

SISTEMA DE INCOMPATIBILIDADE E AUTOCOMPATIBILIDADE EM *Crotalaria juncea* (L.)

MANOEL ALBINO COELHO DE MIRANDA

Engenheiro-Agrônomo,

INSTITUTO AGRONÔMICO DO ESTADO DE SÃO PAULO

Orientador: ROLAND VENCOVSKY

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
Junho de 1981

Aos meus pais e filhos

ofereço

À Dulce Maria
dedico

AGRADECIMENTOS

- Ao Prof. Dr. Roland Vencovsky, pela orientação;
- Aos Professores do curso de Genética e Melhoramento de Plantas da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, pelos ensinamentos;
- Ao Prof. Dr. Hiroshi Ikuta e aos colegas Magno A.P. Ramalho e Romeu A.S. Kiihl, pela colaboração e sugestões apresentadas;
- À Companhia Industrial Pirahy de Papéis, pela construção do telado onde se desenvolveu parte desta pesquisa;
- Aos Colegas da Seção de Leguminosas do Instituto Agronômico do Estado de São Paulo;
- Ao Instituto Agronômico do Estado de São Paulo.

ÍNDICE

	Página
LISTA DE TABELAS	v
RESUMO	vii
SUMMARY	viii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
3. MATERIAIS E MÉTODOS	8
3.1 Possibilidade de autofecundação	13
3.2 Cruzamentos recíprocos entre plantas incompatíveis do cultivar 'comum'	14
3.3 Mecanismos genéticos da autocompatibilidade ..	15
3.4 Cruzamento de plantas incompatíveis F_2 com testadora também incompatível, descendente de uma mesma planta F_1 compatível	17
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
4.1 Possibilidade de autofecundação	19
4.2 Cruzamentos recíprocos entre plantas incompatíveis do cultivar 'comum'	20
4.3 Mecanismos genéticos da autocompatibilidade ..	24
4.4 Cruzamento de plantas incompatíveis F_2 com testadora também incompatível, descendente de uma mesma planta F_1 compatível	31
5. CONCLUSÕES	35
6. LITERATURA CITADA	36

LISTA DE TABELAS

Tabela nº		Página
1	Resultados esperados para o sistema gameto- fítico	7
2	Resultados esperados para o primeiro ca- so de sistema esporofítico	7
3	Resultados esperados para o segundo caso de sistema esporofítico	7
4	Resultados esperados para o terceiro caso de sistema esporofítico	8
5	Resultados esperados para o quarto caso de sistema esporofítico	8
6	Número de ráceros, de botões florais e flo- res utilizados em autofecundações no culti- var 'comum'	21
7	Número de botões e flores utilizados nos cruzamentos recíprocos e percentagens de pegamento em crotalaria cultivar 'comum' .	23
8	Proporções esperadas do gene para fertili- dade que inibe o sistema S mas que não é alelo à série	25
9	Segregações de plantas autocompatíveis e incompatíveis na população F ₂ e no cruza- mento teste (1974)	27

Tabela nº		Página
10	Percentagem média de pegamento das plantas autocompatíveis de F_2 e das populações parentais, na ausência de insetos polinizadores	28
11	Percentagens de plantas compatíveis e segregação de autocompatíveis e incompatíveis na população F_2 e no cruzamento teste (1978)	30
12	Percentagens de plantas compatíveis e segregação de autocompatíveis e incompatíveis na população F_2 e no cruzamento teste (1980)..	32
13	Frequências esperadas e observadas no número de cruzamentos férteis e inférteis realizados entre planta testadora e as demais incompatíveis de F_2 30-1	33

SISTEMA DE INCOMPATIBILIDADE E AUTOCOMPATIBILIDADE EM

(*Crotalaria juncea* L.)

Manoel Albino Coelho de Miranda

Orientador : Dr. Roland Vencovsky

RESUMO

Estudou-se a possibilidade de se autofecundar o cultivar 'comum' de *Crotalaria juncea* (L.), em diferentes estádios de desenvolvimento, não chegando-se a bom termo pelo fato de que nesta leguminosa, os fatores S agem assim que o estigma esteja receptivo.

Através de cruzamentos recíprocos entre pares de plantas incompatíveis e dados obtidos em revisão bibliográfica, verificou-se que o sistema de autoincompatibilidade existente em crotalária é provavelmente o gametofítico.

Em cruzamentos entre plantas incompatíveis e linhagens autocompatíveis e dos retrocruzamentos para as gerações paternas foi determinado que o fator para autocompatibilidade não é alélico à série S e mostra na geração F₂: três plantas autocompatíveis para uma planta autoincompatível, portanto não se tratando do tipo I de autocompatibilidade.

Em uma população F₂ segregante para a compatibilidade, foi possível identificar cruzamentos inférteis entre plantas incompatíveis, mostrando um aumento na frequência de um mesmo fator S.

INCOMPATIBILITY SYSTEM AND SELF COMPATIBILITY IN

(*Crotalaria juncea* L.)

Manoel Albino Coelho de Miranda

Adviser: Dr. Roland Vencovsky

SUMMARY

The possibility of selfing *C. juncea* cv. 'comum' was studied at different flower's age. In this condition selfing was not feasible due to the fact that in this species stigma is receptive as soon as S factor becomes operating.

Results of reciprocal crosses between pairs of incompatible plants showed that the incompatibility system found in *C. juncea* is probably gametophytic.

In crosses between incompatible plants and self-compatible lines and the backcrosses to the parental generations, it was figured out that the factor for self-compatibility was not allelic to the S series, thus indicating that it is not involved the type I of self-compatibility. In the F₂ generation showed up the ratio 3:1 the character self-compatibility:incompatibility.

It was possible to identify, in one F₂ segregating population for compatibility, infertile crossings with incompatible plants, showing an increase in the frequency of a same S factor.

1. INTRODUÇÃO

O cultivo da *Crotalaria juncea* (L.) tem como principais explorações econômicas a produção de fibras e a biofertilização.

A produção de fibras é destinada à fabricação de papéis de alta qualidade, principalmente para cigarros, por apresentar queima rápida, pequena quantidade de cinza e ausência de sabor e cheiro.

Na biofertilização, é uma das principais leguminosas utilizadas pelo seu rápido desenvolvimento e fácil incorporação e decomposição. Deixa matéria orgânica rica em compostos nitrogenados, que podem suprir total ou parcialmente as necessidades da cultura subsequente. Hoje, a adubação nitrogenada tem sua utilização reduzida pelos altos custos de produção, pois depende da energia proveniente de petróleo.

Diante deste fato, a fixação do nitrogênio, realizada principalmente pelas leguminosas em simbiose com as bactérias do gênero *Rhizobium*, passa a ter grande importância para a

produção de alimentos a baixos custos. Esta fixação é uma alternativa de que a natureza se utiliza para a incorporação do nitrogênio atmosférico, não assimilável diretamente pelas plantas, na biosfera.

Existem pelo menos dois problemas principais limitantes para que haja maior expansão da cultura desta leguminosa: o baixo rendimento de produção de sementes por área e a murcha causada pelo fungo *Ceratocystis fimbriata* (Ell et Hast), que impossibilita o cultivo sucessivo em mesmo local.

A incompatibilidade existente em crotalaria é o fator responsável pela baixa produção de sementes por causa da impossibilidade de autofecundação, agravada muitas vezes por população insuficiente de insetos polinizadores SALGADO et alii (1972) e COSTA e AMARAL (1976).

Os problemas decorrentes da baixa produção, poderão ser minimizados através do conhecimento do mecanismo genético determinante da compatibilidade e da incompatibilidade. COSTA et alii (1973) descobriram uma planta autocompatível e a importância deste fato residia na expectativa de produção mais regular de sementes. Estudos posteriores confirmaram as vantagens da obtenção de linhagens autocompatíveis quanto à produção de sementes, COSTA e AMARAL (1976).

A impossibilidade de autofecundação restringe a utilização de métodos de melhoramento de populações, que ficam limitados aos da seleção massal, CHOPDE (1968). Por outro lado, esta mesma incompatibilidade, no Japão, possibilita a exploração da heterose, através da obtenção de híbridos F_1 , com

bastante sucesso, em crucíferas.

Dependendo da taxa de cruzamento natural em crotalária autocompatível, novos métodos de melhoramento de populações, poderão ser aplicados, diminuindo os empecilhos decorrentes do sistema de incompatibilidade.

O presente trabalho pretende investigar se o sistema de incompatibilidade existente em crotalária é o gametofítico e elucidar a herança da autocompatibilidade.

2. REVISÃO DE LITERATURA

No melhoramento é primordial o conhecimento do sistema reprodutivo da planta a ser melhorada, pois disto dependerá a metodologia a ser empregada.

A *Crotalaria juncea* (L.) pertence à família *Leguminosae*, sub-família *Papilionoidae*, tribu *Genistae* e ao gênero *Crotalaria*.

O número diplóide desta planta ~~alógama~~ é de dezesseis cromossomas, segundo ATKINSON (1950).

A flor da crotalária mostra adaptação à polinização entomófila, com quilha rígida, que quando pressionada expõe o estigma a ser polinizado. No momento em que o estigma é colocado para fora, pela pressão do inseto, este empurra o pólen, acumulado na extremidade superior do conjunto formado pela quilha, que adere ao inseto polinizador. Por esta razão é que somente himenópteros de certo porte conseguem polinizar a crotalária. Nesta leguminosa, além da polinização feita por insetos, encontram-se outros dispositivos que visam impedir a auto-

fecundação: a incompatibilidade e a protandria.

A abertura da antera ocorre no dia anterior à da flor. É neste instante que o pólen mostra maior viabilidade com 97,2% de germinação. Com o passar dos dias há uma redução gradativa com 66,5% no primeiro e de 47,7% no segundo dia após a deiscência da antera, VERNA e SHRIVAS (1968).

A biologia reprodutiva tem papel importante na determinação de procedimentos específicos como época e local de instalação de ensaios, manutenção da pureza varietal e instalações para cruzamentos artificiais.

COSTA e AMARAL (1976) determinaram, nas condições do Estado de São Paulo, que esta leguminosa é uma planta autoincompatível, que necessita de polinização entomófila realizada por mamangava e irapuãs.

A autoincompatibilidade foi definida por BREWBAKER (1957), como a "incapacidade da planta produzir sementes pela autofecundação, pois os gametas só são funcionais quando utilizados em cruzamentos".

Os sistemas de incompatibilidade foram classificados por LEWIS (1954) em heteromórficos e homomórficos, sendo este último subdividido em gametofítico e esporofítico. Os sistemas heteromórficos caracterizam-se pela influência da morfologia das flores das diferentes plantas na incompatibilidade. Nos sistemas homomórficos as diferenças na morfologia floral não têm relação com a incompatibilidade, sendo esta regulada por conjunto de alelos múltiplos.

Sistema gametofítico - Neste sistema a incompatibilidade é determinada pela própria constituição genética do

polên sendo controlada normalmente por um só loco S, apresentando grande número de formas alélicas. No sistema gametofítico existem três tipos básicos de polinização: 1 - com incompatibilidade completa, quando ambos os alelos são comuns; 2 - em que metade dos grãos de pólen é compatível, quando um dos alelos é diferente; 3 - em que todo pólen é compatível, quando ambos os alelos são diferentes.

Sistema esporofítico - Assemelha-se ao gametofítico porque o seu controle genético também envolve um loco de alelos múltiplos, diferindo pela reação de incompatibilidade ser conferida ao pólen, pela planta produtora do pólen.

Segundo LEWIS (1954) as principais características que distinguem o sistema esporofítico do gametofítico são: 1 - existem frequentemente diferenças em cruzamentos recíprocos; 2 - a incompatibilidade pode depender do genitor feminino; 3 - uma família pode conter três grupos de incompatibilidade; 4 - os homozigotos são constituintes normais do sistema; 5 - um grupo de incompatibilidade pode conter dois genótipos.

Após autofecundação de plantas incompatíveis, seria possível diferenciar os sistemas de autoincompatibilidade de acordo com as tabelas elaboradas por HARUTA (1962) e adaptadas por HIKUTA (1970). (tabelas de 1 a 5).

Há uma relação íntima entre a constituição citológica do pólen e os sistemas de incompatibilidade, sendo que o sistema gametofítico está associado ao pólen binucleado, e o sistema esporofítico do pólen trinucleado, BREWBAKER (1957).

Aparentemente dentro da mesma família botânica

Tabela 1 - Resultados esperados para o sistema gametofítico

♀ \ ♂	S_1S_1	S_1S_2	S_2S_2
S_1S_1	I	C	C
S_1S_2	I	I	I
S_2S_2	C	C	I

C - Cruzamento compatível

I - Cruzamento incompatível

Tabela 2 - Resultados esperados para o primeiro caso de sistema esporofítico

♀ \ ♂	S_1S_1	S_1S_2	S_2S_2
S_1S_1	I	C	C
S_1S_2	C	I	I
S_2S_2	C	I	I

Tanto no pólen, como no estigma, S_2 dominante sobre S_1 .

Tabela 3 - Resultados esperados para o segundo caso de sistema esporofítico

♀ \ ♂	S_1S_1	S_1S_2	S_2S_2
S_1S_1	I	C	C
S_1S_2	I	I	I
S_2S_2	C	I	I

No pólen, S_2 dominante sobre S_1 , e no estigma, $S_1 = S_2$

Tabela 4 - Resultados esperados para o terceiro caso de sistema esporofítico.

♀ \ ♂	S_1S_1	S_1S_2	S_2S_2
S_1S_1	I	I	C
S_1S_2	C	I	I
S_2S_2	C	I	I

Tabela 5 - Resultados esperados para o quarto caso do sistema esporofítico*.

♀ \ ♂	S_1S_1	S_1S_2	S_2S_2
S_1S_1	I	I	C
S_1S_2	I	I	I
S_2S_2	C	I	I

*Dr. Hiroshi Ikuta. Deptº de Genética e Instituto de Genética - ESALQ-USP. (Comunicação Pessoal).

ocorre um único sistema. As leguminosas, solanáceas e talvez as gramíneas apresentam o sistema gametofítico, enquanto que as crucíferas e compostas, o esporofítico, DUVICK (1967).

Em várias leguminosas forrageiras, o sistema gametofítico foi bem estudado, como por exemplo, no trevo vermelho *Trifolium pratense* (L.), trevo branco *Trifolium repens* (L.) e trevo híbrido *Trifolium hybridum* (L.), ATWOOD (1947), WILLIAMS (1951), LEFFEL (1963) e COHEN e LEFFEL (1969).

Não foi encontrada nenhuma referência bibliográfica sobre o sistema de incompatibilidade em crotalária.

Estudos com o trevo vermelho *Trifolium pratense* (L.) mostraram que poucas sementes poderiam ser obtidas quando um grande número de flores fossem autofecundadas. A este fenômeno denominou-se pseudo-compatibilidade.

Os fatores responsáveis pela alteração da expressão da incompatibilidade foram classificados por PANDEY (1959) em: ambientais, artificiais e genéticos.

Mais tarde, DENWARD (1963), detalhou esta classificação concluindo que a pseudo-compatibilidade é a consequência de: 1 - ambiente, especialmente em espécies com fraco sistema de incompatibilidade; 2 - genes modificadores; 3 - variabilidade nos alelos S na habilidade de permitir o crescimento de tubo polínico em um estigma incompatível; 4 - mutações espontâneas ou induzidas; 5 - poliploidia; 6 - hibridações interespecíficas e distúrbios no arranjo poligênico da reação da incompatibilidade.

A frequência de plantas autocompatíveis em popu

lações diplóide e tetraplóide de *Trifolium hybridum* (L.) foi determinada por TOWNSEND (1965). Na população diplóide, 68% das plantas não produziram uma única semente, enquanto que na população tetraplóide esta percentagem foi de apenas 31%. O teste de progênie indicou que plantas com 10% de pegamento ou menos eram incompatíveis ou apresentavam um nível muito baixo de compatibilidade. Na geração seguinte, 25% da população tetraplóide era autocompatível, enquanto que somente duas plantas, ou 1% da população diplóide, apresentou este comportamento. O teste de progênie indicou que o pegamento de sementes era devido à pseudo-compatibilidade, em sua grande maioria.

A herança da autocompatibilidade na população tetraplóide de *Trifolium hybridum* (L.) é explicada pela hipótese da interação e competição entre alelos. Há evidências de que a extensão da competição e interação entre dois alelos S em um grão de pólen diplóide é influenciada por modificadores e poligenes. Depois de três gerações de endogamia, o nível de autocompatibilidade permanecia alto nas progênies selecionadas.

Das duas plantas do *Trifolium hybridum* (L.) diplóide selecionadas, encontradas por TOWNSEND (1965), uma delas carregava o fator S_f . Este fator é de herança mendeliana simples, sendo alélico à série de fatores S. A segunda planta apresentou características gametofíticas e esporofíticas, TOWNSEND (1966). Para mais fácil discussão e referência destes dois tipos de autocompatibilidade, designou-se de tipo I aquele caracterizado pela presença do alelo S_f e tipo II em que um loco não alélico à série S ~~modifica~~ a sua expressão.

Este loco, designado A_1 , suprime a ação do gene S_1 quando A é heterozigótico.

Os alelos A agem independentemente. O genótipo da planta autocompatível foi considerado como $A_1A_2S_1S_2$ para desenvolver esta hipótese. A ação do alelo S_1 é suprimida pelo A_1 no pólen, mas não no estigma. Não há evidências que indiquem a supressão da ação de S_2 .

O alelo A_2 aparentemente não tem nenhum efeito sobre o loco S . Não foram encontradas plantas homozigóticas para o loco S_2 , nem na autofecundação da planta compatível e nem evidências de que um pólen carregando S_2 pudesse funcionar em um estigma S_2 . Desta forma, somente pólenes com a constituição genética A_1S_1 são compatíveis em autofecundações. Então os genótipos esperados da autofecundação da planta autocompatível $A_1A_2S_1S_2$ seriam $A_1A_1S_1S_1$ (incompatível), $A_1A_1S_1S_2$ (incompatível), $A_1A_2S_1S_1$ (compatível) e $A_1A_2S_1S_2$ (compatível) em frequências iguais.

Esta hipótese é semelhante à proposta por WILLIAMS (1951), para explicar o comportamento de uma planta compatível de *T. hybridum* diplóide. O autor postula que a autofecundação poderia ser consequência de uma interação de genes modificadores tanto no loco S como em outro capaz de alterar a expressão da incompatibilidade.

Como os dados utilizados para desenvolver o Modelo Genético do Tipo II de autocompatibilidade foram obtidos de progênie de uma única planta, TOWNSEND (1969) procurou estudar este tipo em materiais de outras constituições genéticas,

chegando às seguintes conclusões: em alguns cruzamentos o alelo A_1 suprime a ação de outros alelos S e em outros cruzamentos esse alelo não suprimiu a ação de alelos S. Portanto a constituição genética tem influência considerável na expressão do tipo II de autocompatibilidade.

Anteriormente, EAST e YARNELL (1929) encontraram um alelo para autocompatibilidade no loco S. As plantas com genótipo $S_f S_x$, onde S_x é qualquer outro alelo da série, são autocompatíveis e quando autofecundadas dão plantas autocompatíveis de constituição $S_f S_f$ e $S_f S_x$, semelhante ao tipo I encontrado em *Trifolium hybridum*. O mesmo ocorreu em outras leguminosas como no trevo branco e no vermelho, RINKE e JOHNSON (1941) e ATWOOD (1945). Estes últimos autores sugerem a utilização do alelo S_f para a produção de linhas puras através de autofecundações.

Segundo ALLARD (1971) em *Antirrhinum majus* existe um gene para fertilidade que anula o sistema S mas que não é alelo desta série, semelhante ao tipo II encontrado em *Trifolium hybridum*.

COSTA et alii (1973), trabalhando em casa de vegetação, obtiveram uma planta de crotalária autocompatível que deu origem a diversas linhagens, concluindo que este caráter provavelmente é dominante, não especificando o tipo de autocompatibilidade nem o número de genes envolvidos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 POSSIBILIDADE DE AUTOFECUNDAÇÃO

MATERIAL - Nas autofecundações foram utilizadas 11 plantas do cultivar 'comum' pertencentes à coleção de leguminosas do Instituto Agronômico do Estado de São Paulo. Cada planta recebeu a designação correspondente ao número do vaso seguido dos números 1 e 2, no caso de duas plantas por vaso. O cultivar 'comum' é o material hoje utilizado na produção de sementes para a obtenção de fibras e para a adubação verde. É resultante da mistura de várias introduções provenientes principalmente da Índia, que eram mantidas lado a lado, nas coleções, e posteriormente foram reunidas por não mais apresentarem diferenças quanto ao porte e vigor, devido aos cruzamentos realizados por insetos polinizadores.

MÉTODO - Utilizou-se a metodologia sugerida por

IKUTA (*), que consiste em polinizar estigmas de flores em diferentes estádios de desenvolvimento (desde botões que ainda não apresentam pétalas coloridas, até flores com pétalas começando a murchar, com o nectário apresentando grande quantidade de exudado).

Nos rãcemos foram separados por um marcador, as flores e os botões. A seguir os botões foram abertos com o auxílio de pinças, sendo retirados as sêpalas, pétalas e estames, deixando-se o estigma exposto. O mesmo procedimento foi utilizado com as flores. Realizou-se, então, as polinizações com a última flor aberta, por ser esta a que apresenta maior quantidade de pólen viável, VERNA e SHRIVAS (1968).

O trabalho foi realizado em insetário que apresentava teto de vidro e parede de tela, evitando a interferência de insetos polinizadores.

3.2 CRUZAMENTOS RECÍPROCOS ENTRE PLANTAS INCOMPATÍVEIS DO CULTIVAR 'COMUM'

MATERIAL - Foram utilizados oito plantas já testadas no ensaio anterior que mostraram ser autoincompatíveis, perfazendo quatro pares: a (55-1) e (41-1), b (51-1) e (51-2), c (56-1) e (56-2) e d (53-1) e (42-1).

*Dr. Hiroshi Ikuta. Departamento de Genética e Instituto de Genética - ESALQ-USP. (Comunicação Pessoal).

MÉTODO - Foram realizados cruzamentos recíprocos, tanto em botões como em flores. O pólen utilizado era proveniente da última flor aberta identificada como a mais próxima do último botão, conforme procedimento usado no ensaio anterior.

Foram determinadas as percentagens de pegamento tanto em flores como em botões.

3.3 MECANISMO GENÉTICO DA AUTOCOMPATIBILIDADE

Material - Foram realizados três ensaios: em 1974, 1978 e 1980.

Em 1974, utilizou-se como fonte de autocompatibilidade, material proveniente da Cadeira de Agricultura da ESALQ, COSTA et alii (1973) e como material autoincompatível, sementes de quatro plantas do cultivar 'comum', que sobreviveram de uma reboleira altamente infestada com murcha de ceratocistis da Seção de Leguminosas do IAC.

As gerações segregantes (RCPI - retrocruzamento para pai incompatível e a população F_2) foram plantadas em vasos plásticos em insetário já descrito anteriormente, para se evitar a presença de insetos polinizadores.

Em 1978 e 1980 foram utilizadas linhagens, IAC 77-1 e IAC 77-2, que são autocompatíveis e resistentes à murcha e que haviam sofrido cinco autofecundações consecutivas, em casa de vegetação, RIBEIRO et alii (1977). Como material incompatível utilizou-se o cultivar 'comum' representado por vinte plantas que não apresentavam vagem na ausência de insetos polini

zadores. Esta última população foi mantida através de cruzamentos realizados manualmente.

O ensaio de 1978 foi semeado em casa de vegetação e o de 1980 em telado com o intuito de se evitar altas temperaturas que poderiam mascarar os resultados esperados, TOWNSEND (1968).

Em todos os ensaios procurou-se eliminar as plantas raquíticas ou doentes, somente levando-se em consideração as mais vigorosas e sadias. Em cada vaso numerado, conservou-se uma única planta que recebeu esta numeração.

MÉTODO - Nos três ensaios, os cruzamentos foram realizados em botões que iriam abrir-se no dia seguinte, antes da antese, para se evitar a fecundação nos materiais passíveis de serem autofecundados, e em flores abertas do cultivar 'comum'. Tomou-se cuidado de se utilizar pólen de uma flor por planta para que houvesse menor possibilidade de cruzamentos não controlados.

Na obtenção de sementes F_1 , as plantas incompatíveis sempre foram usadas como fêmeas, para se evitar autofecundação. As plantas F_1 foram retrocruzadas com os pais compatíveis e incompatíveis.

A geração F_2 foi obtida pela autofecundação natural das plantas F_1 . As diferentes populações F_2 foram identificadas pelo número da planta F_1 que lhe deu origem, nos ensaios de 1978 e 1980.

As gerações F_1 , F_2 , os retrocruzamentos e as ge-

rações paternais foram avaliadas quanto à presença ou não de vagens em plantas individuais, sempre na ausência de insetos polinizadores. Foram consideradas plantas incompatíveis as que não apresentavam uma única vagem. As segregações esperadas foram testadas pelo teste do χ^2 .

A crotalária é uma planta de dias curtos, SEN GUPTA e TALUKDAR (1955) e por esta razão, as sementeiras foram realizadas em janeiro. As plantas floresceram rapidamente reduzindo o período vegetativo e conseqüentemente, diminuindo em altura, evitando que os ramos tocassem o teto do telado, facilitando as operações de emasculação e polinização das flores.

Concomitantemente, no ensaio de 1974, para se verificar a validade do critério utilizado para a separação entre as compatíveis e incompatíveis, calculou-se a percentagem de pegamento, contando o número de vagens e flores produzidas. O número de flores foi calculado pelo número de cicatrizes deixadas por aquelas que caíram, acrescidas do número de vagens.

3.4 CRUZAMENTO DE PLANTAS INCOMPATÍVEIS F_2 COM TESTADORA TAMBÉM INCOMPATÍVEL DESCENDENTES DE UMA MESMA PLANTA F_1 COMPATÍVEL

MATERIAL - Foram utilizadas dezenove plantas incompatíveis (que não apresentavam vagens) das setenta e oito estudadas da população F_2 30-1, do ensaio realizado em estufa no ano de 1978. (tabela 11)

MÉTODO - No final da avaliação quanto a presença de vagens as incompatíveis foram separadas. Escolheu-se, ao acaso a planta trezentos e sessenta e três como fornecedora de pólen, realizando o maior número possível de cruzamentos entre esta e as demais incompatíveis, em flores abertas, na ausência de insetos polinizadores (estufa 1978). Foi feita a contagem do número de cruzamentos férteis e inférteis.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 POSSIBILIDADE DE AUTOFECUNDAÇÃO

Normalmente o início da ação dos fatores S, no órgão floral feminino, coincide com o início da antese. Por outro lado, como nas crucíferas, o estigma já está receptivo alguns dias antes da abertura da antera e isto permite que mesmo espécies autoincompatíveis possam produzir sementes de autofecundações quando a polinização é realizada em botões.

A tentativa de se autofecundar a crótaria tinha dois objetivos: 1 - Em flores abertas, verificar se as plantas utilizadas eram realmente autoincompatíveis ou não produziam sementes por protandria ou protogenia, ou ainda, por ser a estrutura da flor adaptada à polinização entomófila, isto é, a ausência do inseto não permitiria o contato íntimo entre o pólen e o estigma; 2- Em botões, admitindo-se similaridade ao que ocorre em crucíferas, para a obtenção de genótipos homozigotos, para os fatores de incompatibilidade, oriundos de uma mesma planta, o que

permitiria, através de cruzamentos testes, diferenciar os sistemas de incompatibilidade, de acordo com as tabelas elaboradas por HARUTA (1962) e adaptadas por HIKUTA (1970). (tabelas de 1 a 5).

A obtenção de genótipos idênticos para a autoincompatibilidade iria facilitar a produção de híbridos e viabilizar autofecundações exigidas nos programas de melhoramento.

Pode-se verificar que é praticamente impossível a autofecundação artificial em crotalária tanto em flores abertas como em botões. Foram utilizados quarenta e oito ramos, cento e trinta e quatro botões florais e cento e cinquenta e nove flores abertas, perfazendo um total de duzentos e noventa e três autofecundações e mesmo assim não se concretizou nenhuma fecundação. (tabela 6)

Isto demonstra que há um mecanismo genético responsável pela não fecundação do óvulo e que neste sistema os fatores de incompatibilidade começam a agir assim que o estigma esteja receptivo.

4.2 CRUZAMENTOS RECÍPROCOS ENTRE PLANTAS INCOMPATÍVEIS

Dentre as características principais que distinguem o sistema gametofítico do esporofítico, está a diferença no pegamento entre cruzamentos recíprocos, LEWIS (1954).

No sistema esporofítico podem ou não existir interações alélicas entre os fatores S, sendo que estas são independentes no órgão masculino e feminino, BATEMAN (1954). Daí

Tabela 6 - Número de rãcemos, de botões florais e flores utilizados em autofecundações de plantas do cultivar 'comum' de crotalãria - 1976.

Identifi cação da planta	Nº de rãcemos	Nº de botões florais	Nº de flores abertas	Nº total de autofe cundações
55 - 1	3	11	16	27
58 - 1	4	13	14	27
51 - 1	5	9	15	24
56 - 1	4	14	15	29
41 - 1	4	10	12	22
56 - 2	4	10	14	24
51 - 2	6	17	19	36
43 - 1	3	11	14	25
59 - 1	6	12	19	31
42 - 1	5	19	14	33
53 - 1	4	8	7	15
Totais	48	134	159	293

a maior possibilidade de ocorrência de diferenças na taxa de pagamento, nos cruzamentos recíprocos neste sistema.

Os cruzamentos realizados mostram taxas de pagamento próximas nos dois sentidos (tabela 7), dando uma indicação que o sistema encontrado em crotalária provavelmente é o gametofítico. Neste sistema de incompatibilidade há três possibilidades: 1 - incompatibilidade completa, quando ambos os alelos são comuns; 2 - em que metade do pólen é compatível, quando um alelo é diferente; 3 - em que todo o pólen é compatível, quando ambos os alelos são diferentes LEWIS (1954). No caso em questão, parece que os dois alelos são diferentes, nos vários cruzamentos, pois as taxas de pagamento são próximas de 100%. (tabela 7).

Ainda corroborando com os resultados, temos que a crotalária é uma leguminosa, e portanto apresenta pólen binucleado, sendo que esta característica está associada ao sistema gametofítico DUVICK (1967).

A série alélica no sistema gametofítico é normalmente numerosa. Há aproximadamente duzentos e doze alelos no loco S de trevo vermelho e vinte e dois em trevo híbrido, WILLIAMS (1951). A taxa bastante alta de pagamento nos cruzamentos recíprocos realizados poderia ser explicada pela baixa probabilidade de ocorrência de um mesmo fator S em uma população restrita. Esta probabilidade cai rapidamente com o aumento do número de alelos, pois com cinco alelos a probabilidade é de 40% de aparecimento de um determinado fator S, caindo para 10% quando este número sobe para 20 e para 0,01% quando o número de

Tabela 7 - Número de botões e flores utilizados nos cruzamentos recíprocos e percentagens de pegamento em *Crotalaria juncea* (L.) cultivar 'comum' 1976.

Pares	Cruzamentos	Nº de botões	Nº de flores	% de pegamento em botões	% de pegamento em flores
a	(55-1) x (41-1)	11	16	27,27	100,00
	(41-1) x (55-1)	10	7	1,00	100,00
b	(51-1) x (51-2)	8	14	0,00	78,57
	(51-2) x (51-1)	17	14	0,00	85,71
c	(56-1) x (56-2)	16	14	0,00	92,86
	(56-2) x (56-1)	15	14	0,00	92,86
d	(53-1) x (42-1)	7	12	0,00	91,66
	(42-1) x (53-1),	14	17	0,00	76,47

alelos é duzentos.

A taxa de pegamento em botões é muito mais baixa do que em flores abertas mesmo se tratando de cruzamentos férteis.

4.3 MECANISMO GENÉTICO DA AUTOCOMPATIBILIDADE

Em leguminosas já foram descritos dois tipos de autocompatibilidade: Tipo I, como sendo o sistema devido ao gene S_f , alélico à série de incompatibilidade, e o Tipo II, tendo características gametofíticas e esporofíticas, não alélico a série S, mas modificando-a, TOWNSEND (1969).

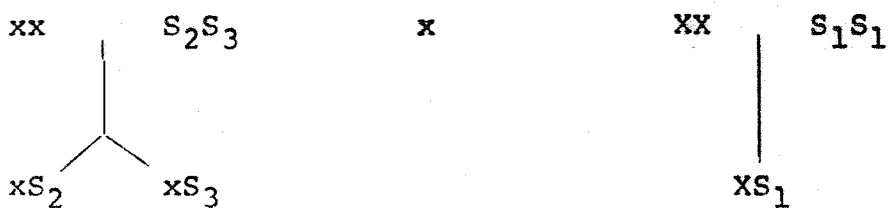
Uma terceira hipótese foi formulada para explicar a autocompatibilidade em crotalária, em que um gene dominante anula o sistema S, mas não é alélico à série e a reação do pólen é independente do genótipo materno. (tabela 8).

O primeiro estudo realizado em 1974, em insetário, permitiu através do cruzamento teste, e da geração F_2 , confirmar a hipótese apresentada na tabela 8, em que o responsável pela autocompatibilidade é dominante e não está localizado no mesmo loco dos fatores S (tipo I), pois houve o aparecimento de plantas incompatíveis na geração F_2 , fato que não ocorreria se o gene responsável pela autocompatibilidade estivesse no mesmo loco dos fatores S.

Os desvios foram não significativos tanto no cruzamento teste, quanto na geração F_2 , utilizando-se 65 plantas no retrocruzamento e 109 plantas na F_2 para uma proporção de 1:1 e

Tabela 8 - Proporções esperadas do gene para fertilidade que inibe o sistema S mas não é alelo à série.

Pais: ♀ Autoincompatíveis ♂ Autocompatível



F_1 - Autocompatível - XxS_1S_2

XxS_1S_3

Autofecundado - XxS_1S_2 :

F_2	XS_1	XS_2	xS_1	xS_2
XS_1	XXS_1S_1	XXS_1S_2	XxS_1S_1	XxS_1S_2
XS_2	XXS_1S_2	XXS_2S_2	XxS_1S_2	XxS_2S_2
xS_1	XxS_1S_1	XxS_1S_2	xxS_1S_1	xxS_1S_2
xS_2	XxS_1S_2	XxS_2S_2	xxS_1S_2	xxS_2S_2

xx - Plantas incompatíveis.

3:1 respectivamente, supondo dominância para a autocompatibilidade. (tabela 9).

Também não se trata do tipo II, pois a autocompatibilidade neste sistema é explicada pela supressão da ação do fator S quando o loco não alelo é heterozigoto (A_1A_2). Portanto a geração paternal, quando autofecundada deveria sempre apresentar fenótipos incompatíveis, representados pelos homozigotos, fato que não ocorre no presente caso onde a autocompatibilidade é estável com o transcorrer das gerações.

No mesmo experimento calculou-se a percentagem média de pegamento nas diferentes populações. As plantas F_2 que produziram sementes nas populações x_1 , x_3 e x_6 obtiveram médias próximas da população paternal autocompatível, apesar de que na população x_4 a percentagem média de pegamento foi quase a metade das outras. (tabela 10). Como o cultivar 'comum' não apresentou vagens na ausência de insetos polinizadores, enquanto que nas demais populações mostraram percentagens por volta de 30% de pegamento pode-se diferenciar os fenótipos quanto a autocompatibilidade pela presença de vagens.

Como a população incompatível foi representada, no primeiro ensaio, por sementes provenientes de apenas quatro plantas, resolveu-se repetir o ensaio utilizando-se população do cultivar 'comum' representada por sementes de vinte plantas. Por haver possibilidade maior quanto ao número de plantas a serem avaliadas, utilizou-se, no referido ensaio, casa de vegetação da Seção de Leguminosas.

É fato conhecido que a pseudo-compatibilidade

Tabela 9 - Segregações de plantas autocompatíveis e incompatíveis na população F_2 e no cruzamento teste.
Crotalaria juncea (L.) - insetário 1974.

	Fenótipo		Total	% de planta com vagem	χ^2
	Com vagem	sem vagem			
RCPI (1:1)	32	33	65	49,23	0,14 n.s.
F_2 (3:1)					
x - 1	30	6	36	83,33	
x - 3	27	6	33	81,81	
x - 6	25	8	33	75,75	
x - 4	4	3	7	57,14	
Total	86	23	109	78,89	0,88 n.s.

Tabela 10 - Percentagem média de pegamento das plantas auto-compatíveis de F_2 e das populações paternas, na ausência de insetos polinizadores.

		%
F_2	x - 1	27,54
	x - 3	27,11
	x - 6	26,09
	x - 4	16,98
Linhagem compatível		30,46
Cultivar 'comum'		0

pode ser influenciada pela temperatura. Normalmente esta casa de vegetação apresenta temperaturas elevadas nas horas mais quentes do dia, por volta de 45°C, pois não tem vidros pintados nem sistema de ventilação eficiente. No ensaio aí instalado, a pseudo-compatibilidade parece ter influenciado os resultados, pois houve aparecimento de plantas com vagens no cultivar 'comum' e no cruzamento teste, o desvio foi significativo em relação a proporção esperada (1:1), com número de plantas com vagens superior ao de plantas sem vagens, e desvio maior apesar de não significativo, em relação à população F_2 (tabela 11) do que no ensaio anterior.

Na população F_2 , apesar de haver diferenças entre as descendentes de uma única planta F_1 , quanto à proporção esperada (3:1) o desvio não foi significativo, em relação às novecentos e noventa e duas plantas analisadas (tabela 11).

Um último ensaio foi realizado no ano de 1980 em telado, com a finalidade de se evitar as altas temperaturas existentes em casa de vegetação. Neste ensaio houve redução na percentagem de plantas com vagem no cultivar 'comum' e no cruzamento teste (RCPI) o desvio não foi significativo em relação à proporção esperada (1:1).

Por outro lado, na linhagem IAC 77-2, no (RCPC) retrocruzamento para pai compatível, e no F_1 , verificou-se a presença de plantas sem vagens, o que não era esperado.

Novamente na F_2 não houve desvio significativo em relação à proporção esperada (3:1), quando se trabalhou com

Tabel 11 - Percentagem de plantas compatíveis e segregação de autocompatíveis e incompatíveis na população F_2 e no cruzamento teste. *Crotalaria juncea* (L.) - casa de vegetação 1978.

	Fenótipo		Total	% de plantas compatíveis	χ^2
	Com vagem	sem vagem			
'Comum'	5	14	19	26,31	-
IAC 77-1	9	--	9	100,00	-
IAC 77-2	8	--	8	100,00	-
RCPC	45	--	45	100,00	-
RCPI (1:1)	32	18	50	64,00	3,92 +
F_2 (3:1)					
22-1	77	--	77	100,00	
23-1	69	6	75	92,00	
23-2	37	9	46	80,43	
24-1	63	9	72	87,00	
25-1	7	16	23	30,43	
27-1	10	7	17	58,82	
30-1	58	20	78	74,35	
30-2	37	11	48	77,08	
32-1	25	15	40	62,50	
34-1	10	39	49	20,40	
35-1	11	46	57	19,29	
36-1	59	14	73	80,82	
37-1	28	31	59	47,45	
37-2	70	--	70	100,00	
38-1	57	12	69	82,60	
38-2	21	17	38	55,26	
39-1	47	6	53	88,67	
39-2	45	3	48	93,75	
Total	731	261	992	73,68	0,91 n.s.

o total de plantas ensaiadas. (tabela 12).

Pelos resultados apresentados nos três ensaios pode-se concluir que a autocompatibilidade encontrada em crotalária é governada por um carácter dominante, representado por um gene que suprime a ação do loco S, sem pertencer a sua série alélica.

As discrepâncias encontradas em alguns dos resultados obtidos podem ser explicadas pelos seguintes fatores:

- 1 - fatores ambientais causando a pseudo-compatibilidade;
- 2 - critério não muito adequado para avaliação dos genótipos, ou seja, a presença ou ausência de vagens não discrimina a compatibilidade da incompatibilidade;
- 3 - constituição genética interferindo na expressão da compatibilidade, à semelhança do que ocorre em trevo híbrido, TOWNSEND (1969) ;
- 4 - pequeno número de plantas usadas no retrocruzamento.

4.4 CRUZAMENTO DE PLANTAS INCOMPATÍVEIS F₂ COM UMA TESTADORA TAMBÉM INCOMPATÍVEL, DESCENDENTE DE UMA MESMA PLANTA F₁ COMPATÍVEL.

A população F₂ 30-1 de 1978 (tabela 11) está de acordo com a hipótese de que o fator para autocompatibilidade é dominante e tem herança mendeliana, mostrando segregação de três plantas autocompatíveis para uma planta autoincompatível, como demonstra o teste estatístico, com desvio não significativo ($\chi^2 = 0,30$).

Pela autofecundação da planta F₁, obrigatória

Tabela 12 - Percentagem de plantas compatíveis e segregação de autocompatíveis e incompatíveis na população F_2 e no cruzamento teste. *Crotalaria juncea* (L.) - Telado 1980.

	Fenótipo		Total	% de planta com vagem	χ^2
	com vagem	sem vagem			
'comum'	4	41	45	8,88	
IAC 77-2	37	3	40	92,50	
RCPC	23	3	26	88,46	
RCPI (1:1)	36	42	78	46,15	0,46 n.s.
F_1	53	9	62	85,48	
F_2 (3:1)					
21-1	34	18	52	65,38	
23-1	13	20	33	39,39	
23-2	37	13	50	74,00	
24	48	5	53	90,56	
25-1	16	23	39	41,02	
26-1	23	16	39	58,97	
28-1	56	0	56	100,00	
Total	227	95	322	70,49	3,48 n.s.

mente deveriam surgir, nas descendentes incompatíveis, os genótipos $xx S_1S_1$, $xx S_1S_2$ e $xx S_2S_2$, na proporção 1:2:1, conforme pode ser visualizado na tabela 8.

Assim caso a planta testadora fosse homozigota para o fator S, ter-se-ia pólen S_1 ou pólen S_2 , havendo fecundação das plantas S_2S_2 ou S_1S_1 , e incompatibilidade no genótipo S_1S_2 , na proporção de três cruzamentos inférteis para um fértil. Por outro lado, se a planta testadora fosse heterozigota ter-se-ia pólen S_1 e S_2 , ao mesmo tempo que iriam fecundar os genótipos homozigotos S_1S_1 e S_2S_2 , havendo esterilidade no cruzamento com S_1S_2 , na proporção de um fértil para um infértil.

A autofecundação aumentou a frequência de um mesmo fator S na população, pois começaram a aparecer cruzamentos inférteis. No entanto a proporção de cruzamentos viáveis e inviáveis não concorda com o esperado, nos dois casos possíveis como pode ser visto na tabela 13, admitindo-se o sistema gametofítico.

As alterações encontradas poderiam ser determinadas por: grãos de pólen carregando determinados fatores S, que teriam maior viabilidade em certos estigmas autocompatíveis, alterando as proporções esperadas. TOWNSEND (1973) mostra que em *Trifolium hybridum* pode haver fertilização seletiva em progênies autofecundadas em materiais sensíveis à temperatura; e também pelo pequeno número de plantas testadas.

Tabela 13 - Frequências esperadas e observadas no número de cruzamentos férteis e inférteis realizados entre a planta testadora e as demais incompatíveis de F₂ 30-1. *Crotalaria juncea* (L.) - casa de vegetação 1978.

Segregações	Cruzamentos inférteis		Cruzamentos férteis		Totais
	f.obs	f.esp.	f.obs	f.esp.	
3:1	3	13,5	15	4,5	18
1:1	3	9,0	15	9,0	18

5. CONCLUSÕES

De acordo com o material e metodologia empregados, e diante dos resultados obtidos conclue-se:

a) O fator S em crotalária inicia sua ação assim que o estigma se torna receptivo;

b) Não há possibilidade de obtenção de genótipos homozigotos pela polinização de botões;

c) Há indicações que o sistema de incompatibilidade é o gametofítico;

d) O fator responsável pela autocompatibilidade é dominante, não alélico à série S, pois há o aparecimento de plantas incompatíveis nas populações segregantes, mostrando na geração F₂ três plantas compatíveis para uma planta incompatível;

e) Em pelo menos uma população F₂ incompatível, proveniente de uma mesma planta F₁, ocorreu cruzamentos inférteis indicando um aumento da frequência de um mesmo fator S naquela população.

6. LITERATURA CITADA

- ALLARD, R.W., 1971. Sistema de controle de polinização em plantas cultivadas. In: Princípio de Melhoramento Genético das Plantas. São Paulo, Edgard Blücher Ltda Editora, p.182-208.
- ATCKISON, E., 1950. Citological observations on *Crotalaria*. In: Studies in the Leguminosae. Journal of the Mitchell Society, p.70-75.
- ATWOOD, S.S., 1945. The behavior of the self compatibility factor and its relation to breeding methods in *Trifolium repens*. Journal American Society Agronomy. 37:991-1010.
- ATWOOD, S.S., 1947. Cytogenetics and breeding of forage crops. Advances in Genetics. 1:1-67.
- BATEMAN, A.J., 1954. Self-incompatibility systems in Angiosperms II. Iberia amara. Heredity. 8:305-322.
- BREWBAKER, J.L., 1957. Polem cytology and self-incompatibility systems in plants. Journal Heredity. 48:271-277.

- BREWBAKER, J.L., 1969. Sistemas de Reprodução. In: Genética na Agricultura. Editora da Universidade de São Paulo. p.34-60.
- CHOPDE, P.R., 1968. Problems and Prospects in sunn hemp. Indian Journal of Genetics & Plant Breeding. 28A:266-268.
- COHEN, M.M. e R.C. LEFFEL, 1964. Pseudo-self compatibility and segregation of gametophytic self-incompatibility alleles in white clover, *Trifolium repens* L. Crop Science 4:429-431.
- COSTA, J.D., L.A.C. LOVADINI e R.A.S. KIIHL, 1973. Auto-compatibilidade em *Crotalaria juncea* L. Revista de Agricultura. 48(4):148.
- COSTA, J.D. e E. AMARAL, 1976. Produção de sementes de *Crotalaria juncea* L. na presença e ausência de insetos polinizadores. Revista de Agricultura. 51(2):57-60.
- DENWARD, I., 1963. The function of the incompatibility alleles in red clover (*Trifolium pratense* L.). I - The effect of grafting upon self-fertility. II - Results of crosses within inbred families. III - Changes in the S - specificity. IV- Resume. Hereditas 49:189-202, 203-236, 285-329, 330-334.
- DIVICK, D.N., 1967. Influence of morphology and sterility on breeding methodology. In: Frey, K.J. ed. Plant Breeding, Ames, Iowa. State University Press, p.88-124.
- EAST, E.M. e A.J. MANGELSDORF, 1925. A new interpretation of the hereditary behavior of self-sterile plants. Proceeding Academy of Science. U.S.A. 11:166-171.

- EAST, E.M. e S.H. YARNELL, 1929. Studies on self fertility Genetics. 14:455-487.
- HARUTA, T., 1962. Studies on the genetics of self and cross incompatibility in cruciferous vegetables. Takii Plant Breeding and Experiment Station, Kyoto, Japan. Research Bulletin - 2.
- HIKUTA, H., 1970. O estudo genético de incompatibilidade em crucíferas. Aula ministrada no curso de Pós-Graduação de Genética e Melhoramento. Piracicaba. Apostila p.11.
- KENDALL, W.A., 1968. Growth of *Trifolium pratense* L. pollen tubes in compatible e incompatible styles of excised pistils. Theoretical Applied Genetics 38:351-354.
- LEFFEL, R.C., 1963. Pseudo-self-compatibility and segregation of gametophytic self-incompatibility alleles in red clover. *Trifolium pratense* L. Crop Science 3:377-380.
- LEWIS, D., 1954. Comparative incompatibility in angiosperms and fungi. Advance in Genetics 6:235-285.
- LUDQVIST, A., 1965. The genetics of incompatibility. In: S. J. Geerts ed., Genetics Today. (Proc. XI Int.Congr.Genet., 1963) Pergamon, Oxford 3:637-647.
- PANDEY, K.K., 1959. Mutations of self-incompatibility gene (S) and pseudo-compatibility in Angiosperms. Lloydia 22: 222-234.
- RIBEIRO, I.A., M.A.C.de MIRANDA, E.A. BULISANI, L.D'ARTAGNAN de ALMEIDA e L.A.C. LOVADINI, 1977. Melhoramento da Cro-talaria. I - Autocompatibilidade e resistência à murcha de *Ceratocystis fimbriata*. Bragantia 36:291-295.

- RINKE, E.H. e I.J. JOHNSON, 1941. Self-fertility in red clover in Minnesota. Journal American Society Agronomy 32: 512-521.
- SALAGDO, A.L.B. e L.A.C. LOVADINI e J.M. PIMENTEL e W. GIMENES, 1972. Instruções para a cultura da *Crotalaria juncea*. Instituto Agronômico, Campinas-SP. Boletim nº 168 p.21.
- SEN GUPTA, J.C. e S. TALUKDAR, 1955. Investigation on growth physiology and development of sunnhemp. *Crotalaria juncea* cv L.C. 12. Indian Journal of Agricultural Science 25:51-66.
- SILOW, R.A., 1931. A preliminary report on pollen tube growth in red clover *T.pratense* L. Bull. Welsh. Pl. Breed Stn. Sew. S. 12:228-240.
- TOWNSEND, C.E., 1965. Self-compatibility studies with tetraploid alsike clover, *Trifolium hybridum* L. Crop Science 5:295-299.
- TOWNSEND, C.E., 1965. Self-compatibility plants in diverse populations and inheritance of a self-compatibility factor (S_f). Crop Science 5:358:360.
- TOWNSEND, C.E., 1966. Self-compatibility studies with diploid alsike clover, *Trifolium hybridum* L. II - Inheritance of a self-compatibility factor with gametophytic and sporophytic characteristics. Crop Science 6:415-419.
- TOWNSEND, C.E., 1968. Self-compatibility studies with diploid alsike clover, *Trifolium hybridum* L. III - Response to temperature. Crop Science 8:269-272.

- TOWNSEND, C.E., 1969. Self-compatibility studies with diploid alsike clover, *Trifolium hybridum* L. IV- Inheritance of type II self-compatibility in different genetic backgrounds. Crop Science 9:443-446.
- TOWNSEND, C.E., 1973. Advance in the study of incompatibility. In: J. Heslop. Pollen Development an Physiology, ed. London 281-309.
- VERMA, S.N.P. e S.R. SHRIVAS, 1968. Study of anthesis in Sann-hemp (*Crotalaria juncea* L.). Jawaharlal Nehru Krishi Wishwa Vidyalaya, Research Journal, Jabalpur 2:34-37.
- WILLIAMS, W., 1951. Genetics of incompatibility in alsike clover, *Trifolium hybridum* . Heredity 5:51-73.