

BC/21333

IB/81234



UNICAMP

T/UNICAMP

B735_e

81 234



Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo (a) candidato (a)
RACHEL CARVALHO BRANQUINHO
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Campina 14/10/23

Revanf!

**"ESTUDO DE UM SISTEMA INDUTOR
DE MUTAÇÃO EM MILHO"**

RACHEL CARVALHO BRANQUINHO

Orientação: Prof. William José da Silva

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

UNIDADE	IO		
N.º CHAMADA:	3735 e		
V.	Ex.		
TOMBO BC/	21333		
PROC.	286/94		
C	<input type="checkbox"/>	D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	CR\$ 800,00		
DATA	30/03/94		
N.º CPD			

em-00057965-1

"Pelo intelecto o homem cai em tentação; com sua consciência ele se separou da unidade, mas ao mesmo tempo ela lhe dá a chance de voltar à unidade com consciência total."

(Elisabeth Haich)

Ofereço este trabalho ao Cosmos pelos pais que me deu, pois o apoio deles foi fundamental para a realização da pesquisa. E também por me ter colocado no "caminho" do Prof. William.

AGRADECIMENTOS

- Ao milho, por me forçar a compreender as "colheitas" do ciclo da vida e as difíceis interações gênicas e pessoais.
- À Teresa e família Modro, por sempre acreditarem nas minhas loucuras.
- Ao Sr. Bento, D^a. Cida e D^a. Gê pelo auxílio durante o trabalho, pelo carinho e amizade do dia-a-dia. Ao Ferreira e a todo o pessoal do Barracão pela ajuda direta ou indireta.
- À M. Elisa, Vera e Laudenir pela contribuição na minha formação científica e pessoal.
- À Paula, Cris e Fernanda pela ajuda no trabalho.
- Ao meu irmão e a Lela por respeitarem minha escolha. À Míriam pelo apoio. Aos meus primos Beto, Omarzinho e Henrique pelo apoio na hora necessária.
- À minha avó por me dar o nome.
- Ao pessoal da Secretária do Dept^o de Genética pela paciência e atenção.
- À família Hannibal Barca por ser minha família em Campinas.
- Aos membros da banca, pelas valiosas sugestões.
- À CAPES pelo apoio financeiro.

ÍNDICE

I-Introdução	01
II- Revisão Bibliográfica	03
2.1- Mutantes de proteína e carboidratos do endosperma do milho	03
2.1.1- Mutantes de proteínas	03
2.1.2- Mutantes de carboidratos	05
2.1.3- Interação gênica em endosperma de milho	07
2.2- Ação de transposons em milho	11
2.3- Regulação gênica em sementes de milho	27
III- Materiais	30
3.1- Origem do germoplasma	30
3.2- Germoplasma usado nos testes genéticos	34
IV- Metodologia	35
4.1- Análise genética do sistema de transposon	35
4.2- Teste de alelismo	36
4.3- Teste com iodo	38
V- Resultados	39
5.1- Caracterização fenotípica dos mutantes	39
5.2- Análise genética dos mutantes	46
5.3- Caracterização genotípica dos mutantes	70
5.4- Análise da correspondência entre o genótipo da semente plantada com a progênie obtida na descendência	89

VI- Discussão	97
VII- Conclusões	106
VIII- Resumo/Abstract	108
IX- Referências Bibliográficas	112
X- Apêndice	124

I- INTRODUÇÃO

O milho é um cereal largamente explorado pelo seu valor nutritivo, tendo nas sementes cerca de 83% de carboidratos, 4,8% de óleo e 10,7% de proteínas. O amido está presente em maior parte no endosperma, perfazendo 70% do peso seco da semente. Os açúcares representam apenas 2,5% do peso do endosperma (Alexander & Creech, 1977). São conhecidos vários mutantes que alteram a constituição de proteínas ou carboidratos no endosperma de milho. Os mutantes de endosperma têm sido amplamente estudados, tanto pelas suas qualidades nutritivas, como também do ponto de vista acadêmico, por envolverem mecanismos de controle da síntese de aminoácidos, proteínas e carboidratos nas sementes.

Mutações genéticas surgem devido a alterações na sequência nucleotídica que geram assim diferenças na constituição molecular dos organismos. A frequência do surgimento de mutante em populações não é alta. Assim, muitas vezes é importante a reprodução desses efeitos em laboratório, produzindo mutações através da utilização de agentes mutagênicos. A descoberta de elementos de transposição, que são capazes de produzir altas taxas de mutação, tem demonstrado a importância dos mecanismos intracelulares como geradores de variabilidade genética. Neste sentido, a planta de milho é interessante para a detecção de elementos de transposição devido ao grande número de marcadores genéticos conhecidos. A presença destes mutantes permitem o monitoramento da inserção e excisão desses elementos em genes que

se expressam em quase todos os órgãos da planta. Entre esses marcadores genéticos estão os locos envolvidos na biossíntese e deposição de antocianina em diferentes órgãos da planta. Além dos genes para antocianina, são disponíveis ainda, os mutantes envolvidos na produção de proteínas e carboidratos no endosperma que, por sua vez, podem alterar a morfologia da semente em consequência de mudanças físico-químicas nos tecidos (Wessler, 1988).

O conhecimento da ação dos transposons em genes de endosperma de milho está sendo bastante explorado atualmente, por permitir a clonagem de genes via "gene tagging". Esta é uma interessante aplicação dos transposons em casos onde a identificação do gene não pode ser feita pelo seu produto gênico. Os genes Bz1, Bz2, A1, A2, C1, P, R, o2, vp1, hcf e Kn1 foram clonados por esta técnica (Gierl & Saedler, 1992).

A existência dos transposons nos organismos é assunto palpitante em Biologia. A presença destes elementos móveis em populações naturais e em populações submetidas a alta pressão de seleção indica a ampla distribuição destes elementos nas várias espécies estudadas. Os transposons podem ser considerados como fonte de variabilidade genética contínua e rápida nas populações.

Por ser um assunto de grande importância em Biologia, nossos esforços foram aqui concentrados para estudar um sistema indutor de mutações, com algumas características aparentemente distintas dos mecanismos geradores de variabilidade genética analisados até o momento.

II- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1.-MUTANTES DE PROTEÍNAS E CARBOIDRATOS DO ENDOSPERMA DO MILHO

Variantes genéticas para frações proteicas e para carboidratos do endosperma são bastante conhecidos em milho. Vários genes têm sido identificados e mapeados, e amplamente utilizados tanto em programas de pesquisa básica, como em melhoramento.

2.1.1.- Mutantes de proteínas

No desenvolvimento das sementes as proteínas sintetizadas são armazenadas em corpúsculos proteicos no endosperma. Aproximadamente 95% das proteínas que compõem estes corpúsculos são prolaminas, denominadas zeínas em milho. Existem diferenças estruturais entre as moléculas de zeína, distribuídas em 4 classes: alfa, beta, gama e delta, que são codificadas por diferentes genes que atuam no endosperma. A alfa-zeína, a mais abundante (50%) no endosperma do milho maduro é codificada por uma família multigênica. As outras classes são codificadas por genes presentes em somente uma ou duas cópias. Os genes que estão relacionados com a produção destas proteínas encontram-se nos cromossomos 7 (opaque2), 10 (opaque7), e no cromossomo 4, onde certos polipeptídeos de zeína são localizados e foram descritos por Nelson et al. (1965).

Dentre as 4 classes de zeínas, as mais abundantes são as constituídas por 19 e 22 kd. Os diferentes pesos moleculares

destas proteínas indicam o grande polimorfismo existente em cada um dos genes das diferentes classes desta família multigênica.

A mutação o2 causa a baixa transcrição da classe de 22 kd, resultando em uma redução de 50-70% de zeína (Kodrzycki et al., 1989). Dependendo do "background" em que o alelo nulo o2 estiver, a redução pode ser de 60-80% (Aukerman et al., 1991). A expressão deste gene depende do "background" devido a ação de fatores modificadores (Paulis et al., 1990).

Estudos da expressão gênica da zeína, realizados por Kodrzycki et al. (1989), demonstraram que a regulação destes genes são feitas tanto a nível transcricional quanto pós-transcricional. Além disso, a expressão dos genes de zeína é regulada ordenadamente e os mRNAs são acumulados em alta concentração durante o estágio de desenvolvimento do endosperma. O alto número de cópias dos genes da alfa-zeína mostram baixa atividade transcricional enquanto as outras classes de zeína codificadas por somente dois genes estão em alta atividade transcricional. Além dos genes da alfa-zeína observa-se a existência de pseudogenes, para esta classe, nas análises de sequências de DNA.

O gene o2 foi clonado via "transposon tagging" usando-se o sistema Spm (Schmidt et al., 1987) e Ac/Ds (Motto et al., 1988). Posteriormente demonstrou-se que a proteína codificada pelo o2 possui um domínio putativo semelhante a um "ziper de leucina" caracterizando um sítio de ligação de DNA com proteína como encontrado para algumas proteínas de protooncogênese animal e em

reguladores transcricionais de levedo (Hartings et al., 1989). Este "ziper de leucina" liga-se aos promotores dos genes das zeínas de 22 kd e não se liga aos de 19 kd (Schmidt et al., 1992). Esta mesma proteína quando produzida por E. coli se liga ao gene da zeína, demonstrando que o produto do gene *o2* não depende de outro fator para se ligar ao DNA.

A síntese proteica no endosperma de milho é um sistema ideal para os estudos de regulação gênica, devido à expressão tecido-específica dos genes envolvidos. E também pela participação destes locos numa família multigênica constituída de genes estruturais regulados ao longo do desenvolvimento do tecido. A identificação de box de prolamina em todos os genes de zeína permite a expressão específica destes genes no endosperma (Schmidt et al., 1992). A caracterização de genes com função regulatória de famílias multigênicas pode auxiliar na localização dos genes regulados, e gerar conhecimentos sobre mecanismos envolvidos na regulação gênica.

2.1.2 Mutantes de carboidratos

Na formação do endosperma, o armazenamento de carboidratos inicia-se basicamente com a ação da enzima sacarose sintase, que catalisa a reação de clivagem da sacarose para UDP-glicose e frutose, nas duas direções. O gene Shrunken, que codifica esta enzima, está localizado no cromossomo 9. A mutação neste loco reduz de 2-6% a atividade da sacarose sintetase e em 60% a quantidade de amido no endosperma (Choury & Nelson, 1976).

Os carboidratos metabolizados são basicamente acumulados na forma de amido. Este importante componente de reserva é encontrado na maioria dos tecidos em milho. No amido do endosperma encontram-se dois tipos de cadeia de amido. Uma linear denominada amilose, que corresponde a 25-28% do amido e uma ramificada, a amilopectina, que perfaz cerca de 75% do total de amido do endosperma. Alguns dos mutantes que alteram a constituição do amido no endosperma são tecido-específicos. Aparentemente existem vias únicas na formação de amido para os diferentes tecidos ou uma regulação tecido-específica da expressão gênica (Dang & Boyer, 1989).

A biossíntese de amido ocorre na matriz do amiloplasto, e tem-se demonstrado que a ramificação e a desramificação do carboidrato ocorrem na matriz antes da associação dos polissacarídeos em grânulos de amido (Shannon & Creech, 1977).

Estudos comparativos demonstraram que a enzima ramificadora da folha é a BE IIa (Dang & Boyer, 1989). Sabe-se que o gene amilose-extender (ae) é estrutural e codifica a enzima BE IIb (Alexander & Creech, 1977). O mutante ae interfere na composição do amido do endosperma, porém não interfere na síntese deste carboidrato nas folhas. Este fato indica que a expressão de BE IIa e BE IIb são independentes.

Segundo Shannon & Creech (1977), o mutante ae altera a proporção de amido do endosperma apresentando 59,8% de amilose e uma reduzida fração de amilopectina com menores pontos de ramificação do que a amilopectina encontrada no endosperma normal

(Dang & Boyer, 1989).

Estudos do efeito de dosagem do alelo *ae* demonstram que a atividade enzimática de ramificação não se altera com o alelo nulo. E com o aumento da dose do alelo *Ae* observou-se um aumento linear na atividade ramificadora da enzima *Iib* (Dang & Boyer, 1989).

Outro mutante que altera a qualidade de amido no endosperma é o *waxy* (*wx*), localizado no cromossomo 9, descrito por Collins em 1909 (Alexander & Creech, 1977). O gene *Wx* codifica a enzima glicosil-transferase que liga grânulos de amido e é responsável pela síntese de amilose no endosperma em desenvolvimento. O mutante *wx* ocasiona a conversão de todo alfa-1,4 glucano em amilopectina.

2.1.3- Interação gênica em endosperma de milho

A maioria das características observadas nos organismos é produto final de uma longa cadeia de intrincados processos metabólicos. A utilização de várias técnicas tem permitido uma melhor análise destes processos, mostrando em muitos casos a ação dos genes em passos individuais, definindo assim a ação enzimática de genes específicos. O fenótipo final de um organismo entretanto, é o resultado da ação e da interação de um grande número de genes. Estes genes, por sua vez, são influenciados por fatores ambientais que têm um papel também importante na sua expressão final.

As interações podem ser classificadas em dois tipos básicos, as alélicas e as não-alélicas. As alélicas ocorrem dentro de um determinado loco. As não alélicas ocorrem entre locos diferentes. Como exemplo de interações não alélicas tem-se a epistasia, a aditividade e a ação de modificadores. A interação epistática, segundo Gardner (1991), é uma interação funcional de diferentes genes não alélicos. Ou seja, qualquer gene que mascare a expressão de outro gene não-alélico é epistático sobre ele. De acordo com Strickberger (1990), não há necessidade de que um gene interfira no outro, podendo haver interação em consequência de uma diminuição ou aumento da atividade enzimática dos genes envolvidos. A aditividade se expressa quando ocorre dominância incompleta entre os genes que condicionam uma determinada característica. Nesse caso, o efeito dos genes se somam para a expressão final da característica. Os genes modificadores são aqueles que mudam o efeito fenotípico de outros genes de forma quantitativa.

Esses três tipos de interação são observadas em endosperma de milho, podendo ocorrer tanto entre mutantes de carboidratos como de proteínas. Para se avaliar o tipo de interação é necessário que se conheça como os mutantes individualmente alteram os constituintes do endosperma, produzindo um fenótipo característico. São bem conhecidos os mutantes o2, o7, f1 e f12, que alteram a fração proteica e os mutantes ae, du, su, su2 e wx que alteram a proporção de amilose e amilopectina. Alguns estudos têm sido feitos para elucidar o comportamento fenotípico e

bioquímico de mutantes de endosperma quando combinados em um mesmo "background" genético. A identificação fenotípica dos mutantes duplos e triplos recessivo é dificultada pelo efeito de dosagem gênica. E pela interação entre eles, como ocorre, por exemplo com os mutantes *du* e *su2* (Dunn et al., 1953). A combinação *aesu2* causa 54% de amilose e o fenótipo do endosperma é opaco. O *aewx* possui 15% de amilose e o fenótipo é opaco-enrugado. O *su2wx* não produz amilose e o fenótipo é opaco. O gene *su* em homozigose resulta em fenótipo enrugado. Entretanto, quando combinado com *ae* apresenta fenótipo vítreo. Esta interação facilita a identificação de segregação *Aeae* em "background" *su2su2*. O gene *wx* normalmente produz um fenótipo opaco característico, que também é facilmente indentificado pela reação com iodo. Em combinação com *du* produz um fenótipo enrugado, que não é característico de nenhum dos mutantes. Este mesmo tipo de interação complementar ocorre na combinação do mutante *ae* com o *wx*, resultando em fenótipos que vão de grãos semi-cheios a enrugados. O fenótipo translúcido do *ae* é epistático sobre o efeito enrugado do *su*. Na combinação dos mutantes *o2* e *ae*, a expressão fenotípica é semelhante a do *o2*, o que também ocorre na combinação *o2wx* (Alexander & Creech, 1977).

O mutante *wx* não forma amilose, mantendo uma completa ausência de epistasia com os outros mutantes para este componente do endosperma, com exceção de quando combinado com o gene *ae*. Nesse caso o endosperma *aewx* produz cerca de 15% de amilose. Outras interessantes combinações envolvendo o gene *ae* têm sido

observadas. O gene *ae* condiciona um alto ponto de birrefringência ao amido e é parcial ou totalmente epistático sobre o *su*, *su2* e *wx*. No entanto, quando combinado com *du* e com *dusu2* os valores da amilose são mais próximos dos encontrados em endosperma normal.

Kramer et al., (1958) definiram o padrão de epistasia condicionada pelo ponto de birrefringência. O gene *wx* é epistático sobre *ae*, *du*, *su* e *su2*. Já o gene *ae* é epistático sobre *du*. O gene *du* é epistático sobre o *su*; o *su2* é epistático sobre o *su* e *ae* e finalmente o *su* é epistático sobre o *ae*.

A proporção de amilose em estoques *ae* pode chegar até a 60% do amido dependendo do "background" genético do endosperma. Porém, quando combinado com outros mutantes como *du*, *su*, *su2* e *wx*, essa proporção pode variar de 0-70%. Esta faixa de variação pode ser ainda afetada pela presença de genes modificadores. O mutante *ae* causa uma redução do amido e um aumento da fração proteica quando comparado com milho normal. Este fato tem sido atribuído ao baixo peso do grão *ae* (Shannon & Creech, 1977).

A dificuldade de se separar fenotipicamente sementes com uma e com múltiplas combinações de alelos mutantes pode ser muito grande em consequência de interações gênicas que podem ocorrer entre os vários mutantes que atuam no endosperma do milho. Por isso, análises físico-químicas são necessárias para elucidar estas interações.

2.2- Ação de transposons em milho

McClintock (1951a) identificou algumas mutações em milho ocasionadas por outros genes, que ela denominou de elementos controladores, que mais tarde passaram a ser denominados de elementos de transposição. Os transposons são elementos móveis, presente no genoma dos organismos, responsáveis por uma grande variedade de fenótipos mutantes instáveis. A inserção e/ou excisão de elementos de transposição pode alterar tanto a estrutura como a função do gene. Conseqüentemente afeta o nível da expressão gênica, como também o aparecimento de eventos mutacionais específicos que resultam em setores clonais de células exibindo uma função gênica alterada (Fedoroff, 1984).

Os elementos de transposição acham-se muitas vezes silenciosos no genoma, talvez inseridos na heterocromatina, onde não podem transcrever e muito menos responder a sinais regulatórios. A ativação destes elementos está frequentemente associada estresse ambiental ou genômico nos indivíduos (Finchan & Sastry, 1974).

Estruturalmente os transposons são constituídos de uma região codificadora da transposase, enzima responsável pela transposição e de extremidades invertidas repetidas (TIR). A inserção, excisão e reinserção de um elemento envolve a interação entre a transposase e as extremidades invertidas repetidas. Estes eventos, normalmente, levam a duplicação de nucleotídeos ocasionando à formação de uma cicatriz. O elemento sofre a excisão de um sítio doador e se insere num outro sítio alvo,

normalmente próximo e no mesmo cromossomo.

Os elementos de transposição podem ser classificados em duas categorias, dependendo da presença ou não de uma etapa envolvendo síntese de RNA durante a transposição: os transposons e os retrotransposons. Na primeira categoria estão a maioria dos transposons de plantas e bactérias descritos. Os retrotransposons são elementos com estrutura 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). No entanto, a maioria dos transposons descritos em milho pertencem à primeira categoria.

Os elementos de transposição podem ser classificados em famílias. A identificação dos transposons dentro de uma mesma família depende da resposta à ativação, de um outro elemento, por reconhecimento da TIR. Além das TIR serem iguais para elementos de uma mesma família, os nucleotídeos duplicados no sítio de inserção do elemento no DNA também são iguais. Portanto, um elemento não-autônomo é ativado apenas por um elemento autônomo correspondente. Geralmente, o elemento não-autônomo é derivado de uma deleção de nucleotídeos do autônomo (Peterson, 1980).

Um elemento autônomo é capaz de promover a sua própria excisão e transposição independentemente de outros elementos, apresentando um padrão de herança instável do fenótipo mutado. Um elemento não-autônomo não é capaz de excisar-se 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 não-autônomo tanto em cis como em trans, suprindo-lhes as funções necessárias para ativação da transposição, e também de outros mecanismos genéticos associados com os transposons (Fedoroff et al., 1983). Em milho há várias famílias de transposons descritas, sendo que as mais conhecidas são: Ac (Activador, autônomo)/Ds (Dissociation, não-autônomo); Spm (Supressor-mutador, autônomo)/dSpm (Defectivo, não-autônomo); Dt (dotted); Mu (mutador); Bg (Bergamo, autônomo)/rBg (não-autônomo).

Os transposons estabelecem suas próprias características no desenvolvimento do organismo. Evidências genéticas confirmam que a frequência de transposição e o tempo de reversão são regulados pelo próprio elemento (McClintock, 1964). Essas variações na função do elemento são detectadas através de padrões de reversão somática alterada, tanto no tempo quanto no espaço, ou por inativações reversíveis de elementos inteiros, designada mudança de fase.

Um dos principais mecanismos relacionados com a regulação da transposição é o controle do número de cópias. Na família Ac/Ds tem sido observado que o aumento no número de cópias do elemento autônomo reduz o número de transposições (Schwartz, 1986). No elemento Mu foi verificado que o controle da atividade mutagênica é feita através do número de cópias no genoma (Fedoroff, 1984).

A capacidade do transposon de mudar de um estado ativo para um inativo (inativações reversíveis) é outro mecanismo de

regulação destes elementos. Essa mudança de estado pode ser acompanhada fenotipicamente pela mudança no padrão de variegação produzido, principalmente no endosperma da semente. Isto depende da duração da inativação que pode resultar no aparecimento de sementes sem o padrão variegado. A mudança de estado faz com que os alelos instáveis originem novos alelos, que produzem diferentes fenótipos, também instáveis. Porém, se a inativação permanecer por mais de uma geração, fenótipos estáveis podem ser observados (Doring & Starlinger, 1986). Em alguns casos, a mudança de estado tem sido associada com a transposição intragênica, no entanto, a maioria delas resulta de uma deleção dentro do elemento de transposição (Wessler, 1988). Outros pesquisadores também afirmam que a mudança de estado está relacionada com modificações a nível de DNA, mais especificamente relacionada com o grau de metilação (Doring & Starlinger, 1986; Fedoroff, 1989).

A mudança de estado mais bem caracterizada é a derivada do alelo dSpm que origina novos fenótipos com relação ao padrão da mutação somática causada pela excisão do elemento. Na presença de um elemento ativo Spm, estes alelos produzem grandes setores pigmentados e dão origem a novos alelos em alta frequência. O sequenciamento do DNA revela que a mudança de estado que origina pequenos setores, sugerindo uma reversão tardia no desenvolvimento, é ocasionada pela deleção de 2,2kb no elemento dSpm. As mudanças de estado a-m1 5719 A1, a-m1 1112 e bz-m13 CS9

ocorrem devido a uma deleção no ponto terminal da repetição subterminal. Suspeita-se que a deleção envolvendo as repetições subterminais podem interferir na ligação da transposase, resultando em baixa frequência de excisão (Tacke et al., 1986).

A inativação permanente de um elemento autônomo, como Ac e Spm, é ocasionada por uma deleção. Os elementos ativos podem tornar-se inativos e permanecer assim por várias divisões celulares (ciclo dos elementos) ou por várias gerações (elementos inativos) (Wessler, 1988).

Existe um elemento Ac inativo (Ac-i) que se comporta como Ds. Isto é, ele só transpõe na presença de Ac ativo, não pode transativar outro Ds no genoma e também não contribui no efeito de dosagem do Ac. Este tipo de elemento também é encontrado na família Spm (McClintock, 1962). O fato de elementos inativos poderem ser reativados transitoriamente ou permanentemente sugere que a perda na atividade não envolve rearranjos ou deleção no elemento. Esse é o caso de dois alelos do Ac que atuam no locus waxy, wx-m9 e wx-m7. Eles são estruturalmente idênticos ao do progenitor ativo. Porém, diferentemente do progenitor, ambos elementos exibem uma modificação no DNA envolvendo a metilação de citosina na sequência Ac, que não ocorre no DNA do wx. A reativação do alelo wx-m9 inativo está correlacionada com a desmetilação de 900 pb na região 5' do Ac. Esta região inclui o promotor, o sítio inicial de transcrição e um exon não traduzido (Schwartz, 1986).

A correlação da atividade do Ac com o estado hipometilado pode dar explicações ao fato do Ac transpor-se usualmente logo após a replicação, quando possivelmente está semi-metilado e possivelmente mais ativo. A caracterização molecular do Ac indica que a maioria dos sítios de inserção estão hipometilados. O fato de 80% do DNA de milho achar-se metilado sugere que o Ac tem preferência por sequências hipometiladas ou que a inserção do Ac leva à hipometilação do DNA adjacente (Wessler, 1988).

A maioria das linhagens de milho não possuem os elementos Ac ou Spm ativos, porém contêm múltiplas cópias de sequências homólogas inativas. Este fato, juntamente com a evidência de que estresse no genômico causado por raio X, ultra-violeta e meio de cultura de células e tecidos podem ativar transposons em milho, incluindo Ac e Spm, permitem supor que os agentes que causam danos ao DNA podem também alterar o padrão de metilação e assim ativar elementos silenciosos (Fedoroff, 1986).

Mesmo em linhagens onde eles se apresentam silenciosos, pode aparecer plantas expressando a atividade de transposição. Essa ativação pode estar relacionada com uma resposta a um estresse genômico, a uma quebra cromossômica ocorrida após a exposição a radiação, ou então ser decorrente de problemas durante a meiose (Doring & Starlinger, 1986). O trabalho de Ribeiro (1992), mostrou que a realização de cruzamentos entre linhagens estáveis tornou possível o surgimento de mutantes tanto de endosperma como de plantas de milho, que não ocorriam nas linhagens parentais demonstrando que o estresse genômico pode ser gerado pelo simples

cruzamento de linhagens.

Nessa mesma linha têm sido mostrado que condições de seca, extremos de temperatura, infecção viral e outros choques que se relacionam com a sobrevivência do organismo podem levar à desmetilação de elementos de transposição obscuros no genoma (Chandler et al., 1986).

A atividade do Ac, Spm, e Mu está correlacionada com o estado de metilação. Uma vez ativado, o impacto do elemento autônomo é amplificado pela sua capacidade de transativar vários elementos não-autônomos no genoma. Esta excisão primária do elemento não-autônomo pode criar diversidade genética pela adição de nucleotídeos a regiões codificadoras ou reguladoras, alterando assim as proteínas ou a expressão tecido-específica. Após a excisão, os elementos autônomos ficam habilitados para se transporem em genes ativos devido à preferência por sítios não metilados. Isto realça sua capacidade mutagênica. Como os elementos Ac e Spm são ativos em todos os tecidos, e mutações somáticas podem ser herdáveis, a possibilidade de diversidade genética na progênie é imediata. As mutações serão acumuladas até os elementos Ac e Spm serem inativados por metilação ou tiverem uma deleção no gene da transposase. Uma vez os elementos Ac ou Spm tornem-se inativados, todos os elementos da família estarão imobilizados. O efeito deletério da inserção em certos genes ativos pode ser abrandado pela inserção dos elementos no exon e também pela produção de algum produto gênico funcional.

Tanto o nível de expressão como a ocorrência de eventos mutacionais podem ser modulados durante o desenvolvimento. Por isso, para cada alelo induzido pelo transposon pode-se obter distintos padrões fenotípicos. Estes padrões normalmente podem ser evidenciados quando estes elementos estão associados com genes que se manifestam visualmente em determinados tecidos, como no caso dos locos que controlam pigmentação da planta (Bz,P,I) e nos locos que atuam no endosperma, como o waxy, amilose-extender, opaque2, shrunken (Peterson, 1990). Estas associações permitem selecionar visualmente, em progênies, alelos instáveis com diferenças na duração, frequência e intensidade dos eventos mutacionais.

Em estudos realizados com o mutante o2 tem sido detectada a inserção de elementos de transposição neste loco. O sistema de transposição que, aparentemente, possui uma certa especificidade para o loco o2 é o Bg/rBg, estudado por Salamini (1980). Outro sistema de transposon que pode inserir neste loco é o Spm, que foi utilizado na clonagem deste gene por Schmidt et al (1987). A transposição do Bg no loco o2 mostra diferentes padrões de mutabilidade, indo de variegação fina à grosseira, produzido por clones de células translúcidas dispersas em "background" opaco (Salamini, 1980, 1981; Montanelli et al., 1984; Motto et al., 1987).

A origem do fenótipo variegado também pode ser ocasionado por quebras cromossômicas, como foi detectado no loco bronze por McClintock (1951a) e nos locos stickness e opaque2 por Motto et

al. (1987). Segundo esses últimos autores a não transmissão do cromossomo 7 ou mesmo a instabilidade deste em algumas células durante o desenvolvimento do endosperma pode ser a base do fenótipo variegado. A instabilidade cromossômica em linhas revertentes pode ser ocasionada pela tendência de um elemento de transposição de se reinserir preferencialmente em posições próximas ao local original (Motto et al., 1987).

O sistema de elementos de transposição $m(r)$ -Bg possui o elemento Bg que induz a mutação no alelo $o2m(r)$, podendo ser autônomo ou estar inserido no loco alterado (Salamini, 1980). Segundo este pesquisador o Bg é capaz de ativar a excisão de apenas 1% das cópias dos $r(Bg)$, enquanto, os 99% dos $o2m(r)$ restantes permanecem estáveis. Estas deduções foram feitas pela observação de que o estado variegado pode reverter para normal em baixa frequência, mas dificilmente para o estado recessivo estável. Este elemento induz a reversão de células germinais ou a reversão total do endosperma (reversão somática) com frequência de 0,86% e 0,78% respectivamente (Salamini, 1981). Esta reversão pode ocorrer tanto pela perda do autônomo como do não-autônomo do loco controlado. A transmissão da reversão germinal origina nos descendentes fenótipo semelhante ao selvagem. O elemento Bg possui certa habilidade de induzir altas taxas de endosperma totalmente revertente, além da capacidade de reverter aproximadamente 50% dos gametas na linha germinativa. A reversão do fenótipo variegado para o normal pode ocorrer tanto na micro como na megagametogênese, em frequências de 1,1% e 2,8%,

respectivamente. O aparecimento de grãos normais em progênes variegadas ocorre devido a eventos pós-meióticos, levando à perda da instabilidade que pode ocorrer tanto no gametófito masculino como na divisão mitótica do gametófito feminino. A transposição pode ainda ocorrer logo depois da fertilização, na primeira divisão do núcleo triploide que originará o endosperma (Motto et al., 1989). Segundo Salamini (1980), as mutações podem ocorrer no gametófito masculino depois da divisão que originará os dois núcleos que produzirão o endosperma e o embrião. Esta hipótese foi sugerida pela dificuldade deste autor em determinar o padrão de herança da instabilidade do loco o_2 , pois nem sempre há concordância entre o genótipo da semente plantada com o genótipo das sementes obtidas na descendência da planta proveniente de autofecundação.

Tem sido admitido que o sistema o_2 -m(r)-Bg tem características e atua de modo semelhante aos sistemas de transposição Ac ou Spm, mas que aparenta ter uma certa especificidade para o loco o_2 (Marotta et al., 1986). Para comprovar esta afinidade linhagens homozigotas para o gene *shrunken* foram cruzadas com linhagens portadoras do sistema Bg. Os resultados indicaram que o sistema Bg pode induzir deleções no loco *sh*, originando mutantes estáveis. Em análises moleculares, Motto et al. (1989) demonstraram a inserção do Bg no loco *wx* em duas das 350.000 sementes de plantas F_1 , resultantes do cruzamento de linhagem $wxBg$ -m com linhagem $wx+Bg$. Segundo este pesquisador, os elementos Bg/rBg podem perder o sítio

original de inserção. Entretanto, eles mostram tendências de originar famílias com até 3 sítios de inserção, provavelmente no mesmo cromossomo.

A inserção de elementos de transposição no loco *Sh* também já foi detectada (Geiser et al., 1982; Weck et al., 1984). Os alelos originados pela inserção destes elementos no gene *Sh* ocasionam uma variação na expressão fenotípica dos vários mutantes devido a diferentes rearranjos no DNA (Geiser et al., 1982).

Schwartz (1986), estudou o efeito do elemento de transposição *Ac*, autônomo, no loco *Wx*, originando o alelo *wx-m7*. O elemento *Ac* no germoplasma estudado frequentemente se excisa ou insere no gene *wx*. Neste germoplasma observou-se a resposta ao efeito de dosagem do elemento de transposição. O efeito fenotípico foi observado pela reação com iodo resultando em diferentes padrões de manchas nas sementes. Assim, com uma dose, *wx-m7/wx/wx*, tem-se um mosaico de áreas *Wx* e *wx*. Com duas, *wx-m7/wx-m7/wx* observa-se grandes setores *Wx* e as regiões *wx* com manchas revertentes. Endospermas com 3 doses de *Ac* mostram poucas e pequenas manchas *wx*.

Wessler (1988) mostrou que a inserção dos elementos da família *Ac/Ds* no loco *Wx* resulta na perda parcial ou total da função gênica. A excisão no tecido somático gera endosperma com clones de células com e sem amilose. Os 8 alelos waxy estudados foram gerados por inserções do elemento *Ac* ou *Ds* em posições diferentes do gene. Esses alelos têm expressão diferenciada, produzindo variações na quantidade de amilose, tamanho e

frequência dos setores revertentes do endosperma. A excisão em tecido germinal pode resultar na produção de um novo alelo pelas diferentes posições que as cicatrizes podem estar. A frequência na qual estes alelos são produzidos e a atividade no loco Wx são bem característicos em cada um dos 8 alelos. Também é observada a ocorrência da reversão germinal estável, como no alelo wx-m7, onde se encontram altas frequências de sementes com fenótipo completamente normal. Estes eventos mutacionais ocorrem devido a um aumento da atividade do Ac no primeiro núcleo triplóide do endosperma formado pela dupla fertilização. O Ac funcional pode estar ativo por uma geração celular antes de ser suprimido pela presença de outras doses de Ac. A transposição do elemento Ac antes ou logo após a fertilização originará endosperma completamente normal ou com grandes setores de amido normal (Schwartz, 1986).

O efeito da adição de nucleotídeos (cicatrizes) na expressão gênica vai depender do local onde houve a inserção, se em exon, intron ou sequências não transcritas. A posição de inserção do elemento dentro do loco pode influenciar a expressão fenotípica (Peterson, 1990; Wessler et al., 1986). A excisão do transposon de um exon pode produzir uma grande variação de fenótipos indo desde um efeito nulo (Peacock et al., 1984), a um efeito intermediário (Sutton et al., 1983), ou uma expressão normal no endosperma (Pohlmann et al., 1984).

A baixa frequência de reversão em alelos bem caracterizados em milho demonstra que a reversão está associada a uma baixa

frequência de excisão do elemento. Isto basicamente pode ocorrer devido deleção interna do elemento autônomo (Schwarz-Sommer et al., 1985).

A excisão do Ac do alelo wx-m8, por exemplo, gera um produto gênico funcionalmente ativo, mas alterado estruturalmente devido à presença de aminoácidos adicionais (Schwarz-Sommer et al., 1985). Segundo esses autores, um número de casos tem sido examinados nos quais a excisão do transposon ocorre nas células germinais originando progênies com fenótipos do tipo selvagem. Surpreendentemente, estes tipos revertentes, fenotipicamente selvagens, possuem no loco uma sequência nucleotídica diferente da selvagem. O esperado seria que a excisão do transposon fosse sempre imprecisa e geradora de alteração no sítio de integração. Entretanto, é difícil conhecer a precisa localização do elemento. A alteração em introns ou sequências reguladoras, aparentemente, deve afetar o produto gênico. O interessante é que algumas alterações nos exons parecem não interferir seriamente no produto gênico.

É bem conhecido que as plantas possuem desenvolvimento clonal. Existem áreas da planta que derivam de uma única ou de pequenas populações de células meristemáticas. Em consequência disso podem aparecer tecidos com setores revertentes, que podem ser resultantes da excisão do transposon com restauração da atividade gênica nas células que as originaram. O tamanho do setor está relacionado com o número de divisões mitóticas que ocorreram subsequentemente à excisão. A forma do setor, por outro

lado, é determinada pelo padrão de desenvolvimento celular do tecido.

A inserção de um dos elementos das famílias Ac e Spm pode ocorrer em exon, em intron ou ainda nas regiões 5'flanqueadas transcrita. A posição de inserção dentro do gene pode ocasionar a expressão da instabilidade fenotípica devido a alteração ocasionada no DNA de células do mesmo tecido onde ocorreu a excisão do transposon (Wessler, 1988). Os alelos instáveis gerados por estes elementos podem reverter o fenótipo selvagem, porém no sítio da excisão permanecem integrados alguns nucleotídeos resultante de inversões e/ou duplicações, denominados cicatrizes.

A expressão fenotípica resultante da ação dos transposons vai depender da posição da inserção/excisão e também da cicatriz deixada pelos elementos nos genes. Nos casos onde a função do produto gênico pode ser analisada, a integração destes elementos pode ocasionar a eliminação total da expressão gênica, ou alterar o controle da expressão no desenvolvimento (Schwarz-Sommer et al., 1985). A excisão destes elementos em milho, ocasionando cicatrizes, pode não restaurar a correta posição de leitura ou se a restaurar, pode resultar em proteína com propriedades enzimáticas alteradas. No revertente do alelo wx-m1, a cicatriz de 6-9 pb reduz a atividade enzimática da UDP-glucosyl-transferase, causando o aparecimento de setores somáticos de expressão intermediária. A mudança no padrão de expressão também pode ser o resultado do movimento do transposon para novas

posições dentro do próprio gene (Peterson, 1990). Por este motivo a função gênica pode ser restaurada em vários graus, indo desde a recuperação da atividade total à inatividade (Gierl & Saedler, 1992).

A inserção de um transposon nem sempre elimina totalmente a expressão gênica. Aparentemente, este é o caso da inserção do Ds ou dSpm nos genes responsáveis pela produção de antocianina na aleurona. Na ausência do Ac ou do Spm, seus elementos não-autônomos não podem excisar. Com isso mostram fenótipos estáveis intermediários. Na presença dos elementos autônomos, o Ds continua com expressão gênica intermediária, talvez por não sair de todas as células causando setores normais e/ou com expressão "total"; já o Spm promove a excisão de todo dSpm restaurando a expressão gênica em alguns setores (Fedoroff, 1984).

A mutação causada pela excisão de elementos de transposição em tecido somático reflete a frequência de mutações no restante da planta. Porém, os eventos mutacionais que ocorrem precocemente no desenvolvimento, antes da diferenciação dos gametas, são mais facilmente herdáveis. A excisão do elemento defeutivo frequentemente ocorre tanto em tecido somático como em germinal, restaurando a expressão gênica (Schwarz-Sommer et al., 1985).

É amplamente encontrado no genoma de milho sequências homólogas aos elementos de transposição Ac, mas nem todas estão ativas, seja devido ao padrão de metilação ou ainda por arranjos de nucleotídeos que não permitem a codificação da transposase. A alta capacidade mutagênica do transposon tem um papel importante

nas populações por ser um mecanismo gerador de variabilidade genética. Muitas das mutações geradas por estes elementos, entretanto, devem ser deletérias. Como os organismos sobrevivem a estas mutações deletérias e como e porque estes elementos persistem nas gerações não se sabe. O fato é que parece existir uma co-existência benéfica entre organismos e elementos, que devem estar co-evoluindo (Fedoroff, 1989).

O principal papel dos elementos de transposição na evolução é de mecanismo gerador de variabilidade a nível de DNA, seja por duplicação ou deleção de sequências, por inserção de alguns pares de bases, por alterar o quadro de leitura, como também por gerar produtos gênicos ativos alterados apenas estruturalmente.

Os transposons estão envolvidos tanto nos processos de desenvolvimento como no processo evolutivo por ocasionarem rearranjos nos cromossomos e também por influenciarem a tecido-especificidade dos genes, duração do desenvolvimento e o nível de expressão gênica (Schwarz-Sommer et al., 1985).

McClintock sugeriu que os elementos de transposição são liberados de um estado passivo em resposta a estresse genômico, como um mecanismo evolucionário de defesa (Johns et al., 1990). A sua capacidade regulatória torna o transposon um ótimo sistema auto-limitante para uma rápida troca no genoma (Fedoroff, 1989).

2.3-Regulação gênica em sementes de milho

A sustentação para o desenvolvimento dos seres vivos é dada pela regulação da expressão gênica no espaço e no tempo. Os estudos envolvendo genes que participam de vias biossintéticas da transformação de metabólitos produzidos pela folha em tecidos consumidores e/ou armazenadores de energia é de grande importância para a elucidação dos mecanismos que envolvem a regulação gênica durante o desenvolvimento das plantas (Werr et al., 1985).

Existem determinados órgãos, como as sementes, que para se desenvolverem dependem da expressão de genes que atuam especificamente em seus tecidos. Estes órgãos são sistemas que permitem a elaboração de experimentos conclusivos para o entendimento da ativação gênica diferencial em plantas.

O estudo da deposição de proteína nas sementes de milho, por exemplo, é um modelo amplamente explorado para estudos de regulação gênica. A expressão de genes para proteína é primariamente regulada a nível transcricional, entretanto o processamento pós-transcricional pode modular a quantidade final do produto traduzido (Goldberg et al., 1989). As proteínas de milho podem ser basicamente subdivididas em duas classes pelo peso molecular, as de 19 e as de 22 kd, codificadas por aproximadamente 100 genes localizados nos cromossomos 4,7 e 10. A expressão destes genes é regulada de maneira coordenada e tecido-específica durante o desenvolvimento do endosperma. Existem mutantes que reduzem a síntese das duas classes, como o floury2

ou preferencialmente a de 22 ou 19 kd como os mutantes o2 e o7, respectivamente. No mutante o2 a redução da síntese de polipeptídeos de 22kd é devida à redução da transcrição de genes da zeína. Análises destes mutantes têm sugerido que mais de uma via regulatória está envolvida na expressão de genes da zeína e que os genes codificadores das duas classes são aparentemente regulados independentemente. O mapeamento dos vários genes estruturais de zeína indica que a regulação destes genes deve ser feita pela interação de ativadores trans com sequências da região adjacentes 3' e 5'. Nas duas classes, a maior homologia observada foi nos 15 pb da região -330 altamente conservada em todos os genes da zeína. Uma sequência similar a esta também foi encontrada em outro gene de endosperma de milho, o sh, que codifica a sacarose sintetase (Werr et al., 1985). Esta mesma sequência, também encontrada em outros cereais na posição -300, já foi encontrada em vírus, em animais e até no homem (Maier et al., 1987).

Vários segmentos de DNA derivados da região 5' flanqueada de diferentes genes para proteína de semente ligam-se a definidos fatores proteicos nucleares. Entretanto, na maioria dos casos, não tem sido demonstrada a ligação de fatores trans como reguladores da atividade promotora. Vários genes que participam do armazenamento de proteína em muitas espécies foram isolados. Coincidentemente ou não, as regiões 5' flanqueadas são sequências conservadas. Com isto pode-se suspeitar do envolvimento destes fatores trans na regulação da expressão gênica em proteínas das

sementes (Baumlein et al., 1992). Além disso, estes fatores também podem ser responsáveis pela transcrição tecido-específica (Maier et al., 1987). Estas sequências regulatórias podem estimular a expressão de genes somente no endosperma ou podem suprimir a expressão nos outros tecidos (Simpson et al., 1986; Colot et al., 1987)

Para se determinar o número mínimo de elementos necessários para a expressão gênica tecido-específica têm sido deletadas regiões "upstream" de genes para reserva de proteínas. Os resultados indicam que aproximadamente 100 pb são suficientes para a regulação tecido-específica e controle temporal destes genes (Matzke et al., 1990).

A metilação do DNA aparenta ter um efeito importante na regulação da expressão gênica em organismos superiores. Este processo consiste na ligação de grupo metil na base nitrogenada citosina. O efeito da metilação na regulação gênica é devido à interferência que o grupo metil pode ocasionar na interação DNA-proteína. Supostamente existem fatores específicos para transcrição proteica que reconhecem sequências metiladas e não metiladas e que interagem com a RNA polimerase (Holliday, 1987). A metilação inibe a interação DNA-proteína e conseqüentemente impede a transcrição do gene. Uma vez metilada, uma sequência nucleotídica pode ser mantida no estado inativo durante todo o desenvolvimento do organismo ou até mesmo por várias gerações.

III- MATERIAIS

3.1- Origem do Germoplasma

Para o desenvolvimento do estudo foram utilizadas linhagens e variedades de milho pertencentes ao Banco de Germoplasma do Departamento de Genética e Evolução - IB - UNICAMP.

O germoplasma utilizado neste estudo originou-se de 3 famílias de meios irmãos de uma população sintética de milho denominada Asteca Prolífico. Essa população, homocigota para o gene opaque2, teve suas progênies selecionadas em 1980, por segregar para um transposon não identificado atuando sobre genes envolvidos na biossíntese de antocianina. As sementes dessas famílias mostravam fenótipo característico da ação de elementos de transposição, ou seja, endosperma amarelo contendo pintas e/ou manchas roxas de tamanho variável, compondo um fenótipo instável para expressão de antocianina. De amostras das sementes variegadas, em gerações sucessivas de autofecundação, obteve-se uma linhagem pura designada Asteca-129o2. Essa linhagem produziu, ao longo de sua síntese, alguns mutantes de planta e de endosperma, que foram putativamente atribuídos à ação do transposon que originalmente produzia sementes com pintas roxas. Entre estes está o mutante causado pela inserção do transposon no gene designado Vp12. A mutação neste loco causa deficiência de carotenóides no endosperma, viviparidade e plântulas albinas (Maluf, 1991). A linhagem Asteca-129o2, aparentemente estável para

características de planta e frutos, ficou conhecida pela sua protoginia pronunciada, ou seja, exposição dos estilo-estigma bem antes da ântese, caráter esse incomum em milho. Essa característica despertou o interesse para o estudo da herança da protoginia em milho. Com esse propósito foram feitos cruzamentos da linhagem Asteca-129o2, de alta protoginia, com a linhagem 222, bem contrastante, com alta protandria. Essa última foi derivada da variedade Cuban Yellow Dent. Para a análise genética foram feitos F_2 e retrocruzamentos do F_1 para duas linhagens parentais na geração seguinte. Surpreendentemente, tanto o F_2 como o retrocruzamento à S_4 Ast-o2 apresentaram um fato bastante incomum. A segregação de grãos para vários mutantes de endosperma com fenótipos semelhantes ao amylose-extender (ae), ao sugary (su), ao sugary2 (su2), ao etched, etc, todos ocorrendo simultaneamente nas mesmas espigas. A surpresa resultou do fato de que nenhuma das duas linhagens parentais até então tinha segregado para gene algum que afete a composição química e/ou textura do endosperma, com exceção do fator opaque2 (o2) que já ocorria inicialmente nas famílias amostradas. As duas linhagens, tanto L222 como S_4 Ast-o2, são muito bem conhecidas e aparentemente estáveis para características visuais.

Em seguida, passou-se a desenvolver um germoplasma mais apropriado para se tentar entender a razão do aparecimento concomitante dos vários mutantes de endosperma nesses cruzamentos. O retrocruzamento Asteca-129o2 ($RC_1/L222$) foi autofecundado por várias gerações sucessivas para a obtenção de

uma linhagem pura que deveria segregar apenas para o sistema indutor de mutações. Isso foi conseguido através de autofecundação e seleção de famílias que apresentavam segregação para os vários mutantes de endosperma em gerações consecutivas. Desse trabalho obteve-se a linhagem Ast 222 portadora de um sistema mutador ativado desconhecido. O programa de cruzamentos para obtenção deste germoplasma está representado esquematicamente na FIG. 1 do apêndice.

Esse germoplasma apresenta, portanto, uma característica ainda não descrita em milho, ou seja, a capacidade de produzir várias mutações de endosperma em uma mesma progênie. Por ser este material uma linhagem pura, o surgimento das mutações foi hipoteticamente atribuído a um sistema mutador desconhecido que originalmente produziu instabilidade na antocianina de sementes o_2 da população Asteca prolífico opaque 2 .

Na geração S_5 (5 autofecundações) desta linhagem foram selecionadas 3 famílias com 13 progênies para se iniciar a avaliação da segregação dos primeiros cinco fenótipos identificados como normal (N), ceroso (ce), amilose (am), opaque 2 (o_2) e enrugado (enr) (FIG.1).

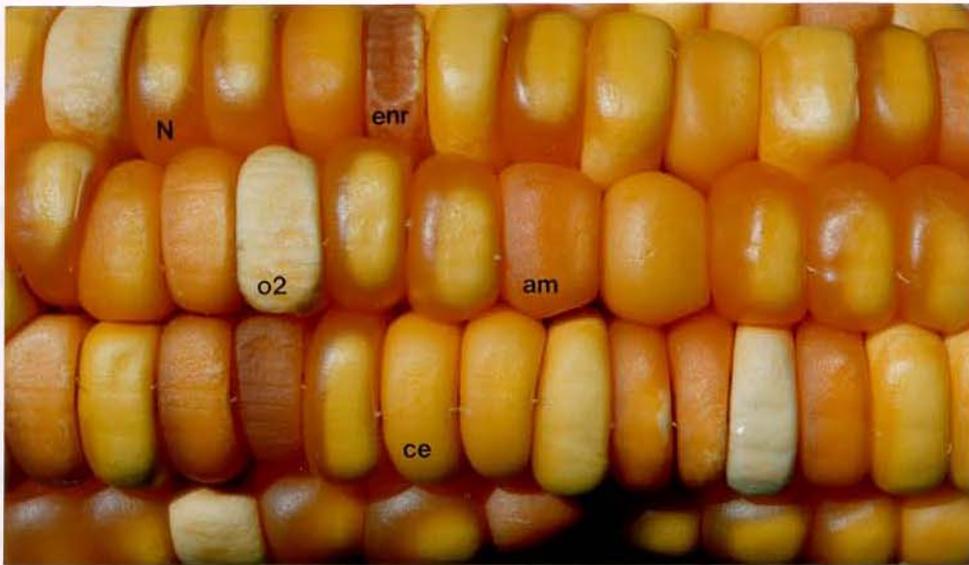


FIGURA 1- Classes fenotípicas observadas em uma progênie autofecundada da linhagem Ast 222. Sementes com endosperma normal (N); com endosperma ceroso (ce); com endosperma amilose (am); com endosperma opaco2 (o2) e com endosperma enrugado (enr).

IV- METODOLOGIA

4.1.- Análise genética do sistema mutador

O objetivo neste ponto foi o de estudar o comportamento do sistema mutador através da derivação de progênies estáveis e instáveis para o sistema mutador e observar as interações entre mutantes de carboidrato e proteína nas progênies selecionadas. Para isto foram realizados plantios subsequentes na área experimental do Laboratório de Milho da UNICAMP.

Foram analisadas 34 progênies correspondentes a 21 famílias da linhagem Ast 222-S₆. Esse trabalho foi realizado em novembro de 1990, para o monitoramento dos tipos segregantes destas progênies. No ciclo seguinte de autofecundação (Ast 222-S₇) foram analisadas 129 progênies de 48 famílias. A linhagem Ast 222-S₈ foi estudada na primavera-verão de 1991/92, através da análise de 83 progênies de 43 famílias. Na última geração (Ast 222-S₉) foi realizado o teste de alelismo. Cerca de 47 progênies de 24 famílias foram autofecundadas, com identificação individual das plantas polinizadas artificialmente, para posterior análise da segregação.

Nas progênies (S₆-S₉) autofecundadas da linhagem Ast 222 foram identificadas e quantificadas as várias classes fenotípicas dos mutantes. A sistemática utilizada foi a seguinte: cada progênie da linhagem Ast 222 com endosperma de fenótipo mutante era classificada e plantada separadamente, e as plantas obtidas

eram autofecundadas visando o monitoramento dos fenótipos produzidos na geração seguinte. No florescimento eram feitas autofecundações das plantas de cada uma das várias progênes portadoras do sistema mutador a fim de se obter progênes com maior grau de endogamia e para se observar a frequência dos eventos mutacionais nos vários tipos de endosperma, para análise da estabilidade dos elementos do transposon putativo.

No monitoramento dos tipos segregantes dentro de uma mesma progênie foram feitas anotações de cada tipo de endosperma semeado, anotando-se o fenótipo e a origem da progênie. Assim, como exemplo, uma espiga que segregava para vários tipos de endosperma teve suas sementes classificadas em tipo normal, ceroso, amilose e enrugado. Esses tipos eram separados e plantados em 4 linhas distintas. Uma proveniente de sementes normais, outra de sementes com fenótipo ceroso, outra de fenótipo amilose e uma última de fenótipo enrugado. Na geração seguinte as plantas eram novamente autofecundadas e as sementes das espigas novamente classificadas e plantadas individualmente. Esse procedimento em gerações consecutivas auxiliou a identificação dos genótipos das progênes com o decorrer das gerações de autofecundação.

4.2 Teste de alelismo

Estes testes foram realizados para identificar o genótipo dos mutantes de endosperma surgidos na linhagem Ast 222.

Assim, para verificar a ocorrência ou não de complementação alélica, foram feitos cruzamentos dos vários mutantes de endosperma da linhagem Ast 222, com 9 e 10 gerações de autofecundação, com estoques de mutantes wx, ae, o2, su, su2, sh2 e bt. Esses mutantes foram escolhidos por serem fenotípicamente semelhantes aos mutantes de endosperma que surgiram com o sistema mutador em estudo.

Como é necessário que ocorra boa coincidência no período de florescimento dos vários materiais que se pretende cruzar, os mutantes, com exceção do bt, foram plantados 10 dias antes da linhagem Ast 222 devido à maior precocidade da última. O testador bt, por ter comportamento semelhante, foi plantado no mesmo dia que a linhagem Ast 222.

No período de florescimento as progênes do sistema mutador foram autofecundadas com marcação individual das plantas. De cada linha, 5 plantas foram selecionadas e numeradas para serem as doadoras de pólen para os testadores. No total, cada planta marcada foi cruzada com aproximadamente 7 plantas do estoque de marcadores genéticos. Nos casos em que não se pode utilizar as plantas do sistema mutador como macho, fez-se o cruzamento recíproco.

Para a análise dos F_1 foram examinadas 423 progênes com o objetivo de verificar a ocorrência ou não de segregação para algum dos testadores, que obviamente indicaria quais os genes mutados que foram gerados pelo sistema mutador. No caso dos alelos testadores pertencerem ao mesmo loco do mutante gerado, a

segregação esperada seria de 1 normal: 1 mutante nas progênes heterozigotas. Já em progênes homozigotas dominantes ou recessivas esperar-se-ia 100% do tipo normal ou do mutante, respectivamente.

4.3- Teste com iodo

O endosperma normal da semente de milho, devido à presença do alelo Wx (normal), é composto de amido com aproximadamente 25% de amilose, e resulta em coloração azul quando em presença de iodo. O mutante waxy é constituído de 100% de amilopectina, como não possui amilose, resulta em coloração castanha com iodo, que corresponde praticamente à própria cor do corante. O fenótipo ceroso apresenta este mesmo comportamento na presença do iodo, por isso a identificação deste tipo ce foi feita tanto visualmente como pela reação com iodo.

A solução de iodo constitui-se de lugol com 75mg de iodo (400mg KI /100ml) e tem sido utilizada para diferenciar endosperma normal do tipo wx (Schwartz & Echt, 1982). Esta técnica foi utilizada principalmente para diferenciar os genótipos o2o2 Ce- dos o2o2cece, devido à interação epistática destes locos. Para a realização destes testes, as sementes foram previamente lixadas para retirada do pericarpo e possibilitar a melhor penetração do corante no endosperma.

V- RESULTADOS

5.1.- Caracterização fenotípica dos mutantes

No decorrer da análise das progênies da linhagem Ast 222 foram observados frutos com fenótipos normal (N), normal manchado (NM), ceroso (ce), ceroso manchado (ceM), amilose (am), amilose manchado (amM), opaque2, opaque2 manchado (o2M), manchado (M) e enrugado (enr). Estes tipos serão descritos a seguir.

Fenótipos normal e normal manchado

A designação do fenótipo normal foi dada ao endosperma do tipo selvagem que é o do milho normal, largamente cultivado, com frutos constituídos de aproximadamente 73,5% de carboidratos, 4,8% de óleo e 10,3% de proteínas (Alexander & Creech, 1977). Esta composição resulta em um endosperma vítreo com coloração variando de amarelo a laranja (FIG.2). A denominação NM recebe os números 1 e 2 devido às diferenças que ocorreram no padrão das manchas. A NM1 caracteriza-se pelas manchas opacas na porção basal do grão (FIG.2 e 3). E o NM2 possui manchas opacas um pouco mais destacadas da superfície do grão (FIG.3). Este fenótipo NM2 é muito semelhante ao padrão designado variegado grosseiro por Salamini (1980) em trabalhos com o mutante o2 na presença do sistema de transposon Bg.



FIGURA 2- Fenótipo normal (N) e normal manchado1 (NM1) de progênies autofecundadas da linhagem Ast 222.



FIGURA 3- Fenótipos normal manchado1 (NM1) e normal manchado2 (NM2) em progênies autofecundadas da linhagem Ast 222.

Fenótipos ceroso e ceroso-manchado

O fenótipo deste mutante foi denominado de ceroso devido à aparência opaca do endosperma com coloração amarelo-pálido. Na reação com iodo este fenótipo demonstrou ausência de amilose pela coloração castanha com a solução de lugol. Neste material foram caracterizado dois tons de amarelo nos grãos ceroso (ce), um mais claro e outro um pouco mais alaranjado. O fenótipo ce manchado (ceM) apresenta o grão ce com manchas opacas na porção basal (FIG. 4). A instabilidade somática no endosperma pode ser verificada na FIG.5, onde um grão normal possui um setor ce.



FIGURA 4- Fenótipos ceroso (ce) e ceroso manchado (ceM) observados em progênies autofecundadas da linhagem Ast 222.

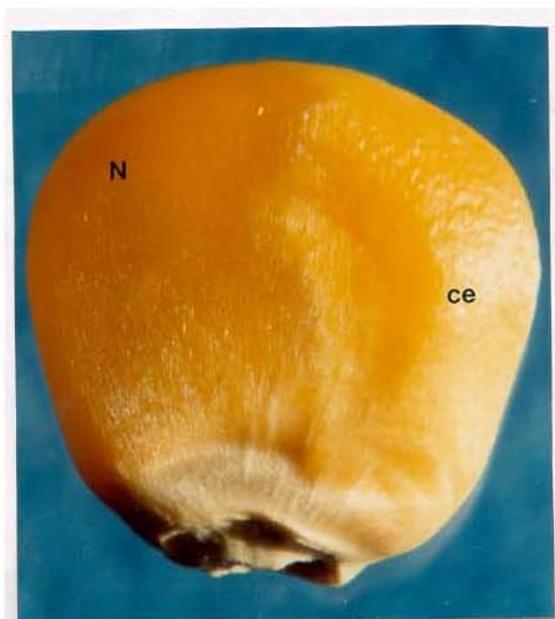


FIGURA 5- Instabilidade somática observada em progênie da linhagem Ast 222. Semente normal com setor ceroso.

Fenótipo amilose

O endosperma do mutante amilose-extender é constituído de 61% de amilose (Alexander & Creech, 1977) e possui uma coloração ocre fosca bastante característica. O fenótipo classificado neste trabalho como amilose, representado por am, tem características visuais semelhantes às citadas para o mutante amilose-extender (ae) do cromossomo 5. A variante manchada 1 e 2 (amM) foi dada aos grãos com manchas opacas seguindo o mesmo padrão dos fenótipos NM1 e NM2. Os fenótipos am e amM estão apresentados na FIG.6.

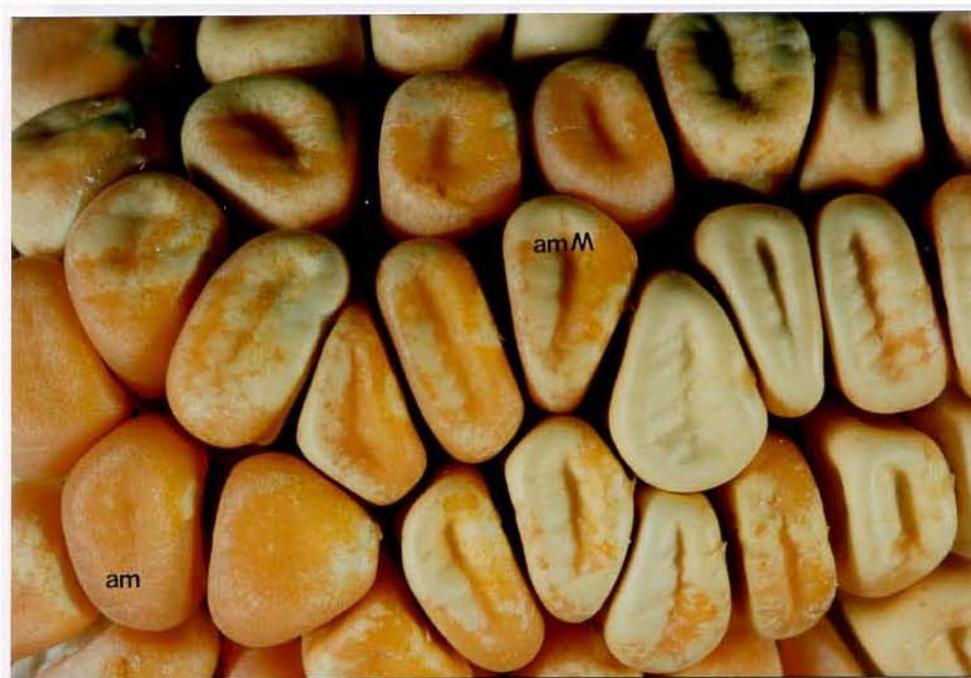


FIGURA 6- Fenótipos amilose (am) e amilose manchado1 (amM1) observado em progênies da linhagem Ast 222.

Fenótipo opaco

Este mutante, que já estava presente no estoque original, possui grãos opacos com textura farinácea condicionada pelo gene opaque2 (o2). A sua textura opaca é dada pela ausência de proteínas de 22kd (Kodrzycki et al., 1989). As variações fenotípicas encontradas foram classificadas como opaque2 manchado, opaque2 ceroso (o2ce) e manchado. O tipo o2ce era identificado pela reação com iodo. A FIG.7 mostra três destes fenótipos.



FIGURA 7- Fenótipos do tipo opaque2 (o2), opaque2 manchado (o2M) e manchado (M) em progênies autofecundadas da linhagem Ast 222.

Fenótipo enrugado

As sementes com este fenótipo são de coloração ocre levemente enrugada, semelhantes ao mutante sugary2. Este fenótipo é identificado como enr na análise da linhagem Ast 222. A variante manchada foi designada de enrM.

5.2- Análise genética dos mutantes

As progênies da linhagem Ast 222 foram analisadas principalmente para verificar a ocorrência de mutantes de endosperma. Das 293 progênies estudadas, apenas uma apresentou mutação de planta, mostrando uma segregação de 3 plantas normais para 1 planta albina. Todas estas progênies apresentaram mutações de endosperma que foram analisadas na 7^o, 8^o, 9^o e 10^o geração de autofecundação (S₇-S₁₀). O monitoramento das mutações surgidas foi facilitado pelo alto grau de endogamia das progênies. Em todas as progênies analisadas foram encontrados fenótipos normal, ceroso, amilose, opaqu² e enrugado. As progênies segregantes apresentaram diferentes combinações de fenótipos normal e mutante ou de dois tipos de mutantes.

Nas TABELAS de 1-15 são apresentados os resultados de segregação das progênies estudadas. As progênies segregantes para 2 e 4 classes fenotípicas estão apresentadas nas TABELAS de 1-8, e as segregantes para 3 e 5 classes estão nas TABELAS 9-15.

Na TABELA 1 são apresentadas as frequências das classes fenotípicas das progênies autofecundadas nas gerações S₇-S₁₀ que segregaram para os tipos normal e ceroso. Os resultados observados foram analisados pelo teste de qui-quadrado considerando-se a hipótese de segregação monofatorial (3N:1ce). As 15 progênies desta tabela foram amostradas da TABELA 1.1 do apêndice. Entre as 41 progênies segregantes para os fenótipos N e ce, cerca de 6 desviaram da proporção esperada de 3:1. Apesar dos

desvios significativos, os resultados mostram forte evidência de controle genético monofatorial, mostrando que o fenótipo do tipo ce é aparentemente condicionado por um gene recessivo. Nas gerações S7 e S8 foram observadas algumas progênies irmãs com e sem desvios significativos. A ocorrência de desvios entre progênies irmãs demonstram a possível existência de algum outro mecanismo interagindo na segregação do gene que condiciona o tipo ce. Nas progênies 2.6.9 e 7.3.6 observou-se a ocorrência de instabilidade somática com o aparecimento de um grão normal, com setor do tipo ce.

As frequências das classes fenotípicas das progênies autofecundadas das gerações S7-S10 que segregaram para os fenótipos normal e opaco são mostradas na TABELA 2. Os resultados observados foram analisados pelo teste de qui-quadrado considerando-se a hipótese de segregação monofatorial (3N:1o2). As 15 progênies desta tabela foram amostradas da TABELA 2.1 do apêndice. Das 31 progênies avaliadas deste fenótipo cerca de 7 (18%) desviaram significativamente da proporção esperada. Nesse caso, como o gene o2 faz parte do germoplasma original esperar-se-ia segregação do tipo 3:1, por se tratar de característica recessiva. Na geração S8 das três progênies irmãs da família 5.2 uma desviou da proporção esperada. Novamente se observou comportamento diferente na segregação de progênies irmãs, apesar da alta taxa de endogamia. Como o gene o2 conhecidamente condiciona uma característica recessiva, tais desvios significativos da segregação devem ser atribuídos a um mecanismo

genético que atua possivelmente sobre ele.

A TABELA 3 mostra as frequências das classes fenotípicas das progênies autofecundadas das gerações S₈, S₉ e S₁₀ que segregaram para os fenótipos ceroso e enrugado. Os resultados observados foram analisados pelo teste de qui-quadrado, também, considerando-se a hipótese de segregação monofatorial (3ce:1enr). As 11 progênies em questão foram amostradas da TABELA 4.1 do apêndice. Entre as 62 progênies segregantes para os fenótipos citados, cerca de 11% desviaram da proporção esperada de 3:1. Estes dados confirmaram que o fenótipo ce é condicionado por um par de alelos recessivos. Portanto, o fenótipo enrugado é obtido em consequência da expressão do tipo ce com outro fator, que também mostra herança monofatorial. A progênie 1.5.5 (S₈) apresentou um grão do tipo ceroso com um setor enrugado. Tal fenótipo é característico de instabilidade somática. Nas progênies irmãs 1.1.3.1 e 1.1.3.2 (S₉), com genótipos praticamente iguais, uma apresentou desvios na segregação e outra não. As duas, entretanto, mostraram instabilidade somática. A progênie 6.14.1.4 apresentou três grãos mais enrugados, com fenótipo próximo do tipo sh₂.

TABELA 1- Frequências dos fenótipos observados em progênie segregantes para os tipos normal(N) e ceroso(ce) da linhagem Ast 222 em 4 gerações de autofecundação. No teste de X^2 foi avaliada a hipótese de segregação monofatorial de 3N:1ce.

Geração de Autofecundação	Progênie	Endosperma		X^2 g.l=1
		N	ce	
S7	2.2	192	44	5,08 *
	2.3	134	47	0,09 ns
	4.3	121	39	0,03 ns
	7.6	75	45	10,00 **
S8	2.6.9	98 #	31	0,06 ns
	4.1.5	285	92	0,07 ns
	4.1.6	251	58	6,40 *
	4.1.10	112	19	7,70 **
	7.3.6	296 #	89	0,73 ns
S9	2.6.1.1	213	71	0,00 ns
	2.6.1.2	183	45	3,37 ns
	5.8.3.15	148	51	0,04 ns
	7.3.4.1	136	48	0,12 ns
S10	1.5.1.1.4	290	106	0,66ns
	5.8.3.1.3	198	50	3,10 ns

Obs.: ns: X^2 não significativo

* e **: X^2 significativo a nível de 5% e 1%, respectivamente.

#: instabilidade somática com aparecimento de grão normal com setor ce.

TABELA 2- Frequências dos fenótipos observados em progênes segregantes para os tipos normal (N) e opaco2 (o2) da linhagem Ast 222 em três gerações de autofecundação. No teste de X^2 foi avaliada a hipótese de segregação monofatorial de 3N:1o2.

Geração de Autofecundação	Progênie	Endosperma		X^2 g.l.=1
		N	o2	
S7	2.4	67	18	0,66 ns
	6.5	243	99	2,84 ns
	8.1	219	62	1,29 ns
S8	5.2.4	275	79	1,36 ns
	5.2.8	254	56	7,95 **
	5.2.9	243	77	0,15 ns
	6.2.4	278	116	4,14 *
	6.3.3	222	52	5,30 *
	7.2.2	338	103	0,64 ns
S9	5.2.2.2	76	21	0,58 ns
	5.2.2.3	169	63	0,57 ns
	5.2.4.1	158	43	1,39 ns
	5.2.4.2	249	76	0,45 ns
	5.8.3.14	187	44	4,37 *

TABELA 3 - Frequências dos fenótipos observados em progênies segregantes para os tipos ceroso(ce) e enrugado(enr) da linhagem Ast 222 em 3 gerações de autofecundação. No teste de χ^2 foi avaliada a hipótese de segregação de 3ce:1enr.

Geração de Autofecundação	Progênie	Endosperma		χ^2 g.l.=1
		ce	enr	
S ₈	1.5.5	233 #	86	0,65 ns
	1.5.8	319	95	0,93 ns
S ₉	1.1.3.1	222 #	60	2,09 ns
	1.1.3.2	190 #	40	7,10 **
	5.8.4.2	53	11	2,08 ns
	6.14.1.4	108	29!	1,07 ns
S ₁₀	1.1.3.3.24	263	69	3,15 ns
	1.5.1.1.13	84	12	8,00 **
	6.14.7.1.11	120	31	1,61 ns
	6.14.7.1.13	52	21	0,55 ns
	8.2.2.1.11	226	71	0,19 ns

Obs.: ! - 3 grãos do tipo sh2

- grão do tipo ce com setor enrugado

A frequência das classes fenotípicas das progênies autofecundadas das gerações S₇- S₁₀ que segregaram para os tipos amilose e enrugado são apresentada na TABELA 4. Os resultados observados foram analisados pelo teste de qui-quadrado considerando-se a hipótese de segregação monofatorial (3am:1enr). Das 11 progênies desta tabela apenas uma desviou da proporção esperada. Estes resultados indicam que a característica enrugada é aparentemente condicionada por um gene recessivo, em loco com herança monofatorial, confirmando o que foi encontrado na segregação da característica ce mostrada na TABELA 3.

Na TABELA 5 são mostradas as frequências das classes fenotípicas das progênies autofecundadas das gerações S₇- S₉ que segregaram para os tipos amilose e opaque2. Os resultados observados foram analisados pelo teste de qui-quadrado considerando-se a hipótese de segregação monofatorial (3am:1o2). Das 14 progênies, apenas uma não se enquadra na segregação esperada, confirmando que o gene o2 é uma característica recessiva.

TABELA 4- Frequências dos fenótipos observados em progênie segregantes para os tipos amilose(am) e enrugado(enr) da linhagem Ast 222 em 4 gerações de autofecundação. No teste de χ^2 foi avaliada a hipótese de segregação monofatorial de 3am:1enr.

Geração de Autofecundação	Progênie	Endosperma		χ^2 g.l.=1
		am	enr	
S ₇	1.3	115	38	0,00 ns
	1.4	82	29	0,07 ns
S ₈	1.5.11	237	69	0,98 ns
S ₉	1.5.11.1	182	45	3,24 ns
	1.5.11.2	59	14	1,32 ns
	1.5.11.3	94	25	1,01 ns
	1.5.11.6	46	24	3,22 ns
	1.5.11.7	76	17	2,24 ns
	1.5.11.8	48	10	1,86 ns
S ₁₀	6.14.7.1.6	149	54	0,2 ns
	6.14.7.1.8	274	65	6,14**

TABELA 5- Frequência dos fenótipos observados em progênies segregantes para os tipos amilose (am) e opaco2 (o2) da linhagem Ast 222 em 3 gerações de autofecundação. No teste de χ^2 foi avaliada a hipótese de segregação monofatorial 3am:1o2.

Geração de Autofecundação	Progênie	Endosperma		χ^2 g.l.=2
		am	o2	
S7	0.1	58	17	0,22 ns
S8	5.2.18	279	89	0,13 ns
	5.2.19	251	96	1,32 ns
	5.2.20	171	49	0,87 ns
	5.2.21	62	20	0,02 ns
	5.2.22	224	78	0,11 ns
	5.2.23	207	63	0,40 ns
	6.17.2	151	55	0,32 ns
S9	5.1.1.21	192	47	3,63 ns
	5.2.2.1	159	37	3,92 *
	5.2.18.1	197	70	0,21 ns
	5.2.18.2	230	84	0,51 ns
	5.2.18.3	160	42	1,91 ns
	5.2.18.4	192	65	0,01 ns

Os dados de frequência fenotípica das progênes autofecundadas das gerações S_8 - S_9 que segregaram para os tipos normal manchado¹ e ceroso são apresentados na TABELA 6. Os resultados observados foram analisados pelo teste de qui-quadrado considerando-se a hipótese de segregação monofatorial (3NM1:1ce). Das 15 progênes que segregam para estes dois fenótipos, apenas uma desviou da proporção esperada. Como a característica ce se mostrou como recessiva, tais resultados indicam que a característica NM1 é controlada apenas por um loco. A progênie 6.14.3 (S_8) apresentou um grão normal com setor do tipo ce, demonstrando instabilidade somática no gene que condiciona o fenótipo ce.

As frequências das classes fenotípicas das progênes autofecundadas da geração S_{10} que segregaram para os tipos opaque² e ceroso são mostrada na TABELA 7. A separação destas duas classes foi baseada no teste de iodo. Os resultados observados foram analisados pelo teste de qui-quadrado considerando-se a hipótese de segregação monofatorial (3o2:1ce). Estes dados confirmam os já obtidos em segregações anteriores mostrando que a característica ce tem herança monofatorial e é controlada por um gene recessivo.

TABELA 6- Frequências dos fenótipos observados em progênes segregantes para os tipos normal manchado1 (NM1) e ceroso (ce) da linhagem Ast 222 nas gerações S₈ e S₉. No teste de χ^2 foi avaliada a hipótese de segregação monofatorial esperada de 3NM1:1ce.

Geração de Autofecundação	Progênie	Endosperma		χ^2 g.l.=1
		NM1	ce	
S ₈	2.1.2	168	45	1,70 ns
	2.5.1	198	67	0,01 ns
	2.6.3	151	46	0,29 ns
	2.6.6	88	32	0,18 ns
	2.6.7	102	31	0,20 ns
	2.6.10	140	42	0,36 ns
	4.1.1	246	61	4,31 *
	6.14.3	235 #	84	0,30 ns
	8.2.2	235	71	0,53 ns
	8.2.3	67	17	1,02 ns
	8.2.4	117	29	2,05 ns
	8.2.5	72	26	0,12 ns
	8.2.6	144	53	0,38 ns
8.2.7	118	31	1,40 ns	
S ₉	5.8.3.20	123	40	0,02 ns

ocorrência de um grão normal com setor do tipo ce

TABELA 7- Frequências dos fenótipos observados em progênies segregantes para os tipos opaco2 (o2) e ceroso (ce) da linhagem Ast 222 na geração S₁₀. No teste de χ^2 foi avaliada a hipótese de segregação monofatorial esperada de 3o2:1ce.

Geração de Autofecundação	Progênie	Endosperma		χ^2 g.l.=1
		o2	ce	
S ₁₀	5.8.3.1.6	35	11	0,03 ns
	5.8.3.1.7	164	45	1,34 ns
	5.8.3.1.8	209	60	1,04 ns

Na TABELA 8 são apresentadas as frequências das classes fenotípicas das progênies autofecundadas das gerações S₇- S₁₀ que segregaram para os tipos normal, ceroso, amilose e enrugado. Os resultados observados foram analisados pelo teste de qui-quadrado considerando-se a hipótese de segregação bifatorial (9N:3ce:3am:1enr). Do total de 23 progênies analisadas, cerca de 22% desviaram significativamente da proporção esperada. Os outros dados mostraram que as características ce e am são condicionadas por genes recessivos possivelmente localizados em cromossomos diferentes. A característica enr parece resultar da ação destes dois genes. Dentro das gerações S₇, S₈ e S₁₀ foram encontrados desvios significativos de segregação a nível de 1%. Desvios significativos e não-significativos foram observados entre progênies irmãs (7.3.2, 7.3.9 e 7.3.10), portanto progênies com "background" genético muito próximo. Estas discrepâncias indicam que além das mutações surgidas, ocorrem também, simultaneamente, desvios na segregação desses mesmos mutantes.

TABELA 8- Frequências dos fenótipos observados em progênies segregando os tipos normal(N), ceroso(ce), amilose(am) e enrugado(enr) da linhagem Ast 222 nas 4 gerações subsequentes de autofecundação. No teste de χ^2 foi avaliada a hipótese de segregação bifatorial do tipo 9N:3ce:3am:1enr.

Geração de Autofecundação	Progênie	Endosperma				χ^2 g.l.=3
		N	ce	am	enr	
S ₇	7.1	136	45	19	8	16,18 **
	7.3	103	43	28	13	3,41 ns
	7.4	82	22	22	9	1,39 ns
	7.5	65	23	25	3	3,05 ns
S ₈	1.5.1	229	87	67	26	2,62 ns
	7.3.2	128	49	35	20	4,49 ns
	7.3.9	64	21	0	8	21,60 **
	7.3.10	142	31	23	10	14,36 **
S ₉	1.5.1.1	73	22	23	7	0,28 ns
	1.5.1.2	127	34	32	13	2,76 ns
	1.5.1.3	106	28	33	3	7,11 ns
	5.8.4.5	31	10	8	1	1,89 ns
	6.14.7.1	123	49	38	16	1,87 ns
S ₁₀	1.5.1.1.1	129	36	47	18	2,44 ns
	5.8.3.1.5	44	4	4	0	17,47 **
	6.14.7.1.1	52	15	15	2	2,56 ns
	6.14.7.1.5	100	26	26	12	2,42 ns
	8.2.2.1.6	215	78	66	6	14,27 **

Nas TABELAS de 9-14 estão apresentadas as progênies segregantes para 3 e 5 classes fenotípicas. O trabalho de Alexander & Creech (1977), envolvendo combinações de mutantes demonstrou que os genótipos *aeo2*, *wxo2* e *bto2* possuem expressão fenotípica do *o2*. Em combinação com outros mutantes de carboidrato, como o *sh2* e *su2*, o fenótipo passa a ser o do mutante de carboidrato. Portanto, num germoplasma onde o gene *o2* está combinado com outros genes mutantes, pode-se esperar a ocorrência de alterações em algumas das classes fenotípicas observadas. Estas combinações poderiam resultar em proporções como a da segregação bifatorial ou da trifatorial, com interações epistáticas.

As frequências das classes fenotípicas das progênies autofecundadas das gerações S7- S10 que segregaram para os tipos normal, *opaque2* e *ceroso* encontram-se na TABELA 9. Os dados observados foram analisados pelo teste de qui-quadrado considerando-se a hipótese de segregação bifatorial com interação epistática do tipo 9N:3o2:4ce. A interação deve ter ocorrido a nível fenotípico devido a não distinção dos fenótipos ce do ceM. Das 15 progênies estudadas, cerca de 4 desviaram significativamente da proporção esperada. Estes dados de segregação parecem indicar a presença de dois locos com segregação independente com interação entre eles. Novamente podem ser observadas progênies relacionadas, com e sem desvios. Pois das 4 progênies irmãs da família dois (S7 e S8), 50% delas desviam significativamente da proporção esperada. Na geração S9 a

progênie 8.2.2.3 apresentou um grão normal com setor ce, mostrando uma possível instabilidade dentro do loco que condiciona esta característica.

As frequências das classes fenotípicas das progênies autofecundadas das gerações S₇- S₉ que segregaram para os tipos normal, amilose e opaque₂ são apresentadas na TABELA 10. Os resultados observados foram analisados pelo teste de qui-quadrado considerando-se a hipótese de segregação bifatorial com interação epistática (9N:3am:4o₂). O mutante o₂ quando combinado com outros mutantes, frequentemente mascara a expressão gênica destes (Alexander & Creech, 1977). Além desta particularidade, o gene o₂ sofre efeito de fatores modificadores (Paulis et al., 1990). Como o loco o₂ tem herança monofatorial e a segregação observada nestas progênies seguem a proporção de 9:3:4 tem-se evidências para suspeitar que o fenótipo am é resultado da expressão de outro gene mutante também recessivo. As progênies mostradas são na sua maioria da família 5, em três gerações. Cerca de 25% dessas família também mostraram desvios significativos da proporção esperada.

TABELA 9- Frequências dos fenótipos observados em progênies segregantes para os tipos normal (N), opaco2 (o2) e ceroso (ce) da linhagem Ast 222 nas 4 gerações de autofecundação. No teste de χ^2 foi avaliada a hipótese de segregação bifatorial com interação epistática esperada de 9N:3o2:4ce.

Geração de Autofecundação	Progênie	Endosperma			χ^2 gl=2
		N	o2	ce	
S7	2.1	196	44	61	9,65 *
	2.5	58	24	32	1,34 ns
	2.6	223	37	67	20,59 **
	8.2	173	38	76	5,72 ns
	8.3	71	21	37	1,15 ns
S8	2.6.2	123	49	43	4,06 ns
	5.8.1	282	98	118	0,58 ns
	5.8.5	139	44	55	14,88 **
S9	4.1.3.2	174	43	66	3,60 ns
	5.8.3.9	196	76	48	18,48 **
	5.8.3.10	79	37	48	4,37 ns
	5.8.3.11	108	38	54	0,51 ns
	5.8.4.4	80	30	36	0,31 ns
	8.2.2.3	61#	20	26	0,03 ns
S10	8.2.2.3.12	164	45	47	7,48 *

Obs.: # - ocorrência de um grão normal com setor ce

TABELA 10- Frequência dos fenótipos observados em progênes segregantes para os tipos normal(N), amilose(am) e opaco2(o2) da linhagem Ast 222 em 3 gerações de autofecundação. No teste de X^2 foi avaliada a hipótese de segregação bifatorial com interação epistática de esperada do tipo 9N:3am:4o2.

Geração de Autofecundação	Progênie	Endosperma			X^2 g.l.=2
		N	am	o2	
S7	5.1	227	64	98	1,41 ns
	5.2	160	55	73	0,06 ns
S8	5.2.2	260	53	104	10,87 **
	5.2.11	181	63	73	0,75 ns
	5.2.12	240	52	101	8,08 *
	5.2.14	208	72	95	0,10 ns
	5.8.7	184	53	62	3,83 ns
S9	5.4.3.1	140	40	60	0,74 ns
	5.4.3.2	121	22	33	12,22 **
	5.8.3.4	149	51	59	0,55 ns
	5.8.3.7	169	48	64	1,72 ns
	6.14.7.3	111	25	41	3,57 ns

Na TABELA 11 são mostradas as frequências das classes fenotípicas das progênies autofecundadas das gerações S₇- S₁₀ que segregaram para os tipos opaqu², ceroso e enrugado. O efeito de modificadores e interação entre mutantes, citado anteriormente, parece também ocorrer nestas progênies, pois não se identificou a 4^o classe esperada, que deveria corresponder à classe am. Os resultados observados foram analisados pelo teste de qui-quadrado considerando-se a hipótese de segregação bifatorial com interação epistática (12o2:3ce:1enr). Estes dados mostram que o fenótipo ce pode ser observado em segregação, mesmo em combinação com o gene o2. Das 5 progênies desta tabela, duas desviaram significativamente da proporção esperada.

As frequências das classes fenotípicas das progênies autofecundadas das gerações S₇, S₉ e S₁₀ que segregaram para os fenótipos amilose, opaqu² e enrugado são apresentadas na TABELA 12. Os resultados observados foram analisados pelo teste de qui-quadrado considerando-se a hipótese de segregação bifatorial com interação epistática do tipo 9am:3o2:4enr. Uma das duas progênies desta tabela desviou da proporção esperada. A progênie 1.1 (S₇) apresentou dois grãos da classe enr, bem próximos do tipo sh². Como o gene o2 já ocorria no germoplasma original, a observação de progênies segregantes com outros mutantes nestas proporções indica que nessa família tem-se segregação para um loco mutado com segregação monofatorial, que apresenta interação epistática com o gene o2.

TABELA 11- Frequências dos fenótipos observados em progênie segregantes para os tipos opaco2 (o2), ceroso (ce) e enrugado (enr) da linhagem Ast 222 em 3 gerações de autofecundação. No teste de χ^2 foi avaliada a hipótese de segregação bifatorial com interação epistática do tipo 12o2:3ce:1enr.

Geração de Autofecundação	Progênie	Endosperma			χ^2 g.l.=2
		o2	ce	enr	
S7	6.9	149	33	24	10,62 **
	6.10	133	27	11	0,98 ns
S9	5.8.3.27	105	22	8	0,59 ns
S10	5.8.3.1.9	231	51	13	2,37 ns
	8.2.2.1.7	361	69	11	14,98 **

TABELA 12- Frequência dos fenótipos observados em progênies segregantes para os tipos amilose(am), opaco2(o2) e enrugado(enr) da linhagem Ast 222 em 3 gerações de autofecundação. No teste de χ^2 foi avaliada a hipótese de segregação bifatorial com interação epistática do tipo 9am:3o2:4enr.

Geração de Autofecundação	Progênie	Endosperma			χ^2 g.l.=2
		am	o2	enr	
S7	1.1	156	45	50!	4,23 ns
S10	5.8.3.1.14	169	79	95	7,32 *

Obs.: ! - dois grãos eram mais enrugados se aproximaram do fenótipo sh2

Na TABELA 13 são apresentadas as frequências das classes fenotípicas das progênies autofecundadas das gerações S₈- S₁₀ que segregaram para os fenótipos ceroso, opaque₂ e enrugado. Os resultados observados foram analisados pelo teste de qui-quadrado considerando-se a hipótese de segregação bifatorial com interação epistática levando a segregação do tipo 9ce:3o₂:4enr. Estes dados mostram que o mutante o₂, mascara a expressão do gene que condiciona o tipo ce. Apenas uma das 6 progênies não se enquadrou na proporção esperada.

As frequências fenotípicas das progênies autofecundadas das gerações S₇- S₁₀ que segregaram para os fenótipos normal, ceroso, amilose, opaque₂ e enrugado são apresentadas na TABELA 14. Os resultados observados foram analisados com o teste de qui-quadrado considerando-se a hipótese de segregação de 3 locos com 2 alelos com interação epistática, originando a proporção de 27N:12ce:9am:12o₂:4enr. Como o gene o₂ já ocorria no material, tem-se nessa família evidências do surgimento de pelo menos dois outros locos mutados com herança simples, mostrando segregação independente. Este tipo de segregação resulta das interações epistáticas entre os mutantes ce, am e o₂, agora agrupados nas mesmas progênies. Das 12 progênies segregantes mostradas nesta tabela, 30% desviam da proporção esperada. Na geração S₇ observam-se progênies de uma mesma família com qui-quadrado significativo e não-significativo. Das 7 progênies da família 5.8, apenas uma desvia da proporção esperada.

TABELA 13- Frequências dos fenótipos observados em progênies segregantes para os tipos ceroso (ce), opaco2 (o2) e enrugado (enr) da linhagem Ast 222 em 2 gerações de autofecundação. No teste de χ^2 foi avaliada a hipótese de segregação bifatorial do tipo 9ce:3ceo2:4enr.

Geração de Autofecundação	Progênie	Endosperma			χ^2 g.l.=2
		ce	o2	enr	
S ₉	5.8.3.16	140	32	46	5,71 ns
	8.2.2.1	92	52	99	39,60 **
S ₁₀	1.1.3.3.23	108	43	54	1,15 ns
	5.8.3.1.15	89	31	39	0,06 ns
	5.8.3.1.16	19	4	9	0,85 ns
	8.2.2.1.9	139	43	48	2,29 ns

TABELA 14- Frequências dos fenótipos observados em progênies segregantes para os tipos normal (N), ceroso (ce), amilose (am) e enrugado (enr) da linhagem Ast 222 nas 4 gerações subsequentes de autofecundação. No teste de X^2 foi avaliada a hipótese de segregação de 3 locos esperada do tipo 27N:12ce:9am:12o2:4enr.

Geração de Autofecundação	Progênie	Endosperma					χ^2 g.l.=4
		N	ce	am	o2	enr	
S7	6.6	155	40	40	63	19	10,43 *
	6.7	130	39	35	55	14	5,94 ns
S8	1.5.2	125	49	50	63	14	4,40 ns
	4.1.3	151	37	41	31	22	23,55 **
	5.8.3	227	78	45	101	19	7,57 ns
S9	5.8.3.1	90	43	42	44	15	3,31 ns
	5.8.3.2	59	28	18	28	9	0,35 ns
	5.8.3.21	9	28	3	74	4	169,20 **
	5.8.4.7	26	8	13	19	4	6,10 ns
	6.14.1.2	93	26	34	46	24	13,89 **
S10	5.8.3.1.1	52	19	13	16	6	2,47 ns
	5.8.3.1.4	73	25	23	29	4	4,85 ns

5.3- Caracterização genotípica dos mutantes

Os fenótipos dos mutantes ceroso e amilose surgidos na linhagem Ast 222 são semelhantes a alguns já descritos como o waxy e amilose-extender, respectivamente. O tipo designado enrugado, por outro lado, poderia ser um dos mutantes da biossíntese de carboidratos como o sugary, o sugary2, o shrunken2 ou brittle. A identificação desses fenótipos foi feita através de teste de complementação alélica (teste de alelismo) para verificar se as alterações genéticas surgidas correspondiam a novos mutantes ou se tratava dos já descritos. Para testar essas hipóteses foram realizados testes de alelismo envolvendo os mutantes wx, ae, o2, su, su2, sh2 e bt por apresentarem características fenotípicas semelhantes aos surgidos na linhagem Ast 222. Este teste foi realizado com progênies da geração S₉ e S₁₀, segregantes para todos os fenótipos citados, envolvendo, portanto, alelos tanto em homozigose como em heterozigose.

As TABELAS 15.1-18.1 mostram os resultados dos cruzamentos de plantas de fenótipos normal, ceroso, amilose, opaque2 e enrugado da linhagem Ast 222 com os testadores wx, ae e o2 da linhagem L477. Nas TABELAS 15.2-18.2 estão os resultados de plantas com estes mesmos fenótipos da linhagem Ast 222 com as plantas dos testadores su, sh2 e bt das populações I₄, I₅ e I₆, respectivamente, e com o testador su2 da linhagem 477.

Na TABELA 15.1 estão relacionadas as progênies resultantes do cruzamento de indivíduos do fenótipo normal e normal manchado 1 e 2 da linhagem Ast 222 com indivíduos da linhagem 477 nas versões wx, ae e o2. Das 18 progênies cruzadas com o testador wx, 12 eram segregantes e 6 eram normais. Este resultado indica que o gene responsável pelo fenótipo ceroso, caracterizado em 4 gerações consecutivas de autofecundação da linhagem Ast 222, é alélico ao gene wx. As progênies 1.5.1.1.4 e 5.8.4.9.4 apresentaram cada uma delas um grão normal com setor wx, mostrando que a instabilidade germinal, que ocorreu nas progênies da linhagem Ast 222, também pode ser observada em cruzamentos F₁ deste germoplasma.

Das 20 progênies resultantes do cruzamento com o testador ae, 5 segregaram 1:1 e duas desviaram desta proporção. Cerca de 13 são progênies normais, portanto, portadoras dos respectivos genes dominantes. Estes dados demonstram, portanto, que o tipo am nas progênies corresponde ao genótipo ae.

O cruzamento do fenótipo N com o testador o2 resultou em 2 progênies segregantes, uma na proporção esperada e outra não. Cerca de 8 progênies eram homocigotas normais. O tipo NM1 segregou para wx e ae, mostrando que corresponde a fenótipo de heterocigoto para os dois locos. Os cruzamentos do fenótipo NM2 com o testador o2 resultou em 5 progênies 100% o2, indicando que o tipo NM2 é uma variante do o2. Interessante notar aqui também que nos cruzamentos com o testador o2 ocorreram desvios significativos e não-significativos de segregação entre as

progênies F_1 , onde as plantas doadoras de pólen são irmãs. A confirmação de ocorrência de mutação nos locos wx e ae da linhagem Ast 222 e a alta frequência de progênies com desvios da proporção esperada são indícios claros da existência de um mecanismo genético gerador de variabilidade neste germoplasma.

As 77 progênies normais resultantes do cruzamento dos mesmos indivíduos da linhagem Ast 222 da TABELA 15.1 com os testadores su , $su2$, $sh2$ e bt são mostradas na TABELA 15.2. Os dados indicaram que as sementes enrugadas não são portadoras de mutações nesses locos.

TABELA 15.1- Resultados dos cruzamentos de plantas da linhagem Ast 222 provenientes de sementes de fenótipo normal(N), normal manchado1 (NM1) e normal manchado2 (NM2) com os testadores waxy (wx), amylose-extender (ae) e opaque2 (o2). As sementes N, NM1 e NM2 são provenientes de progênie que segregaram para os vários fenótipos da progênie.

Fenótipo da Progênie	Fenótipo da semente plantada	Progênie da planta	Cruzamento com Testadores		
			wx	ae	o2
1-N,ce,am,enr	N	1.5.1.1.1	68 N:71 ns	N	N
		1.5.1.1.4	58 N:66 ns #	N	N
		1.5.1.1.5	N	N	N
2-N,ce,am,enr, o2M,o2wx	N	5.8.3.1.1	74 N:71 ns	N	92 N:62 *
		5.8.3.1.3	27 N:30 ns	N	-
		5.8.3.1.4	57 N:48 ns	N	67 N:62 ns
		5.8.3.1.5	135 N:114 ns	N	N
3-N,ce,amM1,enr	N	6.14.7.1.1	109 N:99 ns	64 N:35 *	N
		6.14.7.1.3	96 N:108 ns	N	N
		6.14.7.1.4	138 N:127 ns	N	N
		6.14.7.1.5	100 N:113 ns	N	N
4-NM1,ceM,enrM	NM1	8.2.2.1.2	-	82 N:67 ns	-
		8.2.2.1.3	-	41 N:47 ns	-
		8.2.2.1.6	78 N:68 ns	21 N:19 ns	-
		8.2.2.1.7	56 N:54 ns	136 N:116 ns	-
5-NM2,amM2	NM2	5.8.4.9.1	N	N	o2
		5.8.4.9.2	N	15 N:11 ns	o2
		5.8.4.9.3	N	N	o2
		5.8.4.9.4	N #	N	o2
		5.8.4.9.5	N	185 N:126 *	o2

Obs.: ns χ^2 não-significativo para proporção esperada de 1 normal: 1 mutante.

* χ^2 significativo a 5% para proporção de 1:1.

um grão normal com setor wx

TABELA 15.2- Frequências de progênies normais: mutantes, obtidas do cruzamento de plantas provenientes de sementes normais da linhagem Ast 222 com os estoques de mutantes de carboidratos sugary (su), sugary2 (su2), shrunken2 (sh2) e brittle (bt).

Fenótipo Plantado	Testadores			
	su	su2	sh2	bt
Normal	18:0	19:0	21:0	19:0

Na TABELA 16.1 estão relacionadas as progênies resultantes do cruzamento de indivíduos de fenótipo ceroso e ceroso manchado com indivíduos da linhagem L477 homozigotos recessivos para os genes wx, ae e o2. Das 20 progênies resultantes do cruzamento de plantas da linhagem Ast 222 com o testador wx, duas são segregantes, uma desvia da proporção esperada e outra não. O cruzamento de plantas do tipo ce com indivíduos do testador wx resultaram em 18 progênies com 100% de indivíduos homozigotos para o gene wx, indicando aqui também, que o fenótipo ceroso surgido na linhagem Ast 222 corresponde a mutação no loco wx. No entanto, o aparecimento de uma progênie F₁ (Ast 222xL477) segregando na proporção de 1:1 demonstrou que o genótipo do endosperma não corresponde ao do embrião da mesma semente, na progênie 6.14.7.1.14, ou seja, o endosperma é wxwxwx e o embrião Wxwx. Tal evento poderia ter surgido por heterofertilização, que ocorre com frequência que varia de 1-5% (Robertson, 1984). Outra alternativa, talvez a mais provável, é que o mesmo mecanismo que gera as mutações também desvia as proporções da segregação. Em outra progênie F₁ (1.5.1.1.11 x L477 wx) observou-se o aparecimento de 15 sementes normais, em planta proveniente de semente waxy. Nas outras três progênies desta mesma família os F₁ foram todos wx. Assim sendo, algum mecanismo genético deve estar agindo, afetando a segregação, mesmo em progênies com alta taxa de endogamia.

No cruzamento com o testador ae obtiveram-se 13 progênies segregantes, sendo que 9 desviaram da proporção de 1:1. Estes

resultados indicam que as sementes de fenótipo wx, em algumas progênies, são heterozigotas para o loco ae. A frequência de 69,23% destas progênies com desvios da proporção esperada, pode, neste caso, pelo menos em parte, ser devida a dificuldades na separação visual do mutante ae.

Os cruzamentos de plantas provenientes de sementes do fenótipo ceroso com o testador o2 resultaram em duas progênies segregantes dentro da proporção esperada e 7 progênies normais. Já os cruzamentos com o fenótipo ceM produziram quatro progênies, duas segregantes, uma com 100% de o2 e outra normal. A progênie 8.2.2.1.12 apresentou um grão normal com setor wx no cruzamento com o testador ae, indicando a ocorrência de instabilidade no loco wx nas duas cópias do DNA da oosfera após a fertilização. A progênie resultante do cruzamento da planta 8.2.2.1.13 com o testador wx apresentou um grão enrugado em uma progênie com 100% wx. Este evento também evidencia a possível ocorrência de instabilidade nas duas cópias do gene Ae da L477.

Na TABELA 16.2 estão relacionadas as 69 progênies normais resultantes do cruzamento dos mesmos indivíduos da linhagem Ast 222 da TABELA 16.1 com os testadores su, su2, sh2 e bt. Os dados indicam que não ocorreu na linhagem Ast 222 mutação nestes 4 locos.

TABELA 16.1- Resultados dos cruzamentos de plantas da linhagem Ast 222 provenientes de sementes de fenótipo ceroso(ce) e ceroso manchado (ceM) com os testadores waxy (wx), amylose-extender (ae) e opaque2 (o2). As sementes ce e ceM são provenientes de progênies que também segregaram para vários fenótipos da progênie.

Fenótipo da Progênie	Fenótipo da semente plantada	Progênie da planta	Cruzamento com Testadores		
			wx	ae	o2
1-N,ce,am, enr	ce	1.5.1.1.11	15 N:69 *	N	-
		1.5.1.1.12	wx	61 N:21 *	-
		1.5.1.1.13	wx	N	-
		1.5.1.1.14	wx	N	-
2-N,ce,am, enr, o2M,o2ce	ce	5.8.3.1.15	wx	26 N:3*	49 N:42 ns
		5.8.3.1.16	wx	104 N:10 *	-
		5.8.3.1.17	wx	N	-
		5.8.3.1.18	wx	202 N:20 *	N
3-N,ce,amH, enr	ce	6.14.7.1.11	wx	104 N:45 *	N
		6.14.7.1.12	wx	-	N
		6.14.7.1.13	wx	11 N:8 *	N
		6.14.7.1.14	61 N:60 ns	5 N:4 ns	N
		6.14.7.1.15	wx	3 N:4 ns	N
4-ceM,ce, enrM	ceM	1.1.3.3.2	wx	N	o2
		1.1.3.3.5	-	-	82 N:84 ns
5-ceM,ce, enrM	ce	1.1.3.3.7	wx	145 N:112 *	18 N:20 ns
		1.1.3.3.8	wx	171 N:106 *	-
		1.1.3.3.24	wx	N	N
6-NM,ceM, enrM	ceM	8.2.2.1.12	wx	113 N:43 * #	N
		8.2.2.1.13	wx!	24 N:30 ns	7 N:10 ns
		8.2.2.1.14	wx	21 N:20 ns	-

Obs.: ns X^2 não-significativo para proporção esperada de 1 normal: 1 mutante.
 * X^2 significativo a 5% para proporção de 1:1. ! um grão enrugado
 # um grão normal com setor wx.

TABELA 16.2- Frequências de progênies normais: mutantes obtidas do cruzamento de plantas do tipo ceroso da linhagem Ast 222 com os estoques de mutantes de carboidratos sugary (su), sugary2 (su2), shrunken2 (sh2) e brittle (bt).

Fenótipo Plantado	Testadores			
	su	su2	sh2	bt
ceroso	19:0	22:0	19:0	9:0

As progênies resultantes do cruzamento de indivíduos de fenótipo amilose e amilose manchado com indivíduos da linhagem 477 nas versões wx, ae e o2 são apresentadas na TABELA 17.1. No cruzamento com o testador wx, cerca de 13 progênies segregaram, sendo que duas apresentaram desvios da proporção esperada. Três outras progênies são homozigotas normais. Tal resultado indica que certos tipos am eram heterozigotos e outros homozigotos dominantes para o loco wx. Os desvios de segregação dos dois F₁ da família 1.5.1.1 com o testador wx provavelmente são originados pelos mesmos mecanismos que alteram a frequência do mutante wx.

Das 19 progênies resultantes do cruzamento com o testador ae, 4 são normais e 12 são 100% ae. Essas observações indicam que o fenótipo amilose surgido nessas famílias é alélico ao gene ae. O fato de terem ocorrido 4 progênies normais pode ser decorrente da dificuldade na identificação fenotípica da semente plantada com relação ao mutante ae, como ocorre em certos "background" genéticos. As outras três progênies (F₁) segregantes resultantes do cruzamento do tipo amM1 com testador ae mostram claramente o efeito de dosagem que esse gene pode apresentar, pois o fenótipo classificado como homozigoto recessivo é na verdade heterozigoto para o gene ae. A expressão do alelo ae depende muito da expressão de outros genes que afetam a biossíntese de carboidrato, proteína e pigmentos que se acumulam no endosperma. Daí a necessidade de se interpretar a presença do gene ae nos endospermas mais de forma quantitativa que qualitativa.

Os cruzamentos dos tipos com fenótipo am com o testador o2 resultaram em 3 progênies segregantes e 6 normais. Com o fenótipo amM1 foram obtidas 6 progênies normais. Já com o fenótipo amM2, duas progênies foram 100% o2, indicando que as sementes com manchas do tipo amM1 não apresentam mutação no loco o2. Já as sementes com tipo amM2 são portadoras do gene o2.

Na TABELA 17.2 estão relacionadas as 51 progênies normais resultantes do cruzamento dos mesmos indivíduos da linhagem Ast 222 da TABELA 17 com os testadores su, su2, sh2 e bt, mostrando que não ocorreram mutações nesses locos da linhagem Ast 222.

ABELA 17.1- Resultados dos cruzamentos de plantas da linhagem Ast 222 provenientes de sementes de fenótipo amilose(am) e amilose manchado (aeM 1 e 2) com os testadores waxy (wx), amylose-tender (ae) e opaque2 (o2). As sementes ae e aeM são provenientes de progênie que segregaram para os vários fenótipos da progênie.

Fenótipo da progênie	Fenótipo da semente plantada	Progênie da planta	Cruzamento com Testadores		
			wx	ae	o2
-N,ce,am, enr	am	1.5.1.1.6	12 N:19 ns	N	N
		1.5.1.1.7	79 N:50 *	ae	N
		1.5.1.1.8	134 N:137 ns	ae	N
		1.5.1.1.9	67 N:39 *	ae	N
		1.5.1.1.10	N	ae	N
N,ce,am, enr, o2M, o2ce	am	5.8.3.1.10	41 N:28 ns	-	7 N:10 ns
		5.8.3.1.11	150 N:120 ns	ae	33 N:30 ns
		5.8.3.1.12	25 N:25 ns	ae	N
		5.8.3.1.13	17 N:13 ns	ae	-
		5.8.3.1.14	15 N:13 ns	ae	13 N:14 ns
-N,ce,amM1, enr	amM1	6.14.7.1.6	129 N:119 ns	N	N
		6.14.7.1.7	N	ae	N
		6.14.7.1.8	116 N:90 ns	N	N
		6.14.7.1.9	15 N:11 ns	aeM	N
		6.14.7.1.10	165 N:153 ns	N	N
-N,amM1	amM1	6.14.1.1.1	-	ae	N
-NM,amM2	amM2	5.8.4.9.6	-	65 N:48 ns	o2
		5.8.4.9.7	-	134 N:118 ns	o2
		5.8.4.9.8	N	ae	-
		5.8.4.9.9	-	97 N:83 ns	-

Obs.: ns χ^2 não-significativo para proporção esperada de 1 normal: 1 mutante.
* χ^2 significativo a 5% para proporção de 1:1.

TABELA 17.2- Frequências de progênies normais: mutantes obtidas do cruzamento de plantas do tipo amylose-extender da linhagem Ast 222 com os estoques de mutantes de carboidratos sugary (su), sugary2 (su2), shrunken2 (sh2) e brittle (bt).

Fenótipo Plantado	Testadores			
	su	su2	sh2	bt
Amilose	10:0	17:0	15:0	9:0

As progênies resultantes do cruzamento de indivíduos de fenótipo opaco² manchado, opaco² ceroso, manchado e normal manchado² com indivíduos da linhagem 477 nas versões wx, ae e o² acham-se na TABELA 18.1. Sementes com o fenótipo o²M produziram plantas que quando cruzadas com o testador wx resultaram em três progênies segregantes em 1:1. Estes dados indicam que o fenótipo o²M pode ser heterozigoto para o loco wx. Já o cruzamento envolvendo o fenótipo o²ce originou progênies 100% wx, portanto tal fenótipo corresponde ao duplo mutante.

No cruzamento com o testador ae obtiveram-se três progênies segregantes sendo que uma desviou da proporção esperada. As três outras progênies restantes eram homozigotas dominantes no loco Ae, pois o F₁ foi 100% normal.

Com o testador o² foram feitos 12 cruzamentos, todos eles resultando em progênies 100% o². Os dados indicaram que as 5 variantes do fenótipo o² eram homozigotas para o gene o².

Na TABELA 18.2 estão relacionadas as 26 progênies normais resultantes do cruzamento dos mesmos indivíduos da linhagem Ast 222 da TABELA 18 com os testadores su, su², sh² e bt. Os dados aqui também indicam que a Ast 222 não apresentou mutações em qualquer um desses locos.

TABELA 18.1- Resultados dos cruzamentos de plantas da linhagem Ast 222 provenientes de sementes de fenótipo opaco (o2), opaco manchado (o2M), manchada (M) e opaco-ceroso (o2ce) com os testadores waxy (wx), amylose-extender (ae) e opaque2 (o2). As sementes o2, o2M, M, o2ce são provenientes de progênie que também segregaram para os vários fenótipos da progênie.

Fenótipo da Progênie	Fenótipo da semente plantada	Progênie da planta	Cruzamento com Testadores		
			wx	ae	o2
1-N, ce, am, enr, o2M, o2ce	o2M	5.8.3.1.6	14 N:21 ns	N	o2
		5.8.3.1.7	72 N:92 ns	4 N:3 ns	o2
		5.8.3.1.8	86 N:101 ns	-	o2
		5.8.3.1.9	-	40 N:48 ns	o2
2-N, ce, am, enr, o2M, o2ce	o2ce	5.8.3.1.20	wx	169 N:99 *	o2
		5.8.3.1.21	wx	N	-
3-M	M	6.13.1.1.1	-	-	o2
		6.13.1.1.2	-	-	o2
		6.13.1.1.3	-	-	o2
		6.13.1.1.4	-	-	o2
		6.13.1.1.5	-	-	o2
4-NM, NM2	NM2	5.8.3.24.4	N	N	o2
		5.8.3.24.5	-	-	o2

Obs.: ns: χ^2 não-significativo para proporção esperada de 1 normal: 1 mutante.
* : χ^2 significativo a 5% para proporção de 1:1.

TABELA 18.2- Frequências de progênies normais: mutantes obtidas do cruzamento de plantas do tipo opaco da linhagem Ast 222 com os estoques de mutantes de carboidratos sugary (su), sugary2 (su2), shrunken2 (sh2) e brittle (bt).

Fenótipo Plantado	Testadores			
	su	su2	sh2	bt
Opaco	9:0	8:0	5:0	4:0

Na TABELA 19.1, finalmente, estão relacionadas as progênies resultantes do cruzamento de indivíduos de fenótipo enrugado com indivíduos da linhagem 477 nas versões wx, ae e o2. As 9 progênies ce envolvendo o cruzamento de indivíduos com este fenótipo com o testador wx e as 15 progênies am resultantes do cruzamento de indivíduos deste mesmo fenótipo com o testador ae indicaram que tal fenótipo é produzido pela interação destes dois genes, portanto possuem endosperma wxwxwx aeaeae.

Como a expressão dos mutantes de carboidratos sofre influência do "background" genético, o mutante enr poderia ser su, su2, sh2 e bt. Este fenótipo poderia ainda ser resultado da expressão complementar dos genes wx e ae como mostrou Alexander & Creech (1977). Os resultados da TABELA 19.2 mostram que ocorreram 49 progênies normais do cruzamento do fenótipo enrugado com os testadores su, su2, sh2 e bt. Coerentemente esses resultados mostram que a característica enrugada não é condicionada por mutantes que afetam o acúmulo de açúcares no endosperma, e que essas progênies não apresentaram mutações nesses locos.

TABELA 19.1- Resultados dos cruzamentos de plantas da linhagem Ast 222 provenientes de sementes de fenótipo enrugado (enr) com os testadores waxy (wx), amylose-extender (ae) e opaque2 (o2). As sementes enr são provenientes de progênie que também segregaram para os vários fenótipos da progênie.

Fenótipo da Progênie	Progênie da planta	Cruzamento com Testadores		
		wx	ae	o2
1-N, ce, am, enr	1.5.1.1.15	wx	ae	N
	1.5.1.1.16	wx	ae	N
2-N, ce, am, enr o2M, o2ce	5.8.3.1.22	-	ae	N
	5.8.3.1.24	-	ae	-
	5.8.3.1.25	wx	ae	7 N:9 ns
3-N, ce, am, enr	6.14.7.1.16	wx	ae	N
	6.14.7.1.17	wx	ae	N
	6.14.7.1.18	wx	ae	-
4-N, am1	1.5.10.1	wx	ae	N
	1.5.10.5	-	ae	N
	1.5.10.10	wx	ae	-
5-NM, am2	8.2.2.1.15	wx	ae	N
	8.2.2.1.16	-	ae	N
	8.2.2.1.17	-	ae	-
	8.2.2.1.18	-	ae	-

TABELA 19.2-Frequências de progênies normais: mutantes obtidas do cruzamento de plantas do tipo enrugado (enr) da linhagem Ast 222 com os estoques de mutantes de carboidratos sugary (su), sugary2 (su2), shrunken2 (sh2) e brittle (bt).

Fenótipo Plantado	Testadores			
	su	su2	sh2	bt
Enrugado	11:0	18:0	13:0	7:0

5.4- Análise da correspondência entre o genótipo da semente plantada com o genótipo da progênie obtida por autofecundação.

O monitoramento dos fenótipos da linhagem Ast 222 foi feito seguindo-se um critério de classificação, separação dos mutantes e plantio de cada grupo em linhas separadas. Este procedimento permitiu avaliar a correspondência do fenótipo da semente plantada com a segregação obtida da planta autofecundada. Serviu também para observar se a segregação dos mutantes nas progênies está relacionada com o padrão de segregação esperado pela genética mendeliana ou se os mutantes estão sendo constantemente gerados por outros mecanismos que também alteram a segregação. Neste estudo já foi evidenciado que a linhagem Ast 222 tem um mecanismo genético capaz de gerar os mutantes wx e ae, bem como de produzir desvios significativos de segregação em aproximadamente 14,33% das progênies analisadas, ao longo de 4 gerações de autofecundação. O mesmo mecanismo parece também ser responsável por instabilidade somática nos locos wx, ae e o2. A repetibilidade destes acontecimentos em um germoplasma com alta taxa de endogamia é forte evidência para se suspeitar do envolvimento de algum sistema de transposon. Ou ainda, pode existir outro mecanismo gerador de variabilidade genética não descrito que pode estar agindo na linhagem Ast 222. Como não se tem conhecimento de algum outro mecanismo indutor de mutação em alta frequência como os transposons, as sugestões de prováveis eventos que geraram as mutações nos locos wx e ae será baseada na

hipótese da presença de elementos móveis no germoplasma estudado.

Nas TABELAS de 20-23 estão apresentadas as frequências das classes fenotípicas observadas que não puderam ser explicadas por mecanismos de segregação alélica, porque o genótipo da semente plantada não foi observado na descendência da planta autofecundada.

Na TABELA 20 são mostradas quatro progênes derivadas do plantio de sementes de fenótipo wx. A progênie da geração S₇ apresentou um desvio curioso, pois um caráter recessivo (waxy) produziu indivíduos com fenótipo normal na descendência. As progênes irmãs 1.5.1.1.11 e 12 (S₁₀) segregaram os tipos waxy, enrugado, normal e amilose-extender. De acordo com essas classes suspeitar-se-ia que o genótipo da planta mãe fosse Wxwx Aea^e, portanto, deveria ser proveniente de semente normal e não do tipo wx como foi semeado. De acordo com a frequência de grãos, o genótipo mais provável destas plantas, que foram autofecundadas, seria wxwx Aea^e. Suspeita-se ainda que as classes N e ae, provavelmente, surgiram de eventos de transposição no loco wx dos gametas. Na progênie 6.14.7.1.14 (S₁₀) observa-se que ocorreu segregação monofatorial em um planta autofecundada admitida como homozigota para o gene wx. Este fato pode ter ocorrido em função da possível excisão de um transposon do gene wx, no núcleo gamético que fecundou a oosfera. Tal evento resultaria numa falta de coerência entre o genótipo do endosperma e o genótipo do embrião da semente plantada. Alteração semelhante a essa última poderia também ser explicada por heterofertilização, mas a alta

frequência de instabilidades nesses locos, verificada em várias progênes, parece aumentar as chances de ter ocorrido eventos de transposição.

As 21 progênes descendentes da autofecundação de plantas provenientes de sementes do fenótipo *ae* são mostradas na TABELA 21. Na geração S_8 , 9 progênes irmãs da família 1.1 segregaram os fenótipos *wx* e *o2* na proporção de 3:1. Progênes segregantes para tais fenótipos seriam esperados se o genótipo da planta autofecundada fosse *wxwx AeAe O2o2*. Portanto, este genótipo não poderia produzir fenótipo *ae* na descendência. Já na progênie 1.1.2 observou-se um grão enrugado do tipo *sh2*. As progênes irmãs 1.1.6, 8 e 9 (S_8) segregaram os fenótipos *wx*, *o2* e enrugado. As duas últimas se enquadram nas proporções de segregação bifatorial com interação do tipo $9wx:3o2:4wa$. Essa segregação seria esperada na autofecundação de um indivíduo com genótipo *wxwx Aeae O2o2*. Um fenótipo *ae* só poderia ser gerado na descendência considerando-se eventos de transposição no loco *wx* do núcleo gamético que fecundou os núcleos polares. Nas progênes 1.1.18, 1.3.1 e 7.2.10 da geração S_8 observa-se segregação dos fenótipos *wx* e enrugado. Estes fenótipos são esperados da autofecundação de planta com genótipo *wxwx Aeae*. No entanto, um genótipo desse não poderia gerar um fenótipo *ae*. Eventos de transposição no loco *wx* do gameta *wxae* poderiam muito bem explicar os resultados obtidos.

As progênes 1.5.1.1.9, 5.8.3.1.1.2 e 6.14.7.10 da geração S_{10} segregaram os fenótipos *ae*, *enr*, *N* e *wx*. Tais classes

fenotípicas são esperadas quando se autofecunda plantas de genótipo $Wxwx Aea$. Este genótipo faz com que a semente tenha fenótipo normal. No entanto, o endosperma que foi plantado era do tipo ae . Segundo a frequência de grãos das classes ae e enr na primeira e terceira progênes suspeita-se que o genótipo mais provável da planta seja $Wxwx aea$. Este genótipo geraria gametas $Wxae$ e $wxae$ e os grãos normais poderiam ter surgido pela excisão de um transposon do loco ae do gameta $wxae$, e a classe wx da excisão do mesmo gene no gameta.

As progênes irmãs 5.8.3.1.10, 11 e 13 (S_{10}) segregam os fenótipos ae , o_2 , wa , N e wx . Segundo a frequência observada, o genótipo mais provável que originaria tais fenótipos seria $Wxwx aea o_2o_2$. As classes N e wx poderiam ter surgido por eventos de transposição no loco ae dos vários gametas.

TABELA 20- Frequências fenotípicas de progênies derivadas do plantio e autofecundação de sementes wx provenientes de espigas segregantes da linhagem Ast 222.

Fenótipo Plantado	Número da Progênie	Endosperma				x ²
		N	wx	ae	wx/ae	
wx	6.15	20	81	0	0	-
	1.5.1.1.11	16	160	9	33	-
	1.5.1.1.12	2	80	2	18	-
	6.14.7.1.14	185	53	0	0	ns 1

Obs.: 1 teste de X² para a proporção de 3N:1wx.

TABELA 21- Frequências fenotípicas dos tipos normal (N), waxy (wx), amylose-extender (ae), opaque2 (o2) e waxy/amylose-extender (wx/ae) de progênies derivadas da autofecundação de plantas obtidas de sementes provenientes de espigas que segregaram para o fenótipo amilose-extender da linhagem Ast 222.

Fenótipo Plantado	Número da Progênie	Endosperma					x ²
		N	wx	ae	o2	wx/ae	
ae	1.1.1	0	198	0	145	0	** 1
	1.1.2	0	268#	0	65	0	* 1
	1.1.3	0	200	0	132	0	** 1
	1.1.4	0	176	0	79	0	* 1
	1.1.5	0	154	0	49	0	ns 1
	1.1.6	0	153	0	26	18	** 2
	1.1.8	0	107	0	41	50	ns 2
	1.1.9	0	75	0	17	40	ns 2
	1.1.11	0	334	0	133	0	ns 1
	1.1.12	0	294	0	58	0	** 1
	1.1.13	0	261	0	107	0	ns 1
	1.1.14	0	270	0	99	0	ns 1
	1.1.18	0	281	0	0	70	* 2
	1.3.1	0	233	0	0	68	ns 2
	7.2.10	0	226	0	0	48	* 2
	1.5.1.1.9	23	26	241	0	42	-
	5.8.3.1.1.2	26	13	26	0	13	-
	5.8.3.1.10	6	5	95	41	31	-
	5.8.3.1.11	15	14	76	20	17	-
	5.8.3.1.13	2	3	170	64	73	-
	6.14.7.1.10	4	2	115	0	58	-

Obs.: 1- teste de X² para as proporções de 3N:1wx

2- teste de X² para as proporções de 9wx:3o2:4wa

A TABELA 22 mostra cinco progênies descendentes da autofecundação de plantas provenientes de sementes de fenótipo enrugado. Os resultados do teste de alelismo demonstraram que este fenótipo é condicionado pelo genótipo wxwxw^x aeaeae. Portanto, os indivíduos com este genótipo quando autofecundados deveriam gerar descendentes com o mesmo fenótipo. No entanto, isto não foi observado nas progênies apresentadas nesta tabela. Nas progênies da geração S₇ e S₈ os eventos de transposição ocorreram, provavelmente, tanto no loco wx como no ae. E na progênie 6.14.8 ocorreu um evento de instabilidade somática que originou um grão normal com setor wx. Na geração S₁₀ as duas progênies irmãs da família 8.2.2.1 segregaram dentro das proporções esperadas para as características ae e wx/ae. O genótipo mais provável da planta que resultou nesses descendentes seria aeae Wxwx. Poderia, portanto, ter ocorrido a excisão de um transposon do loco wx, que restauraria totalmente a função gênica do alelo wx.

TABELA 22- Frequências fenotípicas dos tipos normal (N), waxy (wx), amylose-extender (ae), opaque2 (o2) e waxy/amylose-extender (wx/ae) de progênies derivadas da autofecundação de sementes enrugadas (enr) provenientes de espigas segregando para o fenótipo enrugado da linhagem Ast 222 em 3 gerações.

Fenótipo Plantado	Número da Progênie	Endosperma				X ²
		N	wx	ae	wx/ae	
enr	1.5	37	31	24	43	-
	6.14.8	77#	59	10	8	** 3
	6.14.9	147	51	78	14	** 3
	8.2.2.1.3	0	0	105	30	ns 1
	8.2.2.1.7	0	0	112	31	ns 1

Obs.: 1- teste de X² para as proporções de 3ae:1wa.
 3- teste de X² para as proporções de 9N:3wx:3ae:1wa
 # semente wx com setor wx/ae.

VI- DISCUSSÃO

O sistema gerador de instabilidade identificado na linhagem Ast 222 foi descoberto devido a sua capacidade de produzir alta frequência de mutações nos locos *wx* e *ae*. Ao contrário, a identificação de mecanismos causador de instabilidade, como os transposons em milho, tradicionalmente, tem sido feita através de análises genéticas, em alguns casos de citogenéticas, juntamente com a observação de fenótipos variegados tanto em tecido de planta como no endosperma. Foi a detecção de fenótipos instáveis como esses que levou McClintock (1951a) a descrever o primeiro sistema de transposição em milho, o Ac/Ds. Após esse trabalho, vários outros elementos de transposição foram descritos em plantas de milho, todos eles estudados a partir do aparecimento de instabilidade somática.

Menos comum tem sido a identificação de elementos causadores de instabilidade no genoma pelo surgimento de novos alelos, como o que ocorreu na Ast 222. O aparecimento de mutações recessivas em linhagens também motivou Robertson em 1978 a descrever um sistema de transposição, o Mutador (Mu).

O sistema Mu, entretanto, não parece ter especificidade para determinados genes como o encontrado no sistema da Ast 222, que produz mutações apenas nos locos *wx*, *ae* e *o2*. Pois o Mu produz mutações em vários genes como o alfa, *Bz2*, *Adh1* e *wx* (O'Reilly et al., 1985; McLaughlin and Walbot, 1987; Chen et al., 1987; Wessler et al., 1988), além de ocasionar o aparecimento de outras mutações

gerando sementes albinas, plântulas verde-pálidas, anões, etc. (Robertson, 1978). Outra diferença interessante é que a atividade mutadora do Mu é drasticamente reduzida em germoplasma com alta taxa de endogamia, a ponto de desaparecer totalmente (Alleman & Freeling, 1986). Este fato contrapõe-se ao observado no sistema da Ast 222, em que a frequência mutacional continua elevada em progênies com até 10 gerações de autofecundação. Outro comportamento distinto entre os dois sistemas é que os eventos de transposição no Mu são tardios, ao passo que no sistema indutor de mutações da Ast 222 são precoces.

Outra característica encontrada no sistema mutador da Ast 222 é que os eventos de instabilidade são precoces, que provavelmente fez com que a segregação em 14,3% das 251 progênies analisadas desviassem significativamente das proporções esperadas. Estes desvios dificilmente poderiam ser atribuídos a efeitos de outros genes que poderiam alterar a frequência gamética dos mutantes encontrados. Quando se produz linhagens com controle das progênies, envolvendo alta taxa de endogamia e conhecendo-se o heredograma completo por várias gerações, como o caso da Ast 222, os efeitos de outros genes alteradores da frequência gamética ficam facilmente identificáveis. Tem-se então a oportunidade de se analisar seguidamente a coerência no padrão de segregação nas várias gerações relacionadas, o que torna evidente a presença ou ausência de um fator genético que estaria induzindo desvios na segregação. Além do mais a endogamia produz homozigose nesses locos eliminando o efeito desses genes

causadores de desvios nas segregações das progênes subsequentes. As discrepâncias nas segregações da linhagem Ast 222 ficam, aparentemente, restritas às atividades do sistema mutador estudado.

Outro ponto que tem caracterizado vários sistemas de transposição é a sua capacidade de produzir quebras cromossômicas. Célebre foi o trabalho mostrando quebras, fusões e pontes cromossômicas causado pelo elemento Ac, mostrado por McClintock (1951b). O trabalho de Doerschug (1973) com o Dt também mostra essa associação. No caso da linhagem Ast 222 os desvios de segregação observados, ocasionados por transposições próximas aos locos wx, ae e o2, poderiam levar à quebras ou perdas dos cromossomos 9, 5 e 7 respectivamente, onde estão localizados esses genes. Esses eventos causariam, como consequência, uma diminuição na frequência destes alelos nos gametas, que poderia redundar nos desvios de segregação observados. Esse comportamento é comumente observado em germoplasma com transposon, como o encontrado por Motto et al. (1987) em estudos com o Bg no loco o2. Quebras cromossômicas assim induzidas produzem outros efeitos fenotípicos bastante característicos no endosperma, causando má formação nos grãos, produzindo sementes com endosperma defeituosos e minisementes, bem como irregularidades nas fileiras de sementes na espiga, causadas por aborto do óvulo. No caso da linhagem Ast 222 essas características não foram observadas em nenhuma progênie das estudadas ao longo de 4 gerações. Com isso a hipótese desse

sistema produzir alterações cromossômicas frequentes fica praticamente afastada. A comprovação final, entretanto, fica na dependência de análise citogenética.

Por outro lado, os desvios de segregação nas progênes autofecundadas da linhagem Ast 222 poderiam também serem gerados por instabilidade pós-meiótica, tanto no gametófito masculino como na divisão mitótica do gametófito feminino. Ou ainda, poderiam surgir de instabilidades nas primeiras divisões mitóticas do núcleo triplóide, que iria formar o endosperma. O resultado seria a reversão total do endosperma. Tais eventos foram descritos por Salamini (1980) em estudos com o Bg no loco o2 e por Schwartz (1986) em estudos com o Ac no loco wx. O comportamento de instabilidade germinal é amplamente conhecido como sendo um modo característico da ação de elementos de transposição, como descreveu Salamini (1980) para o sistema Bg, onde 50% dos gametas sofriam eventos de inserção/excisão.

O sistema gerador de instabilidade da Ast 222 também ficou caracterizado pela sua capacidade de gerar discordâncias entre o genótipo da semente plantada e o genótipo da descendência obtida da planta autofecundada. Como vimos nas tabelas de 20 a 22, em cerca de 30 progênes, o fenótipo da semente plantada não tem correspondência com o fenótipo das sementes obtidas na descendência desta planta quando autofecundada. Um comportamento semelhante a este também foi observado no loco o2 na presença do sistema Bg Salamini (1980). No sistema da Ast 222 esses eventos podem envolver apenas um loco, seja wx ou ae, tornando o

indivíduo, por exemplo, um heterozigoto estável. Pode também, envolver os dois locos de maneira instável. O fato de Motto et al. (1989) terem encontrado mutações com o Bg inserido no loco wx e o2 poderia sugerir que o elemento Bg e as instabilidades observadas nas progênies da Ast 222 são relacionados. Entretanto, a baixa frequência de transposição do Bg no loco wx, cerca de duas em 350000 sementes, e o fato de não se ter encontrado até agora mutações no loco ae produzidas pelo Bg. Estas informações demonstram a existência de diferenças entre estes dois mecanismos gerador de variabilidade genética. No sistema da Ast 222 a taxa de mutação é tão alta que é frequente observar sementes homozigotas para wx e ae produzirem plantas heterozigotas para esses locos. Casos deste tipo puderam ser observados no plantio de sementes de fenótipo wx (TABELA 20). Como a progênie 6.14.7.1.14 que segregou 3N:1wx mostrando que o embrião era heterozigoto para este loco. Neste caso, provavelmente ocorreu a instabilidade no loco wx no gametófito masculino que fecundou a oosfera produzindo um embrião heterozigoto, enquanto o endosperma recebeu o núcleo recessivo inalterado. Eventos de instabilidade ocorrendo, aparentemente, apenas no loco ae, também puderam ser observados. Nas progênies 5.8.3.1.10, 11 e 13 (TABELA 21), tanto as frequências de grãos resultantes da autofecundação, como o teste de alelismo indicaram que o genótipo da planta mãe era Wxwx aeae O2o2. Planta com esse genótipo autofecundado só poderia originar sementes de fenótipo normal e wx devido à instabilidade do loco ae. Nas progênies acima observou-se instabilidades

separadamente nos locos wx e ae em progênies distintas. O sistema mutador da Ast 222 produz altas taxas de instabilidade produzindo mutações simultaneas nos dois locos de um mesmo indivíduo. Isso pode ser observado no plantio de sementes de genótipo wxwx aeae que originaram plantas que, autofecundadas, produziram espigas segregando para sementes de endosperma normal, wx, ae e wx/ae nas progênies 1.5, 6.14.8 e 9 (TABELA 22), mostrando alterações simultâneas nos dois locos em questão.

Tanto os eventos de instabilidade gamética que ocorreram repetidamente nos locos wx e ae das progênies descritas acima, como os desvios de segregação observados nas tabelas de 1-14 são fortes evidências para mostrar a tendência do sistema da Ast 222 em gerar instabilidades nestes dois genes. Alguns casos mostrando certa especificidade de elementos de transposição por certos locos já foram descritos. Como é o caso do elemento Dt que se insere especificamente no loco A1 (Brown et al., 1989). Embora este elemento tenha sido mapeado em diferentes localizações nos cromossomos do milho (Pryor, 1985), somente mutantes do gene A1 tem sido associados até agora à presença do Dt no genoma. O sistema Uq/ruq também mostra uma certa especificidade pelo loco C, que condiciona a presença de antocianina nos tecidos, embora tenha sido utilizado para identificação do mutante "miniature" (Pan & Peterson, 1989). Outro transposon com ação específica é o Bg. Este sistema transpõe preferencialmente no loco o2 (Montanelli et al., 1984), mas já foi observada a sua inserção no gene wx, embora em frequência muito baixa (Motto et al., 1989).

Essas informações mostram que as características do sistema Bg/rBg são as que mais se aproximam do sistema mutador da Ast 222. Pois além da inserção comum nos locos wx e o2, o fenótipo NM2 da Ast 222 (figura 3) é semelhante ao padrão de variegação grosseira encontrado em sementes o2 na presença do elemento Bg, mostrado por Salamini (1981). No entanto, a baixa frequência de instabilidade que o Bg gera no loco wx e a sua não inserção no gene ae o torna aparentemente distinto do sistema encontrado na linhagem Ast 222. Isso é reforçado pelo fato dos estudos de Motto et al. (1989) demonstrarem que apenas uma dose do elemento Bg-7b3 não é suficiente para induzir a excisão do rbg, o que não ocorre com o sistema da Ast 222. Pois as progênes F₁ (Ast 222 x L477) demonstraram que apenas um conjunto cromossômico da Ast 222 é suficiente para gerar instabilidade no endosperma do cruzamento. Experimentos de hibridização com sondas da família Bg/rbg seriam pertinentes, numa próxima fase, para demonstrar se os dois sistemas ainda poderiam ter algo em comum.

A instabilidade específica do sistema da linhagem Ast 222 foi observada tanto em progênes resultantes da autofecundação da linhagem Ast 222 como também, em seus cruzamentos com a L477. Poderia, desse modo, suspeitar-se da existência de alguma sequência alvo nestes locos que seriam reconhecidas para a inserção de um transposon. Os genes wx, ae e o2 estão envolvidos com o armazenamento de metabólitos chaves no endosperma sendo críticos para a germinação, emergência e desenvolvimento inicial da plântula, características sem dúvida, de alto valor

adaptativo. A existência de um sistema de transposon relacionado aos locos wx, ae e o2, pode sugerir a possibilidade de existência de sequências nucleotídicas semelhantes nos três locos que por outro lado, poderiam estar relacionadas com a expressão tecido-específica. Essa ideia é compatível com o achado de sequências da região 5' flanqueadora que participam da regulação gênica em proteína de sementes (Baumlein et al., 1992) e da existência de sequências similares que atuam na biossíntese de amido, condicionada pelo gene sh (Werr et al., 1985). Os trabalhos de Maier et al. (1987) mostram que tais sequências regulatórias podem também ser responsáveis pela transcrição tecido-específica.

Na linhagem Ast 222 os setores mutantes em endosperma normal ou setores duplo mutantes (enr) em endosperma waxy são normalmente únicos e grandes. Cada um destes setores deve ser produto da instabilidade dos locos wx e/ou ae. A frequência dos eventos de instabilidade somática foi da ordem de 0,02%, em 66594 grãos analisados da linhagem Ast 222. Tanto os grandes setores, resultantes da instabilidade somática, como o elevado número de progênies autofecundadas com desvios significativos das proporções esperadas nas segregações mendelianas sugerem que as instabilidades geradas pelo sistema estudado ocorre precocemente durante o desenvolvimento da semente, diferente do que ocorre com o sistema Mu (Robertson, 1985). Nos estudos de Schwartz (1986) a inserção do Ac no loco wx originou o alelo wx-m7 e o padrão de manchas depende da dose deste alelo. No caso da Ast 222 os setores revertente do endosperma são grandes mesmo na geração F₁

do cruzamento com a L477. No caso do alelo wx-m7 com uma dose apenas do elemento autônomo têm-se no endosperma um mosaico de áreas Wx e wx.

Como se observou, o sistema gerador de instabilidade da Ast 222, embora possua algumas características semelhantes aos transposons descritos, não se comporta igualmente a nenhum deles no conjunto de suas propriedades. As informações geradas neste estudo dão indícios fortes do possível envolvimento de elementos de transposição nas instabilidade observadas. No entanto, para se comprovar a existência de elementos de transposição são requeridas análises citológicas e moleculares da linhagem Ast 222.

VII- CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitem concluir:

1- A linhagem Ast 222 é portadora de um sistema que gera alta frequência de instabilidade sistematicamente nos locos wx e ae. A contínua e simultânea ocorrência de mutações nos dois locos pode indicar a existência de passos comuns na regulação da síntese de amilose e amilopectina no endosperma do milho.

2- A análise genética das progênies da linhagem Ast 222 indica que os desvios de segregação observados nos locos wx e ae devem estar relacionados com o mesmo mecanismo que induziu o surgimento destes mutantes.

3- A análise fenotípica da instabilidade no endosperma, bem como a análise de segregação das progênies, sugere que os eventos de instabilidade ocorrem precocemente, seja nos gametas ou nas primeiras divisões do núcleo triplóide, ocasionando a reversão total do endosperma. Esta atividade precoce do sistema indutor de mutações é responsável pela frequência de 14,33% de progênies com desvios de segregação.

4- O sistema indutor de mutações presente na Ast 222 possui algumas características semelhantes a elementos de transposição já descritos em milho. Porém as instabilidades verificadas neste

estudo ocorrem especificamente nos locos wx e ae. Esta aparente especificidade ainda não observada nos elementos de transposição estudados, sugere que o sistema da Ast 222 pode ser um dos elementos de transposição conhecidos, porém com comportamento ainda não descrito, ou um novo sistema indutor de mutação.

5- Para comprovar que a instabilidade verificada na Ast 222 é devida à presença de elementos de transposição e determinar seus mecanismos de ação são necessárias análises citológicas e moleculares do germoplasma estudado.

VIII- RESUMO

O cruzamento da linhagem S₄ Ast-02 com a linhagem 222 foi feito para se estudar a herança da protandria em milho. Progênes F₁ foram retrocruzadas com a S₄Ast-02. Surpreendentemente, as progênes Ast (RC₁/222) apresentaram vários grãos com fenótipos semelhantes aos mutantes de endosperma waxy (wx) e amylose-extender (ae). O retrocruzamento, autofecundado por 6 gerações, produziu a linhagem Ast 222. Esta linhagem foi usada no presente trabalho para estudar o sistema genético responsável pelo surgimento dos mutantes neste germoplasma.

A análise fenotípica da instabilidade no endosperma, bem como a análise de segregação das progênes foram avaliadas ao longo de 4 gerações sucessivas de autofecundação. Alta frequência de instabilidade genética foram observadas nos locos wx e ae. Das 251 progênes estudadas, 14,33% desviaram significativamente da proporção esperada. Aparentemente estes desvios podem ser atribuídos à eventos de instabilidades precoces, tanto nos gametófitos como nas primeiras divisões do núcleo triploide, ocasionando a reversão total do endosperma. O sistema que induz mutações na Ast 222 também é capaz de induzir instabilidades em sementes F₁ derivadas do cruzamento com a linhagem estável 477. A contínua e simultânea ocorrência de mutações nos locos wx e ae pode indicar a existência de passos comuns na regulação da síntese de amilose e amilopectina.

O sistema indutor de mutações presente na Ast 222 possui algumas características semelhantes a elementos de transposição já descritos em milho. Porém as instabilidades verificadas neste estudo ocorrem especificamente nos locos wx e ae. Esta aparente especificidade ainda não observada nos elementos de transposição estudados, sugere que o sistema da Ast 222 pode ser um dos elementos de transposição conhecidos, porém com comportamento ainda não descrito, ou um novo sistema indutor de mutação. Para comprovar que a instabilidade verificada na Ast 222 é devida à presença de elementos de transposição e determinar seus mecanismos de ação são necessárias análises citológicas e moleculares do germoplasma estudado.

ABSTRACT: STUDY OF A INDUCTOR SYSTEM OF MUTATIONS IN MAIZE.

The inbred lines of maize (Zea mays L.) S₄ Ast-o2 and 222 were crossed to study the inheritance of the protandry trait. F₁ progenies were backcrossed to S₄ Ast-o2 line. Surprisingly, several kernels with phenotypes similar to waxy (wx) and amylose-extender (ae) endosperm mutants were observed in ears of the derived BC₁ progenies, Ast(BC₁/222). An inbred line, Ast 222, was derived from Ast(BC₁/222) upon six of generations selfpollination. The Ast 222 line was used in the present work to study the genetic system that induces endosperm mutants in this germplasm. Endosperm phenotype instability as well as segregation of endosperm mutants were analysed throughout four generations of selfed progenies. High frequencies of genetic instability were observed in the wx e ae locus. Out of 251 studied progenies, 36 (14,33%) showed deviations of segregation for both wx e ae locus. Apparently, those deviations were due to events of instability occurring precociously, either in the gametophyte or during the first divisions of the triploid endosperm nucleus. It is known that early genetic instability leads to whole endosperm reversions. Therefore, early instability could explain the deviations of wx e ae segregation in the progenies studied. The system that induces mutations in the Ast 222 inbred line was also able to induce instability in F₁ kernels derived from a cross of Ast 222 with a stable inbred line 477. The continuous and simultaneous occurrence of wx and ae mutations may indicate the

existence of common steps in the regulation of starch biosynthetic pathways in the endosperm.

The mutator system present in Ast 222 inbred line showed genetic characteristics similar to those extensively described for transposable elements in maize. These results suggest that the mutator system here studied could be a transposable element. The apparent specificity for *wx e ae* locus, that is peculiar to this system, has not been observed for transposable elements of maize. This specificity suggests that the Ast 222 mutator system could be a transposable element with a characteristic not yet described or a new system inducing mutations. Cytological and molecular analysis are required to better understand the nature, mechanism of action, and a possible involvement of a transposable element responsible for the genetic instability of Ast 222 inbred line.

IX- Referências Bibliográficas

ALEXANDER, D. E. & CREECH, R. G. Corn and corn improvement. Sprague and Eberhart, USA, 1977.

ALLEMAN, M. & FREELING, M. (1986) The Mu transposable elements of maize: evidence for transposition and copy number regulation during development. Genetics 112, 107-119.

AUKERMAN, M. J., SCHIMIDT, R. J., BURR, R. J., BURR, F. A. (1991). An arginine to lysine substitution in the bZIP domain of an opaque-2 mutant in maize abolishes specific DNA binding. Genes Dev. 5, 310-320.

BAUMLEIN, H., NAGY, I., VILLARROEL, R., INZÉ, D. WOBUS, U. (1992). Cis-analysis of a seed protein gene promoter: the conservative RY repeat CATGCATG within the legumin box is essential for tissue-specific expression of a legumin gene. Plant Journal 2(2), 233-239.

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.

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.

CHOURY, P.S. & NELSON, O.E. (1976). The enzymatic deficiency conditioned by the shrunken-1 mutations in maize. Biochem. Genet. 14, 1041-1055.

COLOT, V., ROBERT, L.S., KAVANAGH, T.A., BEVAN, M.V., THOMPSON, R.D. (1987). Localization of sequences in wheat endosperm protein genes which confer tissue-specific expression in tobacco. EMBO Journal 6, 3559-3564.

DANG, P.L. & BOYER, C.D. (1989). Comparison of soluble starch synthases and branching enzymes from leaves and kernels of normal and amylose-extender maize. Biochemical Genetics 27, 521-533.

DOERSCHUG, E.B. (1973). Studies of Dotted, a regulatory element in maize. I. Inductions of Dotted by chromosome breaks. II. Phase variation of Dotted. Theor. Appl. Genet. 43, 182-89.

DORING, H.P. & STARLINGER, P. (1986). Molecular Genetics of Transposable Elements in Plants. Ann. Rev. Genet. 20, 175-200.

DUNN, G.M., KRAMER, H.H., WHISTLER, R.L. (1953). Gene dosage effects on corn endosperm carbohydrates. Agronomy Journal 45, 101-104.

FEDOROFF, N. (1984). Transposable genetic elements in maize. Scientific American 65-74.

FEDOROFF, N. (1986). The structure of four bz-m5 alleles. Maize Genet. Coop. News Lett. 60, 18.

FEDOROFF, N. (1989). Maize transposable elements in development and evolution. Amer. Zool. 29, 549-555.

FEDOROFF, N., WESSLER, S., SHURE, M. (1983). Isolation of the transposable maize controlling elements Ac and Ds. Cell 35, 235-242.

FINCHAM, J.R.S. & SASTRY, G.R.K. (1974). Controlling elements in maize. Ann. Rev. Genet. 8, 15-51.

FRIEDMAN, P. & PETERSON, P.A. (1982). The Uq controlling element system in maize. Mol. Gen. Genet. 187, 19-29.

GARDNER, E. J., SIMMONS, M. J., SNUSTAD, D. P. Principles of genetics.

8th ed. John Wiley & Sons, Inc. New York, 1991.

GEISER, M., WECK, E., DORING, H. P., WERR, W., COURAGE-TEBBE, U.,
TILLMANN, E., STARLINGER, P. (1982). Genomic clones of a wild-
type allele of the sucrose synthase gene of *Zea mays* L.

EMBO Journal 1, 1455-1460.

GIERL, A. & SAEDLER, H., (1992). Plant-transposable elements and
gene tagging. Plant Molecular Biology 19, 39-49.

GOLDBERG, R. B., BARKER, S. J., PEREZ-GRAU, L. (1989). Regulation of
gene expression during plant embryogenesis. Cell 56, 149-160.

HARTINGS, H., MADDALONI, M., LAZZARONI, N., Di FONZO, N., MOTTO, M.,
SALAMINI, F., THOMPSON, R. (1989). The O2 gene which regulates
zein deposition in maize endosperm encodes a protein with
structural homologies to transcriptional activators. EMBO
Journal 8, 2795-2801.

HOLLIDAY, R. (1987). The inheritance of epigenetic defects.
Science 238, 163-170.

JOHNS, M. A., FUERSTENBERG, S. I., HENNELLY, C. A. (1990). Non-random
chromosomal distribution of Ac-like sequences in inbred maize.
Genet. Res. Camb. 55, 71-80.

KODRZYCKI, R., BOSTON, R. S., LARKINS, B. A. (1989). The opaque-2 mutation of maize differentially reduces zein gene transcription. Plant Cell 1, 105-114.

KRAMER, H. H., PFAHLER, P. L., WHISTLER, R. L. (1958). Gene interaction in maize affecting endosperm properties. Agronomy Journal 80, 207-210.

MAIER, U. G., BROWN, J. W. S., TOLOCZYKI, C., FEIX, G. (1987). Binding of a nuclear factor to a consensus sequence in the 5' flanking region of zein genes from maize. EMBO Journal 6, 17-22.

MALUF, M. (1991). Estudo de um mutante de carotenóide e vivíparo causado por transposon em Zea mays. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biologia - UNICAMP, Campinas.

MAROTTA, 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)-B9 strain of maize. Maydica 31, 131-151.

MATZKE, A. J. M., STOGER, E. M., SCHERNTHANER, J. P., MATZKE, M. A. (1990). Deletion analysis of a zein gene promoter in transgenic tobacco plants. Plant Molecular Biology 14, 323-332.

- McCLINTOCK, B. (1951a). Mutable loci in maize. Carnegie Inst. Washington Yearb. 50, 174-181.
- McCLINTOCK, B. (1951b). Chromosome organization and gene expression. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 16: 13-47.
- McCLINTOCK, B. (1962). Topographical relations between elements of control systems in maize. Carnegie Inst. of Wash. Year Book 61, 448-461.
- 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.
- McCLAUGHIN, 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 componentes o2m(r)-Bg system of maize controlling elements. Mol. Gen. Genet. 197, 209-218.

- MOTTO, M., DI FONZO, N., SOAVE, C., SALAMINI, F. (1987). Chromosomal and genic instabilities originating from revertant derivatives of the o2m(r) mutable allele of maize. Maydica 32, 249-272.
- MOTTO, M., MADDALONI, M., PONZIANI, G., BREMBILLA, M., DI FONZO, N., SOAVE, C., THOMPSON, R., SALAMINI, F. (1988). Molecular cloning of the o2-m5 allele of Zea mays using transposon marking. Mol. Gen. Genet. 212, 488-494.
- 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.
- NELSON, O.E., MERTZ, E.T., BATES, L.S. (1965). Second mutant gene affecting the amino acid pattern of maize endosperm proteins. Science 150, 1469-1470.
- 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 alfa1 locus of Zea mays using the transposable elements En and Mu1. EMBO j. 4, 877-882.
- PAULIS, J.W., BIETZ, J.A., BOGYO, T.P., DARRAH, L.L., ZUBER, M.S. (1990). Expression of alcohol-soluble endosperm proteins in maize single and double mutants. Theor. Appl. Genet.

79:314-320.

PEACOCK, W. J., DENNIS, E. S., GERLACH, W. L., SACHS, M. M., SCWARTZ, D. (1984). Insertion and excision of Ds controlling elements in maize. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 19, 347

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.

PETERSON, P. A. (1980). Instability among the components of a regulatory element transposon in maize. Cold Spring Symp. Quant Biol. 45, 447-455.

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.

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.

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

RIBEIRO, F.S.M. (1992). Análise Genética de mutantes originados do cruzamento dialélico de seis linhagens puras de milho. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas)- Instituto de Biologia - UNICAMP, Campinas.

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

ROBERTSON, D.S. (1984). A study of heterofertilization in diverse lines of maize. The Journal of Heredity 75, 457-462.

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.

SALAMINI, F. (1980). Genetic instability at the opaque-2 locus of maize. Molec. gen. Genet. 179, 497-507.

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

- SCHMIDT, R. J., BURR, F. A., AUKERMAN, M. J., BURR, B. (1992). Maize regulatory gene opaque-2 encodes a protein with a "leucine-zipper" motif that binds to zein DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 46-50.
- SCHMIDT, R. J., BURR, F. A., BURR, B. (1987). Transposon tagging and molecular analysis of the maize regulatory locus opaque-2. Science 238, 960-963.
- SCHMIDT, R. J., KETUDAT, M., AUKERMAN, M. J., HOSCHEK, G. (1992). Opaque-2 is a transcriptional activator that recognizes a specific target site in 22-kd zein genes. Plant Cell 4, 689-700.
- 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. Gent. 187, 410-413.
- SCHWARTZ, D. (1986). Analysis of the autonomous wx-m7 transposable element mutant of maize. Maydica 31, 123-129.
- SCHWARTZ, D. (1989). Pattern of Ac transposition in maize. Genetics 121, 125-128.
- SCHWARZ-SOMMER, Z., GIERL, A., CUYPERS, H., PETERSON, A., SAEDLER, H. (1985). Plant transposable elements generate the DNA sequence

diversity needed in evolution. EMBO Journal 4,591-597.

SHANNON, J.C. & CREECH, R.G. (1977). Genetics of storage polyglucosides in *Zea mays* L. Annals New York Academy of es Sciences 279-289.

SHURE, M., WESSLER, S., FEDOROFF, N. (1983) Molecular identification and isolation of the waxy locus in maize. Cell 35,225-233.

SIMPSON, J., SCHELL, J., VAN MONTAGU, M., HERRERA-ESTRELLA, L. (1986). Light-inducible and tissue-specific pea lhcp gene expression involves an upstream element combining enhancer- and silencer-like properties. Nature 323,551-554.

STRICKBERGER, M.W. Genetics. 3rd ed. MacMillan Publ. Company. New York, 1990.

SUTTON, W.D., GERLACH, W.L., SCHAWARTZ, D., PEACOCK, W.J. (1983). 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.

- 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.
- WECK, E., COURAGE, U., DORING, H.-P., FEDOROFF, N., STARLINGER, P. (1984). Analysis of sh-m6233, a mutation induced by the transposable element Ds in the sucrose synthase gene of *Zea mays*. EMBO Journal 3, 1713-1716.
- WERR, W., FROMMER, W.-B., MASS, C., STARLINGER, P. (1985). Structure of the sucrose synthase gene on chromosome 9 of *Zea mays* L. EMBO J. 4, 1373-1380.
- WESSLER, S. R., BARAN, G., VARAGONA, M., DELLAPORTA, S. L. (1986). Excision of Ds produces waxy proteins with a range of enzymatic activities. EMBO Journal 5, 2427-2432.
- WESSLER, S. R., FLEENOR, D., VARAGONA, M. (1988). The splicing of transposable elements and DNA insertion from Wx mRNA. In: Plant Transposable Elements pp. 293-303, Ed. O. E. Nelson, Jr. Plenum Press, New York.
- WESSLER, S. R. (1988). Phenotypic diversity mediated by the maize transposable elements Ac and Spm. Science 242, 399-405.

X- Apêndice

FIGURA 1- Esquema do programa de cruzamentos visando a síntese da linhagem Ast 222 que carrega o sistema indutor de mutação estudado.

C.V. 82/83	Asteca-129o2 (protoginia) x L222 (protândria)
C.V. 83/84	F ₁ x S ₄ Ast o2
C.V. 84/85	S ₄ Ast (RC ₁ /L222) autofecundação: segrega O2-
C.V. 85/86	S ₁ Ast (RC ₁ /L222) autofecundação: o2o2 manchado
C.V. 86/87	S ₂ Ast (RC ₁ /L222) autofecundação: o2o2 germen grande
C.V. 87/88	S ₃ Ast (RC ₁ /L222) autofecundação: o2o2 predominantemente vítreo
C.V. 88/89	S ₄ Ast (RC ₁ /L222) autofecundação: segrega normal e fenótipo am
C.V. 89/90	S ₅ Ast RC ₁ /L222) autofecundação do fenótipo normal: progênes segregantes para o2 e para os tipos am, ce e enr. autofecundação do fenótipo am resultou em progênes segregantes para o2 e para os tipos am e enr.

TABELA 1.1-Número de progênies autofecundadas da linhagem Ast 222, em 4 gerações, segregantes para os tipos normal e ceroso. Os valores de X^2 não-significativo (ns) e significativo (*) referem-se à segregação monofatorial 3:1, com 1 grau de liberdade.

Geração de Autofecundação	Família	X^2		Total de progênies
		ns	*	
S ₇	2	1	1	2
	4	3	0	3
	7	0	1	1
	8	1	0	1
S ₈	2.2	2	0	2
	2.4	2	0	2
	2.6	5	0	5
	4.1	5	3	8
	5.4	1	0	1
	7.3	3	1	4
	8.2	1	0	1
S ₉	2.4.2	1	0	1
	2.6.1	3	0	3
	5.8.3	3	0	3
	7.3.4	2	0	2
S ₁₀	1.5.1.14	1	0	1
	5.8.3.1	1	0	1
TOTAL		35	6	41

TABELA 2.1-Número de progênies autofecundadas da linhagem Ast 222 em 3 gerações, segregantes para os tipos normal e opaco2. Os valores de χ^2 não-significativo (ns) e significativo (*) referem-se à segregação monofatorial 3:1, com 1 grau de liberdade.

Geração de Autofecundação	Família	χ^2		Total de progênies
		ns	*	
S7	2	1	0	1
	6	1	0	1
	8	1	0	1
S8	2.4	8	0	8
	5.1	3	2	5
	5.2	3	1	4
	5.4	1	0	1
	5.6	0	1	1
	6.2	0	1	1
	6.3	0	1	1
	7.2	1	0	1
7.3	1	0	1	
S9	5.2.2	2	0	2
	5.2.4	2	0	2
	5.8.3	0	1	1
TOTAL		24	7	31

TABELA 3.1-Número de progênies autofecundadas da linhagem Ast 222, segregantes para os tipos ceroso e enrugado. Os valores de X^2 não-significativo (ns) e significativo (*) referem-se à segregação monofatorial 3:1, com 1 grau de liberdade.

Geração de Autofecundação	Família	X^2		Total de progênies
		ns	*	
S ₈	1.1	7	0	7
	1.3	2	2	4
	1.4	2	0	2
	1.5	6	0	6
	2.2	1	0	1
	6.14	2	0	2
S ₉	1.1.3	2	1	3
	1.4.2	2	0	2
	1.5.1	1	0	1
	1.5.5	0	1	1
	2.2.1	2	0	2
	4.1.3	1	0	1
	5.3.1	1	0	1
	5.8.3	2	0	2
	5.8.4	2	0	2
	6.14.1	2	0	2
	6.14.4	0	1	1
	7.2.10	5	1	6
7.3.2	1	0	1	
S ₁₀	1.1.3.3	2	0	2
	1.5.1.1	0	1	1
	5.8.3.1	1	0	1
	6.14.7.1	2	0	2
	8.2.2.1	2	0	2
TOTAL		48	7	55