5.

	K3L		k	χ^2		K7S		k	χ^2
	++	+0				++	+0		
ápice	27	24	0,52	0,18ns		26	25	0,51	0,02ns
base	28	22	0,56	0,72ns		27	23	0,54	0,32ns

χ^2 heterogeneidade = 0,095ns

GL=1

χ^2 heterogeneidade = 0,104ns

GL=1

Tabela 28. Frequência de genótipos para amostras do ápice e da base, para as progênies RC-1, RC-2, RC-3, RC-4 e RC-5.

Amostra do ápice

	K3L		K7S	
	++	+0	+0	00
RC-1	26	23	18	31
RC-2	27	22	22	27
RC-3	16	34	24	26
RC-4	26	23	22	27
RC-5	27	24	26	25
Total	122	126	112	136

χ^2 heterogeneidade = 7,466ns

GL= 4

χ^2 heterogeneidade = 2,246ns

GL= 4

Amostra da base

	K3L		K7S	
	++	+0	+0	00
RC-1	23	27	19	31
RC-2	30	21	26	25
RC-3	38	15	13	40
RC-4	20	31	34	17
RC-5	28	22	27	23
Total	139	116	119	136

χ^2 heterogeneidade = 12,91*

GL= 4

χ^2 heterogeneidade = 21,497**

GL= 4

Tabela 29. Resultados dos testes de independência para as progênies RC-1, RC-2, RC-3, RC-4 e RC-5.

RC	χ^2	ápice GL	χ^2	base GL
RC-1	0,389ns	1	1,058ns	1
RC-2	3,8 ns	1	1,04 ns	1
RC-3	1,219ns	1	1,665ns	1
RC-4	0,226ns	1	2,971ns	1
RC-5	0,170ns	1	2,243ns	1

Tabela 30. Teste de χ^2 para avaliação das proporções esperadas pela herança mendeliana (1:1:1:1), para as progênies RC-1, RC-2 e RC-5.

material	amostra	f	K3L ++	K7S +0	K3L +0	K7S 00	K3L +0	K7S +0	K3L +0	K7S 00	χ^2
RC-1	ápice	f_o	9		17		9		14		3,816ns
		f_e	12,25		12,25		12,25		12,25		
	base	f_o	11		12		8		18		5,2ns
		f_e	12,5		12,5		12,5		12,5		
		f_o	16		11		6		16		5,612ns
		f_e	12,25		12,25		12,25		12,25		
RC-2	base	f_o	14		16		12		9		2,097ns
		f_e	12,75		12,75		12,75		12,75		
		f_o	15		12		11		13		0,68ns
		f_e	12,75		12,75		12,75		12,75		
RC-5	base	f_o	13		15		14		8		2,32ns
		f_e	12,5		12,5		12,5		12,5		

Através da análise dessas cinco progênies RC, pode-se observar que os desvios apareceram principalmente nas amostras da base, sugerindo transmissão preferencial pelo grão de pólen. Devido a este fato decidiu-se aumentar o número de amostras da base, e para isso foram avaliadas as progênies: RC-6, RC-7, RC-8, RC-9, RC-10 e RC-11. A composição de knobs dessas progênies é apresentada na **Tabela 31**, e o número de plantas analisadas para cada uma delas foi ao redor de 30. O tamanho da amostra analisada para cada progênie foi menor que as anteriores para permitir que mais progênies fossem verificadas.

Os resultados do teste de χ^2 para segregação dos locos individuais estão na **Tabela 32**. Para os materiais: RC-6, RC-7, RC-9 e RC-10 os resultados foram não significativos. Para a progênie RC-8 foi significativo para o loco K3L ao nível de 1% de probabilidade e para progênie RC-10 para o loco K7S ao nível de 5% de probabilidade. Novamente, foram encontrados desvios em duas progênies e outras duas mostraram tendências para determinados genótipos, embora não significativas (RC-7, loco K7S; e RC-9, loco K3L).

As seis progênies foram comparadas e foi aplicado o teste de heterogeneidade, cujos resultados são apresentados na **Tabela 33**. O resultado foi significativo ao nível de 5% de probabilidade para o loco K3L, indicando que as progênies são heterogêneas quanto à composição de knob para este loco.

Como para as progênies anteriores, foi realizado o teste de independência com a correção de continuidade e os resultados estão na Tabela 34 e todos foram não significativos, indicando que os knobs não afetaram a recombinação dos cromossomos não homólogos. Para melhor comprovação desse resultado foi aplicado o teste de χ^2 para testar a proporção mendeliana esperada de 1:1:1:1 nas progênies RC-6, RC-7, RC-9 e RC-11, as quais não apresentavam desvios para as segregações monogênicas. (Tabela 35). Conforme o esperado todos os resultados foram não significativos.

Considerando todas essas progênies RC analisadas, RC-1 a RC-11, pode-se observar que quatro delas apresentaram desvios significativos para as segregações monogênicas: RC-3, RC-4, RC-8 e RC-10. É importante destacar que das quatro, três possuem a mesma composição genética, RC-3, RC-4 e RC-8, pois apresentam a mesma composição de linhagens.

TABELA 31. Composição de knobs para as progênies: RC-6, RC-7 RC-8, RC-9, RC-10 e RC-11.

		composição de knobs							
gametas do F_1		K3L	K7S	K3L	K7S	K3L	K7S	K3L	K7S
testados		+	+	+	0	0	+	0	0
genótipo das progênies		K3L	K7S	K3L	K7S	K3L	K7S	K3L	K7S
		++	+0	++	00	+0	+0	+0	00
RC-6	base	12		9		4		8	
RC-7	base	11		5		10		6	
RC-8	base	10		10		2		5	
RC-9	base	5		6		11		11	
RC-10	base	8		1		7		5	
RC-11	base	7		2		8		5	

TABELA 32. Teste de χ^2 para segregação de locos individuais das progênies RC-6, RC-7, RC-8, RC-9 RC-10 e RC-11.

material	loco	genótipo	f _o	f _e	GL	χ^2
RC-6	K3L	++	21	16,5	1	2,45ns
		+0	12	16,5		
	K7S	+0	16	16,5	1	0,03ns
		00	17	16,5		
RC-7	K3L	++	16	16	1	0ns
		+0	16	16		
	K7S	+0	21	16	1	3,125ns (0,05 < p < 0,1)
		00	11	16		
RC-8	K3L	++	20	13,5	1	6,26**
		+0	12	13,5		
	K7S	+0	12	13,5	1	0,33ns
		00	15	13,5		
RC-9	K3L	++	11	16,5	1	3,67ns (0,05 < p < 0,1)
		+0	22	16,5		
	K7S	+0	16	16,5	1	0,03ns
		00	17	16,5		
RC-10	K3L	++	9	10,5	1	0,428ns
		+0	12	10,5		
	K7S	+0	15	10,5	1	3,857**
		00	6	10,5		
RC-11	K3L	++	9	11	1	0,727ns
		+0	13	11		
	K7S	+0	15	11	1	2,909ns
		00	7	11		

Tabela 33. Frequência de genótipos das progênes RC-6, RC-7, RC-8, RC-9, RC-10 e RC-11.

	K3L		k	K7S		k
	++	+o		+o	oo	
RC-6	21	12	0,63	16	17	0,48
RC-7	16	16	0,50	21	11	0,65
RC-8	20	7	0,74	12	15	0,44
RC-9	11	22	0,33	16	17	0,48
RC-10	9	12	0,42	15	6	0,71
RC-11	9	13	0,41	15	7	0,68
	86	82		95	73	

k: taxa de transmissão do gameta com knob.

χ^2 heterogeneidade = 13,44*

GL= 5

χ^2 heterogeneidade = 7,401

GL= 5

Tabela 34. Resultados dos testes de independência para progênes RC-6, RC-7, RC-8, RC-9, RC-10 e RC-11.

RC	χ^2	GL
RC-6	0,561ns	1
RC-7	0ns	1
RC-8	0,292ns	1
RC-9	0,379ns	1
RC-10	1,094ns	1
RC-11	0,115ns	1

TABELA 35. Teste de χ^2 para avaliação das proporções esperadas pela herança mendeliana (1:1:1:1), para progênes RC-6, RC-7, RC-9 e RC-10.

gametas		K3L	K7S	K3L	K7S	K3L	K7S	K3L	K7S		
testados		+	+	+	0	0	+	0	0		
material	f	K3L	K7S	K3L	K7S	K3L	K7S	K3L	K7S	GL	χ^2
		++	+0	++	00	+0	+0	+0	00		
RC-6	f _o	12		9		4		8		3	3,9ns
	f _e	8,25		8,25		8,25		8,25			
RC-7	f _o	11		5		10		6		3	3,25ns
	f _e	8		8		8		8			
RC-9	f _o	5		6		11		11		3	3,72ns
	f _e	8,25		8,25		8,25		8,25			
RC-11	f _o	7		2		8		5		3	3,818ns
	f _e	5,5		5,5		5,5		5,5			

A Tabela 36 apresenta a composição de knobs das progênies: RC-12, RC-13 e RC-14, que são progênies onde o híbrido foi utilizado como parental feminino, e foram analisadas apenas amostras da base. Como para as amostras anteriores, realizou-se o teste de χ^2 para segregação dos locos individuais (Tabela 37) e os resultados foram não significativos para a maior parte dos materiais, exceto para a progênie RC-12, loco K3L, que foi significativo ao nível de 5% de probabilidade. Este resultado significativo poderia indicar uma segregação preferencial do cromossomo 3 com knob na meiose feminina. Como a amostra para esta progênie foi pequena e este resultado não se repetiu para as demais progênies, pode-se considerar que o desvio observado foi devido a um erro de amostragem.

As progênies foram então comparadas e foi aplicado o teste de heterogeneidade, cujo resultado foi não significativo para os dois locos (Tabela 38). Isto indica que as amostras são homogêneas quanto à composição de knobs.

Como para as amostras anteriores, foi aplicado o teste de independência com correção de continuidade para verificar a segregação independente dos cromossomos não homólogos com knobs. Os resultados estão na Tabela 39 e foram não significativos para as três progênies, mostrando que os knobs não afetam recombinação dos cromossomos não homólogos. Confirmando este resultado, a Tabela 40

apresenta os resultados do teste de χ^2 para avaliar a proporção mendeliana esperada de 1:1:1:1 nas progênies RC-13 e RC-14, as quais não apresentavam desvios nas segregações monogênicas.

TABELA 36. Composição de knobs das progênies RC-12, RC-13, RC-14.

material	composição de knobs								número de plantas
	K3L ++	K7S +0	K3L ++	K7S 00	K3L +0	K7S +0	K3L +0	K7S 00	
RC-12	7		8		2		4		21
RC-13	6		5		4		5		20
RC-14	9		13		14		16		52

TABELA 37. Teste de χ^2 para segregação de locos individuais para progênies RC-12, RC-13 e RC-14.

material	loco	genótipo	f_o	f_e	GL	χ^2
RC-12	K3L	++	15	10,5	1	3,86*
		+0	6	10,5		
	K7S	+0	9	10,5	1	0,423ns
		00	12	10,5		
RC-13	K3L	++	11	10	1	0,2ns
		+0	9	10		
	K7S	+0	10	10	1	0ns
		00	10	10		
RC-14	K3L	++	22	26	1	1,23ns
		+0	30	26		
	K7S	+0	23	26	1	0,692ns
		00	29	26		

Tabela 38. Frequência de genótipos e taxa de transmissão do gameta com knob (k) para as progênies RC-12, RC-13 e RC-14.

	K3L		k	K7S		k
	++	+0		+0	00	
RC-12	15	6	0,71	9	12	0,43
RC-13	11	9	0,55	10	10	0,50
RC-14	22	30	0,42	23	29	0,44
$\chi^2_{\text{heterogeneidade}} = 5,194\text{ns}$				$\chi^2_{\text{heterogeneidade}} = 0,253\text{ns}$		
GL = 2				GL		

Tabela 39. Resultados dos testes de independência para progênies RC-12, RC-13 e RC-14.

RC	χ^2	GL
RC-12	0,002ns	1
RC-13	0ns	1
RC-14	0,484ns	1

Tabela 40. Teste de χ^2 para avaliação das proporções esperadas pela herança mendeliana (1:1:1:1), para progênies RC-13 e RC-14.

material	f	K3L	K7S	K3L	K7S	K3L	K7S	K3L	K7S	GL	χ^2
		++	+0	++	00	+0	+0	+0	00		
RC-13	f _o	6		5		4		5		3	0,4ns
	f _e	5		5		5		5			
RC-14	f _o	9		13		14		16		3	2,0ns
	f _e	13		13		13		13			

4.3.2. Análise da frequência de bandas-C de progênie RC do grupo dois.

As progênie RC do grupo dois são aquelas que apresentam segregação para três locos em estudo na população: K2L, K3L e K9S, pois são oriundas do cruzamento entre uma linhagem do grupo 301-14-2-1 e o híbrido (301-14-2-1 x 303-14-4-4-4/3). A Figura 2 apresenta os cariótipos dos oito genótipos possíveis para as referidas progênie.

Figura 2. Cariótipo representativo dos genótipos de progênie RC com três locos segregando: K2L, K3L e K9S.

a) genótipo: K2L +o, K3L ++, K9S ++

b) genótipo: K2L +o, K3L ++, K9S +o

c) genótipo: K2L +o, K3L +o, K9S ++

d) genótipo: K2L +o, K3L +o, K9S +o

e) genótipo: K2L oo, K3L ++, K9S ++

f) genótipo: K2L oo, K3L ++, K9S +o

g) genótipo: K2L oo, K3L +o, K9S ++

h) genótipo: K2L oo, K3L +o, K9S +o

Todos os genótipos são homozigóticos para presença de knobs em K6L, K7L e K8L.

Figura 2

A Tabela 41 apresenta a composição de knobs dos três materiais analisados: RC-A, RC-B e RC-C, onde em RC-A o híbrido foi utilizado como parental feminino e em RC-B e RC-C, o híbrido foi o doador de pólen. Foram analisadas em média 40 plantas para cada material, sendo as amostra da base da espiga.

Os resultados do Teste de χ^2 para segregação dos locos individuais são apresentados nas Tabelas 42, 43 e 44. Pode-se observar que os resultados foram não significativos para as três progênies.

Em seguida foi realizado o teste de independência para as três progênies (Tabela 45) e os resultados foram não significativos para todas elas, indicando que não houve alteração na segregação independente dos cromossomos não homólogos. Isto foi confirmado pelos resultados não significativos do teste de χ^2 para avaliação das proporções esperadas segundo a herança mendeliana, considerando os três locos (Tabelas 46 e 47).

TABELA 43. Teste de χ^2 para segregação de locos individuais da progênie RC-B.

material	loco	genótipo	f_o	f_e	k	GL	χ^2
RC-B	K2L	+0	18	18	0,50	1	0ns
		00	18	18			
	K3L	++	19	18	0,52	1	0,11ns
		+0	17	18			
	K9S	++	22	18	0,61	1	1,77ns
		+0	14	18			

TABELA 44. Teste de χ^2 para segregação de locos individuais da progênie RC-C.

material	loco	genótipo	f_o	f_e	k	GL	χ^2
RC-C	K2L	+0	20	20,5	0,48	1	0,024ns
		00	21	20,5			
	K3L	++	17	20,5	0,41	1	1,19ns
		+0	24	20,5			
	K9S	++	21	20,5	0,51	1	0,024ns
		+0	20	20,5			

Tabela 45. Resultados do teste de independência para as progênies RC-A, RC-B e RC-C.

RC	χ^2	GL
RC-A	2,305ns	3
RC-B	1,409ns	3
RC-C	3,204ns	3

4.3.3. Análise da frequência de bandas-C da progênie do grupo três.

As progênies do grupo três são aquelas que apresentam segregação para os quatro locos em estudo na população: K2L, K3L, K7S e K9S, e são derivadas do cruzamento entre uma linhagem do grupo 301-14-2-1-1 e o híbrido (301-14-2-1 x 303-14-4-4-4/5). A Figura 3 apresenta os 16 genótipos possíveis para essas progênies. Foi analisada uma espiga: RC-D, onde o híbrido foi o doador de pólen. A composição de knobs é apresentada na Tabela 48, e foram analisadas 70 sementes da base da espiga.

Os resultados dos testes de χ^2 para segregação dos locos individuais estão na Tabela 49, e todos foram não significativo. A Tabela 50 apresenta os resultados do teste de χ^2 para avaliação das proporções esperadas pela herança mendeliana considerando os quatro locos. Os resultados também foram não significativos, assim como o resultado do teste de independência ($\chi^2 = 6,82ns$, GL= 9), indicando não haver transmissão preferencial de cromossomos com knobs pelo grão de pólen.

Figura 3. Cariótipos representativos dos genótipos das progênies RC com quatro locos segregando: K2L, K3L, K7S e K9S.

- a) genótipo: K2L +o, K3L ++, K7S +o, K9S ++
- b) genótipo: K2L +o, K3L ++, K7S +o, K9S +o
- c) genótipo: K2L +o, K3L ++, K7S oo, K9S ++
- d) genótipo: K2L +o, K3L ++, K7S oo, K9S +o
- e) genótipo: K2L +o, K3L +o, K7S +o, K9S ++
- f) genótipo: K2L +o, K3L +o, K7S +o, K9S +o
- g) genótipo: K2L +o, K3L +o, K7S oo, K9S ++
- h) genótipo: K2L +o, K3L +o, K7S oo, K9S +o
- i) genótipo: K2L oo, K3L ++, K7S +o, K9S ++
- j) genótipo: K2L oo, K3L ++, K7S +o, K9S +o
- l) genótipo: K2L oo, K3L ++, K7S oo, K9S ++
- m) genótipo: K2L oo, K3L ++, K7S oo, K9S +o
- n) genótipo: K2L oo, K3L +o, K7S +o, K9S ++
- o) genótipo: K2L oo, K3L +o, K7S +o, K9S +o
- p) genótipo: K2L oo, K3L +o, K7S oo, K9S ++
- q) genótipo: K2L oo, K3L +o, K7S oo, K9S +o

Todos os genótipos são homozigóticos para presença de knobs em K6L, K7L e K8L.

Figura 3.

continuação da Figura 3.

Tabela 4B. Composição de knobs da progênie RC-D.

material	composição de knobs									
	4	4	5	3	4	5	6	5		
K2L K3L K7S K9S	K2L K3L K7S K9S	K2L K3L K7S K9S	K2L K3L K7S K9S	K2L K3L K7S K9S	K2L K3L K7S K9S	K2L K3L K7S K9S	K2L K3L K7S K9S	K2L K3L K7S K9S	K2L K3L K7S K9S	K2L K3L K7S K9S
+0 ++ +0 ++	+0 ++ +0 ++	+0 ++ +0 ++	+0 ++ +0 ++	+0 ++ +0 ++	+0 ++ +0 ++	+0 ++ +0 ++	+0 ++ +0 ++	+0 ++ +0 ++	+0 ++ +0 ++	+0 ++ +0 ++
RC-D	4	4	5	3	4	5	6	5		5

K2L K3L K7S K9S	K2L K3L K7S K9S	K2L K3L K7S K9S	K2L K3L K7S K9S	K2L K3L K7S K9S	K2L K3L K7S K9S	K2L K3L K7S K9S	K2L K3L K7S K9S	K2L K3L K7S K9S	K2L K3L K7S K9S	K2L K3L K7S K9S
00 ++ +0 ++	00 ++ +0 ++	00 ++ +0 ++	00 ++ +0 ++	00 ++ +0 ++	00 ++ +0 ++	00 ++ +0 ++	00 ++ +0 ++	00 ++ +0 ++	00 ++ +0 ++	00 ++ +0 ++
4	4	6	4	1	8	2	5			

TABELA 49. Teste de χ^2 para segregação de locos individuais da progênie RC-D.

loco	genótipo	f_o	f_e	k	GL	χ^2
K2L	+0	36	35	0,51	1	0,057ns
	00	34	35			
K3L	++	34	35	0,48	1	0,057ns
	+0	36	35			
K7S	+0	34	35	0,48	1	0,057ns
	00	36	35			
K9S	++	32	35	0,45	1	0,51ns
	+0	38	35			

Tabela 50. Teste de χ^2 para avaliações proporções esperadas

pela herança mendeliana para progênie RC-D.

[illegible][illegible]

5. DISCUSSÃO

5.1. Análise da frequência de bandas-C de progênies F_2 de um heterozigoto para dois locos e RC onde o híbrido foi o parental feminino

Conforme descrito anteriormente, o presente trabalho teve como objetivo testar a ocorrência da transmissão preferencial de determinadas composições de knobs através da segregação preferencial dos cromossomos não homólogos ou seleção gamética, via diferentes velocidades de germinação do grão de pólen.

Desde que foi descrito, o fenômeno de segregação preferencial é tido como um dos responsáveis por proporções genéticas alteradas nas progênies derivadas de plantas onde ocorre (RHOADES, 1942) e pode ser detectado na megasporogênese, onde apenas um dos quatro núcleos, derivados da divisão meiótica, sobrevive. A maior parte desses estudos foi realizada com materiais que possuíam o cromossomo 10 anormal, que segundo LONGLEY (1945), seria capaz de induzir a ida preferencial dos cromossomos com

knobs para o polo onde estivesse, durante a meiose I. O cromossomo 10 anormal induziria ainda a formação de neocentrômeros em alguns cromossomos em ambas as divisões meióticas, puxando estes cromossomos precocemente a um dos polos (RHOADES, 1952). O número de cromossomos que possuem neocentrômeros é o mesmo que possuem knobs, então acredita-se que os knobs seriam os sítios de formação neocentromérica.

Apenas um estudo relatou a ocorrência da segregação preferencial na ausência do cromossomo 10 anormal (LONGLEY, 1945). Esse estudo foi realizado com progênies de retrocruzamento, derivadas do cruzamento entre um híbrido heterozigótico para vários knobs, e linhagens sem knobs. Segundo o autor, o número de knobs encontrado nas progênies deveria corresponder ao do gameta do parental heterozigoto, e qualquer desvio presente nesta população seria resultante da segregação não ao acaso na megasporogênese das plantas F_1 . Observando a segregação de cada knob individual, o autor constatou que os cromossomos com knobs estavam presentes acima dos 50% esperado, concluindo que este fenômeno deveria ter ocorrido na megasporogênese das plantas F_1 .

Foi estudado também a distribuição de knobs no pólen das plantas F_1 e não foram encontradas diferenças significativas entre pólen com mais knobs e pólen sem knobs. Entretanto, segundo o autor, este dado não distingue

entre a possibilidade da segregação anormal na microsporogênese, que deveria produzir duas células da tétrade com muitos knobs, e outras duas com poucos, da possibilidade de diferentes viabilidades entre pólenes com poucos ou muitos knobs.

Estratégia semelhante foi usada no presente trabalho, onde foram produzidos híbridos segregando para duas posições de knobs (K3L e K7S) e para três (K2L, K3L e K9S) (Tabela 2) e a partir destes, progênies F_2 (Tabela 3) e RC (Tabela 4a), onde o híbrido foi usado como parental feminino. Analisaram-se então as frequências de bandas-C dessas progênies F_2 (Tabela 12) e RC (Tabelas 36 e 41) e foram comparadas com frequências esperadas segundo as Leis de Mendel. A ocorrência de desvio nestas frequências poderia ser originária da segregação não ao acaso dos cromossomos não homólogos na meiose do heterozigoto. No caso dos materiais F_2 , o pai masculino também é um heterozigoto, então os desvios poderiam ser ainda devido a seleção gamética.

Os resultados de todos os testes de χ^2 para segregação de cada loco individual estão nas Tabelas 13 e 14 para progênies F_2 ; Tabela 37 para RC do grupo um; e Tabela 42 e com excessão de dois resultados, todos foram não significativo. A progênie F_2 derivada de (2-1-2-4/1 87 x 1-3-1-3/2 87) apresentou resultado significativo ao nível de 5% de probabilidade para o loco K7S, amostra do ápice da

espiga, e a progênie RC-12 apresentou resultado significativo ao nível de 5% de probabilidade para o loco K3L.

Os resultados dos teste de independência: Tabela 15 para F_2 ; Tabela 41 para RC do grupo um; e Tabela 45 para RC do grupo dois, foram não significativos para todas as progênies, indicando que as frequências de bandas-C observadas não diferiram da esperada pela herança mendeliana, o que geneticamente indicou que a segregação dos cromossomos não homólogos na meiose feminina seria independente para todas essas progênies estudadas. O desvio encontrado na progênie F_2 pode ser devido a uma seleção gamética, e para a progênie RC-12 pode ser devido a erro de amostragem, considerando-se que a amostra analisada foi pequena.

5.2. Análise da frequência de bandas-C de progênies RC onde o híbrido foi utilizado como doador de pólen

Conforme descrito anteriormente, de maneira geral a capacidade de fertilização do grão de pólen é independente de seu conteúdo genético. No entanto em alguns locos são encontradas proporções genéticas distorcidas, resultado de uma seleção gamética, ou seja, pólen com diferentes constituições gênicas têm diferentes capacidades de

competição, que pode ser influenciada pela ação de um único gene ou pelo conjunto de genes.

Segundo BENNETT (1985), algumas características das células e das plantas são afetadas pelo conteúdo de DNA das mesmas, independentemente da expressão gênica deste DNA, denominando este fenômeno, de efeito nucleotípico. Deste modo, correlações entre conteúdo de DNA e tamanho de cromossomo, núcleo e célula, são devidos ao efeito nucleotípico. Além disso, em angiospermas têm sido mostrado que o conteúdo de DNA correlaciona-se com a duração do ciclo mitótico.

KARP et alii (1982) estudaram a correlação entre variação do conteúdo de DNA e desenvolvimento do grão de pólen em organismos triplóides: *Hiacintus orientalis* ($2n = 3x = 24$) e *Scillia siberica* ($2n = 3x = 18$), onde o conteúdo de DNA nas tétrades variava de haplóide até diplóide. Os autores encontraram que a duração do ciclo mitótico e tamanho do grão de pólen eram proporcionais a quantidade de DNA nuclear para *Hiacintus orientalis*.

Em milho já foi mostrado que a variação do conteúdo de DNA pode apresentar um valor adaptativo. RAYBURN et alii (1985) comparando 21 materiais dos Estados Unidos e México, encontraram que a variação do conteúdo de DNA estava diretamente relacionada com a quantidade de heterocromatina (bandas-C) e que havia uma correlação negativa entre conteúdo de DNA (e heterocromatina) das plantas e zona de

maturidade, ou latitude, para as mesmas. Foi sugerido então que pode ter ocorrido uma pressão de seleção pelo homem, que selecionou materiais com menores quantidades de DNA para maiores latitudes, em função de uma maturação precoce dessas plantas, o que seria relacionado ao menor tempo de ciclo mitótico.

Um único estudo sugere que blocos de heterocromatina afetam a duração do ciclo mitótico, podendo encurtar este ciclo em plantas anuais (NAGL, 1974).

Esses dados são ainda bastante controvertidos e não foi realizado nenhum estudo considerando o conteúdo de heterocromatina e o desenvolvimento dos grãos de pólen.

O objetivo do presente estudo é avaliar se grãos de pólen com diferentes conteúdos de heterocromatina (número de knobs) apresentam diferenças na sua capacidade de competição. Para isso foram produzidas progênies RC com dois, três e quatro posições de knobs segregando (Tabela 4b), onde o híbrido foi usado como doador de pólen. Foi avaliado se a presença de bandas-C afetaria a herança mendeliana, via diferentes capacidades de competição dos grãos de pólen com diferentes composições de knobs.

5.2.1. Análise da frequência de bandas-C de progênies RC com dois locos segregando.

Inicialmente foram analisadas cinco progênies RC, onde

foram avaliadas 50 sementes do ápice e 50 sementes da base da espiga. Os resultados não significativos do teste de χ^2 para segregação de cada loco individual para as progênies RC-1, RC-2 e RC-5 (Tabelas 18, 19, e 22), nas amostras do ápice e base, indicam que as frequências observadas não diferem da esperada pela herança mendeliana, ou seja, todos os gametas aparecem nas mesmas proporções (1 :1 :1 :1) em ambas as amostras, indicando não haver nenhum tipo de seleção gamética. Para a progênie RC-1 houve um desvio não significativo ($0,05 < p < 0,1$) que pode indicar um erro de amostragem ou uma tendência para desvio.

No entanto, as progênies RC-3 e RC-4 apresentaram alguns resultados significativos que podem indicar estar ocorrendo algum tipo de seleção gamética. Considerando os dois locos, parece que em ambas as progênies o gameta selecionado, que conseguiu atingir a base da espiga, foi o que apresentou apenas um knob, no cromossomo três, ou no sete: gametas (K3L +, K7S 0) ou (K3L -, K7S 0). Na progênie RC-3 houve também um desvio nas frequências observadas para amostras do ápice e o gameta que apareceu em maior proporção foi o sem nenhum knob: (K3L 0, K7S 0).

Em seguida foram realizados testes de independência (Tabela 29) e os resultados foram não significativos para todas as progênies. Tais resultados indicam que a segregação dos dois locos é independente, ou seja não deve ter havido alterações na segregação independente dos cromossomos não

homólogos.

A análise de mais seis progênies RC do grupo um, mostrou alguns resultados interessantes e de certo modo contrastantes ao anterior. Nessas análises foram verificadas apenas amostras da base da espiga. Os resultados não significativos para os testes de χ^2 para segregação de loco individual para as progênies RC-6, RC-7, RC-9 e RC-11 (Tabela 32) indicam da mesma maneira que para as outras amostras, que as frequências observadas não diferem das esperadas, ou seja, os gametas estão na mesma proporção (1:1:1:1). Entretanto em RC-7 e RC-9 apareceram desvios não significativos ($0,05 < p < 0,1$) podendo indicar erro de amostragem ou tendência para desvios. As progênies RC-8 e RC-10, apresentaram resultados significativos. Quando foram considerados os dois locos, os resultados mostraram-se diferentes das amostras anteriores (RC-3 e RC-4). A progênie RC-8 mostrou um excesso de gametas com um knob (K3L +, K7S 0), mas também de gameta com os dois knobs (K3L +, K7S +), o mesmo acontecendo com RC-10 que também apresentou uma predominância de gametas com um e dois knobs. O único resultado semelhante para todas as progênies com desvios, foi que para amostras da base, nunca houve uma predominância de gametas sem nenhum knob.

Da mesma forma que para as amostras anteriores, os resultados foram não significativos para os testes de independência para todas elas, indicando que a segregação

dos dois locos é independente.

Considerando-se que a heterocromatina do knob tem replicação tardia e a hipótese de que um maior conteúdo de DNA aumentaria a duração do ciclo mitótico, os resultados alterados encontrados nessas progênies são o inverso do esperado, caso os knobs tivessem alguma influência na capacidade de competição do grão de pólen. Por outro lado tal resultado pode indicar que esta quantidade de heterocromatina *per se* seja insuficiente para agir na capacidade de competição dos grãos de pólen e que os desvios encontrados sejam devidos a outros fatores como interação pólen-estigma ou interação genótipo-conteúdo de heterocromatina, pois nas amostras analisadas, das quatro progênies que apresentaram desvios significativos, três possuíam a mesma composição genética, ou seja, tinham a mesma composição de linhagens: RC-3, RC-4 e RC-8.

5.2.2 Análise da frequência de bandas-C de progênies RC com um maior número de locos segregando

Em seguida analisou-se progênies RC com três e quatro knobs, para verificar se a presença de um maior conteúdo de heterocromatina provocaria maiores desvios nas proporções gaméticas das progênies e assim ajudaria a elucidar os desvios encontrados na análise anterior. Nestes materiais,

principalmente os segregando para quatro locos, existiam gametas com quantidades bastante diferentes de heterocromatina, desde gameta sem nenhum dos knobs em estudo (K2L 0, K3L 0, K7S 0, K9S 0), até gametas apresentando os quatro knobs, e também todas as combinações possíveis entre esses knobs.

Os resultados não significativos para os teste de segregação de loco individual tanto para progênies com três locos, RC-B e RC-C (Tabelas 43 e 44), como para progênies com quatro: RC-D (Tabela 49), indicam que as frequências observadas de gametas e genótipos não diferem da esperada pela herança mendeliana, ou seja, todos os gametas estão na mesma proporção, não mostrando nenhum tipo de seleção gamética.

Da mesma forma que para todas as outras progênies analisadas, os resultados do teste de χ^2 para segregação dos locos em conjunto apresentaram-se não significativos para todas elas (Tabelas 47 e 50), indicando mais uma vez que a segregação desses cromossomos é independente.

Podemos observar então que o aumento na quantidade de heterocromatina não alterou de nenhuma maneira a capacidade de competição do grão de pólen, resultado de certa forma contrastante com as suposições encontradas na literatura sobre a influência da mesma na duração de ciclo mitótico (NAGL, 1974).

6. CONCLUSÕES

Os dados obtidos no presente trabalho fornecem algumas informações a respeito da herança dos knobs:

1) A análise das frequências de bandas-C de progênies F_2 e de RC, onde o híbrido foi o parental feminino, usada como estratégia para testar a transmissão preferencial de determinadas composições de knobs pelo óvulo, não mostrou nenhum indício da ocorrência de segregação preferencial dos cromossomos não homólogos, com ou sem knobs, na meiose feminina. Como os materiais utilizados não possuíam o cromossomo 10 anormal, este resultado parece indicar que a presença do mesmo é fundamental para a ocorrência deste fenômeno, conforme descrito na literatura.

2) A análise das frequências de bandas-C em progênies RC, onde o híbrido foi o doador de pólen, realizada como estratégia para testar a capacidade de competição de grãos de pólen com diferentes composições de knobs, ou seja diferentes conteúdos de heterocromatina, apresentou alguns aspectos interessantes. Nas amostras estudadas com maiores diferenças em relação a quantidade de heterocromatina,

progênies RC com três e quatro posições de knobs segregando, não houve alteração na capacidade de competição dos mesmos. Por outro lado, em progênies com menor número de knobs, apareceram alguns desvios, indicando uma possível seleção gamética, mas favorecendo justamente gametas com maior conteúdo de heterocromatina. Desse modo, a partir desses resultados não se pode afirmar que o conteúdo de heterocromatina, por si só, influencie a capacidade de competição de grãos de pólen. Estes desvios podem ter sido causados por uma interação entre genótipo e composição de knobs das progênies.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIAR-PERECIN, M.L.R., de. Estudos dos cromossomos somáticos de milho (*Zea mays* L.) e de suas regiões heterocromáticas. Piracicaba, 1979. 138p. (Livre docência- Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP)
- AGUIAR-PERECIN, M.L.R. de. Bandamento-C e tipos de heterocromatina em milho. In: AGUIAR-PERECIN, M.L.R. de; MARTINS, P.S.; BANDEL, G; ed. Tópicos de Citogenética e Evolução de Plantas. Ribeirão Preto, SBG, 1985a. p:51-67.
- AGUIAR-PERECIN, M.L.R., de. C-Banding in maize. I. Band patterns. Caryologia, Pisa 38(1): 23-30, 1985b.
- AGUIAR-PERECIN, M.L.R. de. Estruturas dos cromossomos do milho. In: PATERNIANI, E. & VIEGAS, G.P. ed.. Melhoramento e Produção de Milho, vol.I, Campinas, Fundação Cargill, 1987. p: 79-108.
- AGUIAR-PERECIN, M.L.R., de & VOSA C. G.. C-Banding in maize. II. Indetification of somatic chromosomes. Heretidy, London, 54(1): 37-42, 1985.

AGUIAR-PERECIN, M.R.L. de & DECICO, J.U. Preliminary results on the segregation of knobs (C-bands) in inbreds derived from a flint variety. Maize Genetics Cooperation Newsletter, Urbana, 62:100, 1988.

ARRIGHI, F.E. & T.G. HSU. Localization of heterochromatin in human chromosomes. Cytogenetics, Basel, 10(2): 81-6, 1971.-6, 1971.

BENNETT, M.D.. Intraspecific variation in DNA amount nucleotipic dimension in plants genetics. In ALAN, R.; Plant Genetics, Liss , 1985. p:283-302

BIANCH, A.; MOA, A.M.; MARIANI, A. Knobs in open polinated maize population in Italy. Maize Genetics Cooperation Newsletter, Urbana 32: 12-4, 1958.

BIANCH, A. & VETTURINI, M. The knob endowment of selected lines in maize. In OXFORD CHROMOSSOME CONFERENCE ,2, 1967. Cromossomes Today, proceedings, edited by C.D. Darligton & K.R. Lewis. New York, Plenun Press, 1969. p: 223-9.
p: 223-9.

BIRD, R.M. Chromosome knob pattern in maize and annual teosinte. Maize Genetics Cooperation Newsletter, Urbana, 54: 59-61, 1980.

BLUMENSCHIEIN, A. Identification of chromosomes segments that contribut to the specificity of

- racial characteristics in maize. Raleigh, 1964. 75p (Ph. D. Thesis, North Carolina State University).
- BROWN, W. L. Numbers and distribution of chromosome knob in United States. Genetics, Princeton, 34: 524-36, 1949.
- BUCKTON, K.E.; O'RIORDON, M.L.; JACOBS, P.A.; ROBINSON, J.; HILL, R.; e FRANS, H.J.. C and Q polymorphism in the chromosome of three human population. Annual of Human Genetics, New York, 40: 99-112, 1976.
- CARLSON, W.R. The cytogenetics of corn. In: WADEN, D.B. ed. Maize Breeding and Genetics, Jonh Wiley and Sons, New York, 1988. p:641-71.
- CHUGHTAI, S.R. & STEFFENSEN, D.M. Heterocromatic knob composition of comercial lines of maize. Maydica, Bergamo, 32(3): 171-87, 1987.
- DENNIS, E.S. & PEACOCK, W.J. Knob heterocromatin homology in maize and its relatives. Canadian Journal of Genetics and Cytology, Ottawa, 25(3): 203-9, 1984.
- FOMINAYA, A. & ORELLANA, J. Does differential C-heterochromatin content affect chromosome pairing in octoploide triticales? Heredity, London 61(2): 167-73, 1988.
- FOMINAYA, A.; VEGA C. e FERRER, E . Giemsa C-banded karyotypes of *Avena* species. Genome, Ottawa, 30

- (5): 627-32, 1988.
- GILL, B.S. & KIMBER, G. Giemsa C-banded and the evolution of wheat. Proceedings of Natural Academic Science, Washington, 71(IV): 4086-90, 1974.
- HADLAZKY, G. & KALMAN L. Discrimination of homologous chromosomes of maize with Giemsa staining. Heredity, London 35: 371-4, 1975.
- IBRAIMOV, A.I. Human chromosomal polymorphism, VII. The distrubution human population. Human Genetics, Berlin, 61:384-91, 1983.
- KALSY, H.S. & SHARMA D.. Study of parameters and heterotic effect of maize (*Zea mays* L.) varieties with varyng chromosome knob numbers. Euphytica, Washington, 19:522-530, 1970.
- KARP, A.; REES, H.e JEWELL, W. The effects of nucleotype and genotype grain development in *Hyacinth* and *Scilla*. Heredity, London 48(2): 251-61, 1982.
- LONGLEY, A.E. Morphological characters of teosinte chromosomes. Journal of Agricultural Research, Washington, 54: 835-62, 1937.
- LONGLEY, A.E. Chromosome of maize from North American indians. Journal of Agricultural Research, Washington, 56: 177-95, 1938.
- LONGLEY, A.E. Abnormal segregation during megaporogenesis in maize. Genetics, Princeton, 30:

110-3, 1945.

MAGUIRE, M.P. Variability in length and arm ratio of the pachytene chromosome of corn. Cytologia, Tokyo, 21: 248-57, 1962.

MASTENBROEK, I. & WET J.M.J. Chromosome C-banding of *Zea mays* and its closet relatives. Canadian Journal of Genetics and Cytology, Ottawa, 25 (3): 203-9, 1980.

McCLINTOCK, B. Chromosome morphology in *Zea mays*. Science, Washington, 69: 629, 1929.

McCLINTOCK, B., KATO, Y.T.A., and BLUMENSCHIEIN, A. Chromosome constitution of races of maize. Colegio de Postgraduados, Chapingo, Mexico. 1981. 517p.

MOHAMED, A.H. & SHOEB E.S. Inheritance of quantitative characters in *Zea mays* IV. Relationship between frequency and combining ability. Canadian Journal of Genetics and Cytology, Ottawa, 7: 388-93, 1965.

MORGAN, D.T.Jr. The formation of chromocenters in interkinetic nuclei of maize. Journal of Heredity, Washington, 34: 195-8, 1943

NAGL, W. Role of heterochromatin in control of cell cycle duration. Nature, London, 249(5452): 53-4, 1974.

OHNO, S. The sex chromosomes: its origin and nature. In: PAVAN, C.; C. CHAGAS; O. FROTA-PESSOA and

- L.R. CALDAS eds.. Mammalian Cytogenetics and Related Problems in Radiobiology, Macmillan Company, New York. 1964. p: 253-67.
- OTTAVIANO, E.; SARI GORLA. M. and PE, E. Male gametophytic selection in maize. Theoretical and Applied Genetics, Berlin, 63(3): 249-54, 1982.
- PARDUE, M.L. & GALL, J.C. Chromosome localization of mouse satellite DNA. Science, Washington, 168(3937): 1356-8, 1970.
- PASUPULETI, A.C. Chromosome morphology of two inbreds lines: Mol17 and B73. Maize Genetics Cooperation Newsletter, Urbana, 60: 132-133, 1986.
- PEACOCK, W.J.; DENNIS, T.S.; RHOADES, M.M. and PRYOR, A.J. Highly repeated DNA sequences limited to knobs heterochromatin in maize. Proceedings of Natural Academic Science, Washington, 78(7): 4490-4, 1981.
- PFAHLER, P.L. Fertilization ability of maize pollen grains. II. Female sporophytic and pollen storage interaction. Genetics, Princeton, 57: 513-521, 1967.
- PIMENTEL GOMES, F. O teste de χ^2 e algumas de suas implicações. In: Curso de estatística Experimental, Piracicaba, Nobel, 1976. p: 368-84.
- PRYOR, A.J.; FALKENER, K.; RHOADES. M.M. and PEACOCK, W.J. Asynchronous replication of heterochromatin in maize. Proceedings of Natural Academic Science,

Washington, 77(11): 6705-9, 1980.

PORTER, H.L. & RAYBURN, A.L. B chromosome and C-banded heterochromatin variation in Arizona maize populations adapted to different altitudes. Genome, Ottawa, 33(4): 659-62, 1990.

RAYBURN, A.L.; PRICE, H.J.; SMITH, J.D. and GOLD, J.R.. C-band heterochromatin and DNA content in *Zea mays*. American Journal of Botany, New York, 72(10): 1610-7, 1985.

RAYBURN, A.L. & AUGER, J.A. Genome size variation in *Zea mays* spp *mays* adapted to different altitudes. Theoretical and Applied Genetics, Berlin, 79(4): 470-4, 1990.

RHOADES, M.M. Preferential segregation in maize. Genetics, Princeton, 27:395-407, 1942

RHOADES, M.M. Preferential segregation in maize. In: GOWEN, J.W. ed. Heterosis, Ames, Iowa State College Press, 1952. p: 66-80.

RHOADES, M.M. The cytogenetics of maize. In: SPRAGE, S.E. ed.. Corn and Corn Improvement. New York, Academic Press, 1955. p: 123-219.

RHOADES, M.M. & DEMPSEY, E. The effects of abnormal chromosome 10 on preferential segregation and crossing-over in maize. Genetics, Princeton, 53: 989-1020, 1966.

RHOADES, M.M. & DEMPSEY, E. Further studies on

- preferential segregation. Maize Genetics Cooperation Newsletter, Urbana, 64: 30, 1990.
- SARI GORLA, M.; OTTAVIANO, E. and FAINI, D. Genetic variability of gametophyte grown rate in maize. Theoretical and Applied Genetics, Berlin, 46: 289-94, 1975.
- SARI GORLA, M.; BELLINTANI, R. and OTTAVIANO, E. Competitive ability of maize pollen. Interaction between genotypes of pollen and stylar tissues. Maydica, Bergamo, 21(2): 77-80, 1976.
- TAVCAR, A. Numbers of chromosomes of *Zea mays* var. rostrata. Maize Genetics Cooperation Newsletter, Urbana, 31: 149-50, 1957.
- VACCHANI, N.V. A study of relationship of chromosome knobs with certain agronomic and morphological characters in corn inbred. Agronomy Journal, Madison, 42: 196-201, 1951.
- VETTURINI, M. Knob endowment of American inbred lines in maize. Genetica Agraria, Roma, 23: 48-49, 1969.
- VOSA, C.G. Plant chromosome banding and cytotaxonomy. In: AGUIAR-PERECIN, M.L.R.; MARTINS, P.S. and BANDEL, G. ed. Colóquio sobre Citogenética e Evolução de Plantas. Ribeirão Preto, SBG, 1985. p:17-25.
- VOSA, C.G. & MARCHI, P. Quinacrine fluorescence and Giemsa staining in plants. Nature New Biology,

London, 237: 191-2, 1972.

VOSA, C.G. & AGUIAR, M.L.R. de. New technics for detection in mitotic chromosome in maize and teosinte. Maize Genetics Cooperation Newsletter, Urbana, 46: 165-7, 1972.

WARD, E.S. Bandig patterns in maize mitotic chromosome. Canadian Journal of Genetics and Cytology, Ottawa, 22(1):61-67, 1980.

WELLHAUSEN, E.J. & PRYWER, C. Relationship between chromosome knob number and yield in corn. Agronomy Journal Research, Madison, 46: 507-11, 1954.