

**BC/14524
IB/80544**



**"ESTUDO DE UM MUTANTE DE CAROTENÓIDE E VIVÍPARO
CAUSADO POR TRANSPOSON EM *Zea mays*"**

MIRIAN PEREZ MALUF

Orientação: Prof. William José da Silva *n.f*

*Este exemplar corresponde
à versão final da Tese
Defendida por aluna
Mirian Perez Maluf e aprovada
pela comissão julgadora.
William J. da Silva
02/10/91/1991*

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia - UNICAMP, como
requisito para obtenção do título
de Mestre em Ciências Biológicas,
ênfase em Genética.

UNICAMP - 1991

T/UNICAMP

M222_e



UNIDADE	IB/1074
Nº CHAMADA	Mede
V. _____	EX _____
TOMBO BC	14524
PROC.	308197
C <input type="checkbox"/>	D <input checked="" type="checkbox"/>
PRECO	243 2.000,00
DATA	13-09-91
Nº CPD	

CM00015739-0

"A Qualidade é o estímulo contínuo que nos faz criar o mundo em que vivemos, na sua integridade, nos mínimos detalhes. O homem inventa respostas à Qualidade, e entre essas respostas está a compreensão do que ele mesmo é."

(Robert M. Pirsig)

Aos meus pais, José Luís e Mirza, por sempre
acreditarem nas minhas loucuras,

À Lane, por sempre sonhar comigo,

Ao Evandro, por tudo.

AGRADECIMENTOS

-Ao Prof. William José da Silva pela orientação sempre segura deste trabalho, pelo impulso e apoio na minha formação científica, e pelo constante estímulo ao pensamento crítico.

-Ao Sr. Bento e D^a. Cida pelo auxílio durante o trabalho, pelo carinho e amizade com que me receberam, e por toda a força que representam pra todos nós.

-Às "meninas do laboratório", pela convivência em todas as horas, pelas discussões e críticas, e pela ajuda no trabalho.

-À Rachel e à Cris pela amizade e companheirismo.

-Ao Biólogo João Rosolen pelo cuidado na obtenção dos cruzamentos.

-Aos meus colegas de curso pelo apoio na tentativa de melhoria do nosso "meio-ambiente".

-A todo o pessoal do Barracão pelo carinho e amizade.

-Ao pessoal da Secretaria do Dept. de Genética pela paciência e atenção.

-A todos os meus amigos pela força que sempre me deram, e especialmente ao Niltinho pela sua energia presente em todas as horas.

-Aos membros da banca, pelas valiosas sugestões.

-Ao CNPq pelo apoio financeiro.

ÍNDICE

I- Introdução.....	01
II- Objetivos.....	05
III- Revisão Bibliográfica.....	06
3.1- Mutantes de Carotenóides.....	06
3.1.1- Carotenóides.....	06
3.1.2- Mutantes de Carotenóides e Vivíparos em milho.....	11
3.2- Transposons em Milho.....	16
3.2.1- Sistemas de Transposons.....	19
3.2.2- Mecanismos de Transposição.....	27
3.2.3- Regulação de Transposição.....	28
IV- Material e Métodos.....	31
4.1- Germoplasmas.....	31
4.1.1- Origem do mutante vp_{12}	32
4.2- Metodologia.....	35
4.2.1- Análise Genética de vp_{12}	35
4.2.2- Testes de Alelismo.....	36
4.2.3- Identificação da Família do Transposon de vp_{12}	37
4.2.3.1- Cruzamentos Teste.....	37
4.2.3.2- Testes com Iodina.....	38
4.2.4- Efeito do Transposon de vp_{12} em Genes Análogos.....	39
4.2.5- Cruzamentos Dialélicos.....	40
V- Resultados.....	41
5.1- Análise Genética da Mutação.....	41
5.2- Testes de Alelismo.....	48

5.3- Identificação da Família do Transposon de $\nu\rho_{12}$	49
5.4- Análise do Efeito do Transposon de $\nu\rho_{12}$ em genes análogos...	53
5.5- Análise de Cruzamentos Dialélicos.....	55
VI- Discussão.....	64
6.1- Análise Genética da Mutação.....	64
6.1.1- Análise de segregação no loco $\nu\rho_{12}$	68
6.1.2- Testes de alelismo.....	69
6.2- Análise da expressão do Transposon do $\nu\rho_{12}$	72
6.2.1- Identificação da família do transposon do $\nu\rho_{12}$	76
6.2.2- Análise dos cruzamentos dialélicos.....	79
VII- Conclusão.....	82
VIII- Resumo/ Abstract.....	84
IX- Bibliografia.....	87

I- INTRODUÇÃO

São conhecidas em milho pelo menos duas classes de mutantes de endosperma albinos (Robertson, 1975). Numa delas, Classe I, os mutantes possuem endosperma com coloração alterada, variando de amarelo pálido a branco, produzindo plântulas albinas ou verde pálido. Em outra, Classe II, os mutantes, apesar de produzirem plantas albinas não apresentam alterações na coloração do endosperma. Em ambas as classes encontra-se associado com o albinismo das plântulas a viviparidade do embrião, ou seja, a germinação prematura das sementes ao longo da maturação (Robertson, 1955, 1975).

Os mutantes vivíparos são caracterizados por um desenvolvimento normal da semente, durante a ontogenia. Porém durante os primeiros estágios do amadurecimento ocorre um alongamento da plúmula e a semente germina, enquanto ainda está na própria espiga. Já foram descritos vários genes envolvidos com os mutantes vivíparos em milho. São eles: vp_1 , vp_2 , vp_4 , vp_5 , vp_7 , vp_9 , ps , w_9 , al , y_9 (Robertson, 1955). A variedade de mutantes vivíparos em milho está relacionada com a complexidade dos mecanismos envolvidos na manutenção e controle do estado de dormência das sementes.

Entre os mutantes da classe I são encontrados os mutantes vivíparos vp_2 , vp_5 , vp_9 , ps , w_9 , al , y_9 . Análises bioquímicas destes mutantes indicaram que estes acumulam um ou mais precursores da via biossintética de carotenóides, sendo essa a provável causa da alteração na coloração do endosperma. Mesmo em sementes homozigotas para os genes citados a expressão desta característica é variável. Em

uma mesma espiga alguns mutantes apresentam 100% de viviparidade, enquanto outros podem se apresentar tanto dormentes como vivíparos, ou nem chegar a expressar a característica. A frequência da expressão fenotípica característica parece ser fortemente influenciada pelo meio, sendo fatores importantes o teor de umidade, oxigênio, temperatura, etc. (Robertson, 1975; Fong et al., 1983). Tem sido, porém, bastante realçado que a viviparidade e a inibição da síntese de carotenóides, nos mutantes da classe I, sejam causadas pela ação de um único gene, embora a natureza do processo metabólico envolvido seja ainda pouco conhecida (Wilson et al., 1973).

Um passo importante para se elucidar alguns aspectos da viviparidade foi a constatação de que embriões imaturos de mutantes da Classe I, vp_2 , vp_7 , vp_9 , w_3 , possuem níveis reduzidos de ácido abscísico, ABA (Brenner et al., 1977; Smith et al., 1978 e 1980), e que quando transferidos para meio de cultura contendo ABA têm seu crescimento interrompido (Robichaud et al., 1980; Smith, 1978). Isto leva à suposição de que estes mutantes representam bloqueios na via biossintética de ABA. Como a maioria dos fitohormônios, ABA é o mediador de diferentes respostas fisiológicas, incluindo promoção da embriogenese e prevenção da germinação precoce (Quatrano, 1987).

Embora a via biossintética do ABA seja ainda pouco conhecida, evidências sugerem a existência de uma via metabólica comum para ABA e carotenóides (Neill et al., 1986; Parry et al., 1990). Esta via comum poderia explicar como um único bloqueio metabólico pode levar tanto à deficiência em carotenóides quanto à viviparidade.

Essas dúvidas tem estimulado a procura de mutantes de

carotenóides e vivíparos em milho .Apesar de já terem sido identificados alguns locos relacionados com as vias metabólicas de carotenóides e ABA, os produtos gênicos correspondentes ainda não foram identificados. Em milho, apenas dois genes, vp_1 e y_1 , foram clonados (MacCarty et al.,1989; Buckner et al.,1990), e em ambos os casos foi aplicada a técnica "gene tagging" utilizando o transposon Mu.

O interesse por este assunto no Laboratório de Genética de Milho - UNICAMP passou a surgir com o aparecimento de um mutante de carotenóide e vivíparo associado à expressão de um transposon, cujo fenótipo característico é a produção de sementes amarelo pálido com setores revertentes para amarelo normal.

Em milho, os transposons foram descritos há mais de 40 anos por Barbara McClintock (McClintock, 1951). Sabe-se hoje que os transposons encontrados em milho são semelhantes aos encontrados em outros organismos, constituindo-se em elementos naturais do genoma que podem interferir na regulação e expressão gênica (Doring et Starlinger,1984).

Em vista disso, a existência de um mutante para carotenóides e vivíparo, associado com a expressão de um transposon, constitui-se num fato de grande interesse nos estudos de mecanismos de desenvolvimento das sementes e biossíntese de carotenóides. Para tal, é necessário que seja inicialmente caracterizado o tipo de mutante envolvido, a família do transposon, e como este último está relacionado com a mutação. Em seguida pode-se partir para um isolamento do gene mutado, utilizando o transposon associado a este no processo designado "gene tagging" (Doring, 1989). Este estudo básico é ainda importante por se tratar de um mutante para carotenóide, cuja

importância na qualidade nutritiva na dieta animal é indiscutível. Essa iniciativa atende a necessidade premente de se fazer uso de modelos biológicos adequados para estudos de regulação e interação gênicas, visando a expressão de genes em indivíduos transgênicos, via transposons.

II- OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo a análise genética do mutante de carotenóide/vivíparo através de: estudos de padrões de segregação do mutante em vários tipos de famílias e testes de alelismo, na tentativa de se identificar o loco mutado em questão, bem como a família de transposon envolvido na mutação. Finalmente pretendeu-se estudar o efeito do referido transposon em genes análogos.

III- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1- MUTANTES DE CAROTENÓIDES E VIVÍPAROS

3.1.1- Carotenóides

Os carotenóides são pigmentos lipo-solúveis de ampla distribuição nos tecidos fotossintéticos das plantas superiores, sendo encontrados como constituintes dos cloroplastos. São também responsáveis em parte, pela coloração de amarelo a vermelho presente em tecidos da planta, como as flores, frutos e sementes.

Apesar de estarem relacionados usualmente com vegetais, a distribuição destes pigmentos abrange também o reino animal, e microrganismos. Um carotenóide de grande importância na dieta humana é o β - caroteno, que constitui a principal fonte de provitamina A. A vitamina A é essencial para o bom funcionamento da visão, servindo como preventivo da "cegueira noturna", xerofthalmia e cegueira, além de ter papel importante na resposta imune (Sommer et al.,1981; Sommer, 1989).

Os carotenóides são compostos isoprenóides, C_{40} , e são sintetizados numa via metabólica a partir de mevalonato. No cloroplasto, os carotenóides existentes em maior quantidade são β -caroteno e luteína, os mais importantes, seguidos das violaxantinas, neoxantinas, α -carotenos, β -criptoxantinas, zeaxantinas e anteraxantinas que ocorrem em concentrações variáveis. Em flores amarelas são encontrados anteraxantinas e violaxantinas na forma de esterés. Outras flores apresentam grandes quantidades de β -caroteno ou

licopeno, porém algumas acumulam carotenóides espécie-específicos, como é o caso da eschscholtzxantina em *Eschscholtzia californica*. Carotenóides raros e altamente específicos são responsáveis pela coloração dos frutos, como a capsantina do pimentão vermelho, *Capsicum annuum*. Na maioria dos frutos é detectada a presença de grandes quantidades de licopeno ou de seus derivados.

A utilização de sistemas livres de células, principalmente de frutos como tomate e a pimenta vermelha, os passos principais da via biossintética dos carotenóides puderam ser determinados (Porter e Spurgeon, 1979). De maneira geral, a via biossintética envolve as seguintes etapas:

1. Síntese de mevalonato
2. Síntese de geranylgeranyl pirofosfato
3. Síntese de fitoeno
4. Conversão de fitoeno, pigmento incolor, em licopenos, carotenóides coloridos, passando por fitofluenos, ζ -carotenos e neurosporenos.
5. Ciclização de licopenos ou neurosporenos.
6. Modificações posteriores, tais como adições de grupos hidroxilas, carbonila e epoxy.

Nas flores e frutos, os carotenóides estão localizados nos cromoplastos, formados a partir de cloroplastos degenerados, associados com estruturas da membrana interna ou então em agregados cristalinos e glóbulos osmofílicos. Nestes casos, a síntese de carotenóides é parte do processo de formação dos cromoplastos e maturação dos frutos. Com isso, qualquer alteração ambiental ou nutricional que interfira nos processos de florescimento e maturação, irá afetar o teor e composição de carotenóides (Britton, 1982).

Nos tecidos fotossintéticos, os carotenóides estão localizados em cloroplastos. Nestes, a maior parte dos carotenóides está localizada nas membranas do tilacóide, associados com o aparato fotossintético. Durante a fotossíntese os carotenóides estão envolvidos nos processos de absorção e transferência de energia luminosa, no complexo de clorofila a/b. Porém sua função mais importante é a de proteção dos sistemas fotossintéticos contra os efeitos nocivos da fotoxidação, que pode ocorrer em condições de excesso de luminosidade. Nestes casos, uma grande quantidade de clorofilas excitadas são produzidas, levando à transferência da energia em excesso para o Oxigênio, e produzindo 1O_2 , um composto oxidante e destrutivo. Os carotenóides agem como moléculas quelantes dessa energia excedente (Britton, 1982). Pode-se daí compreender que uma deficiência em carotenóides pode ser bastante prejudicial à planta. Na ausência destes, devido a mutação ou utilização de herbicidas, ocorre uma fotoxidação das clorofilas e da maior parte do sistema fotosintético (Anderson e Robertson, 1960). Com isso cessa o acúmulo de proteínas e ribossomos dos plastídeos (Reiss et al., 1983; Harpster et al., 1984; Foierbend et al., 1979), limitando a formação dos cloroplastos. Recentemente foi determinado que os mRNA codificados no núcleo e cujos produtos gênicos são transportados para os plastídeos, também não são acumulados em plantas deficientes em carotenóides, e expostas à luz. Entre esses mRNAs estão os que codificam para a subunidade menor da ribulose bifosfato carboxilase e a proteína de ligação da clorofila a/b, a LHPC (Mayfield e Taylor, 1984).

Assim como nos cromóforos, a biossíntese de carotenóides é parte integrante da formação dos cloroplastos. Aparentemente, a

síntese de carotenóides não é paralisada após a formação do cloroplasto, existindo uma grande quantidade destes disponíveis no meio celular (Britton, 1982).

Devido à complexidade dos mecanismos envolvidos na biossíntese de carotenóides, esta pode ser diretamente afetada pelas condições ambientais e nutricionais. Plantas bem nutridas, principalmente com relação a nitrogênio e micronutrientes, tem um maior teor de carotenóides. A intensidade da luz é outro fator importante na biossíntese. Diferentes intensidades influenciam a morfologia dos cloroplastos e a composição dos pigmentos (Goodwin, 1980). Outros fatores ambientais são a temperatura e o nível de oxigenação, pois condições anaeróbicas são inibitórias da biossíntese. Além disso, qualquer fator que induza clorose na planta, deficiência de ferro e magnésio, tais como infecções por fungos, vírus ou bactérias, normalmente levam a um decréscimo no teor de carotenóides (Britton, 1982).

A nível genético, pouco se sabe sobre a via biossintética de carotenóides e sua regulação. Um dos fatores que limitam esse entendimento é o desconhecimento do papel, e até mesmo da origem, da maioria das enzimas envolvidas nos passos metabólicos (Bramley e Mackenzie, 1988). Apesar de já terem sido identificados vários mutantes de carotenóides, em diferentes organismos, somente dois genes relacionados com a biossíntese desses pigmentos foram clonados até hoje. Um deles é o gene *al-3*, em *Neurospora crassa* (Nelson et al., 1989), que aparentemente é um gene estrutural responsável pela síntese de geranylgeranyl pirofosfato (GGPP) sintetase, a qual cataliza a conversão de isopentenil pirofosfato em GGPP (Haring e Turner, 1981). O outro gene clonado é o y_1 , que ocorre em milho

(Buckner et al., 1990), possivelmente relacionado com a regulação da biossíntese de carotenóides.

Algumas tentativas tem sido feitas para se elucidar alguns aspectos genéticos da síntese de carotenóides, em *Myxococcus xanthus*. Esta é uma mixobactéria que, quando iluminada com luz azul, produz uma mistura de carotenóides levando a uma alteração na coloração das colônias de amarelo, ausência de carotenóides, para vermelho (Reichenbach e Kleinig, 1984). Este fato torna a *M. xanthus* um modelo ideal para se entenderem as bases genéticas da resposta a luz na biossíntese de carotenóides.

Através da utilização do transposon Tn-5, foram identificados três locos não ligados, relacionados com a indução da biossíntese de carotenóides pela luz (Martinez et al., 1986). O loco *car R* tem uma função reguladora, e mutações neste loco levam a uma síntese constitutiva produzindo fenótipo Car^c , dando colônias vermelhas na presença e ausência de luz. Um outro gene, *car Q*, foi identificado e parece estar associado ao loco *car R* (Martinez et al., 1989). O gene *car A* está ligado ao loco *car B*, no qual várias mutações induzidas por Tn-5 levaram a um bloqueio na síntese, inclusive nos mutantes Car^c (Martinez et al., 1986; Balsalobre et al., 1987). Além disso, *car A* é um elemento cis-controlador da expressão de *car B*. O terceiro loco envolvido é o *car C*, que também bloqueia a síntese de carotenóides e é epistático sobre o fenótipo Car^c . Os fenótipos determinados por mutações em *car B* e *car C* são Car^- (Martinez et al., 1989).

Com base nesses fatos foi proposto um modelo de regulação da biossíntese de carotenóides em *M. xanthus*, onde *car R* codifica uma proteína produzida ou ativada na ausência de luz, responsável pela repressão de *car Q*. Na presença de luz, *car Q* produz uma proteína que

ativa a transcrição de car B, através de interação a nível de DNA com o sítio car A, e também provavelmente a expressão de car C. Neste caso, tanto car B como car C seriam genes estruturais (Martinez et al., 1989).

Em milho, a biossíntese de carotenóides tem sido estudada a partir dos mutantes de endosperma que apresentam deficiência em carotenóides. Além de serem encontrados nos tecidos fotossintéticos, os carotenóides fazem parte da composição do endosperma de suas sementes. Os dois tipos principais de carotenóides encontrados são o β -caroteno e as xantofilas, os quais são responsáveis pela coloração amarela das sementes. Sua função no endosperma do milho não é, no entanto, conhecida (Goodwin, 1986).

3.1.2- Mutantes de Carotenóide e Vivíparos em Milho

O processo de desenvolvimento e maturação de sementes em milho envolve uma série de eventos, nos quais cada componente exerce um papel específico. O controle desses eventos depende de numerosos genes, que quando sofrem mutações podem alterar o desenvolvimento normal da semente. O fenótipo do endosperma da semente de milho constitui um reflexo imediato dessas alterações. Por isso, os mutantes de endosperma tem uma grande importância na elucidação de mecanismos de regulação e expressão gênica desses processos.

Os mutantes de endosperma podem afetar muito ou pouco o desenvolvimento da semente. Entre estes, é descrita uma classe de mutantes em milho, que condicionam uma germinação precoce. Nestes mutantes, a germinação ocorre enquanto a semente está ligada à espiga, e por isso foram denominados vivíparos (Mangelsdorf, 1930; Lindstrom, 1923; Eyster, 1931; Sprague, 1936). Normalmente, nesses mutantes a

germinação envolve apenas o desenvolvimento da plúmula, com pouca ou nenhuma germinação da radícula (Robertson, 1955).

Além de promoverem a germinação precoce, os mutantes vivíparos estão relacionados com outros tipos de alterações fenotípicas na semente e/ou planta. Estudando um dos mutantes vivíparos, vp_5 , e translocações do cromossomo B, Robertson (1952) demonstrou que a viviparidade é determinada pelo genótipo do endosperma.

Posteriormente Robertson (1975) estabeleceu duas classes de mutantes produzindo plântulas albinas em milho:

- Classe I, caracterizada por sementes com endosperma variando de amarelo limão a branco e plântulas albinas. Alguns alelos desses mutantes podem, às vezes, originar plântulas verde pálido ou verdes. Nesta classe, são incluídos os mutantes vivíparos da Classe II (Robertson, 1955). Até hoje, foram identificados os seguintes locos: vp_2 , vp_5 , vp_9 , ps , al , w_3 , y_9 , que são vivíparos e z , lc , ly , lw , lw_2 , ce , w_{7748} , lw_3 , lw_4 , y , que apresentam dormência.

- Classe II, caracterizada por mutantes albinos, sem alteração da coloração do endosperma. Pouco se sabe a respeito destes mutantes, cujos locos identificados são: w_1 , w_2 , w_4 , w_5 , w_7 , w_8 , w_9 , w_{10} , w_{11} , w_{12} , w_{13} , w_{14} , w_{15} e wd .

A nível bioquímico, os mutantes da Classe I representam mutantes de carotenóides, sendo que uma parte, vp_2 , vp_5 , vp_9 , ps , al , w_3 , y_9 , acumulam um ou mais precursores da via biossintética, como fitoeno, fitoflueno, ζ -caroteno, licopeno e neurosporeno (Anderson e Robertson, 1973). Os outros mutantes não acumulam nenhum precursor. Foi demonstrado também, que os mutantes da Classe I são capazes de sintetizar clorofila, e que a ausência de pigmentação é devida à

fotoxidação (Anderson e Robertson, 1973).

É interessante observar que os mutantes da Classe I que acumulam os precursores de carotenóides, são também vivíparos. Estes mutantes, por serem objeto de interesse deste trabalho, são caracterizados a seguir, de acordo com Robertson (1955, 1975).

$-vp_2$: esse gene é responsável pela coloração do endosperma que varia de amarelo pálido a branco, e pela produção de plântulas albinas. As sementes mutantes homozigotas são menores do que as sementes normais, de uma mesma espiga. O mapeamento feito com auxílio de translocações localizou este gene no braço curto do cromossomo 5, entre *bml* e *pr*. Acumula fitoeno e fitoflueno.

$-vp_5$: produz sementes com endosperma variando de amarelo pálido a branco. Localiza-se no cromossomo 1, à esquerda do loco *P*. Acumula fitoeno, fitoflueno e ζ -caroteno.

$-vp_9$: fenotipicamente atua de modo semelhante a vp_5 , inclusive no tipo de precursores de carotenóides acumulados. Porém suas sementes são fortemente vivíparas, sendo rara a ocorrência de uma semente dormente. Localiza-se no cromossomo 7, à esquerda de *gli*.

$-ps$: difere dos demais pela coloração do endosperma mutante, que ao invés de ser limão ou branco é rosa. As plântulas também tem coloração rosa. Localiza-se no cromossomo 5. Acumula fitoeno, fitoflueno e licopeno.

$-w_3$: produz também endosperma de coloração amarelo limão a branco, sendo o último mais frequente, segregando sementes vivíparas ocasionalmente. Localiza-se no cromossomo 2 e acumula fitoeno, fitoflueno e ζ -caroteno.

$-al$: difere dos demais por produzir quantidades variáveis de tecido branco e verde, nas plântulas. Às vezes a quantidade de tecido

verde é suficiente para que a planta cresça até a maturidade. Localiza-se no cromossomo 2 e também acumula fitoeno, fitoflueno e ζ -caroteno.

$-y_9$: possui invariavelmente endosperma amarelo limão. Normalmente produz plantas verdes, e às vezes plantas verde pálido. Também, neste caso, podem ser obtidas plantas maduras homozigotas, ao contrário dos outros mutantes que são letais. Localiza-se no cromossomo 10. Acumula fitoeno, fitoflueno e ζ -caroteno.

A alteração na coloração do endosperma nesses mutantes, que pode variar de amarelo limão a branco, parece ser determinada por genes modificadores (Robertson, 1975). Estudos demonstraram que o "background" genético altera a coloração do mutante. Robertson notou este fato ao transferir todos esses mutantes de Classe I para a linhagem M14. Nesta, os genes modificadores devem ter se perdido, pois todos os mutantes apresentaram endosperma branco, com exceção de um alelo de vp_9 e y_9 que originaram endosperma limão (Robertson, 1975).

Junto com esse fato, a observação da viviparidade é importante. A sua expressão é variável entre e dentro dos mutantes. Além da influência de fatores ambientais, tais como teor de umidade e estado nutricional da planta, é também possível a ação de genes modificadores na expressão dos mutantes vivíparos (Robertson, 1975).

Com os estudos de expressão desses mutantes, então, a hipótese de que existe uma correlação entre a síntese de carotenóides e viviparidade, sugerida a princípio por Eyster (1931), tem sido confirmada.

Wilson et al (1973) estudando a relação entre a mobilização de material de reserva, condições nutricionais de endospermas e embriões normais e vivíparos (vp_1 e vp_5), chegou às seguintes

conclusões. As mudanças fisiológicas observadas nos embriões vivíparos são semelhantes em sementes vivíparas e normais, diferindo no fato que os embriões vivíparos começam a se desenvolver ainda com endosperma rico em nutrientes solúveis. Além disso, o teor de umidade em embriões vivíparos é maior do que em embriões normais.

Um dado importante para se elucidar alguns aspectos da viviparidade foi a constatação de que embriões imaturos de mutantes da Classe I, como vp_2 , vp_7 , vp_9 e w_3 , possuem níveis reduzidos de ácido abscísico - ABA (Brenner et al., 1977; Smith et al., 1978), e que quando transferidos para meio de cultura contendo ABA têm seu crescimento interrompido (Robichaud et al., 1980; Smith et al., 1978). Isto levou à suposição que estes mutantes poderiam representar bloqueios na via biossintética de ABA.

O ácido abscísico é um regulador de crescimento endógeno da planta, o qual sugere-se está intimamente relacionado com a manutenção do estado de dormência da semente. Além disso, o ABA tem um efeito direto na expressão gênica de embriões em desenvolvimento, pois ABA exógeno inibe a transcrição de genes característicos da germinação (Quatrano et al, 1983) e ativa genes característicos da embriogênese (Dure, 1985).

A via biossintética de ABA tem recebido a atenção dos pesquisadores há mais de trinta anos. Os estudos mais recentes demonstraram a existência de uma via indireta para síntese de ABA em plantas superiores, cujos precursores são as xantofilas, carotenóides oxigenados como a violaxantina e neoxantina (Zeevaart et Creelman, 1988). Esses dados são reforçados com os experimentos envolvendo o uso de inibidores da carotenogênese, como a fluridona, que também inibe a síntese de ABA (Fong et al, 1983; Henson, 1984; Moore et al, 1985); e

com a utilização dos mutantes deficientes em carotenóides de milho para estudos do metabolismo de ABA (Neill et al, 1986). Num estudo mais aprofundado, Parry et al (1990) determinaram que o principal precursor de ABA em plantas superiores é o 9'-cis-neoxantina, sintetizado a partir de trans-violaxantinas.

O fato das vias metabólicas de ABA e carotenóides terem passos comuns, explica a relação entre os mutantes de carotenóides e viviparidade. Em milho, já foram clonados dois genes relacionados com mutações nessas vias: y_1 (Buckner et al, 1990) e vp_1 (McCarty et al., 1989). O gene vp_1 é um dos mutantes que controlam a viviparidade em milho, apesar de não apresentar bloqueio na síntese de carotenóides e ABA (Neill et al, 1987). Porém os embriões mutantes possuem uma baixa sensibilidade ao hormônio (Robichaud et Sussex, 1986), sugerindo que o vp_1 pode ter um efeito regulador (McCarty et al, 1989).

O mutante y_1 apresenta um bloqueio na síntese de carotenóides que ocorre aparentemente só no endosperma, já que as plantas originadas de sementes limão são verdes. Este mutante porém não é vivíparo. Experimentos onde o transposon Mu foi inserido no gene Y_1 deram origem a um alelo, y_1 -*mum*, que origina sementes amarelo limão e plantas verdes, quando crescidas a 25°C, e plantas verde pálido quando crescidas a 35°C. Este alelo alterado, foi utilizado para a clonagem de y_1 (Buckner et al, 1990).

3.2- TRANSPOSONS EM MILHO

Os transposons foram descritos pela primeira vez em milho por Barbara McClintock (1951), que os denominou elementos controladores.

Sabe-se hoje que os transposons são encontrados em todos os organismos estudados, sendo considerados elementos naturais do genoma (Fedoroff, 1983). São distinguidos das demais sequências de DNA pela sua capacidade de se transpor dentro do genoma, através da excisão e inserção. A característica marcante dos transposons é a sua capacidade de condicionar mutações instáveis com fenótipos revertentes, numa frequência elevada. As mutações ocasionadas por eles podem ser revertidas totalmente para o fenótipo selvagem, pela excisão do elemento, ou se tornarem mutações recessivas estáveis devido a excisões imprecisas.

Os transposons são caracterizados por serem elementos com extremidades repetidas invertidas, denominadas TIR, as quais estão ligadas à região codificadora das enzimas necessárias para a transposição. De acordo com a presença ou não de uma etapa envolvendo síntese de RNA durante a transposição, os elementos de transposição podem ser classificados em duas categorias: os transposons e os retrotransposons. Na primeira categoria estão a maioria dos transposons de plantas e bactérias descritos. A segunda categoria inclui aqueles elementos cuja estrutura é igual ou parecida com a dos retrovírus, sendo que já foram descritos em diversos organismos como em fungos, no homem e em milho (Fedoroff, 1989). Em milho, representantes de retrotransposons são o Bsl e o Cin4, cujas regiões codificadoras apresentam homologia com a transcriptase reversa viral (Jonhs et al., 1985; Schwarz-Sommer et al., 1985). A maioria dos sistemas de transposons descritos em milho pertencem à primeira categoria.

Uma propriedade interessante dos transposons é a sua capacidade de estabelecer parâmetros próprios de desenvolvimento. Evidências

genéticas confirmam que a frequência de transposição e o tempo de reversão são regulados pelo próprio elemento (McClintock, 1951, 1956, 1965). Essas variações na função do elemento são detectadas através de padrões de reversões somáticas alteradas, tanto no tempo quanto no espaço, mudanças de estado, ou por inativações reversíveis de elementos inteiros, designados mudança de fase.

Entre os transposons estudados podem ser distinguidos duas categorias de elementos. Os autônomos e os não-autônomos. Um elemento autônomo é capaz de promover a sua excisão e sua transposição independentemente de outros elementos, apresentando um padrão de herança instável da mutação. Um elemento não-autônomo não é capaz de se excisar e transpor por si só, necessitando para tal da presença do elemento autônomo. Isso resulta numa herança estável da mutação ocasionada por ele, na ausência do elemento autônomo. Os elementos autônomos são capazes de ativar um elemento não-autônomo tanto em cis quanto em trans, suprindo-lhe as funções necessárias para ativação da transposição, e também de outros mecanismos genéticos associados com os transposons (Fedoroff, 1983).

A existência de elementos não-autônomos que podem ser ativados forneceram a base para classificação dos transposons. Isso deve-se ao fato de que um elemento não-autônomo só é ativado por um determinado elemento autônomo correspondente (Peterson, 1980). Elementos que interagem entre si e possuem o mesmo modo de ação pertencem a uma mesma família. Em milho há várias famílias de transposons descritas, sendo que as mais conhecidas são: Ac (autônomo)/Ds (não-autônomo); Spm (autônomo)/dSpm (não-autônomo); Dt (dotted); Mu (mutator), como cita Fedoroff, (1983). Outra característica importante é a capacidade de expressão dos transposons. Mesmo em linhagens onde se apresenta

silencioso, podem aparecer plantas expressando a atividade de transposição. Essa ativação pode estar relacionada com uma resposta a um estresse genômico. Este pode ser uma quebra cromossômica ocorrida após a exposição a uma radiação ionizante, ou então decorrente de problemas durante a meiose (Doring e Starlinger, 1985). Uma aplicação prática dos transposons é a possibilidade destes serem utilizados como marcadores genéticos, por isso denominados "tag", para identificação e clonagem de locos gênicos. Este processo, denominado "gene tagging", é um instrumento eficaz na clonagem de genes cujos produto gênico é desconhecido. Em milho, vários locos já foram clonados utilizando transposons. São eles: Bz1, Bz2, A1, C1, P, R, O₂, Vp₁ (Doring, 1989).

3.2.1- Sistemas de Transposons

Dentre os sistemas de transposons em milho, os mais estudados são descritos a seguir.

- Ac/Ds

Este foi o primeiro sistema de transposição descrito, por McClintock (1951). A princípio foi identificado o elemento Ds (Dissociador) como sendo um loco envolvido com sítio de quebras cromossômicas. Em estudos genéticos subsequentes, foi identificado o elemento Ac (ativador) como um elemento capaz de promover a sua inserção e conseqüentemente capaz de causar mutações de herança instável. O elemento Ds (dissociador) foi então caracterizado como sendo um elemento não-autônomo, cujas mutações por ele determinadas só eram instáveis na presença de Ac (McClintock, 1955).

A nível molecular vários elementos Ac e Ds foram identificados e clonados até agora. O elemento Ac tem 4,6 Kb de

comprimento, possui uma extremidade repetida invertida de 11 pares de bases e causa uma duplicação de 8 pares de bases nos sítios de inserção (Muller-Neuman et al., 1984; Pohlman et al., 1984). Codifica um único RNA de 3,5 Kb (Kunze et al., 1987).

A maioria dos elementos Ds clonados representam deleções do elemento autônomo Ac (Fedoroff, 1989), sendo que todos tem em comum a TIR de 11 pares de bases, como é o caso de Ds1 que possui pouco mais do que os 11 pares de bases em comum (Sutton et al., 1984). Todas essas deleções de Ac originando Ds, levam à comprovação de que o produto gênico codificado é essencial para transposição.

Nem todos os elementos Ds são capazes de causar quebras cromossômicas, que são o tipo de alteração mais frequentemente associado com a família. Todos os Ds clonados que levam a isso são estruturalmente semelhantes: possuem 4 Kb de comprimento que consiste de um elemento Ds inserido num segundo. Este "duplo Ds" é constituído de duas cópias idênticas de um Ds, sendo que uma destas cópias está inserida na outra com a orientação invertida (Doring et Starlinger, 1986).

Elementos da família Ac/Ds já foram descritos associados a mutações em diferentes locos, como *wx*, *P^{vu}*, *R^{nj}*, *sh*, *bz*, *Adh*, e citadas por Doring e Starlinger (1986).

-Spm/dSpm

Está é também uma família de dois componentes: Spm (elemento autônomo) e dSpm (elemento defectivo). O sistema foi identificado independentemente por McClintock (1954) e Peterson (1953). Este último chamou o elemento Spm (supressor, mutador) de En (ativador) e o dSpm de I (inibidor). Ambos os sistemas são idênticos a

nível genético e molecular (Masson et al., 1987; Pereira et al., 1986).

O elemento Spm tem 8,3 Kb de comprimento e tem TIR de 13 pares de bases, flanqueando a região codificadora (Masson et al., 1987). A excisão leva a uma duplicação do sítio de inserção de 3 pares de bases. O elemento codifica pelo menos dois produtos, denominados de tnpA e tnpB. A proteína tnpA é codificada por um transcrito de 2,5 Kb. TnpB é codificada por um transcrito de 6 Kb. A transcrição de tnpA, e provavelmente de tnpB, é iniciada a 209 nucleotídeos da extremidade esquerda do elemento, e termina com dois sítios de poliadenilação localizados próximos à extremidade direita. O transcrito de tnpA é o mais abundante, compreendendo 11 exons e 10 introns (Pereira et al., 1986). O primeiro intron possui duas ORF (fases abertas de leitura), as quais provavelmente codificam tnpB. Então provavelmente, os dois transcritos se sobrepõem e representam produtos de processamento alternativo, a partir de um único mRNA (Gierl, Saedler et Peterson, 1989).

Todos os dSpm analisados representam deleções internas de Spm (Fedoroff, 1989), e sua transposição só ocorre na presença do elemento intacto, Spm.

McClintock isolou alguns elementos com função intermediária, aos quais chamou de Spm fraco (McClintock, 1963). Estes ativam a função de transposição numa frequência menor e numa fase tardia do desenvolvimento. Molecularmente este elemento tem uma deleção interna de 1,6 Kb que remove parte das ORFs do primeiro exon (Masson et al., 1987). As propriedades genéticas das mutações ocasionadas pela inserção de dSpm são variáveis. O nome da família se refere ao fato de que uma inserção destes pode levar à inibição total

ou parcial da expressão do gene no qual está inserido, dando origem a fenótipos intermediários entre o normal e o mutante. Este fato pode ser ilustrado observando-se o fenótipo desse tipo de mutação no loco A. Este loco é um dos responsáveis pela síntese de antocianina na aleurona da semente, sendo que o alelo mutante α inibe a síntese desta e a semente é incolor. Quando esta mutação é produzida pela inserção de um elemento dSpm, a semente possui uma coloração pálida, na ausência de Spm. Porém na presença de Spm, a semente é incolor com setores revertentes fortemente pigmentados (Fedoroff, 1983).

De maneira geral, a família Spm/dSpm é caracterizada por elementos ativos durante todo o ciclo de desenvolvimento da planta, e cuja função mutadora se expressa relativamente cedo durante o ciclo. Além disso, a regulação do padrão de expressão do elemento é feita pelo próprio, através de mecanismos variados (Fedoroff, 1989). Geneticamente, o controle da expressão é feito através de dois componentes, denominados fase "setting" e fase "programa". A primeira determina se o elemento está geneticamente ativo ou inativo; e a segunda determina a herança do elemento, isto é, quando, onde e com que frequência ele será revertido durante o desenvolvimento da planta (Fedoroff et Banks, 1988).

O sistema Spm/dSpm foi associado a diferentes locos envolvidos na biossíntese de antocianinas (A, A_1 , Bz, C2) e no loco Wx (Doring et Starlinger, 1986).

-Bg/rbg

Este sistema foi descrito pela primeira vez como sendo responsável pela instabilidade no loco O_2 (opaco-2). Neste sistema, o elemento Bg é o elemento autônomo e o rbg o não autônomo (Salamini,

1981; Montanelli et al., 1984). Somente Bg pode induzir a transposição dele e do rbg.

Foi demonstrado que elementos Bg são encontrados em diferentes localizações nos cromossomos (Montanelli et al., 1984). No entanto, aparentemente, este elemento apresenta uma especificidade pelo loco O_2 (Montanelli et al., 1984). Recentemente, porém, foi identificada uma mutação no loco *waxy* causada pela inserção de um elemento bg (Motto et al., 1989). Além disso, altas taxas de mutação no loco "shrunken" (*sh*) e instabilidades cromossômicas foram verificadas na presença de um sistema Bg/rbg ativo (Marotta et al., 1986; Motto et al., 1987).

-Uq/ruq

O sistema Uq ("ubiquitous")/ruq foi identificado primeiramente em progênies de estoques infectados com o Vírus do Mosaico do Trigo (WSMV). É um sistema de dois elementos, semelhante aos previamente descritos. A atividade de transposição foi primeiramente detectada no loco A_1 , da biossíntese de antocianinas. A inserção neste loco do elemento não-autônomo, ruq, levam ao aparecimento do mutante α -ruq, que origina sementes incolores. Na presença de Uq ativo ocorre a excisão de ruq, verificada através da formação de setores revertentes (roxos) em sementes incolores (Friedman et Peterson, 1982). Mais tarde, o sistema Uq foi utilizado para caracterização genética dos mutantes "miniature" ($Mn :: Uq$), responsáveis pela redução no tamanho do endosperma e embrião da semente (Pan et Peterson, 1989).

Geneticamente é caracterizado por um efeito de dosagem, na regulação dos mecanismos de excisão, onde a presença de dois elementos

Uq no genoma tem uma eficiência maior em promover a excisão do que uma única cópia (Friedman et Peterson, 1982). Além disso, este sistema é um dos mais invasores e persistentes em populações de cruzamento e em testadores de milho (Gierl, Saedler et Peterson, 1989).

O sistema Uq também foi identificado causando instabilidade no loco C, da biossíntese de antocianinas (Oberthur et Peterson, 1984).

-Dt/rDt

Em 1936, Rhoades identificou o gene "dotted", Dt, o qual é responsável pelo fenótipo instável do alelo a_1 (Rhoades, 1936). Na presença deste alelo, a aleurona da semente é incolor com pintas roxas, formando setores revertentes muito pequenos.

Atualmente, sabe-se que Dt é o elemento autônomo de um sistema de transposição. Outros elementos não-autônimos são elementos defectivos, e se transpõe na presença de Dt.

Análises genéticas demonstraram que o sistema Dt difere dos outros sistemas em alguns aspectos. Um deles, é que apesar de Dt ter sido mapeado em diferentes localizações nos cromossomos (Pryor, 1985), somente mutantes do gene A_1 foram associados com a presença de Dt, o que indica uma aparente especificidade. Outro aspecto é que um aumento de dose de Dt leva a um aumento exponencial na taxa de reversão somática (Rhoades, 1936; Nuffer, 1955).

A nível molecular já foi caracterizado e clonado o elemento rDt, responsável pela instabilidade no alelo a_1 . Não há evidências genéticas que este codifique uma proteína, porém a presença de duas ORFs sugerem a probabilidade deste ser parte de uma região codificadora (Brown et al., 1989).

-Mu

Este sistema foi descrito por Robertson (1978). Ele observou o aparecimento de mutantes recessivos, em linhagens, numa frequência elevada. Entre esses mutantes, estão sementes albinas, amarelo limão, plântulas verde pálido, anões, virescentes, etc., sendo que alguns mutantes apresentavam fenótipo instável (Robertson, 1978).

Geneticamente, o sistema Mu (mutador) é caracterizado pela capacidade de indução de mutações em diferentes locos com taxas até 50 vezes mais altas do que os outros sistemas mutacionais. Dessas mutações, 35% são instáveis. Apresenta um padrão de herança não mendeliano, onde 90% das progênes autofecundadas de cruzamentos entre plantas mutadoras e não-mutadoras herdaram atividade mutadora (Robertson, 1978). Os setores revertentes geralmente são pequenos e uniformes, tanto na planta quanto na semente, indicando uma regulação tardia e específica da transposição (Robertson, 1985; Walbot et al., 1985; Bennetzen, 1985).

A regulação da transposição e atividade mutagênica neste sistema parece estar associado ao número de cópias do elemento presente no genoma (Walbot et Warren, 1988; Bennetzen et al., 1987), e à inativação destes por metilação do DNA (Walbot et Warren, 1988).

Em linhagens com atividade mutadora, o número de cópias do elemento aumenta até atingir uma média de 40 a 45 cópias por genoma, porém a atividade mutadora/frequência de transposição diminui (Walbot et Warren, 1988). Em cruzamentos de linhagens com atividade mutadora e linhagens não-mutadoras, as progênes possuem o mesmo número de cópias do parental mutador (Alleman et Freeling, 1986). Já em cruzamentos entre linhagens mutadoras o número de cópias permanece constante,

porém são detectados novos sítios de inserção (Alleman et Freeling, 1986). Concluindo, pode-se afirmar que a alta taxa de transmissão da atividade mutagênica e o aumento da frequência de mutação em linhas mutadoras está associado com um aumento no número de cópias do elemento. Além disso, a capacidade mutagênica aumenta nos cruzamentos entre linhagens mutadoras e diminui com a autofecundação.

Alguns elementos defectivos já foram sequenciados. O mais comum é um fragmento de 1,4 Kb, que foi isolado em mutantes para Adh 1 (Bennetzen et al., 1984). Este elemento, denominado de Mu 1, tem as características estruturais dos demais transposons e foram encontradas muitas cópias nas linhagens mutadoras (Bennetzen et al., 1984). Possui TIR longas com 200 pares de bases, 4 ORFs, e deixa uma cicatriz de 9 pares de bases. Além disso, possui um conteúdo de CG diferente do DNA de milho. Foi encontrado associado, também, a mutações em α_1 (O'Reilly et al., 1985) e Bz 2 (McLaughlin et Walbot, 1987).

Um segundo elemento clonado foi o Mu 1,7, que difere de Mu 1 por uma sequência interna extra de 380 pares de bases (Taylor et al., 1986).

Além desse, dois outros elementos foram clonados a partir de inserções nos locos Adh 1 e waxy (Chen et al., 1987; Wessler et al., 1988). Ambos tem TIRs características de Mu 1 e Mu 1,7, porém diferem na sequência interna.

Nenhum desses elementos já caracterizados parece ser suficientemente grande para codificar uma transposase.

Além desses são encontrados em milho outros sistemas de transposons menos estudados, como Fcu, Cy e Mp (semelhante a Ac).

3.2.2- Mecanismos de Transposição

A estrutura dos transposons possui características comuns e específicas, como as TIRs e as cicatrizes deixadas na excisão, as quais estão associadas com os mecanismos de transposição.

No sistema Spm/dSpm as extremidades possuem, além das 13 pares de bases, algumas regiões com repetições diretas e invertidas de uma sequência de 12 pares de bases (Pereira et al., 1986). Deleções nas TIRs reduzem drasticamente a frequência de excisão de Spm (Schiefelbein et al., 1988). Deleções nas sequências de 12 pares de bases também levam a um decréscimo na frequência de transposição (Tacke et al., 1986), sendo que a deleção total desta elimina a capacidade de excisão do elemento (Gierl, 1989). Essas observações sugerem que as TIRs de 13 pb e as regiões subterminais de 12 pb são substratos para as transposases.

Semelhantemente, para o sistema Ac/Ds a análise de deleções de Ac em plantas de tabaco transgênicas demonstrou que as sequências internas, localizadas entre as posições 44 e 181, são necessárias para a transposição (Coupland et al., 1988). Deleções nos nucleotídeos terminais de uma das TIRs de Ac leva a uma eliminação da excisão (Hehl et Baker, 1989).

De uma maneira geral, estruturalmente os transposons são constituídos de uma região codificadora da transposase e de regiões que servem como substratos para transposição. A inserção, excisão e reinserção de um elemento envolve a interação entre transposase e os sítios de reconhecimento. O elemento sofre a excisão de um sítio doador e se insere num outro sítio alvo, normalmente próximo e no mesmo cromossomo do anterior (Greenblatt, 1984; Nowick et Peterson,

1981). A transposição de Spm e Ac parece ser um processo não-replicativo, sem duplicação do elemento durante a excisão, apesar de estar associada à duplicação do cromossomo (Greenblatt et Brink, 1962; Greenblatt, 1984).

Alguns modelos foram propostos para explicar os mecanismos de transposição:

Um primeiro modelo propõe que para excisão, a transposase reconhece as extremidades do elemento, introduz um "nick" na extremidade da sequência de duplicação, o mesmo ocorrendo para inserção. A cicatriz será produzida como resultado da ação das enzimas de reparo do DNA nas bordas do sítio de excisão e no elemento no sítio receptor (Saedler et Nevers, 1985).

O segundo modelo difere do anterior somente com relação à forma do "nick". Neste, o "nick" é do tamanho da sequência de duplicação, sendo a excisão finalizada através do corte das extremidades. Esse processo daria origem a duas estruturas na forma de grampo, cuja resolução daria origem à cicatriz (Coen et al, 1986).

Um terceiro modelo explica porque a reinserção ocorre frequentemente em sítios próximos ao doador. O corte se dá primeiro em uma das extremidades do elemento, e segue-se uma ligação desta no sítio receptor. Logo após, a outra extremidade é liberada do sítio doador e ligada ao receptor. O corte pode ser feito através de qualquer um dos mecanismos citados (Robbins et al., 1989).

Os dois primeiros modelos supõem a formação de uma estrutura intermediária não ligada ao cromossomo; esta cópia extracromossomal foi encontrada para o transposon Mu (Sundaresa et Freeling, 1987).

3.2.3- Regulação da Transposição

Os eventos de transposição geralmente levam a mutação nos locos onde o elemento se insere e, devido à frequência com que estes ocorrem, resultam numa elevação significativa da taxa de mutação. Esse fato torna necessário a existência de um mecanismo de regulação da frequência de transposição, para níveis que não sejam deletérios para a célula e indivíduo.

Um dos mecanismos relacionados com a regulação da transposição é o controle do número de cópias. Já foi citado anteriormente o controle da atividade mutagênica de Mu através do número de cópias no genoma. Em Ac, foi observado que um aumento no número de cópias do elemento reduz o número de transposições (Schawartz, 1986). Além disso, análises moleculares com sondas de transposons demonstraram que o número de fragmentos hibridizados, por genoma, é característico para cada elemento, em todas as linhagens de milho analisadas (Doring et Starlinger, 1986).

Outro mecanismo importante na regulação é a capacidade do transposon de mudar de um estado ativo para um inativo. Essa mudança de estado pode ser acompanhada fenotipicamente pelo padrão de variegação produzido, principalmente no endosperma da semente: dependendo da duração da inativação, ocorre o aparecimento de sementes sem o padrão de variegação. E se o período se estender por mais de uma geração, fenótipos estáveis podem ser observados (Doring et Starlinger, 1986). Esse padrão de inativação é observado frequentemente em Mu (Bennetzen, 1987; Chandler et Walbot, 1986), Spm (Fowler et Peterson, 1978; McClintock, 1961), Ac (McClintock, 1984). Atualmente, sabe-se que essa mudança de estado está relacionada com modificações a nível de DNA, principalmente o grau de metilação encontrado (Doring et Starlinger, 1986; Gierl, Saedler et Peterson,

1989; Fedoroff, 1989).

A importância da existência dos transposons nos organismos tem sido amplamente discutida. Estudos sobre a distribuição de transposons em populações naturais de milho demonstraram a universalidade da distribuição destes, uma vez que foram encontrados presentes em populações indígenas americanas, colombianas, mexicanas, italianas, e em populações de melhoramento com alta taxa de seleção contra variabilidade (Peterson, 1988). Isso, aliado com a sua capacidade de gerar mutações, fazem dos transposons uma fonte de variabilidade constante, que permite uma flexibilidade para populações na adaptação a mudanças ambientais.

IV- MATERIAL E MÉTODOS

4.1- GERMOPLASMA

Por se tratar de um mutante de carotenóide e vivíparo associado à presença de um transposon, portanto com uma característica ímpar que o distingue dos demais mutantes fisiologicamente semelhantes, passamos a partir deste trabalho a designá-lo vp_{12} .

O mutante vp_{12} se encontra inserido na linhagem L477, desenvolvida pelo Laboratório de Genética de Milho - UNICAMP. Para este estudo foram utilizadas, inicialmente, progênies das Coleções de Verão de 87/88 e 88/89, denominadas L477 (RC₁ x /Ast.op (dt)limão c/ pintas amarelas), daqui para frente denominada L477 vp_{12} .

Para o plantio, em todas as fases da pesquisa, foram utilizadas sementes amarelo normal provenientes de progênies autofecundadas, cujas espigas segregavam sementes com endosperma amarelo normal e limão, essas últimas correspondentes ao mutante em questão.

Em testes genéticos foram usados também alguns mutantes vivíparos, anteriormente descritos, que apresentam características fenotípicas semelhantes a vp_{12} . São eles o vp_2 , vp_5 , vp_9 , al , w_3 e y_9 . Os estoques destes mutantes foram cedidos pelo Prof. Dr. E. Peterson, do Maize Cooperative Program, University of Illinois. O material cedido veio com a seguinte especificação: vp_2 [515A], vp_5 [103D], vp_9 [707D], al [203B], w_3 [218A] e y_9 [X07C].

Os estoques vivíparos foram enviados pelo Maize Cooperative Program em duas ocasiões: Maio/89 e Maio/90. Em ambas, foram enviadas

sementes de progênies semelhantes às citadas ou próximas destas.

As linhagens desenvolvidas no nosso laboratório para se testar algumas famílias de transposons, denominadas linhagens testadoras, foram as seguintes:

- L902 (RC₂ x /Spm tester wx^{m-8})
- L902 (RC₂1 x /Ac tester wx^{m-1})
- L477 (RC₂ x /Spm tester wx^{m-8})
- L477 (RC₂1 x /Ac tester wx^{m-1})

Originalmente, os genes testadores de Spm e Ac, foram cedidos pelo Prof. O. Nelson da University of Wisconsin e pelo Prof. D.S. Robertson da Iowa State University. Esses genes foram introduzidos em linhagens de nosso programa através de uma série de retrocruzamentos até a recuperação final da linhagem original. Em todos os testadores o marcador genético é o loco waxy, cujo alelo mutante é resultado da inserção de um elemento não-autônomo (Ds ou dSpm). O controle da ausência de um elemento autônomo no genoma é feito com autofecundações das linhagens testadoras, cujas progênies segregam sementes waxy na totalidade. O marcador waxy foi escolhido por se tratar de um mutante que se expressa no endosperma, mesmo tecido onde se expressa o vp_{12} .

Para se determinar a relação de dominância foram utilizadas as linhagens L902, L922 e L937 pertencentes ao Laboratório de Genética de Milho - UNICAMP.

4.1.1- Origem do mutante vp_{12}

Durante o verão de 78/79, o Laboratório de Genética de

Milho - UNICAMP, sob responsabilidade do Prof. William José da Silva, mostrou-se interessado na seleção de progênies de milho com grau de protogenia elevado, em função de se produzir tipos com capacidade de tolerância para alta densidade de plantio. Para tal, estava sendo sintetizada uma linhagem de milho do sintético Asteca Prolífico, segregando para o gene *opaque-2*. Naquele ano, entre as progênies selecionadas foram encontradas 3 espigas segregando sementes roxas (antocianina). Estas espigas foram identificadas, plantadas e autofecundadas, na Coleção de 79/80.

As progênies resultantes das autofecundações apresentaram sementes com uma variedade de fenótipos: *opaque-2* com manchas vítreas, roxo pintado, portanto com instabilidade na expressão de antocianina, sementes com manchas opacas no topo e ao redor do germe, e sementes brancas. Estas sementes foram plantadas e autofecundadas na Coleção de 80/81. As sementes com endosperma branco originaram plantas albinas, de onde se inferiu tratar-se de um mutante envolvido na síntese de carotenóides. Porém as sementes amarelas da mesma progênie deram origem a várias famílias, que começaram a ser derivadas na Coleção de Primavera/81. Nessa colheita já foram observadas progênies segregando sementes com endosperma amarelo normal, limão uniforme e limão com manchas amarelo normal.

A partir desse ponto, as progênies segregando sementes com endosperma amarelo e endosperma limão foram sendo autofecundadas anualmente. Como o mutante limão é letal, todo plantio era feito com sementes amarelas de espigas segregantes. Na Coleção de 84/85 a mutação limão foi introduzida na linhagem 477, desenvolvida no Laboratório a partir da população Asteca Prolífico normal. A transferência teve como objetivo o isolamento da mutação em um germoplasma bem adaptado às

condições tropicais, estável, tolerante aos principais patógenos e bastante vigoroso. A viviparidade, associada com a mutação da coloração do endosperma, foi notada pela primeira vez na colheita da Coleção de Verão de 86/87. Isso não significa que a viviparidade não se expressou antes, porém naquele momento ficava mais evidente a expressão do gene.

As observações realizadas nas várias gerações de autofecundação com segregação bem definida, levavam à confirmação de que se tratava de um gene envolvido na síntese de carotenóides e fisiologia de vivíparos. Ficava claro, também, a associação entre o mutante de carotenóide, vivíparo e endosperma limão ou branco fosco com pintas amarelas, o que sugere a presença de um elemento de transposição. Esses fenótipos, aparentemente, eram resultado da inserção de um elemento de transposição, cuja expressão fenotípica característica envolvia a instabilidade e reversão de mutações por ele condicionadas. Como o material original se tratava de uma linha pura, portanto geneticamente homogênea, e sem evidências de qualquer outro tipo de alteração genética, as instabilidades observadas passaram a ser consideradas como resultantes da ação de um transposon.

Paralelamente a esta família, outras progênies irmãs foram isoladas e identificadas. Entre estas foram derivadas famílias que segregavam para diferentes tipos de alterações, tais como sementes "mini-seeds", sementes de coloração bronze, roxo e rosas, instáveis e estáveis, folhas variegadas, plantas braquíticas (anãs) e variegadas.

Todo o trabalho de síntese e identificação do germoplasma acha-se documentado nos Livros de Campo referentes às Coleções citadas.

4.2- METODOLOGIA

4.2.1- Análise Genética do vp_{12}

O objetivo neste ponto foi:

- 1- Determinar o número de genes envolvidos na expressão do mutante
- 2- Estudar o tipo de relação de dominância
- 3- Analisar o tipo de segregação, para observar a possibilidade de ocorrência de desvios de segregação
- 4- Estudar o efeito de outros fatores genéticos além do efeito da transposição
- 5- Analisar a expressão fenotípica do transposon do vp_{12} , tentando-se averiguar a frequência de transposição, a fase do desenvolvimento do endosperma em que ocorre a excisão, bem como o provável número de elementos de transposição envolvidos.

Foram analisadas um total de 30 progênies correspondentes a 10 famílias $L477vp_{12}$, com dois ciclos de autofecundação da Coleção de Verão 87/88, e 14 progênies de 4 famílias $L477vp_{12}$ com 3 ciclos de autofecundação da Coleção de Verão 88/89.

A análise envolveu a identificação e quantificação de 3 classes fenotípicas de sementes encontradas: amarelo normal, limão dormente, com e sem expressão do transposon, e limão vivíparo, com e sem a expressão do transposon. Para determinação do tipo de segregação foram consideradas apenas duas classes fenotípicas: sementes com coloração amarelo normal e sementes com coloração limão, esta última agrupando as demais tonalidades em direção ao branco.

A avaliação fenotípica das sementes mutantes, limão, levou em consideração a frequência de ocorrência de vivíparos, o número e tamanho dos setores revertentes normais (pintas amarelas em fundo limão), além da verificação de ocorrência de sementes vivíparas em endosperma normal.

Completando a análise genética, foram realizados testes de dominância, através de cruzamentos de L477 vp_{12} com linhagens de endosperma normal para expressão de carotenóides.

4.2.2- Testes de Alelismo

Estes testes tiveram o objetivo de se determinar se o alelo vp_{12} pertencia a um loco previamente determinado.

Assim, para se verificar a ocorrência ou não de complementação, foram feitos cruzamentos do mutante vp_{12} com estoques de mutantes análogos, isto é, mutantes com a coloração do endosperma variando de limão a branco, vivíparos, e que originam plântulas albinas, da Classe I de Robertson (1975). Dentre estes, os locos que correspondem fenotipicamente a vp_{12} são: vp_2 , vp_5 , vp_9 , al , w_3 e y_9 , que passam genericamente a serem chamados vp_1 .

Para os cruzamentos os estoques de vp_1 foram plantados em linhas pareadas com o mutante vp_{12} . Para cada estoque vp_1 foi plantada, sempre que possível, uma linha de 20 plantas. Para permitir coincidência no período de florescimento, os estoques vp_1 , em linhagens adaptadas à alta latitude dos EUA, foram plantados 20 dias após o plantio de L477 vp_{12} .

Como os mutantes da Classe I quando em homozigose são letais, todos os testes foram feitos com sementes normais na proporção esperada de 1/3 de sementes homozigotas e 2/3 de heterozigotas. Como

os heterozigotos são fenotipicamente indistinguíveis dos homozigotos dominantes, trabalhou-se com um número mínimo de 10 cruzamentos para obtenção dos F_1 de $vp_{12} \times vp_1$, com uma probabilidade de 94% de se efetuar um cruzamento de dois heterozigotos para os dois locos em questão. O plantio do material foi feito entre 29/08/89 e 18/09/89. O florescimento ocorreu entre 20/11/89 e 15/12/89.

Na análise dos F_1 foram examinadas pelo menos 15 progênes de cada cruzamento envolvendo um dos seis mutantes vp_1 , com o objetivo de se verificar a ocorrência ou não de segregação de sementes do tipo normal e limão, na proporção esperada de 3:1, em caso dos alelos pertencerem ao mesmo loco.

4.2.3- Identificação da Família do Transposon do vp_{12}

4.2.3.1 Cruzamentos testes

A fim de se tentar identificar a família à qual pertence o transposon do vp_{12} , daqui em diante designado T_{12} , foram realizados cruzamentos com linhagens testadoras para duas famílias de transposons conhecidas: Ac/Ds e Spm/dSpm.

Os cruzamentos das Linhagens testadoras \times L477 vp_{12} para obtenção dos F_1 foram feitos pelo Biólogo João Rosolen, em Guaíra - SP, no período de Março/ Junho de 1989, em latitude mais adequada para o crescimento das plantas nessa época do ano. Dentre os F_1 , foram escolhidas 6 progênes de cada cruzamento do vp_{12} com o testador para plantio em linhas separadas. Esse número de famílias dá uma probabilidade de 98 % de se obter pelo menos uma linha proveniente de um F_1 heterozigoto para vp_{12} do tipo $WxwxVp_{12}vp_{12}$, e para o

transposon. Cada linha foi autofecundada e retrocruzada para a linhagem testadora correspondente.

Para a análise da segregação foram examinadas pelo menos 5 progênies F_2 e 10 retrocruzamentos de cada linha segregante coletada. Com isso, foram analisadas pelo menos 20 progênies de retrocruzamentos e 10 F_2 , de cada linhagem testadora. A análise compreendeu o estudo de segregação de sementes normais e *waxy* dentro de cada progênie. Nos retrocruzamentos a segregação esperada foi de 1 normal : 1 *waxy*, e nos F_2 foi de 9 amarelo normal: 3 amarelo *waxy*: 3 limão: 1 limão *waxy*.

4.2.3.2- Testes com Iodina

Para complementar as análises genéticas de segregação e verificar se estava ocorrendo instabilidade no loco *waxy*, fenômeno que indica a presença do elemento autônomo do transposon, nos retrocruzamentos e F_2 , foram realizados testes com iodina, em sementes *waxy*. A iodina (Iugol: 75mg iodina; 400 mg KI / 100 ml) é um corante que permite diferenciar endosperma normal de endosperma *waxy*, com bastante facilidade (Schwartz, 1982). O endosperma normal, devido à presença do alelo *Wx*, é composto de amido com aproximadamente 25% de amilose, e apresenta uma coloração azul forte em reação à iodina devido à presença de amilose. Já o endosperma *waxy*, *wxwxwx*, não possui amilose e apresenta uma coloração vermelho castanho com iodina, que é a própria coloração do corante. A presença de transposons em sementes *wxwxwx* produziria uma instabilidade no loco, originando setores com amilose, ilhados na amilopectina, que na presença de iodina dariam setores azul escuro, típico do endosperma normal, no fundo vermelho castanho, do endosperma *waxy*.

Para os testes foram tomadas ao acaso 20 sementes de cada espiga, dos retrocruzamentos avaliados anteriormente, segregando para vp_{12} , num total de pelo menos 1200 sementes para cada testador Ac/Ds ou Spm/dSpm. Foram testadas também sementes de endosperma limão/waxy, dos F_2 . Entre estas havia sementes que apresentavam instabilidade no transposon de vp_{12} , isto é, sementes com endosperma limão/waxy com setores revertentes amarelo normal, indicando a presença inequívoca da atividade deste transposon no endosperma. As sementes foram previamente lixadas nas superfícies para retirada do pericarpo e possibilitar a penetração do corante mais facilmente no endosperma.

4.2.4- Análise do Efeito do Transposon do vp_{12} em Genes Análogos

Este trabalho foi feito com o objetivo de se estudar a possibilidade do transposon vp_{12} afetar a expressão dos genes análogos vp_i . Para tanto foram plantadas as progênes F_1 ($vp_{12} \times vp_i$) e os estoques de vp_i correspondentes. A fim de se ter uma probabilidade de 99% de se obter pelo menos uma progênie que representasse o genótipo desejado, $vp_{12}vp_{12}vp_ivp_i$, foram plantadas 8 progênes F_1 de cada cruzamento em linhas separadas. O plantio foi feito em 16/02/90.

O trabalho de polinização deste campo foi seriamente prejudicado por problemas com a germinação dos estoques americanos, falta de sincronia no florescimento, e condições climáticas adversas. Em vista disso, optou-se por repetir o experimento, utilizando-se num outro plantio os F_2 obtidos.

Na colheita, foram selecionados F_2 segregantes para os dois locos, isto é, espigas com sementes de endosperma normal e limão na proporção de 9:7, derivadas da segregação independente dos dois locos,

já que ambos condicionam fenótipos bastante semelhantes. Pareados aos F_2 foram plantados os estoques de vp_1 correspondentes. O plantio foi feito em 3/09/90 e o florescimento ocorreu entre 9/11 a 20/11/1990.

Para a análise dos dados foram considerados, dentro de cada cruzamento com vp_1 , todas progênies disponíveis dos retrocruzamentos e autofecundações. A avaliação foi feita levando-se em conta a identificação de sementes amarelo normal e limão, com e sem viviparidade, para a determinação do tipo de segregação e comparação com a segregação esperada.

4.2.5- Cruzamentos Dialélicos

A fim de se obter informações sobre os mecanismos de transposição do transposon do vp_{12} , foram realizados cruzamentos entre progênies estáveis de endosperma normal derivadas de famílias de $L477vp_{12}$.

Com isso pretendeu-se verificar a ocorrência de elementos inativos do transposon do vp_{12} em progênies normais estáveis através da possível ativação destes a partir de complementação com elementos complementares presentes na outra progênie, também estável.

Para tal, foram plantadas 20 linhas com sementes de endosperma normal, provenientes de espigas 100% amarelas, e com endospermas bem uniforme. Estas espigas eram provenientes de sementes amarelas de espigas segregantes amarelo e limão em famílias de $L477vp_{12}$ autofecundadas. Cerca de 5 progênies amarelo estáveis de famílias diferentes foram cruzadas entre si, em um esquema dialélico com polinizações recíprocas. Portanto um total de 15 famílias de F_1 foram produzidas, cada uma com os dois recíprocos correspondentes. Este experimento foi incluído na Coleção de Verão 89/90.

V- RESULTADOS

5.1- ANÁLISE GENÉTICA DA MUTAÇÃO

Para a análise genética do mutante vp_{12} foram avaliadas progênes de famílias com dois, S_2 , e três, S_3 , ciclos de autofecundações. Foram consideradas diferentes classes fenotípicas associadas com o mutante, notadamente sementes com endosperma amarelo normal e limão. Nestas últimas verificou-se a ocorrência de sementes limão uniformes (estáveis) e sementes limão com um, ou raramente dois, setores amarelo normal (instáveis) (Figura 1). Além destas duas classes de sementes, ocorreram também sementes limão com e sem embriões vivíparos (Figura 2).

Para a caracterização do tipo de herança da mutação, e identificação do número de locos envolvidos, é necessário a determinação do padrão de segregação. Para o vp_{12} a simples observação das classes fenotípicas citadas anteriormente confirmou a correlação entre sementes de endosperma limão e viviparidade, já que sementes vivíparas só se expressam em endosperma limão, portanto deficientes em carotenóides, semelhantemente a outros vivíparos da Classe I citados por Robertson (1975). Dessa maneira, para determinação do padrão de segregação, os diferentes tipos de sementes limão, ou seja limão sem expressão do transposon (limão uniforme) e sementes limão com expressão do transposon (setor amarelo em fundo limão), foram considerados como uma única classe fenotípica.

Os resultados das análises das famílias S_2 e S_3 de $L477vp_{12}$ estão apresentados, respectivamente, nas tabelas I e II. Nestas, foram agrupados os valores das progênes individuais dentro da mesma

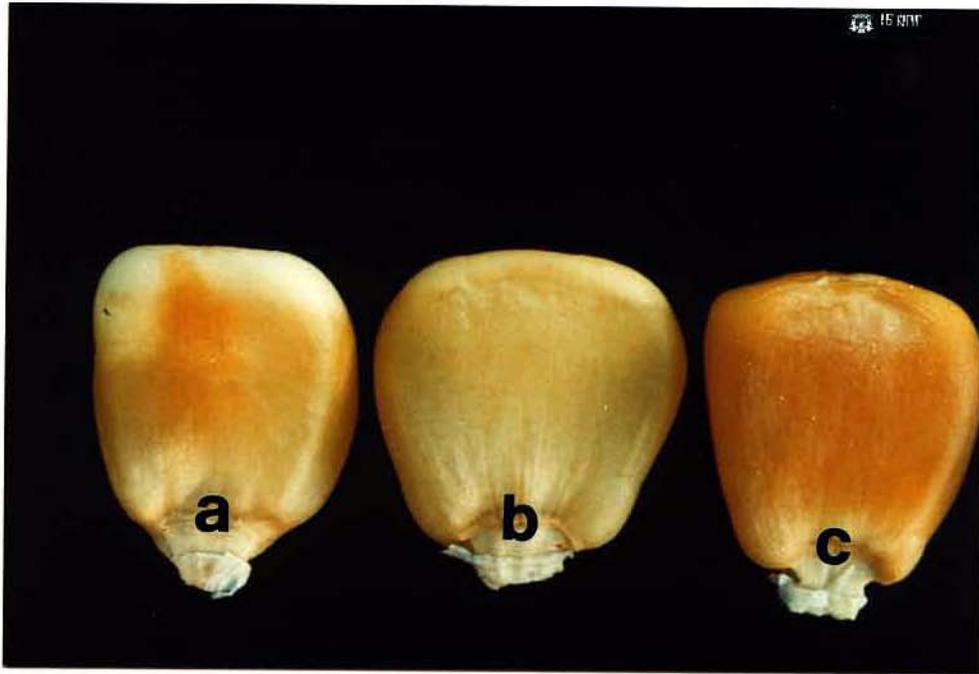


Figura 1- Principais classes fenotípicas observadas segregando em uma progênie autofecundada de $L477v\rho_{12}$. Semente "a"- endosperma limão, instável, com setor revertente normal; semente "b"- endosperma limão estável; semente "c"- endosperma normal. Obs: A fim de se obter um contraste ideal na fotografia, foi escolhida uma semente instável (a) com setor maior do que o comumente observado.



Figura 2- Variação observada na expressão da viviparidade em sementes com endosperma limão, de progênes autofecundadas de L477vp₁₂. São encontradas desde sementes dormentes (c) até sementes com formação de folículos (a,b).

família. Observa-se da Tabela I que com exceção da família 813 com $\chi^2 = 5,67^*$, nenhuma outra família analisada apresentou desvios significativos da proporção esperada para uma herança monofatorial da mutação. Um outro desvio significativo foi encontrado na análise do total de sementes avaliadas das progênes com dois ciclos de autofecundação, com um $\chi^2 = 5,75^*$ (Tabela I). Para se entender a possível causa destes desvios observados, tanto para a família 813 quanto para o total, foram feitos os testes de Heterogeneidade, para se verificar a homogeneidade da segregação nas progênes dentro e entre famílias. Nas tabelas I e II, o Teste de Heterogeneidade (Het.) se refere à homogeneidade das progênes dentro de uma mesma família. O valor H_{total} se refere à homogeneidade entre as famílias analisadas. Os testes foram significativos em ambos os casos para os desvios da segregação de 3:1, $\chi^2_{Het} = 8,08^*$, para a família 813, e $\chi^2_{Het} = 18,52^*$, para o total de sementes estudadas.

Os dados das Tabelas I e II indicam que todas as famílias, com exceção da 813, mostraram segregação do tipo 3:1. E nesta última, somente uma espiga apresentou desvios da segregação esperada. Também os χ^2 para heterogeneidade de progênes dentro das famílias foram significativos em 5 das 14 estudadas. As diferenças dentro dessas famílias podem ser atribuídas tanto ao número de sementes analisadas como a outros fatores genéticos associados ao loco em questão. A heterogeneidade total significativa é consequência das discrepâncias observadas nas famílias com desvios da segregação de 3:1. Os desvios de segregação de 3:1 no total de sementes com duas gerações de autofecundação deram um $\chi^2 = 5,75^*$ (Tabela I), provavelmente em função dos desvios ocorridos na família 813.

TABELA I- Padrão de segregação de sementes amarelas normais e limão, com (t^+) e sem (t^-) a expressão do transposon T_{12} , em famílias de $L477vp_{12}$, com dois ciclos de autofecundação. Os X^2 com 1 grau de liberdade se referem à segregação esperada de 3:1. O X^2_{Het} se refere ao teste de heterogeneidade.

FAMÍLIA	N ^o ESPIGAS	AMARELAS	LIMÃO			$X^2_{gl=1}$	$X^2_{Het.}$
			(t^+)	(t^-)	total		
812	4	800	26	241	267	0,05 ns	0,55 ns(3) ^a
813	4	633	44	128	172	5,67*	8,08* (3)
814	2	358	37	67	104	1,53 ns	3,18 ns(1)
815	2	329	40	73	113	0,07 ns	0,39 ns(1)
817	3	671	31	188	219	0,07 ns	4,44 ns(2)
818	4	707	44	185	229	0,19 ns	6,75 ns(3)
819	2	335	35	59	94	2,18 ns	5,12* (1)
821	2	357	42	67	109	0,78 ns	0,80 ns(1)
822	6	1225	105	277	382	1,50 ns	16,19** (5)
823	1	179	14	43	57	0,09 ns	-
TOTAL		5594	418	1328	1746	5,75*	18,52* (9)

Obs: a - graus de liberdade

ns - não significativo a nível de 5%

* - significativo a nível de 5%

** - significativo a nível de 1%

TABELA II- Padrão de segregação de sementes amarelas normais e limão, com (t⁺) e sem (t⁻) a expressão do transposon T₁₂, em famílias de L477vp₁₂, com três ciclos de autofecundação. Os X² com 1 grau de liberdade se referem à segregação esperada de 3:1. O X²_{Het} se refere ao teste de heterogeneidade.

FAMÍLIA	N ^o ESPIGAS	AMARELAS	LIMÃO			X ² _{gl=1}	X ² _{Het.}
			(t ⁺)	(t ⁻)	total		
939	4	765	53	215	268	0,49 ns	3,69 ns(3) ^a
940	2	495	16	133	149	1,24 ns	4,46 ns(1)
942	5	1121	58	354	412	2,87 ns	44,63** (4)
943	3	818	32	228	260	0,44 ns	6,29* (2)
TOTAL		3200	159	930	1089	0,35 ns	9,76* (9)

Obs: a - graus de liberdade

ns - não significativo a nível de 5%

* - significativo a nível de 5%

** - significativo a nível de 1%

Pelo exposto fica evidente que o mesmo tipo de segregação observada nas progênies com duas gerações de autofecundação (Tabela I) também ocorre nas progênies com três gerações de autofecundação (Tabela II). Os dados de segregação de um total de 11.629 sementes, agrupando-se as progênies com duas e três autofecundações, mostram que não há evidências para rejeitar a hipótese de que as sementes amarelas e limão apresentam segregação de 3:1. Isso indica a ocorrência de uma herança monofatorial no loco vp_{12} .

A observação do fenótipo das sementes e espigas das progênies de diferentes famílias de vp_{12} aparentemente não evidenciou a ocorrência de outros tipos de alterações genéticas, como quebras cromossômicas, translocações, que poderiam estar associadas a vp_{12} . Isso é evidenciado pela produção de espigas bem granadas, sem falhas com sementes de tamanho normal e uniformes, sem a presença de "miniseeds", e fileiras de grãos completas e alinhadas. As plantas adultas provenientes destas sementes também não apresentaram nenhum outro tipo de alteração fenotípica detectável visualmente.

A frequência de ocorrência de sementes com endosperma limão e vivíparo não foi considerada uma vez que foram observadas desde progênies de sementes limão com ausência de vivíparos até praticamente 100% de expressão, e essa expressão é dependente de fatores não genéticos (Robertson, 1975).

Para o estudo da caracterização fenotípica da expressão do transposon inserido no loco vp_{12} foram avaliadas as sementes com coloração limão com, e sem a instabilidade no loco, caracterizado, respectivamente, pela existência ou não de setores revertentes amarelo normal em fundo limão (Figura 1). Essa análise fenotípica da

instabilidade demonstrou que os setores revertentes normais em sementes com endosperma limão são únicos, raramente ocorrendo dois setores numa mesma semente. Esses setores, normalmente de tamanho reduzido, tem coloração amarela igual à da semente normal, não apresentando variação na tonalidade. A frequência de tipos revertentes variou de 0,10 a 0,38 em S_2 e de 0,11 a 0,20 em S_9 , dando uma frequência média de 24% de transposição em famílias S_2 e 15% em famílias S_9 . Como a segregação no loco vp_{12} foi do tipo 3 amarelo normal, para 1 limão, conclue-se que o tipo limão é uma característica recessiva e que o setor revertente amarelo corresponde às células onde ocorreu a excisão do transposon do loco vp_{12} .

Os testes de dominância também comprovaram que a mutação é de caráter recessivo, já que todos os cruzamentos de $L477vp_{12}$ com linhagens normais resultaram progênies normais.

5.2- TESTES DE ALELISMO

O mutante vp_{12} sem setores revertentes tem fenótipo bastante semelhante aos outros mutantes da Classe I (Robertson, 1975). Isso levantou a dúvida se realmente tratava-se de um novo mutante ou se era um dos descritos, que agora se apresentava com a inserção de um transposon. Para testar essa hipótese foram realizados os testes de alelismo envolvendo todos os mutantes que apresentam as mesmas características fenotípicas deste, ou seja, a deficiência em carotenóides no endosperma e na planta, e a viviparidade. Se o vp_{12} fosse um dos genes testados, então as progênies derivadas do cruzamento entre dois heterozigotos deveriam apresentar segregação de

3:1 para as características citadas.

Na Tabela III estão relacionadas as progênies resultantes do cruzamento de indivíduos portadores do vp_{12} com indivíduos portadores de vp_1 ou seja, vp_2 , vp_5 , vp_9 , al , w_3 e y_9 . Nenhuma das progênies, dentre os cruzamentos realizados, apresentou segregação de sementes normais e limão. O número de progênies analisadas para cada cruzamento variou de 15 a 20 para cada mutante. Esse número é suficiente para que os cruzamentos envolvessem heterozigotos para ambos os locos com probabilidade de 95%. Esses dados indicam que o gene vp_{12} é diferente dos seis testados.

5.3- IDENTIFICAÇÃO DA FAMÍLIA DO TRANSPOSON DE vp_{12}

Os testes entre as linhagens testadoras para as famílias de transposons Ac/Ds e Spm/dSpm e a linhagem L477 vp_{12} foram realizados para verificar se o transposon de vp_{12} pertence àquelas famílias. A análise foi feita tanto com auxílio de retrocruzamentos para a para a linhagem testadora, como das autofecundações, na geração F_2 . Para tal, considerou-se, nos retrocruzamentos, o aparecimento das classes fenotípicas amarelo normal, *waxy* e *waxy* revertente (Tabela IV). Já para os F_2 consideraram-se as classes fenotípicas amarelo normal, *waxy*, limão normal e limão *waxy* (Tabelas V e Figura 3). Os dados das contagens de todas as progênies das diferentes famílias de cruzamentos estão agrupados, para cada linhagem testadora.

As segregações para sementes normal e *waxy* mostraram que não há desvios significativos nas proporções esperadas, 1:1 em retrocruzamentos e 9:3:3:1 nos F_2 , com exceção dos cruzamentos com a linhagem 477 Ac/Ds. Esta última apresentou desvios significativos

TABELA III- Progênes obtidas do cruzamento de plantas L477 vp_{12} , provenientes de sementes amarelas de espigas segregantes, com plantas provenientes de sementes amarelas de espigas segregantes para os diferentes estoques de vp_1 .

GENES NO CRUZAMENTO	P R O G Ê N I E S		
	TOTAL	NORMAIS	SEGREGANTES
vp_{12} e vp_2	16	16	0
vp_{12} e vp_5	15	15	0
vp_{12} e vp_9	15	15	0
vp_{12} e al	17	17	0
vp_{12} e w_3	20	20	0
vp_{12} e y_9	20	20	0

TABELA IV- Padrão de segregação dos "testcrosses" de cruzamentos com as diferentes linhagens testadoras, considerando-se as classes formadas de sementes normais, waxy estável e waxy instável, wx-(m) Os X^2 referem-se à segregação do tipo 1:1 e o X^2_{Het} refere-se ao teste de heterogeneidade.

TESTADOR	N ^o . DE PROGÊNIES	SEMENTES			$X^2_{gl=1}$	$X^2_{Het.}$
		NORMAIS	WAXY	wx-(m)		
L902 Spm/dSpm	50	8911	8694	0	3,19 ns	33,61 ns(49) ^a
L902 Ac/Ds	40	7467	7475	0	0,05 ns	41,09 ns(39)
L477 Spm/dSpm	12	1767	1732	0	0,35 ns	8,90 ns(11)
L477 Ac/Ds	20	2829	2683	0	3,85*	16,78 ns(19)

Obs: a - graus de liberdade

ns - não significativo a nível de 5%

* - significativo a nível de 5%

TABELA V - Padrão de segregação de progênies F_2 resultantes da autofecundação do cruzamento de L477 νp_{12} com as linhagens testadoras considerando-se as classes formadas de sementes normais, waxy, limão e limão waxy. Os X^2 referem-se à segregação do tipo 9:3:3:1 e os X^2_{Het} referem-se ao teste de heterogeneidade.

TESTADOR	NORMAIS	WAXY	LIMÃO	LIMÃO/WAXY	X^2_{1gl}	$X^2_{Het.}$
L902 Spm/dSpm	3825	1229	1311	410	1,82 ns	57,48 ns(51) ^a
L902 Ac/Ds	3973	1260	1421	447	3,97 ns	46,31 ns(48)
L477 Spm/dSpm	1843	569	591	172	6,51 ns	28,38 ns(24)
L477 Ac/Ds	2065	612	755	214	8,45*	37,85 ns(27)

Obs: a - graus de liberdade

ns - não significativo a nível de 5%

* - significativo a nível de 5%

tanto em retrocruzamentos, $\chi^2 = 3,85$, quanto em autofecundações, $\chi^2 = 8,45$. Os testes de heterogeneidade não foram significativos, indicando que as progênies são homogêneas com relação ao padrão de segregação. O teste de heterogeneidade se refere à homogeneidade nas progênies analisadas para um mesmo testador. É importante citar que os desvios obtidos são desvios surgidos em espigas individuais em duas progênies, tanto em retrocruzamentos como em F_2 .

Os testes com iodina para se detectar instabilidades, através da detecção de setores revertentes ocasionados pela presença de amilose, não percebidas visualmente, foram avaliados num total de 1240 sementes dos retrocruzamentos e 350 sementes das autofecundações, nos testes de Ac/Ds. Já para os testes de Spm/dSpm foram analisadas 1200 sementes dos retrocruzamentos e 300 sementes das autofecundações.

Todos os testes tiveram resultados semelhantes, para a coloração das sementes, isto é, o endosperma das sementes analisadas coloriu-se uniformemente de vermelho castanho, característico de endosperma waxy, indicando que não ocorreu excisão de Ds ou dSpm do loco waxy. Esses dados revelam que o transposon do vp_{12} não apresenta homologia com elementos de transposição das famílias Ac/Ds e Spm/dSpm.

5.4- Análise do Efeito do Transposon de vp_{12} em Genes Análogos

O efeito do transposon de vp_{12} na expressão de genes análogos foi estudado através de possíveis alterações do padrão de segregação obtido, tanto em retrocruzamentos como em geração F_2 , dos F_1 portadores dos genes vp_{12} e vp_1 . As frequências esperadas em 3 casos estudados são mostradas no Quadro I. As proporções esperadas baseiam-se no fato que o transposon T_{12} não afeta a expressão dos



Figura 3- Setor de uma progênie F_2 , autofecundação de F_1 do cruzamento (L477vp₁₂ x L477 testadora de Ac/Ds), mostrando as classes de sementes observadas, amarelo normal, normal waxy, limão e limão waxy. A seta indica um setor revertente amarelo normal em endosperma limão waxy.

dos genes análogos.

As frequências esperadas do Quadro I foram usadas para o teste de hipóteses envolvendo F_2 e retrocruzamentos em combinações do alelo vp_{12} com os genes vp_2 , vp_5 , vp_9 , al , w_3 e y_9 , presentes respectivamente nas Tabelas de VI a XI. Com exceção de três progênies dos cruzamentos de $vp_{12} \times vp_9$ (Tabela VIII), todas as demais mostraram desvios não significativos das proporções esperadas. Não foi possível se obter nenhum retrocruzamento para o estoque do al (Tabela IX), devido a problemas de coincidência de florescimento durante a polinização.

Os desvios encontrados nos retrocruzamentos para o estoque vp_9 , $\chi^2 = 11,8127$ e $28,5882$, e nos F_2 , $\chi^2 = 6,3805$ e $4,2453$, podem ser atribuídos à segregação de outros fatores como genes modificadores, ou segregação de outro loco para limão diferente dos dois em questão, ou diferenças na regulação da biossíntese de carotenóides, diferentes do transposon do vp_{12} .

5.5- Análise dos Cruzamentos Dialélicos Para esta análise foram observadas pelo menos 10 progênies de cada cruzamento dialélico, envolvendo as 5 linhas L477 derivadas de sementes amarelo estáveis obtidas em autofecundações de progênies normais, da mesma família de espigas segregando para o homocigoto $vp_{12}vp_{12}$. As linhagens estáveis foram assim derivadas na expectativa de conterem elementos de transposição inativados. Cerca de 10 autofecundações das 5 linhagens também foram obtidas para posterior comparação. Todas as espigas analisadas, dos 10 cruzamentos dialélicos, apresentaram fenótipo amarelo normal uniforme, e sem evidências de outras alterações

genéticas, tais como sementes abortadas ou outras irregularidades na formação das fileiras de grãos, ou outros tipos de mutações de endosperma.

QUADRO I- Casos estudados de segregações esperadas em progênie dos três possíveis F_1 portadores dos alelos mutantes nos locos vp_{12} e/ou vp_1 , autofecundados (F_2) e de seus retrocruzamentos (RC) com os estoques de vp_1 de genótipo $Vp_{12}Vp_{12}Vp_1vp_1$, baseados na incapacidade do T_{12} ativar a transposição nos vários locos vp_1 .

CASO	F_1	PROGÊNIE	ENDOSPERMA	
			NORMAL	LIMÃO
1	$Vp_{12}vp_{12}Vp_1vp_1$	F_2	9/16	7/16*
		RC	3/4	1/4
2	$Vp_{12}vp_{12}Vp_1Vp_1$	F_2	3/4	1/4*
		RC	1	0
3	$Vp_{12}Vp_{12}Vp_1vp_1$	F_2	3/4	1/4
		RC	3/4	1/4

Obs: * - segregam sementes limão com o transposon T_{12} .

TABELA VI - Segregações observadas em progênies autofecundadas, F_2 , provenientes de F_1 (477 νp_{12} x Estoque de νp_2) e nos retrocruzamentos, RC, desse F_1 com o estoque de νp_2 . O teste de X^2 refere-se às segregações esperadas, mostradas no Quadro I.

CRUZAMENTO	PROGENIE	SEMENTES		PROPORÇÃO ESPERADA	$X^2_{gl=1}$
		NORMAL	LIMÃO		
F_2	90-1	234	94	3:1	2,34 ns
	90-2	182	146	9:7	0,08 ns
	90-3	228	160	9:7	1,24 ns
RC	90x91-1	228	75	3:1	0,01 ns
	90x91-2	159	43	3:1	1,48 ns
	90x91-3	142	52	3:1	0,34 ns
	90x91-4	92	35	3:1	0,44 ns
	90x91-5	55	21	3:1	0,28 ns
	90x91-6	69	21	3:1	0,13 ns
	90x91-7	134	36	3:1	1,32 ns

Obs: ns - não significativo a nível de 5%

TABELA VII-Segregações observadas em progênies autofecundadas, F_2 , provenientes de F_1 (477vp₁₂ x Estoque de vp₅) e nos retrocruzamentos, RC, desse F_1 com o estoque de vp₅. O teste de χ^2 refere-se às segregações esperadas, mostradas no Quadro I.

CRUZAMENTO	PROGENIE	SEMENTES		PROPORÇÃO ESPERADA	$\chi^2_{gl=1}$
		NORMAL	LIMÃO		
F_2	92-1	243	85	3:1	0,15 ns
	92-2	170	136	9:7	0,05 ns
	92-3	142	138	9:7	3,49 ns
	92-4	271	84	3:1	0,34 ns
	92-5	206	154	9:7	0,14 ns
RC	92x93-1	47	18	3:1	0,25 ns
	92x93-2	139	39	3:1	0,91 ns
	92x93-3	48	15	3:1	0,19 ns
	92x93-4	58	21	3:1	0,10 ns
	92x93-5	55	19	3:1	0,02 ns
	92x93-6	121	32	3:1	1,36 ns

Obs: ns - não significativo a nível de 5%

TABELA VIII - Segregações observadas em progênies autofecundadas, F_2 , provenientes de F_1 ($477v\rho_{12}$ x Estoque de $v\rho_9$) e nos retrocruzamentos, RC, desse F_1 com o estoque de $v\rho_9$. O teste de X^2 refere-se às segregações esperadas, mostradas no Quadro I.

CRUZAMENTO	PROGENIE	SEMENTES		PROPORÇÃO ESPERADA	$X^2_{gl=1}$
		NORMAL	LIMÃO		
F_2	94- 1	242	169	9:7	1,16 ns
	94- 2	203	150	9:7	0,23 ns
	94- 3	206	120	9:7	6,38*
	94- 4	187	160	9:7	0,78 ns
	94- 5	262	96	3:1	0,63 ns
	94- 6	221	80	3:1	0,40 ns
	94- 7	347	99	3:1	1,87 ns
	94- 8	235	160	9:7	1,69 ns
	94- 9	165	107	9:7	2,15 ns
	94-10	108	51	3:1	4,24*
RC	94x95-1	94	11	3:1	11,81**
	94x95-2	129	7	3:1	28,59**

Obs: ns - não significativo a nível de 5%

* - significativo a nível de 5%

** - significativo a nível de 1%

TABELA IX- Segregações observadas em progênies autofecundadas, F_2 , provenientes de F_1 (477 $\nu\rho_{12}$ x Estoque de al) e nos retrocruzamentos, RC, desse F_1 com o estoque de al. O teste de χ^2 refere-se às segregações esperadas, mostradas no Quadro I.

CRUZAMENTO	PROGENIE	SEMENTES		PROPORÇÃO ESPERADA	$\chi^2_{gl=1}$
		NORMAL	LIMÃO		
F_2	96- 1	178	53	3:1	0,52 ns
	96- 2	57	43	9:7	0,02 ns
	96- 3	104	32	3:1	0,16 ns
	96- 4	231	164	9:7	0,80 ns
	96- 5	155	129	9:7	0,32 ns
	96- 6	252	72	3:1	1,33 ns
	96- 7	225	64	3:1	1,26 ns
	96- 8	248	65	3:1	2,99 ns
	96- 9	181	134	9:7	0,19 ns
	96-10	258	82	3:1	0,14 ns

Obs: ns - não significativo a nível de 5%

TABELA X- Segregações observadas em progênies autofecundadas, F_2 , provenientes de F_1 (477vp₁₂ x Estoque de w_3) e nos retrocruzamentos, RC, desse F_1 com o estoque de w_3 . O teste de χ^2 refere-se às segregações esperadas, mostradas no Quadro I.

CRUZAMENTO	PROGENIE	SEMENTES		PROPORÇÃO ESPERADA	$\chi^2_{gl=1}$
		NORMAL	LIMÃO		
F_2	98- 1	206	187	9:7	2,34 ns
	98- 2	138	83	3:1	0,25 ns
	98- 3	169	52	3:1	1,46 ns
	98- 4	176	138	9:7	0,01 ns
	98- 5	257	73	3:1	1,46 ns
	98- 6	135	120	9:7	1,13 ns
	98- 7	261	93	3:1	0,30 ns
	98- 8	176	142	9:7	0,10 ns
	98- 9	207	155	9:7	0,13 ns
	98-10	206	157	9:7	0,04 ns
RC	98x99-1	86	27	3:1	0,07 ns
	98x99-2	167	62	3:1	0,52 ns
	98x99-3	99	38	3:1	0,55 ns
	98x99-4	74	24	3:1	0,01 ns
	98x99-5	45	13	3:1	0,21 ns

Obs: ns - não significativo a nível de 5%

TABELA XI - Segregações observadas em progênies autofecundadas, F_2 , provenientes de F_1 (477vp₁₂ x Estoque de y_9) e nos retrocruzamentos, RC, desse F_1 com o estoque de y_9 . O teste de X^2 refere-se às segregações esperadas, mostradas no Quadro I.

CRUZAMENTO	PROGENIE	SEMENTES		PROPORÇÃO ESPERADA	$X^2_{gl=1}$
		NORMAL	LIMÃO		
F_2	100-1	202	67	3:1	0,01 ns
	100-2	152	133	9:7	0,98 ns
	100-3	186	71	3:1	0,94 ns
	100-4	108	95	9:7	0,77 ns
	100-5	100	70	9:7	0,46 ns
	100-6	267	99	3:1	0,82 ns
	100-7	130	92	9:7	0,48 ns
	100-8	212	90	3:1	3,71 ns
	100-9	212	62	3:1	0,82 ns
RC	55x60-1	319	90	3:1	1,96 ns
	55x60-2	302	89	3:1	1,04 ns
	55x60-3	248	82	3:1	0,01 ns

Obs: ns - não significativo a nível de 5%

VI- DISCUSSÃO

6.1- ANÁLISE GENÉTICA DA MUTAÇÃO

O aparecimento de mutações em organismos vivos tem sido associado com a ação de agentes externos ao indivíduo, tais como radiações, e agentes químicos, que levam a erros durante a síntese do DNA. Essa interpretação é tão convincente que um bom número de geneticistas tem considerado importante a reprodução desses efeitos em laboratório, produzindo mutações através da utilização de diversos agentes mutagênicos. Nestes últimos anos, entretanto, a descoberta de mecanismos intracelulares, controlados pelos próprios genes, para gerar variabilidade genética, tem ampliado a visão da não continuidade do gene. Nesse contexto estão os transposons, cuja presença em todos os organismos estudados por si só é suficiente para demonstrar a sua importância em estudos de Genética e Evolução das espécies.

É nesse aspecto que se pretende contribuir com o presente trabalho, através da demonstração de peculiaridades de um mutante produzido sob a ação de um transposon. O mutante em questão, denominado vp_{12} , chamou logo a atenção dos integrantes do Laboratório de Genética de Milho - UNICAMP, quando foi notado pela primeira vez, por se tratar de um mutante que surgiu espontaneamente numa linhagem pura, isto é, num material geneticamente uniforme que havia sofrido endogamia e selecionado para estabilidade fenotípica em geral, visando a produção de uma linhagem estável. Além disso, esse material não havia sido submetido a nenhum agente mutagênico, como foram os casos para obtenção da maioria dos mutantes de carotenóides e vivíparos

análogos (Robertson, 1955). Logo, a mutação em vp_{12} foi originada a partir de mecanismos intrínsecos do genoma da linhagem. Logo no início, alguns cruzamentos recíprocos, posteriormente autofecundados, indicaram que a instabilidade fenotípica era de origem nuclear.

Nas várias gerações sucessivas de retrocruzamentos e autofecundações para a síntese da linhagem L477 vp_{12} ficou evidente que a instabilidade fenotípica, caracterizada por setores revertentes amarelo normal em endosperma limão, somente ocorria em progênies que segregavam o mutante. Por outro lado, os vivíparos só ocorriam em sementes amarelo limão, com ou sem expressão do transposon. Logo a reversão genética deve estar associada ao mutante de carotenóide, e este à viviparidade. Essa associação da instabilidade fenotípica em sementes amarelo limão ocorre em alta frequência e não pode ser atribuída a mutações somáticas esporádicas e de baixa frequência, que ocorrem num determinado tecido. Ao contrário, a alta frequência detectada é semelhante a outras tantas que tipicamente caracterizam a ação dos transposons (Wessler, 1988). O fato de ocorrerem sementes de endosperma limão sem setores revertentes também deve ser visto como característica da presença de elementos de transposição. Isso porque sabe-se que estes podem causar alterações genéticas estáveis e instáveis, dependendo do tipo de elemento envolvido, se é autônomo ou não-autônomo, e do estado deste, se está ativo ou não (Fedoroff, 1983).

Os transposons têm sido identificados, em vários trabalhos, devido à sua capacidade de produzir mutações em outros locos, em progênies relacionadas. Essa capacidade mutagênica pode ser explicada pela sua habilidade de excisão e inserção no genoma. Esse é o caso de mutações em milho, em genes envolvidos na biossíntese de antocianina

no endosperma, na folha, nas anteras, e em outros tecidos, produzidas pela ação do sistema Ac/Ds (McClintock, 1955). Outro exemplo que pode ser dado é o sistema Mu, que tem sido descrito como indutor de mutações em alta frequência em diversos locos de uma única linhagem de milho (Robertson, 1978). A origem dessa instabilidade em linhas isogênicas é explicada pela presença e ativação de transposons inativos, "silenciosos", como tem sido reportada tanto em linhagens, por Pan e Peterson (1988) e Chandler et al. (1986), como em populações naturais e em sintéticos de programas de melhoramento (Peterson, 1988).

Analogamente aos casos citados, pelo histórico do aparecimento de vp_{12} , percebe-se que pelo menos duas mutações, antocianina instável e folhas estriadas, foram identificadas concomitantemente ao aparecimento do vp_{12} , e que à primeira vista estariam relacionadas com o mutante em questão. Entretanto, a ausência desses mutantes e de outros novos, nas progênies que passaram a segregar vp_{12} , nas últimas gerações (Silva, comunicação pessoal), poderia gerar dúvidas se a instabilidade no loco vp_{12} pode realmente ser atribuída à presença de um transposon, pois gerações sucessivas de autofecundações revelam instabilidade fenotípica apenas no loco vp_{12} . Esse comportamento, entretanto, pode ser esperado se o transposon do vp_{12} tiver uma alta especificidade para inserção neste ponto do genoma. Outro aspecto interessante é que não foi encontrado, até o momento, nenhum outro tipo de alteração fenotípica que poderia ser atribuído a outros mecanismos genéticos capazes de causar mutações, tais como translocações, quebras cromossômicas, ploidia, etc. Ao contrário, as observações e evidências apresentadas neste trabalho reforçam a hipótese de que a mutação em vp_{12} é condicionada pela inserção de um

transposon.

A inserção de um transposon leva à interrupção da expressão do gene alvo, e sua saída, na maioria das vezes, restaura a função do gene (Fedoroff, 1983). O bloqueio na expressão do gene pode ser devido a diferentes causas como a codificação de uma proteína defeituosa, alteração na regulação do gene ou interrupção dos processos de transcrição e/ou tradução (Doring et Starlinger, 1986). No caso do vp_{12} , a inserção de um transposon nesse gene poderia estar relacionada com um bloqueio da biossíntese de carotenóides, consequentemente produzindo sementes amarelo limão ao invés de sementes amarelo normal. A excisão do transposon do vp_{12} causaria o aparecimento de um setor revertente amarelo normal dentro do endosperma limão.

Em milho, vários alelos de diferentes locos já foram descritos como sendo ocasionados pela inserção de transposons (Doring e Starlinger, 1986). A inserção do transposon produz alterações na estrutura molecular do gene alvo e em sua função. Essas modificações tem sido bem documentadas em trabalhos como o de Fedoroff (1982), com o loco *waxy*, e de Peterson (1990), com o loco *P*. Este último ilustra a grande capacidade do elemento *Ac* em gerar variabilidade genética. O loco *P*, em milho, está envolvido na síntese de antocianina, pigmento roxo-vermelho, que se deposita no pericarpo, na raquis da espiga e em outros tecidos. A inserção de um elemento *Ac* dentro do gene *P*, origina o alelo P^v que produz um fenótipo vermelho variegado, tanto no pericarpo quanto na raquis. Uma segunda transposição intragênica do mesmo transposon *Ac* no loco *P* deu origem a um novo alelo, P^{or} , que agora produz variegação consistindo de setores vermelhos em fundo laranja. Análises moleculares demonstraram que a segunda inserção do elemento *Ac* ocorreu no mesmo loco, porém em outro sítio e com

orientação invertida (Peterson, 1990). Este exemplo demonstra elegantemente como os transposons podem originar mutações distintas dentro do mesmo gene. Em nosso caso, fenotipicamente, seria muito difícil detectar outras reinserções dentro do loco vp_{12} , semelhantes ao exemplo descrito, em decorrência da baixa penetrância do gene vp_{12} , para expressão da viviparidade.

6.1.1- Análise da segregação no loco VP_{12}

A análise da segregação de sementes amarelas e limão (Tabelas I e II) indicou que a herança é do tipo monofatorial, uma vez que os X^2 obtidos na análise de famílias individuais não foram significativos. Os desvios observados em algumas poucas famílias podem ser atribuídos à presença de outros genes, como genes gametofíticos ou outros genes modificadores desconhecidos, que podem alterar a frequência gamética do mutante em estudo.

A correlação estreita entre o aparecimento de sementes com endosperma limão e viviparidade parece indicar que as duas mutações são aparentemente condicionadas por um mesmo loco, como tem sido reportado em outros casos (Robertson, 1955). A falta de evidências comprovando uma correspondência unívoca entre o dois fenótipos observados, isto é presença de vivíparos em todas as sementes limão, confirma os achados de Robertson (1975) que a expressão dos genes vivíparos é muito afetada por condições ambientais. Este fato vem também reforçar as evidências de que as vias biossintéticas de carotenóides e ABA possuem passos comuns (Neill et al., 1986; Parry et al., 1990). Nesse sentido, vp_{12} pode representar um mutante de ambas as vias e, devido às suas características fenotípicas, deve ser enquadrado na Classe I de mutantes de endosperma (Robertson, 1975).

A ocorrência de um setor revertente pequeno em endosperma limão, dando coloração amarelo normal (Tabelas I e II), indica que com a excisão a função do gene Vp_{12} foi restaurada e as células alteradas passam a produzir novamente carotenóides, os quais deixaram de ser produzidos com a inserção de T_{12} no Vp_{12} . Por outro lado, como a frequência do alelo vp_{12} não é alterada, isto é, continua sendo de 50% em indivíduos heterozigotos, fato esse deduzido da segregação de 3 amarelas: 1 limão, conclue-se que a reinserção é um evento raro, que se ocorre em baixa frequência, dificilmente é detectado. Essa hipótese é compatível com o fato de não ter sido detectado, até agora, qualquer outra mutação diferente de vp_{12} , em milhares de indivíduos analisados, quer em planta ou em sementes, de progênes segregantes para o loco em questão. Isso parece sugerir que a inserção tenha ocorrido uma única vez e que desde então somente ocorre excisão. A outra implicação é que todas as cópias do T_{12} existentes nas progênes analisadas, foram produzidas via replicação do DNA do gene Vp_{12} . Nesse caso, o T_{12} é replicado juntamente com o gene.

6.1.2- Teste de Alelismo

Esse teste foi realizado com todos os genes mutantes pertencentes à Classe I, e que por isso apresentam as mesmas características do vp_{12} . Entre estes, o único que difere um pouco fenotipicamente do vp_{12} é o y_9 , pois normalmente não dá origem a plântulas albinas, e sim a plântulas com coloração variando de verde a verde-pálido (Robertson, 1975). Essa variação na coloração da plântula, entretanto, é influenciada pelas condições ambientais, principalmente temperatura, e por esta razão também foi incluído no teste.

O teste de alelismo se baseia na complementação do efeito dos genótipos em cruzamento. Se os alelos são iguais e pertencem ao mesmo loco, ao se cruzarem dois heterozigotos para o mesmo loco, na geração F_1 , irão expressar os caracteres amarelo limão/vivíparo, na proporção de 3:1. Se os alelos são distintos e não pertencem ao mesmo loco, no cruzamento de heterozigotos para os dois locos ocorre a complementação gênica e a geração F_1 produz o fenótipo normal da característica em questão.

Como todos os F_1 analisados, presentes na Tabela III, para todos os tipos de cruzamentos envolvendo os genes vp_2 , vp_5 , vp_9 , al , w_3 e y_9 , foram normais pode-se concluir com segurança que o vp_{12} não tem nada em comum com os genes previamente identificados, ou seja aqueles que condicionam bloqueio na síntese de carotenóides e viviparidade, tratando-se portanto de um novo mutante para ser incluído na lista da Classe I.

A expressão da viviparidade no mutante vp_{12} seguiu as mesmas características dos outros mutantes vivíparos descritos por Robertson (1975), encontrando-se uma baixa correlação entre as diferentes frequência de vivíparos em sementes limão, devido à falta de constância da expressão da viviparidade nos tipos amarelo limão. Foram encontradas desde progênies com 100% de expressão de vivíparos, até progênies completamente distintas com 0% de vivíparos. Da mesma forma, que existem diferenças na expressão da viviparidade ocorre também, em menor grau, variação na coloração das sementes mutantes, que podem variar de limão a branco, entre as diferentes famílias. Contudo, em uma progênie de L477 vp_{12} ocorre apenas um dos fenótipos com relação à coloração. A explicação para a variação da tonalidade é dada pela presença de outros genes que modificam a expressão deste, no

genoma, como também acharam Robertson (1975) e Buckner et al. (1990). A complexidade de mecanismos envolvidos na biossíntese de carotenóides/ABA sugere que a expressão gênica do vp_{12} depende mais de mecanismos de regulação do que da presença de genes modificadores.

Dessa maneira é o gene vp_{12} , envolvido na biossíntese de carotenóides/ABA, um gene regulador ao invés de um gene estrutural ? Algumas evidências fenotípicas parecem apoiar essa hipótese.

A observação de setores revertentes em sementes limão demonstrou que a coloração amarela destes, devido à presença dos carotenóides, não difere da coloração das sementes amarelo normal, onde o transposon não está presente. A ausência de diferentes tonalidades de amarelo, tais como amarelo intenso, amarelo claro, amarelo limão, marfim, branco, etc., relacionadas ao efeito de dosagem de genes estruturais (Mangelsdorf, 1931), que se expressam no tecido triplóide do endosperma, pode ser uma evidência para indicar que o vp_{12} é um gene regulador. A excisão do transposon do gene vp_{12} , que ocorre com frequência de 0,15 a 0,24 (Tabelas I e II), em endospermas limão, portanto de genótipo $vp_{12}vp_{12}vp_{12}$, levaria a uma mudança em um dos genes vp_{12} para $Vp_{12}(r)$, onde r indica reversão do fenótipo em um dos alelos, originando o genótipo $Vp_{12}(r)vp_{12}vp_{12}$. Este último seria responsável pela restauração do fenótipo selvagem, ou seja amarelo normal devido à presença de carotenóides, portanto revelando dominância completa no setor revertente.

Ao contrário, para os genes estruturais seria esperado que ocorresse um efeito de dosagem, isto é, sementes com setores variando de amarelo intenso a tonalidades mais fracas, dependendo do número de alelos vp_{12} que perderam o transposon T_{12} , e não dominância completa, como foi encontrado. Além disso, numa mesma progênie autofecundada

seria esperado a ocorrência de sementes com coloração variando de amarelo intenso a branco. Também não se teria segregação de 3:1, como foi encontrado. Pode-se sugerir, daí, que a alteração genética em questão pode não ter ocorrido em um gene estrutural, mas sim em um gene regulador. Para se confirmar esta hipótese seria necessário uma análise do tipo de carotenóides acumulados por vp_{12} , tanto no endosperma quanto na planta, além de uma análise molecular do gene para identificação do produto gênico codificado e de possíveis sequências reguladoras no DNA.

Uma evidência concreta nesse sentido foi dada recentemente por Buckner (1990) ao clonar o gene y_1 . Este gene mutante condiciona a ausência de β -carotenos no endosperma. As plantas são verdes quando crescidas à temperatura de 25°C e verde pálido a 35°C, devido a uma diminuição no teor de β -carotenos (Robertson et Anderson, 1961). Essa expressão tecido-específica e termosensível dos alelos desse loco, associada com observações de que a taxa de reação enzimática nesse mutante não é proporcional à concentração da enzima (Mangelsdorf et Fraps, 1931), levam à hipótese de que y_1 é um gene regulador da via biossintética de carotenóides (Buckner, 1990).

6.2- ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO TRANSPOSON DE vp_{12}

Em todos os sistemas de transposons estudados, a análise fenotípica da expressão destes se prende ao modo de ação específico de cada elemento (Wessler, 1988). Assim, as mutações ocasionadas pelo sistema Ac/Ds estão normalmente associadas com quebras cromossômicas, as do sistema Spm/dSpm com supressão e regulação da expressão do gene alvo e as do sistema Mu com uma alta frequência induzida de mutações,

entre outros.

A análise da expressão do transposon de vp_{12} também apresenta algumas características desses elementos. Assim:

1- A inserção do transposon está envolvida com a supressão total da expressão do Vp_{12} . Isso pode ser demonstrado pela observação da coloração uniforme das sementes amarelo limão dentro de uma mesma família.

2- Os setores revertentes normais em sementes limão são normalmente únicos e de tamanho reduzido. Como a frequência de setores variou de 15 a 24% das sementes limão, entende-se que cada setor deve ser produto de uma excisão do transposon do gene vp_{12} . Pelo tamanho reduzido dos setores pode-se inferir que a excisão ocorre tardiamente durante o desenvolvimento da semente. O tempo de excisão parece ser um atributo bem característico de algumas famílias de transposons. Assim a excisão de Dt/rDt ocorre bem tarde no desenvolvimento e numa frequência elevada, o que é caracterizado por setores revertentes pontuais e numerosos (Rhoades, 1936). O elemento Mu também tem sua excisão na fase tardia de desenvolvimento (Robertson, 1985; Bennetzen, 1985). Outro fato que comprova a expressão tardia do transposon de vp_{12} , é a ausência de desvios significativos na segregação de 3:1 de progênies autofecundadas. Se a excisão do transposon ocorresse na fase de formação dos gametas ou no início do desenvolvimento da semente, um número maior de sementes normais seriam formadas, devido à transposição e reversão total para o fenótipo normal, que consequentemente ocasionaria um desvio na segregação esperada de 3:1.

A alteração no tempo de excisão do transposon de vp_{12} tem sido observada em cruzamentos de $L477vp_{12}$ com outras linhagens que não possuem vp_{12} , como a linha pura L902. Neste caso, alguns F_2

segregantes apresentaram sementes limão com setores revertentes maiores do que o normal, ocupando a metade ou quase a totalidade do endosperma. Análises mais profundas dessas expressões distintas do gene vp_{12} são necessárias para se verificar se o controle do tempo de excisão pode ser afetado por outros genes do genoma ou se é prerrogativa dos elementos de transposição. A frequência e o tempo de excisão pode ser controlada pelo número de cópias do elemento presente no genoma. Em nosso caso, portanto, essa associação foi notada, pois nos cruzamentos com outras linhagens, o que leva a uma redução do número de cópias do elemento ativo, foram encontradas sementes com um padrão de transposição mais precoce, citadas anteriormente, além daquelas com o padrão característico de expressão do transposon.

3- O transposon T_{12} , ao contrário dos transposons estudados, não determina desvios na segregação conforme constatado nos estudos de segregação no loco e nos testes de alelismo. Isso significa que apenas a excisão tardia é detectada no loco e que a inserção é nula ou então muito pequena para ser detectada através de desvios de segregação. Este fato amplia o conhecimento da natureza dos transposons, pois a transposição neste caso é representada apenas pela excisão, e isso certamente deve exigir uma regulação distinta dos casos analisados até agora. A não detecção de reinserção e a baixa frequência de excisão podem indicar que os alelos vp_{12} , produzidos originalmente pela inserção de um transposon no gene vp_{12} , são propagados no genoma pelo processo comum de recombinação homóloga da reprodução sexuada, e não por novos eventos de transposição. Logo um gene vp_{12} , assim como o transposon T_{12} , tem grande probabilidade de serem cópias de outro vp_{12} e outro T_{12} produzidas ao longo da divisão meiótica. Isso pode significar, também, que um transposon com essas características causa

menos traumatismo tanto no gene alvo como no transposon em si, não levando a grandes problemas durante a replicação do DNA e a divisão celular. Este fato poderia também limitar não só a variabilidade dentro do loco $\nu\rho_{12}$ como também limitar a evolução do T_{12} , restringindo a formação de elementos dentro da família de transposon, e consequentemente até de eventos de transposição.

Também, ao contrário dos sistemas de transposons estudados, não há evidências, neste trabalho, de que tenha ocorrido uma inserção em posição distinta do genoma. Esse fato pode sugerir uma especificidade do transposon em questão pelo loco $\nu\rho_{12}$. Ou, então, simplesmente que não ocorreram reinserções em função da baixa capacidade de transposição do elemento. Para se confirmar essas hipóteses seria necessária uma análise molecular do elemento clonado, para se verificar primeiro o número de cópias do transposon no genoma. Em segundo lugar verificar se está ocorrendo reinserção do transposon em uma região não codificadora no genoma, e que por isso não é detectável. Ou, então, se o transposon é perdido após a excisão. Esta última hipótese envolveria a formação de uma estrutura extra-cromossômica. Um elemento deste tipo já foi descrito para Mu (Sundaresa et Freeling, 1987). Deve-se notar que as duas hipóteses, ausência de inserção em regiões codificadoras e grande especificidade, não são mutuamente exclusivas, podendo ambas estarem ocorrendo.

A primeira vista parece que a inserção de um transposon ocorre aleatoriamente no genoma. Em milho, entretanto, têm sido observado que para algumas das famílias de transposons descritas a transposição ocorre normalmente em sítios ligados ao doador. Para Ac/Ds este fato foi demonstrado para dois locos diferentes, P^{vu} e $bz-m2$ (Greenblatt, 1984; Dooner et Belachew, 1989), onde a inserção ocorre normalmente em

regiões do genoma próximos ao loco em questão. O elemento Spm também se reinsere em sítios próximos ao doador em aproximadamente 25% dos casos estudados (Peterson, 1970). Recentemente, em estudos de mapeamento do elemento Ac em linhagens recombinantes (RI), demonstrou-se que das 24 sequências semelhantes a Ac identificadas, 14 estavam no cromossomo 4 (Jonhs et al., 1990). Além disso, já foram descritas famílias de transposon com especificidade por um loco: Dt/rDt, pelo loco A_1 (Brown et al., 1989) e Bg/rbg, pelo loco O_2 (Montanelli et al., 1984).

6.2.1- Identificação da Família do Transposon de vp_{12}

Uma iniciativa comum, após a detecção de uma mutação ocasionada pela ação de um transposon em milho, é a identificação da família do transposon, visando a elucidação de aspectos genéticos da mutação. Além disso, a identificação da família é importante para se determinar se o transposon pertence a uma família já descrita ou se trata de um novo sistema de transposição.

Um procedimento comum para a identificação da família de um transposon é o cruzamento do estoque portador do elemento ativo em questão com a linhagem testadora contendo o elemento inativo. A linhagem testadora contém portanto o elemento não-autônomo inserido num alelo conhecido, causando uma mutação estável, de fácil identificação. Para tal usam-se mutações do endosperma da semente, livres de elementos autônomos específicos. Nos cruzamentos entre linhagens testadoras e a linhagem portadora do transposon desconhecido ativo, se este último pertencer à família em questão, irá promover a excisão do elemento não-autônomo do gene marcador. A excisão será detectada através da instabilidade fenotípica do mutante, que passa a

apresentar setores revertentes para o fenótipo selvagem. A excisão pode ocorrer durante o desenvolvimento da semente. Se ocorrer muito cedo causa desvios na segregação esperada. O monitoramento da transposição é feito usualmente em F_2 e em retrocruzamentos dos F_1 para as linhagens testadoras. Estes últimos tem como objetivo diminuir o número de cópias do elemento autônomo, pois como foi citado anteriormente, o número de cópias do elemento pode estar relacionado com a regulação da transposição. Este tipo de procedimento tem sido utilizado para se identificar a maioria das famílias de transposons conhecidas (Peterson, 1988).

Para a identificação da família do transposon de vp_{12} foram utilizadas duas linhagens testadoras do Laboratório de Genética de Milho. Esses testes foram feitos apenas para as famílias de Ac/Ds e Spm/dSpm, por serem as mais estudadas. Em nosso caso foram utilizadas duas linhagens diferentes para o mesmo testador, para melhor avaliar a expressão fenotípica do transposon e também para permitir uma dupla confirmação dos resultados. Pois a instabilidade deve ocorrer em ambas as linhagens, evitando-se assim a possibilidade da instabilidade ser devida a outro tipo de complementação genômica qualquer, que não a transposição em questão.

Em nenhum dos cruzamentos analisados foi detectado desvio da segregação esperada, ou seja, de 1:1 nos retrocruzamentos e 9:3:3:1 nos F_2 (Tabelas IV e V). Não foi detectada também nenhuma instabilidade do gene *waxy*, causada pela excisão do seu transposon e restaurando a produção de amilose nos setores revertentes. Visualmente seriam notados pontos de amido translúcidos em fundo opaco que contém apenas amilopectina. Testes com iodina para identificação de amilose e amilopectina confirmaram as observações visuais. O resultado dos

testes com iodina foi ainda mais significativo nos casos de sementes limão waxy com setores revertentes amarelo normal (Figura 3), que na totalidade não apresentaram setores revertentes de waxy para normal. Isso seria esperado se o transposon de vp_{12} pertencesse a uma das famílias testadas, Ac/Ds ou Spm/dSpm.

Estes resultados confirmam as análises posteriores de outras características citadas, isto é, que o transposon do vp_{12} não pertence às famílias de Ac/Ds e Spm/dSpm. Para essa identificação serão necessários outros testes envolvendo as famílias de transposons conhecidas em milho, tanto a nível genético quanto molecular. Este último com experimentos de hibridização com sondas de transposons conhecidos.

Os resultados desses testes de complementação com linhagens testadoras devem ser analisados mais criticamente. Outros elementos complementares desconhecidos ou "silenciosos", da mesma família do Ac ou Spm, poderiam estar presentes na linhagem L477 vp_{12} , porém sem ligação alguma com o transposon de vp_{12} e produzir instabilidade nas linhagens com o gene waxy. Como consequência, o resultado seria interpretado de maneira incorreta, inferindo-se que o transposon de vp_{12} é Ac ou Spm. Outra preocupação é que os mecanismos de ativação/repressão de transposons ainda não são bem conhecidos. Essa ativação pode estar relacionada com outros mecanismos além da complementação de elementos autônomos e não-autônomos, como por exemplo o grau de metilação do DNA. Além disso já foi reportada a ativação espontânea de elementos "silenciosos" em Uq (Pan et Peterson, 1988). Por isso, os cruzamentos testes devem ser obrigatoriamente complementados pela análise molecular.

6.2.2- Análise dos Cruzamentos Dialélicos

Na tentativa de se obter maiores informações sobre a complementação de elementos de transposição do $\nu\rho_{12}$ foram realizados cruzamentos dialélicos, envolvendo linhagens estáveis provenientes de progênies segregantes para o $\nu\rho_{12}$. Linhagens geneticamente estáveis, sem histórico de atividades de transposons, podem conter elementos inativos, como Uq (Pan et Peterson, 1988) ou até sequências homólogas ao elemento ativo, como Mu (Chandler et al., 1986). A ativação destes elementos está normalmente associada a choques genômicos, ocasionados por um estresse ambiental ou exposição à radiação (McClintock, 1984). A idéia de se realizar cruzamentos dialélicos entre progênies estáveis, provenientes da mesma progênie segregante, teve como objetivo verificar a possibilidade de existirem naquelas progênies elementos complementares, que ao serem colocados na mesma célula seriam ativados, desencadeando o processo de transposição.

Os resultados destes cruzamentos indicaram, à primeira vista, que as progênies testadas não apresentam elementos reprimidos ou inativos, ou então elementos que possam se complementar. Na presença desses elementos esperar-se-iam duas situações. Numa, o aparecimento de espigas segregando para sementes amarelo normal e limão, estas últimas resultantes de inserção induzida pela complementação de elementos inativos. Isto no caso do transposon se inserir no mesmo gene alvo. Noutra, o aparecimento de espigas com outros tipos de alterações, tais como sementes abortadas, irregularidades na formação das fileiras de grãos, ou de outros tipos de mutantes de endosperma, decorrentes de quebras e rearranjos cromossômicos ou de inserções em outros locos, que também são indícios de ativação da transposição. Nenhum dos F_1 das cinco linhagens

revelaram qualquer alteração fenotípica que poderia advir da complementação de elementos do transposon do vp_{12} , que estariam separados nas linhagens.

Além destes, os resultados dos cruzamentos entre vp_{12} e os genes análogos, vp_2 , vp_5 , vp_9 , al , w_3 e y_9 , não evidenciaram, também, a presença nestes de elementos complementares ou não-autônomos, uma vez que não foram observados desvios significativos das segregações esperadas..

Estes resultados, juntamente com aqueles que evidenciam apenas a ocorrência de excisão e, portanto se manifestando somente nos homozigotos $vp_{12}vp_{12}$, dão evidências de que a transposição não ocorre em indivíduos $Vp_{12}Vp_{12}$ ou $Vp_{12}vp_{12}$. Isto leva à sugestão que a excisão, para ocorrer, necessita de mais cópias dos elementos que estão inseridos no vp_{12} .

Outra questão importante é a composição do sistema de transposição. É ele constituído de dois elementos, autônomo e não-autônomo, ou é constituído por um único elemento. A partir daí, algumas hipóteses podem ser sugeridas. A alta especificidade do transposon ao loco Vp_{12} poderia impedir, no caso de existirem dois elementos, que estes fossem identificados pela complementação em genótipos marcadores. Ao contrário, os dois elementos ocorreriam apenas no loco Vp_{12} , sendo um capaz de se auto-transpor e o outro não. Como apenas os homozigotos $vp_{12}vp_{12}$ mostram a excisão, a transposição ocorreria se pelo menos um dos dois elementos inseridos no gene Vp_{12} fosse o autônomo. Caso contrário, elementos não-autônomos em cada Vp_{12} seriam estáveis.

O transposon do vp_{12} poderia também ser constituído de um único

elemento. Numa progênie estável este poderia estar inativado, devido a metilações, e desta maneira não se expressaria. Interessante citar aqui que neste trabalho foi identificado uma progênie estável para a mutação, isto é as sementes limão não apresentam setores revertentes normais. A progênie, identificada pela primeira vez em uma família com 3 ciclos de autofecundação, manteve-se estável por mais dois ciclos consecutivos de autofecundação. Essa estabilidade da mutação pode ser explicada por transposons tanto de um como de dois elementos, como foi visto em consequência de estarem ambos apenas ocorrendo no mesmo loco vp_{12} . Estas hipóteses, porém, são muito difíceis de serem testadas em experimentos de segregação pela dificuldade de se obter o transposon do vp_{12} em outros locos. Para se esclarecer essa e outras questões levantadas anteriormente será necessária a complementação com análises moleculares do transposon e do loco vp_{12} .

Pode-se perceber pelo exposto, a importância da caracterização desse mutante para a compreensão do funcionamento de sistemas biológicos. O mutante descrito se constitui numa peça importante do metabolismo pois acha-se envolvido no processo de maturação e de germinação das sementes. Outro fato que torna o mutante vp_{12} um instrumento atraente para estudos mais profundos é a presença do transposon T_{12} . Este, se for confirmada a sua especificidade e seu modo de expressão, poderá dar subsídios importantes para experimentos de transformação e mutagênese dirigida. Finalmente, a caracterização de diferentes sistemas de transposição poderá mostrar o papel desses mecanismos naturais na geração de variabilidade genética.

VII- CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos e analisados podem ser tiradas as seguintes conclusões:

1- A partir da análise do padrão de segregação, verificou-se que a mutação em Vp_{12} , que condiciona um bloqueio na biossíntese de carotenóides, apresenta uma segregação de 3:1 típica de herança monofatorial. Daí conclui-se que o mutante é determinado por uma mutação em um único loco, identificado por Vp_{12} .

2- As análises genéticas da expressão do vp_{12} demonstraram que a mutação no loco Vp_{12} é condicionada pela inserção de um transposon neste, a qual leva a uma interrupção da expressão do mesmo, caracterizada por um bloqueio na biossíntese de carotenóides. A excisão do transposon do gene leva a uma restauração na produção de carotenóides no endosperma, verificada através da formação de setores revertentes amarelos em endosperma limão.

3- O teste de alelismo demonstrou que o gene vp_{12} não é alelo de nenhum dos locos previamente descritos, ou seja vp_2 , vp_5 , vp_9 , al , w_3 e y_9 , que condicionam as mesmas alterações fenotípicas. Portanto, o mutante vp_{12} é um novo gene.

4- Tanto as análises genéticas da expressão do transposon T_{12} , quanto as análises de segregação de progênies nas quais este se

expressa, sugerem que a inserção de T_{12} no loco vp_{12} ou em outro qualquer, parece não ocorrer e que as atividades do transposon podem se resumir apenas na excisão de T_{12} do vp_{12} . Esse evento ocorre tardiamente durante o desenvolvimento do endosperma e com uma frequência que varia em média de 15 a 24%.

5- Os testes para identificação da família do T_{12} , aliados às características da expressão genética do mesmo, indicam que o transposon não pertence às famílias testadas, Ac/Ds e Spm/dSpm.

6- Finalmente, o transposon T_{12} não tem nenhum efeito aparente na expressão fenotípica de genes análogos a vp_{12} .

VIII-RESUMO: ESTUDO DE UM MUTANTE DE CAROTENÓIDE E VIVÍPARO CAUSADO POR TRANSPOSIÇÃO EM MILHO

A existência de mutantes para vias biosintéticas é essencial na determinação de passos metabólicos. Um mutante de carotenóide e vivíparo, com instabilidade fenotípica no endosperma, que apareceu espontaneamente numa linhagem originada de famílias segregando elementos de transposição em antocianina, é o objeto de estudo deste trabalho.

Foram analisados aspectos genéticos da mutação, através do estudo de 44 progênies autofecundadas, ao longo de 2 gerações. A segregação de sementes normais (amarelo) e mutantes (limão), num total de 12.586 sementes, apresentou segregação monofatorial ($\chi^2 = 0,344$; $0,50 < p < 0,70$). A associação entre sementes deficientes em carotenóides e vivíparas indica que toda semente vivípara é deficiente em carotenóide, o que sugere a existência de uma única mutação causando os dois fenótipos, confirmando a ocorrência de passos comuns nas vias biosintéticas de carotenóide e ABA. Testes de alelismo envolvendo o mutante em questão, designado vp_{12} , e os genes análogos vp_2 , vp_5 , vp_9 , al , w_3 e y_9 , foram negativos, indicando que o mutante vp_{12} é diferente dos demais.

As análises genéticas da expressão do vp_{12} demonstraram que a mutação no loco vp_{12} é condicionada pela inserção de um transposon no mesmo, a qual leva a uma interrupção da expressão deste, caracterizada por um bloqueio na biossíntese de carotenóides. A excisão do transposon do gene leva a uma restauração na produção de carotenóides no endosperma, verificada através da formação de setores revertentes amarelos em endosperma limão.

-Tanto as análises genéticas da expressão do transposon T_{12} , quanto as análises de segregação de progênies nas quais este se expressa, indicam que a inserção de T_{12} no loco vp_{12} ou em outro qualquer, parece não ocorrer e que as atividades do transposon se resumem apenas na excisão de T_{12} do vp_{12} . Esse evento ocorre tardiamente durante o desenvolvimento do endosperma e com uma frequência que varia em média de 15 a 24% .

Os testes para identificação da família do T_{12} , realizados através de cruzamentos com linhagens testadoras para as famílias Ac/Ds e Spm/dSpm, aliados às características da expressão genética do mesmo, indicam que o transposon não pertence às famílias testadas, Ac/Ds e Spm/dSpm. Além disso, o transposon T_{12} não tem nenhum efeito aparente na expressão fenotípica de genes análogos a vp_{12} .

ABSTRACT: STUDY OF A CAROTENOID/VIVIPAROUS UNSTABLE MUTANT IN MAIZE.

The occurrence of mutants for biosynthetic pathways is an essential instrument in the determination of metabolic steps. A carotenoid/viviparous mutant with a phenotypic instability at the endosperm of an inbredline originated from segregating families for transposable elements in anthocyanin has stimulated the development of this research.

The genetic variability was analysed by a study of 44 selfpollinated progenies throughout two successive generations. The segregation of normal (yellow) and mutant (lemmon) seeds, in a total of 12586 kernels, indicated a monofactorial segregation ($\chi^2 = 0.344$, $0.50 < p < 0.70$). The association between carotenoid mutants and viviparous kernels indicated that every viviparous seed has only one mutation causing the two phenotypes, suggesting the occurrence of common steps in the biosynthetic pathways of carotenoids and ABA. Allelism tests involving the mutant, here designated vp_{12} , and the analog genes, vp_2 , vp_5 , vp_9 , al , w_3 e y_9 , were negatives, indicating that the mutant vp_{12} is different from the others.

The analysis of the vp_{12} genetic expression demonstrated that the mutation is caused by a transposable element insertion in the Vp_{12} locus, which results in an interruption of the carotenoid biosynthesis. The transposon excision from the locus restores the carotenoid production in the endosperm, and this can be verified by the occurrence of yellow revertent sectors in a lemmon background.

Either the genetic analysis of the transposon of vp_{12} (T_{12}) expression and the analysis of the segregation ratio of the locus demonstrate that the T_{12} insertion at the Vp_{12} locus or another one seems not to occur and that the transposon movement consists only of excision from the Vp_{12} locus. This event occurs late during the endosperm development and in an average frequency of 15 to 24%.

The results of the family identification tests of the transposon of vp_{12} (T_{12}), realized through crosses with test inbredlines of the Ac/Ds and Spm/dSpm families, associated with the characteristics of its genetic expression, indicated that the transposon T_{12} does not belong to the tested families. Besides that, the transposon T_{12} has no apparent effect in the phenotypic expression of the analog genes.

IX- BIBLIOGRAFIA

- ALLEMAN, M. , FREELING, M. (1986). The Mu transposable elements of maize: evidence for transposition and copy number regulation during development. Genetics 112, 107-119.
- ANDERSON, I. C. , ROBERTSON, D. S. (1960). Role of carotenoids in protecting chlorophyll from photodestruction. Plant Physiol. 35, 531-534.
- ANDERSON, I. C. , ROBERTSON, D. S. (1963). Chlorophyll and carotenoid contents of some pigment mutants in corn (Abstr.). Plant Physiol. 38, iii.
- BALSALOBRE, J. M. , RUIZ-VAZQUEZ, R. M. , MURILLO, F. J. (1987). Light induction of gene expression in *Myxococcus xanthus*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 2359-2362.
- BENNETZEN, J. L. (1985). The regulation of mutator function and Mu1 transposition. UCLA Symp. Mol. Cell Biol. 35, 343-354.
- BENNETZEN, J. L. , SWANSON, J. , TAYLOR, W. C. , FREELING, M. (1984). DNA insertion in the first intron of maize Adh1 affects message levels: cloning of progenitor and mutant Adh1 alleles. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 4125-4128.
- BENNETZEN, J. L. , FRACASSO, R. P. , MORRIS, D. W. , ROBERTSON, D. S. , SKOGEN-HAGENSON, M. J. (1987). Concomitant regulation of Mu 1 transposition and Mutator activity in maize. Mol. Gen. Genet. 208,

- BRAMLEY & MacKENZIE (1988). Regulation of carotenoid biosynthesis. Curr. Top. Cell. Regul. 29, 291-343.
- BRENNER, M. L., BURR, B. & BURR, F. (1977) Correlation of genetic vivipary in corn with abscisic acid concentration. Plant Phisiol., 63 S-200.
- BRITTON, G. (1982). Carotenoid biosynthesis in higher plants. Physiol. Vég. 20(4), 735-755.
- BROWN, J. J., MATTES, M. G., O'REILLY, C., SHEPHERD, N. S. (1989). Molecular characterization of rDt, a maize transposon of the "Dotted" controlling element system. Mol. Gen. Genet. 215, 239-244.
- BUCKNER, B., KELSON, T. L., ROBERTSON, D. S. (1990). Cloning of the y_1 locus of maize, a gene involved in the biosynthesis of carotenoids. The Plant Cell 2, 867-876.
- CHANDLER, V., RUIN, C., WALBOT, V. (1986). Stable non-mutator stocks of maize have sequences homologous to the Mu1 transposable element. Genetics 114, 1007-1021.
- CHEN, C-H., OISHI, K. K., KLOECKENER-GRUISSEM, B., FREELEING, M. (1987). Organ-specific expression of maize Adh1 is altered after a Mu transposon insertion. Genetics 116, 469-477.
- COEN, E. H., CARPENTER, R., MARTIN, C., (1986). Transposable elements

- generate novel spatial patterns of gene expression in *Antirrhinum majus*. Cell 47, 285-296.
- COUPLAND, G., BAKER, B., SCHELL, J., STARLINGER, P. (1988). Characterization of the transposable element Ac by internal deletions. EMBO J. 7, 3653-3659.
- DOONER, H. K., BELACHEW, A. (1989). Transposition pattern deduced from pericarp phenotypes resulting from movement of the transposable element Modulator, in maize. Genetics 108, 471-485.
- DORING, H. P. (1989) Tagging genes with maize transposable elements. An overview. Maydica 34, 73-88.
- DORING, H. P. & STARLINGER, P. (1984) Controlling elements: Now at the DNA level. Cell 39, 253-259.
- DORING, H. P., STARLINGER, P. (1986). Molecular Genetics of Transposable Elements in Plants. Ann. Rev. Genet. 20, 175-200.
- DURE, L. III. (1985) Embryogenesis and expression during seed formation. Surveys of Plant Molecular and Cell Biology 2 pp.179-197. Oxford University Press, UK.
- EYSTER, W. H. (1931). Vivipary in maize. Genetics 16, 574-590.
- FEDOROFF, N. V. (1983) Controlling Elements in Maize. In: Mobile Genetics Elements, pp.1-63, Shapiro, R., Academic Press, Inc.

- FEDOROFF, N. V. (1989). About maize transposable elements and development. Cell 56, 181-191.
- FEDOROFF, N., MAUVAIS, J. & CHALEFF, D. (1983) Molecular studies on mutations at the *shrunken* locus in maize caused by the controlling element Ds. Jour. Mol. Appl. Genet. 2, 11-29.
- FEDOROFF, N. V., BANKS, J. A. (1988). Is the Suppressor-mutator element controlled by a basic developmental regulatory mechanism? Genetics 120, 559-577.
- FEIERABEND, J., SCHULZ, U., KEMMERICH, P., LOWITZ, T. (1979). On the action of chlorosis-inducing herbicides in leaves. Z. Naturf. Teil C 3, 59-71.
- FRIEDMANN, P., PETERSON, P. A. (1982). The Uq controlling element system in maize. Mol. Gen. Genet. 187, 19-29.
- FONG, F., SMITH, J. D., KOEHLER, D. E. (1983). Early events in maize seed development. Plant Physiol. 73, 899-901.
- FOWLER, R. B., PETERSON, P. A. (1978). An altered state of a specific En regulatory element induced in maize tiller. Genetics 90, 761-782.
- GIERL, A., SAEDLER, H., PETERSON, P. (1989). Maize transposable elements. Ann. Rev. Genet. 23, 71-85.

- GOODWIN, T. W. (1980). The biochemistry of the carotenoids, Vol. 1
Plants (New York: Chapman and Hall).
- GOODWIN, T. W. (1986). Metabolism, nutrition and function of carotenoids.
Ann. Rev. Nutr. 6, 273-297.
- GREENBLATT, I. M. (1984). A chromosomal replication pattern deduced from
pericarp phenotypes resulting from movements of the transposable
element, Modulator, in maize. Genetics 108, 471-485.
- GREENBLATT, I. M., BRINK, R. A. (1962). Twin mutations in medium variegated
pericarp maize. Genetics 47, 489-501.
- HARDING, R. W., TURNER, R. V. (1981). Photoregulation of the carotenoid
biosynthesis pathway in albino and white collar mutants of
Neurospora crassa. Plant Physiol. 68, 745-749.
- HARPSTER, M. H., MAYSFIELD, S. P., TAYLOR, W. C. (1984). Effects of
pigment-deficient mutants on the accumulation of photosynthetic
proteins in maize. Plant Mol. Biol. 3, 59-71.
- HELH, R., BAKER, B. (1989). Induced transposition of Ds by a stable Ac in
crosses of transgenic tobacco plants. Mol. Gen. Genet. 217(1),
53-59.
- HENSON, I. E. (1984). Inhibition of abscisic acid accumulation in
seedlings shoots of pearl millet (*Pennisetum americanum* [L] Leeke)
following induction of chlorosis by norflurazon. Z.

Pflanzenphysiol. 114S, 35-43.

- JONHS, M. A., MOTTINGER, J., FREELING, M. (1985). A low copy number, copia-like transposon in maize. EMBO J. 4, 1093-1102.
- JONHS, M. A., FUERSTENBERG, S. I., HENNELY, C. A. (1990). Non-random chromosomal distribution of Ac-like sequences in inbred maize. Genet. Res. 55, 71-80.
- KUNZE, R., STOCHAJ, U., LAUFS, J., STARLINGER, P. (1987). Transcription of transposable element Activator (Ac) of *Zea mays* L. EMBO J. 6, 1555-1563.
- LINDSTROM, E. W. (1923). Heritable characters of maize. XLII. Reduced endosperm. J. Heredity 22, 251-252.
- MANGELSDORF, P. C. (1930). The inheritance of dormancy and premature germination in maize. Genetics 15, 462-494.
- MANGELSDORF, P. C., FRAPS, G. S. (1931). A direct quantitative relationship between vitamin A in corn and the number of genes for yellow pigmentation. Science 73(1887), 241-242.
- MANOTTA, R., PONZIANNI, G., MOTTO, M., HARTINGS, H., GIERL, A., DI FONZO, N., SOAVE, C., BIANCHI, A., SALAMINI, F. (1986). Genetic instability of the *shrunken* and *waxy* loci in *o2-m(r)-Bg* strain of maize. Maydica 31, 131-151.

- MARTINEZ-LABORDA, A. , MONTSERRAT, E. , RUIZ-VAZQUEZ, R. , MURILLO, F. J. (1986).
Insertions of Tn-5 linked to mutations affecting carotenoid
synthesis in *Myxococcus xanthus*. Mol. Gener. Genet. 205, 107-114.
- MARTINEZ-LABORDA, A. , MURILLO, F. J. (1989). Genic and allelic
interactions in the carotenogenic response of *Myxococcus xanthus* to
blue light. Genetics 122, 481-490.
- MASSON, P. , SUROSKY, R. , KINGSBURY, J. , FEDOROFF, N. V. (1987). Genetic and
molecular analysis of the Spm-dependent α -m2 alleles of the maize α
locus. Genetics 177, 117-137.
- MAYFIELD, S. P. , TAYLOR, W. C. (1984). Carotenoid-deficient maize
seedlings fail to accumulate light-harvesting chlorophyll a/b mRNA.
Eur. Jour. Biochem. 144, 79-84.
- McCLINTOCK, B. (1951) Mutable loci in maize. Carnegie Inst. Washington
Yearb. 50, 174-181.
- McCLINTOCK, B. (1954). Mutations in maize and chromosomal aberrations
in *Neurospora crassa*. Carnegie Inst. Wash. Yrbk. 53, 254-260.
- McCLINTOCK, B. (1956). Controlling elements and the gene. Cold Spring
Harbor Symp. Quant. Biol. 21, 197-216.
- McCLINTOCK, B. (1961). Further studies of the Suppressor-mutator system
of control of gene action in maize. Carnegie Inst. Wash. Yrb. 60,
469-476.

- McCLINTOCK, B. (1963). Further studies of gene control systems in maize. Carregie Inst. Wash. Yrbk. 62, 486-493.
- McCLINTOCK, B. (1964) Aspects of gene regulation in maize. Carregie Inst. Washington Year Book 63, 592-602.
- McCLINTOCK, B. (1978). Mechanisms that rapidly reorganize the genome. Stadler Symp. 10, 25-48.
- McCLINTOCK, B. (1984). The significance of responses of the genome to challenge. Science 226, 792-801.
- McCARTY, D. R., CARSON, C. B., STINARD, P. S., ROBERTSON, D. S. (1989) Molecular analysis of viviparous-1: an abscisic acid insensitive mutant of maize. The Plant Cell 1, 523-532.
- McLAUGHIN, M., WALBOT, V. (1987). Cloning of a mutable *bz2* allele of maize by transposon tagging and differential hybridization. Genetics 117, 771-776.
- MONTANELLI, C., Di FONZO, N., MAROTTA, R., MOTTO, M., SOAVE, C., SALAMINI, F. (1984). Occurrence and behaviour of the components *o2m(r)-Bg* system of maize controlling elements. Mol. Gen. Genet. 197, 209-218.
- MOORE, R., SMITH, J. D., FONG, F. (1985). Gravitropism in abscisic acid deficient seedlings of *Zea mays*. Am. J. Bot. 72, 1311-1313.

MOTTO, M., Di FONZO, N., SOAVE, C., SALAMINI, F. (1987). Chromosomal and genic instabilities originating from revertant derivatives of the *o2 m(r)* mutable allele of maize. Maydica 32, 249-272.

MOTTO, M., THOMPSON, R., Di FONZO, N., PONZIANI, G., SOAVE, C., MADDALONI, M., HARTINGS, H., SALAMINI, F. (1989). Transpositional ability of the Bg-rbg system of maize transposable elements. Maydica 34, 107-122.

MULLER-NEWMAN, M., FUSSWINKEL, H., STARLINGER, P. (1986). Studies on the expression of the transposable element Activator at the protein level. Maize Genet. Coop. News Lett. 60, 39.

NEILL, S. J., HORGAN, R. & PARRY, A. D. (1986) The carotenoid and abscisic acid content of viviparous kernels and seedlings of *Zea mays* L. Planta 169, 87-96.

NEILL, S. J., HORGAN, R., REES, A. F. (1987). Seed development and vivipary in *Zea mays* L. Planta 171, 358-364.

NELSON, M. A., MORELLI, G., CARATTOLI, A., ROMANO, N., MACINO, G. (1989). Molecular cloning of a *Neurospora crassa* biosynthetic gene (albino-3) regulated by blue light and the products of the white collar genes. Mol. and Cell. Biol. 9(3), 1271-1276.

NELSON, O. E. (1968). The waxy locus in maize. II. The location of the controlling element alleles. Genetics 60, 507-524.

- NOWICK, E. M., PETERSON, P. A. (1981) Transposition of the Enhancer controlling element system in maize. Mol. Gen. Genet. 183, 440-448.
- NUFFER, M. G. (1955). Dosage effect of multiple loci on mutation of *a* in the maize endosperm. Science 121, 399-400.
- O'REILLY, C. SHEPHERD, N. S., PEREIRA, A., SCHWARZ-SOMMER, Z., BERTRAM, I., ROBERTSON, D. S., PETERSON, P. A., SAEDLER, H. (1985). Molecular cloning of the *af* locus of *Zea mays* using the transposable elements *En* and *Mu1*. EMBO J. 4, 877-882.
- PAN, Y-B., PETERSON, P. A. (1988) Spontaneous activation of quiescent *Uq* transposable elements during endosperm development in *Zea mays*. Genetics 119, 457-464.
- PAN, Y-B., PETERSON, P. A. (1989). Tagging of a maize gene involved in kernel development by an activated *Uq* transposable element. Mol. Gen. Genet. 219, 324-327.
- PARRY, A. D., BABIANO, M. J., HORGAN, R. (1990) The role of cis-carotenoids in abscisic acid biosynthesis. Planta 182, 118-128.
- PEREIRA, A., CUYPERS, H., GIERL, A., SCHWARZ-SOMMER, Z., SAEDLER, H. (1986) Molecular analysis of the *En-Spm* transposable element system of *Zea mays*. EMBO J. 835-841.
- PETERSON, P. A. (1953). A mutable pale green locus in maize. Genetics 38,

- PETERSON, P. A. (1970). The En mutable system in maize. III. Transposition associated with mutational events. Theor. Appl. Genet. 40, 367-377.
- PETERSON, P. A. (1980). Instability among the components of a regulatory element transposon in maize. Cold Spring Symp. Quant. Biol. 45, 447-455.
- PETERSON, P. A. (1988). Transposon in maize and their role in corn breeding progress. Proc. of the 43rd. Ann. Corn and Sorghum Industry Res. Conf. (Chicago).
- PETERSON, T. (1990). Intragenic transposition of Ac generates a new allele of the maize P gene. Genetics 126, 469-476.
- POHLMAN, R., FEDOROFF, N. V., MESSING, J. (1984). The nucleotide sequence of the maize controlling element Activator. Cell 37, 635-643.
- PORTER, J. W., SPURGEON, S. L. (1979). Enzymatic synthesis of carotenoids. Pure Appl. Chem. 51, 609-622.
- PRYOR, A. J. (1985). The "Dotted" controlling element system in maize. In: Plant Genetics, pp. 419-431. Ed. M. Freeling, Alan R. Liss Inc., New York.
- QUATRANO, R. S. (1987). In: Plant Hormones and their Role in Plant Growth

and Development, pp. 494-514, P. Davis, Ed. (Nijhoff, Boston).

QUATRANO, R. S., BALLO, B., WILLIAMSON, J. D., HAMBLIN, M. T., MANSFIELD, M. (1983) ABA controlled expression of embryo specific genes during wheatgrain development. In: Plant Molecular Biology, pp. 343-353, Goldberg, R. B., Alan R. Liss, Inc., New York.

REICHENBACH, H., KLEINIG, H. (1984). Pigments of myxobacteria. In: Myxobacteria: Development and Cell Interactions, ed. E. Rosenberg. Springer-Verlag, New York.

REISS, T., BERGEFELD, R., LINK, G., THIEN, W., MOHR, H. (1983). Photo oxidative destruction of chloroplasts and its consequences for cytosolic enzymes levels and plant development. Planta 159, 518-528.

RHOADES, M. M. (1936). The effect of varying gene dosage on aleurone colour in maize. J. Genet. 33, 347-354.

RHOADES, M. M. (1938). Effect of the Dt gene on the mutability of the *ai* allele in maize. Genetics 23, 377-397.

ROBBINS, T. P., CARPENTER, R., COEN, E. S. (1989). A chromosome rearrangement suggests that donor and recipient sites are associated during Tam3 transposition in *Antirrhinum majus*. EMBO J. 8, 5-13.

ROBERTSON, D. S. (1952). The genotype of the endosperm and embryo as it influences vivipary in maize. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 38, 580-583.

ROBERTSON, D. S. (1955). The genetics of vivipary in maize. Genetics 40, 745-760.

ROBERTSON, D. S. (1975) Survey of the albino and white endosperm mutants of maize. The Jour. Heredity 66, 67-74.

ROBERTSON, D. S. (1978). Characterization of mutator system in maize. Mut. Res. 51, 21-28.

ROBERTSON, D. S. (1985). Differential activity of the maize mutator Mu at different loci and in different cell lineages. Mol. Gen. Genet. 200, 9-13.

ROBICHAUD, C. S., WONG, J. & SUSSEX, I. M. (1980) Control of in vitro growth of viviparous embryo mutants by abscisic acid. Dev. Genet. 1, 325-330.

ROBICHAUD, C., SUSSEX, I. M. (1986). The response of viviparous-1 and wild type embryos of *Zea mays* to culture in the presence of abscisic acid. J. Plant Physiol. 126, 235-242.

SAEDLER, H., NEVERS, P. (1985). Transposition in plants: a molecular model. EMBO J. 4, 585-590.

SALAMINI, F. (1981). Controlling elements at the *Opaque-2* locus of maize: their involvement in the origin of spontaneous mutation. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 45, 467-476.

- SCHIEFELBEIN, J. W. , RABOY, V. , KIM, H. Y. , NELSON, O. E. (1988). Molecular characterization of Suppressor-mutator (Spm)-induced mutations at the *bronze-1* locus in maize: the *bz-m13* alleles. In Proc. Internatl. Symp. Plant Transposable Elements. ed O. Nelson, pp. 261-278. New York: Plenum.
- SCHWARZ-SOMMER, Z. , GIERL, A. , CUYPERS, H. , PETERSON , P. A. SAEDLER, H. (1985) Plant transposable elements generate the DNA sequence diversity needed in evolution. The EMBO Jour. 4, 591-597.
- SCHWARTZ, D. , ECHT, C. (1982) The effect of Ac dosage on the production of multiple forms of Wx protein by the *wx^{m-9}* controlling element mutation in maize. Mol. Gen. Genet. 187, 410-413.
- SMITH, J. D. , McDANIEL, S. & LIVELY, S. (1978) Regulation of embryo growth and abscisic acid in vitro. Maize Genet. Coop. News. 52, 107-108.
- SMITH, J. D. , KOEHLER, D. E. , FONG, F. (1980). Genetic studies utilizing viviparous mutants of *Zea mays* indicate that abscisic acid may play a critical role in the induction of seed dormancy. Genetics 94 :S 100.
- SOMMER, A. , TARWOTJO, I. , HUSSAINI, G. (1981). Incidence, prevalence and scale of blinding malnutrition. lancet 1, 1407-1409.
- SOMMER, A. (1989). New imperatives for an old vitamin (A). J. Nutr. 119, 96-100.

SPRAGUE, C. F. (1936). The relation of moisture content and time of harvest to germination of immature corn. J. Am. Soc. Agron. 28, 472-478.

SUNDARESA, V., FREELING, M. (1987). An extrachromosomal form of the Mu transposons of maize. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 4924-4928.

SUTTON, W. D., GERLACH, W. L., SCHAWARTZ, D., PEACOCK, W. J. (1984). Molecular analysis of Ds controlling element mutations at the *Adh1* locus of maize. Science 223, 1265-1268.

TACKE, E., SCHWARZ-SOMMER, Z., PETERSON, P. A., SAEDLER, H. (1986). Molecular analysis of "states" of the *A1* locus of *Zea mays*. Maydica 31, 83-91.

TAYLOR, L. P., CHANDLER, V., WALBOT, V. (1986). Insertion of 1,4 Kb and 1,7 Kb Mu elements into the *bronze-1* gene of *Zea mays* L. Maydica 31, 31-45.

WALBOT, V., WARREN, C. (1988). Regulation of Mu element copy number in maize lines with an active or inactive Mutator transposable element system. Mol. Gen. Genet. 211, 27-34.

WESSLER, S. R. (1988). Phenotypic diversity mediated by the maize transposable elements *Ac* and *Spm*. Science 242, 399-405.

WESSLER, S. R., FLEENOR, D., VARAGONA, M. (1988). The splicing of transposable elements and DNA insertions from *Wx* mRNA. In: Plant

Transposable Elements, pp. 293-303, ed. O.E. Nelson, Jr. Plenum Press,
New York.

WILSON, G. F., RHODES, A. M. & DICKSON, D. B. (1973) Some physiological
effects of viviparous genes *vp1* and *vp5* on developing maize kernels.
Plant Physiol. 52, 350-356.

ZEEVART, J. A. D., CREELMAN, R. A. (1988). Metabolism and Physiology of
Abscisic Acid. Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 39, 439-473.