



Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato(a)
FÁTIMA SILVIA MENDONÇA RIBEIRO
Aprovada pela Comissão Julgadora.
25/05/92



BC/16873
IB/80745

**"ANÁLISE GENÉTICA DE MUTANTES ORIGINADOS DO CRUZAMENTO DIALÉLICO
DE SEIS LINHAGENS PURAS DE MILHO".**

FÁTIMA SILVIA MENDONÇA RIBEIRO

Orientação: Prof. Dr. William José da Silva

Dissertação de Mestrado a ser apresentada
à Comissão de Pós-Graduação do Instituto
de Biologia -UNICAMP- como requisito para
obtenção do título de Mestre em Ciências
Biológicas.

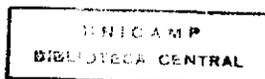
Área de concentração: Genética.

CAMPINAS - S. P.

UNICAMP - 1992

T/UNICAMP

R355_a



UNIDADE	IB
N.º CHAMADA	T/1158
	R.355a
V.	
T.º	168f3
PR.	215/92
C.º	X
PREÇO	R\$ 20.000,00
DATA	01/07/92
N.º CPD	

CM 000 27300-5



Aos meus pais, Manoel e Tereza,
pelo apoio em todos os meus projetos profissionais,
e aos irmãos, Carlos Manoel e Marta,
pelo carinho,

Dedico.

Ao Elias,
pelo carinho e companheirismo, fundamentais em
todos os momentos.

Ofereço.



UNICAMP

AGRADECIMENTOS.

Ao Prof. Dr. William José da Silva, pela orientação segura, pelos exemplos de atitude científica fundamentais para minha formação profissional, pelo apoio, amizade e confiança.

A Profa. Dra. Laudemir M. Prioli, pela oportunidade e estímulo que me conduziram à carreira científica, pelas sugestões e amizade.

As Profas. Catalina R. Lopes, Catarina S. Takahashi e Christine Hackel pelo exame deste trabalho e pelas valiosas sugestões.

Ao Biólogo João Rosolen e à Companhia de sementes Colorado pela oportunidade, cooperação e desempenho no plantio de sementes S₁ e manutenção e autofecundação das plantas no campo.

A Madrinha Lenita, por todo o carinho e apoio.

A Profa. Maria Elisa Q. P. Martins, pelas valiosas discussões, caronas, amizade, estímulo e ajuda no campo.

As meninas do Barracão, Patrícia, Rachel, Cristiane, Miriam e Bia, pela ajuda em alguns plantios ou colheitas.

Ao Sr. Bento e Da. Cida, pelo constante apoio nos trabalhos de campo e pela amizade.

Aos "meninos", Maurício, Chico e Vinícios (in Memoriam), pela ajuda nos plantios e colheitas sob sol ou chuva.

A Sra. Geraldina, sempre amiga.

A Paula, ao Olivetti e ao Marcelo, pelo carinho e amizade.

Aos funcionários do Barracão e da Secretaria, sempre atenciosos e amigos.

Ao CNPQ e FAEP- UNICAMP, pelo suporte financeiro.



INDICE

Página

1. Introdução	1
2 Objetivos.....	6
3. Revisão Bibliográfica	7
3.1 - Alterações Gênicas Espontâneas	7
3.2 - Heterocromatina no Complemento genômico	10
3.2.1 - <i>Knobs</i> heterocromáticos	11
3.2.2 - Cromossomos Extranumerários	16
3.3 - Cultura de Células e Tecidos	21
3.4 - Elementos de Transposição	27
4. Material e Métodos	31
4.1 - Germoplasma	31
4.1.1 - Cruzamento dialélico: Síntese das progênes F_1	32
4.1.2 - Síntese e análise fenotípica da geração de sementes S_1	33
4.1.3 - Síntese e análise fenotípica da geração de sementes S_2	34
4.1.4 - Síntese e análise fenotípica da geração de sementes S_3	34
4.1.5 - Síntese da geração de sementes S_1 , S_3 e/ou S_4	36
4.1.5.1 - Mutantes de Planta	36
4.1.5.2 - Mutantes de Endosperma	37
4.1.6 - Avaliação das progênes com novos mutantes..	38



UNICAMP

4.1.7 - Análise fenotípica de sementes	
<i>S1</i> , <i>S3</i> e/ou <i>S4</i>	38
5. Resultados e Discussão	40
5.1 - Caracterização genética dos mutantes estudados	40
5.2 - Ocorrência de mutantes em gerações avançadas dos cruzamentos das seis linhagens estudadas	77
5.3 - Frequência de mutação	91
5.4 - Teste de Alelismo	95
6. Conclusões	99
7. Resumo	100
8. Abstract	102
9. Referências Bibliográficas	104

1. INTRODUÇÃO.

Durante o processo evolutivo, a expressão fenotípica da variabilidade genética é submetida à seleção natural. O ponto de partida para a obtenção dessa variabilidade genética tem sido considerado a mutação gênica. As alterações de sequências nucleotídicas são então redistribuídas em diferentes arranjos gênicos como consequência da recombinação no processo meiótico. É dessa forma que os evolucionistas têm explicado a maior parte da variabilidade genética que é processada ao longo do processo evolutivo.

Nas últimas décadas, entretanto, tem sido encontradas evidências da existência de outros mecanismos que não fazem uso da recombinação homóloga da reprodução sexuada para gerar variabilidade genética. Um deles se manifesta, por exemplo, produzindo variantes genéticas em cultura de tecidos vegetais (Edallo et al, 1984; Lee e Phillips, 1987b; Zehr et al, 1987; Lee e Phillips, 1988; Evans, 1989). Pois ao contrário do que se imaginou, a cultura de tecidos ao invés de manter com grande confiabilidade a integridade do genoma, apresenta uma frequência relativamente alta de novas formas genéticas de origem somática. Isso é tão evidente que Larkin e Scowcroft (1981), sugeriram o termo "variação somaclonal" para designar as variações genéticas observadas em aglomerados celulares e em plantas regeneradas a partir de explantes somáticos, desenvolvendo-se em condições de estresse gerado pela cultura *in vitro*. De forma correspondente chamaram de "somaclones" as plantas regeneradas a

partir de cultura de células.

Não menos comum tem sido a variabilidade genética que surge de mecanismos que envolvem a ativação de elementos crípticos de transposição (Peschke et al 1987). Esses mesmos elementos podem também ser os responsáveis por parte das variações surgidas em meio de cultura, pois os transposons podem ser ativados em situações de estresse genômico associado, por exemplo, com eventos de quebras e alterações cromossômicas que são comuns em sistemas de cultura *in vitro*. Quebras cromossômicas podem, assim, induzir ou ativar elementos crípticos no genoma (Freeling, 1984). Essas quebras por sua vez podem, por exemplo, ser induzidas por rearranjos especiais de determinados cromossomos (Doerschug, 1973), por exposição à radiação (Neuffer, 1966), pela presença de cromossomos *B* (Rhoades e Dempsey, 1973) e pelos próprios transposons (Larkin et al, 1984). De um modo geral, quando ativados os transposons podem gerar grandes mudanças genômicas (McClintock, 1951; Federoff, 1983). A transposição de DNA pode gerar novos padrões de regulação gênica, inativação ou reativação de alguns genes e rearranjos cromossômicos com deleção, fusão, inversão e transposição de outros genes (Larkin et al, 1984).

A replicação tardia da heterocromatina ou desequilíbrio no *pool* de nucleotídeos, podem também se constituir em mecanismos responsáveis pela formação de rearranjos cromossômicos, podendo estar associados a estresse que surge da cultura de tecidos. Qualquer perturbação que possa afetar a sincronia desde a fase S na qual os cromossomos são duplicados até a divisão celular propriamente dita, pode resultar em aberrações cromossômicas (Rhoades e Dempsey 1972 e 1973).

O desequilíbrio no *pool* de desoxirribonucleotídeos pode trazer em muitas espécies sérias consequências incluindo mutações no núcleo, em cloroplastos e em mitocôndrias, recombinação mitótica, aberrações cromossômicas estruturais, aneuploidias, trocas entre cromátides irmãs e aumento de sensibilidade a agentes mutagênicos (Kunz, 1982).

Formas de recombinação mitótica incluindo *crossing-over* somático e permutas entre cromátides irmãs podem produzir também muitos tipos de rearranjos cromossômicos observados em cultura de tecidos especialmente se as permutas forem assimétricas ou entre cromossomos não-homólogos (Larkin e Scowcroft, 1981). As alterações nos cromossomos mitóticos muitas vezes não são detectáveis devido à insuficiência de resolução das técnicas citológicas disponíveis ou pela baixa frequência em que ocorrem (Lee e Phillips, 1987a). Observações feitas por estes autores, em locais onde ocorrem quebras cromossômicas, sugerem que este evento envolve regiões e cromossomos específicos. Eles observaram um aumento das frações heterocromáticas logo no início da cultura das células, o que representa um potencial para seguidas quebras. Mostraram que em milho 51% das translocações envolvem a região NOR dos cromossomos e o ponto de quebra está entre a heterocromatina e o centrômero.

Nas últimas décadas, tem sido mostrado que a variação somaclonal, a ativação de elementos de transposição e a interação de regiões heterocromáticas podem explicar parte da diversidade genética encontrada em populações de plantas. Uma contribuição significativa abrangendo diversos aspectos relacionados ao comportamento do genoma foi feita por McClintock (1984), sugerindo

que o material genético reage à situações de trauma por ela denominado de "choque genômico". O genoma estaria preparado para responder diferentemente às várias condições adversas devido ao potencial de respostas pré-programadas existentes nas células. Entretanto, poderiam ocorrer ocasionalmente situações em que a célula não teria condições de reagir. Nesse caso, o genoma se manifestaria reorganizando-se de forma rápida na tentativa de minimizar o efeito desse choque. O efeito do choque genômico poderia proporcionar novos padrões de segregação gênica. Entre os muitos experimentos realizados, McClintock discute um deles onde mostra a resposta do genoma de milho na presença de extremidades rompidas de cromossomos na telófase. Ela sugere que esse evento foi o responsável pela ativação de elementos de transposição que são normalmente carregados em estado críptico no genoma. Os transposons podem em seguida inserir-se em outros locos alterando a ação dos genes e provocando uma reestruturação do genoma em vários níveis. Esse expediente pode ocasionar pequenas mudanças envolvendo poucos nucleotídeos, ou grandes modificações abrangendo segmentos cromossômicos. Como resultante podem gerar duplicações, deleções e inverções reorganizando o genoma. Os fatores que causam choque ou trauma genômico podem ser intrínsecos à própria célula ou provenientes de fatores externos, como infecção por vírus, cruzamentos interespecíficos, exposição a drogas e mesmo alterações impostas pela cultura de tecidos. McClintock conclui sugerindo que o estresse genômico é importante para provocar modificações no genoma através da mobilização de mecanismos celulares que podem reestruturar o conteúdo nuclear de diversas maneiras. É essa interação entre estresse e conseqüente reação do genoma que pode proporcionar a variabilidade

que contribui para o surgimento de novas espécies. É nesse contexto que se pretende contribuir com o presente trabalho.

2. OBJETIVOS:

1. Avaliar a capacidade de complementação de genes ou frações de DNA de seis linhagens puras de milho para produzir variabilidade genética nova.

2. Observar em progênes a frequência de algumas alterações gênicas novas, expressas como características monofatoriais.

3. Estudar a participação de cada linhagem na geração de mutantes novos.

4. Produzir linhagens, a partir das progênes segregantes, para futuras investigações sobre a origem dessas mutações.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.

A disposição dos genes nos cromossomos dos organismos superiores, a troca de partes de cromátides não-irmãs e a distribuição ao acaso dos cromossomos nas células filhas na meiose é, sem dúvida, o conjunto de mecanismos responsáveis pela maior parte da variação genética encontrada nos indivíduos. Alguns outros fatores, entretanto, podem ser considerados importantes na geração de variantes genéticas que serão submetidos aos processos de recombinação homóloga e cromossômica. Alterações gênicas e rearranjos cromossômicos têm sido intensivamente relatados nos últimos anos, questionando o dogma da continuidade do material genético (Walbot e Culis, 1985). A reorganização dos genes no conjunto cromossômico é um importante componente da hereditariedade, uma vez que rearranjos cromossômicos podem induzir outras modificações no material genético.

3.1 Alterações gênicas espontâneas.

A descoberta da ocorrência de mutações em diferentes organismos tem dado evidências para explicar a grande diversidade genética e biológica encontrada nas populações. Na sua maioria as mutações têm sido identificadas através de alterações fenotípicas das características dos indivíduos. Isso obviamente pode trazer dificuldades para a sua identificação, pois alterações no genótipo nem sempre refletem em mudanças fenotípicas. Se a mutação

ocorrer, por exemplo, pela substituição de uma terceira base de um códon, há uma grande chance dessa alteração não representar troca de aminoácido na cadeia protéica ou ainda, a região mutada pode não estar diretamente ligada a regiões críticas da molécula. Por outro lado, alterações em sequências do sítio ativo podem ter maiores consequências do que aquelas em outras partes estruturais da molécula.

Na prática, as mutações espontâneas são consideradas aquelas que surgem independentemente de agentes mutagênicos. Mesmo nesses casos, existe sempre um mecanismo específico envolvido no processo, cuja identificação pode ser feita por análises moleculares e através de análise comparativa em estudos de mutações induzidas experimentalmente (Ramel, 1989).

Muitos estudos têm sido realizados com o propósito de estimar a taxa de mutação espontânea de determinados alelos que causam efeitos fenotípicos claros em milho. Exemplos clássicos são aqueles envolvendo genes que afetam a composição e cor do endosperma. Nessa linha, Stadler (1942) foi o primeiro a apresentar uma medida da taxa de mutação de genes atuando num mesmo *background* genético. Sete locos distintos foram analisados quanto a estabilidade do material genético. Quatro dos genes estudados, *Wx* (*waxy*), *Sh* (*shrunken*), *Su* (*sugary*) e *Y* (*yellow*), foram considerados genes com baixa taxa de mutação. O gene *K* (*colored aleurone and plant*) entretanto, apresentou uma taxa de mutação centena de vezes maior do que a dos quatro genes mencionados, e os alelos *Pr* (*red aleurona*) e *I* (*intense color*) revelaram uma taxa intermediária entre os dois extremos citados. O alelo *R*, muta para *r*, numa proporção de 492 em

1.000.000 de gametas analisados, enquanto nenhuma mutação de *Wx* para *wx* foi observada em 1.503.744 gametas. Somente 3 alterações de *Sh* para *sh* foram encontradas em 2.469.285 gametas. A pergunta óbvia naquele momento foi a de como surgiram aquelas mutações? São elas defeitos que surgem ao acaso ou são produzidas por algum mecanismo específico existente na célula? Um ano antes, Rhoades (1941) havia investigado a ação do gene *Dt*, sobre um outro loco *A* (*anthocyanin*) e concluiu haver um "poder" do gene *Dt* em causar mutação no gene *A*. Mutações para α , na presença de *Dt*, ocorriam em todos os tecidos onde o loco *A* estava envolvido na formação do pigmento roxo, antocianina. Esse autor mostrou que o tamanho da área do tecido mutado serve para indicar se a mutação ocorreu tardiamente, quando houve formação de um setor pequeno, ou quando ocorreu precocemente, formando-se então um setor roxo grande no endosperma.

Uma colocação interessante do envolvimento de alguns eventos celulares que podem estar intimamente relacionados à mutagênese espontânea, foi feita por Sargentini e Smith (1985). Eles sugeriram que problemas na recombinação, tais como os que ocorrem no processo de reparo do DNA, na replicação do material genético, como erros da DNA polimerase, tautomerização, desaminação e/ou metilação de bases, não devem ser subestimados como causas da mutagênese espontânea.

Ramel (1989), também relacionou uma série de fatores que podem ocorrer a nível de DNA e de cromossomos induzindo novas formas de reorganização do material genético. Essa lista, obviamente abrange mudanças muito mais complexas do que a proporcionada pela clássica mutação de ponto não excluindo-a,

entretanto do rol de mecanismos que podem ser ativados em determinadas condições, gerando polimorfismo.

Apesar das várias décadas dispendidas no estudo da natureza da mutação espontânea, permanecem ainda para serem identificados os mecanismos envolvidos na produção de alterações do DNA (Sargentini e Smith, 1985 ; Loeb e Cheng, 1990). Esses autores ressaltaram três processos endógenos que têm o potencial para desencadear o processo de mutação espontânea. São eles, os erros da DNA polimerase, a produção de sítios apurínicos e a mutagênese por radicais livres de oxigênio. Esses autores reconhecem que devem haver outras formas, tão ou mais importantes que as citadas, para gerar variação, porém esses três mecanismos têm sido detectados na célula em alta frequência e são passíveis de serem analisados experimentalmente.

De um modo geral, pode-se dizer que as mudanças na sequência de bases nucleotídicas são produto de dois fatores: à frequência de eventos que conduzem à danos no DNA e a eficiência do processo de reparo. O conhecimento dos vários mecanismos indutores de mutação é indispensável para se entender o potencial de geração de variabilidade genética nas espécies e também para abrir perspectivas no sentido de se promover mutações dirigidas. Alguns mecanismos capazes de gerar variabilidade genética nova têm sido notados e estudados em milho e são discutidos a seguir.

3.2 Heterocromatina no complemento genômico.

Há muito vem-se investigando o papel da heterocromatina no conjunto cromossômico de milho, já que sua

presença, longe de ser aleatória, faz parte do conteúdo nuclear de cada célula. Sabe-se que existem diferenças quanto ao seu tamanho e forma, quanto ao padrão de replicação na mitose e aos efeitos genéticos específicos de cada classe. As diferentes classes de heterocromatina ocorrem no centrômero, na região NOR, nos *knobs* heterocromáticos e nos cromossomos *B*. Os *knobs*, por exemplo, afetam a frequência de recombinação de determinadas regiões do complemento cromossômico. Os cromossomos *B* aumentam a frequência de recombinação e induzem perdas de segmentos cromossômicos do conjunto *A*, que carregam os *knobs* durante a segunda divisão do micrósporo. Já os outros tipos de heterocromatina estão relacionados à diferenças na frequência de *crossing-over* de muitos cromossomos (Rhoades e Dempsey, 1972 e 1973; Rhoades, 1978; Pryor et al, 1980; Peacock et al, 1981; Viotti et al, 1985).

3.2.1 *Knobs* heterocromáticos.

Os *knobs* heterocromáticos são cromômeros que foram encontrados pela primeira vez em 1929 por Barbara McClintock em estudos citogenéticos. Mas foi Heitz na mesma época, citado por Jones (1989), quem introduziu o termo heterocromatina para denominar regiões ou segmentos cromossômicos que permaneciam condensados mesmo durante a interfase, e se coravam muito intensamente e distintamente da porção de eucromatina nuclear. Embora os *knobs* tenham sido descobertos na década de 20, ainda hoje podem ser considerados como fonte de diversidade genética (Jones, 1989). Sua presença no genoma pode acarretar mudanças associadas à alterações no processo de replicação

do material genético, tornando-o mais precoce ou tardio e podem levar à indução de instabilidade genética representando um importante aspecto no controle da atividade gênica e na evolução dos cromossomos.

Conhecimentos mais detalhados sobre os *knobs* heterocromáticos vêm-se acumulando nas últimas décadas e algumas dessas peculiaridades já são conhecidas. Os *knobs* foram descritos como regiões heterocromáticas que se situam terminal ou intersticialmente no cromossomo, e em posição fixa nos mesmos. Foram determinadas, 23 possíveis posições para a presença dos *knobs* nos dez cromossomos do milho (McClintock et al, 1981). Esses cromômeros são também fiéis ao genoma, pois uma vez presentes nos cromossomos eles os caracterizam e sua herança é tão regular quanto a de um gene qualquer e por isso são adequados marcadores genéticos (Aquiari-Perecin, 1987). Os trabalhos de Peacock et al (1981), mostraram que os *knobs* heterocromáticos são constituídos de DNA altamente repetitivo com 185 pares de bases (pb) em tandem. Essas sequências nucleotídicas não foram encontradas integralmente em nenhuma outra classe de heterocromatina no milho. O que se observa é uma relação entre o tamanho de alguns blocos heterocromáticos e a presença de um certo número de unidades repetitivas. Foi observado por exemplo, que o *knob* proximal do cromossomo B carrega 1/4 de sequências repetitivas comparado com o *knob* do complemento A. As análises de hibridização *in situ*, mostraram também que essas unidades não estão presentes na heterocromatina centromérica, na heterocromatina da região NOR ou, nos grandes blocos distais dos cromossomos B. Foi também identificado que dentro dessa sequência repetitiva de 185 bp, encontra-se uma outra região de 27

bp que é muito conservada em milho, teosínte e tripsacum condicionando aparentemente alguma característica funcional importante (Dennis e Peacock (1984).

O número, tamanho e posição dos *knobs* heterocromáticos variam entre as raças de milho (Kato, 1976). Em certos cruzamentos entre raças, a presença de *knobs* em condição heteromórfica parece estar relacionada com o aumento do grau de heterose do híbrido. Muito tem sido discutido sobre o real papel dos *knobs* ou segmentos heterocromáticos na expressão dos genes ligados a eles em *cis* no cromossomo. Embora não se tenha idéia dos processos envolvidos na condensação de porções de cromatina (Jones, 1989), alguns pesquisadores associam a presença de *knobs* no genoma com o surgimento de determinadas características. Moll et al (1972), mostraram uma associação entre a presença e constituição de *knobs* em milho e algumas características agronômicas. Quando os quatro *knobs* estudados (2L, 6L, 8L, 9S) apresentavam-se homomórficos, observava-se uma queda na quantidade de espigas por planta. Por outro lado, a combinação dos *knobs* 2L e 8L mostrou um significativo efeito aditivo e de dominância para número de espigas por planta, o que não foi encontrado em outras combinações dos quatro *knobs*. A associação genética entre os padrões de *knobs* e características quantitativas deve ser devido ao efeito da própria região dos *knobs* ou de genes muito próximos a eles. Chughtai e Steffensen (1987) também relataram a associação de *knobs* em condição homomórfica com o atraso de três a quatro dias na liberação de grãos de pólen. *Knobs* em estado heteromórfico não expressaram esse efeito. A heterocromatina aparentemente não tem função por si só mas pode alterar

indiretamente a expressão de uma característica. Os *knobs* heterocromáticos apresentam apenas uma evidência quanto a sua atividade gênica, que seria na formação de fibras cromossomais adicionais na anáfase I em células contendo o cromossomo 10 anormal (Rhoades e Dempsey, 1966). Essas fibras cromossomais adicionais são apenas observadas no *knob* do cromossomo anormal K 10, ou muito próximo a ele, após ocorrer um tipo de interação entre este fragmento heterocromático e as fibras cromossomais normalmente elaboradas a partir de uma substância sintetizada pelos centrômeros. Essa região neocêntrica, junto ao *knob*, auxilia a migração desse fragmento para o respectivo polo no núcleo.

A eliminação de segmentos dos cromossomos A parece estar intimamente relacionada com a presença de *knobs* no seu conteúdo. Braços cromossômicos possuindo grandes blocos heterocromáticos apresentam muito mais quebras do que aqueles com poucos *knobs*, enquanto os cromossomos isentos de *knobs* heterocromáticos são ainda mais estáveis (Rhoades e Dempsey, 1973). Também foi sugerido por esses autores que a replicação dos *knobs* heterocromáticos dos cromossomos A ocorre tardiamente ou é suprimida durante a segunda divisão meiótica dos micrósporos na presença de cromossomos B, e o resultado é expresso pela formação de ponte e perda parcial de cromossomos. Observações citológicas e genéticas, mostraram que as quebras ocorrem entre o *knob* e o centrômero do cromossomo A (Rhoades e Dempsey, 1973; Lee e Phillips, 1987a).

Na mesma linha, Johnson et al (1987), mostraram a influência da heterocromatina em quebras cromossômicas induzidas em cultura de tecidos de aveia. Plantas hexaplóides de

aveia regeneradas de cultura de tecidos *in vitro* mostraram alterações cromossômicas que podem ser atribuídas a perturbações ocorridas durante a replicação das regiões heterocromáticas. De acordo com o idiograma apresentado os 17 grupos de ligação identificados no paquíteno apresentaram regiões de heterocromatina pericentroméricas. Essas regiões heterocromáticas puderam ser identificadas claramente em fotomicrografias. Segundo esses autores a replicação de regiões de heterocromatina no final do período S faz crer que tais regiões são realmente sensíveis à perturbações no ciclo nuclear que deve ocorrer durante a cultura de tecidos. Como a presença da heterocromatina ocorre em regiões distais ou proximais dos braços dos cromossomos de aveia, pontes de uma ou de outra região resultariam em diferentes tipos de alterações cromossômicas. Se somente um cromossomo estivesse envolvido no evento de ponte e quebra, considerando a presença de heterocromatina centromérica, o resultado seria um cromossomo deficiente para quase um braço inteiro. Nos casos onde os dois homólogos estão envolvidos, duplicação, inversão e deficiência de heterocromatina poderiam ocorrer. Tais eventos foram descritos como uma possível explicação para a amplificação de heterocromatina encontrada em híbridos de trigo e centeio regenerados por Lapitan et al (1984).

Uma abordagem distinta sobre a heterocromatina tem sido dada por autores que discutem o estado constitutivo e facultativo da mesma provavelmente alcançado durante o processo evolutivo. Torna-se então fundamental conhecer os mecanismos que podem levar à condensação da eucromatina e estabelecer a distinção entre a heterocromatina constitutiva e facultativa, que pelos

conhecimentos atuais são metabolicamente inertes e estruturalmente indistinguíveis. Segundo Jones (1989) conhecendo-se esses processos poder-se-á avaliar o efeito das mutações em genes cujas funções sejam as de controlar a hierarquia das etapas necessárias para a condensação desses segmentos cromossômicos acarretando alterações sérias no genoma.

3.2.2 Cromossomos extranumerários.

Os cromossomos extranumerários em milho foram inicialmente analisados por Longley (1927) e foram denominados cromossomos *B* por Randolph (1928), para justamente distinguí-los dos bem conhecidos do complemento normal, denominados de *A*. Há, entretanto, peculiaridades dos cromossomos *B* que são responsáveis por sua distinção dos cromossomos *A*.

As diferenças morfológicas são bem acentuadas entre os dois tipos de cromossomos. Os *Bs* são praticamente constituídos por blocos de heterocromatina que se coram fortemente por coloração de Feulgen. Na maioria das espécies são muito menores do que os *As*, não apresentam herança mendeliana e muito raramente possuem regiões organizadoras de nucléolo. Frequentemente sofrem falta de disjunção na anáfase, o que implica em aumento ou diminuição no número de cromossomos *B* no núcleo das células filhas, o que também explica a diferença na quantidade de *Bs* nas diversas células ou em órgãos de um mesmo organismo (Jones e Rees, 1982). Geralmente os cromossomos *B* não afetam qualitativamente o fenótipo sendo aparentemente dispensáveis ao organismo. Porém, em quantidades elevadas causam uma

série de efeitos genéticos, incluindo redução da fertilidade, do vigor, produzindo sementes defeituosas com pouco tecido embrionário ou endosperma com má formação. Pode ocorrer também um aumento no tamanho da célula e do núcleo, com variação no tamanho do grão de pólen, aumentando a porcentagem de gametas abortados (Randolph, 1941; Rhoades e Dempsey, 1972; Jones e Rees, 1982). Essas alterações são mais facilmente detectadas visualmente quanto maior a frequência de cromossomos *B*, devido ao efeito de dosagem. Por exemplo, a queda na fertilidade pode ser observada em espigas oriundas de plantas autofecundadas contendo de 10 a 15 cromossomos *B*. A redução aumenta em plantas com aproximadamente 20 *B*s e, com número excedendo a 25 cromossomos extranumerários, o conjunto de sementes viáveis é ainda menor (Randolph, 1941).

Staub (1987), correlacionou a presença de cromossomos *B* com caracteres qualitativos em milho. Foi observado, que plantas contendo muitos cromossomos *B* mostravam desenvolvimento alterado, com folhas estreitas, estriadas, estioladas, inflorescência masculina com redução no número de espiguetas, formação de poucos frutos e ageotrópicas. O tipo anormal mais comum foi o aparecimento de plantas com folhas estriadas que se manifestavam quando pelo menos sete cromossomos *B* eram contados no núcleo. O número de folhas estriadas foi mais abundante de acordo com o aumento do número de cromossomos extranumerários sendo que plantas com muitas folhas estriadas possuíam aproximadamente onze *B*s. Aparentemente esses cromossomos teriam uma influência quantitativa na ocorrência temporal de folhas estriadas no desenvolvimento da planta.

A verdadeira relação do número de cromossomos

B e as características descritas ainda não se acha bem definida, mas algumas hipóteses podem ser consideradas. Os cromossomos *B* podem causar desvios na segregação com perda de segmentos dos cromossomos *A* através de uma interferência física entre eles. Se realmente os cromossomos *B* são derivados dos cromossomos *A* é possível que haja interação entre eles, pois os *Bs* devem conter sequências de DNA que devem ter pelo menos homologia parcial com os correspondentes de *A*. Ward (1979), propôs que os *Bs* são derivados de um cromossomo designado K10, que é uma versão diferente do cromossomo 10 normal, pois contém uma região de heterocromatina terminal no braço longo, incomum ao cromossomo 10 normal que não possui nenhum *knob* (Chughtai e Stenffensen, 1987). As análises baseadas em comparações de cromossomos *A* e *B* em paquíteno mostraram a ocorrência de estreitas similaridades na localização de blocos heterocromáticos e cromômeros. Especula-se também que os cromossomos *B* por serem altamente heterocromáticos devem se constituir num reservatório ideal para elementos de transposição (Staub, 1987).

Em relação ao efeito de elementos de transposição no complemento genômico *B*, Patrosso et al (1988), identificaram a ocorrência e localização citológica do elemento *Mutator* (*Mu*) em cromossomos *A* e *B*. O fator *Mu* foi encontrado em dois blocos heterocromáticos situados próximo ao segmento eucromático no braço longo do cromossomo *B*. Entretanto, esse grau de homologia não foi observado com frequência nos cromossomos *A*. Essas similaridades moleculares levaram à elaboração da hipótese de que os cromossomos *B* são derivados do complemento *A* (Viotti et al, 1985; Peacock et al, 1981), por um processo rápido (Patrosso et al, 1988). Tomando essas

considerações para identificar a origem dos cromossomos *B* a partir de *A*, não é surpreendente a presença de sequências *Mu* nesses cromossomos acessórios, constituídos de heterocromatina facultativa. Desde que um número relativamente alto de cópias do elemento *Mu* (20 cópias por genoma diplóide) é requerido para ativação da transposição, a falta de disjunção dos cromossomos *B* pode ser um meio relativamente simples de elevar o número de cópias desse transposon, causando aumento na frequência de mutações (Patrosso et al, 1988).

Análises da distribuição de duas sequências altamente repetitivas, presentes nos cromossomos *A* e *B* de milho, foram realizadas por Viotti et al (1985). A hibridização *in situ*, indicou que tais sequências são, com exceção do bloco heterocromático distal do cromossomo *B*, peculiares aos *knobs* heterocromáticos dos cromossomos *A* e à heterocromatina pericentromérica do cromossomo *B*. Essas unidades de repetição não são encontradas em nenhuma outra classe de heterocromatina presente no genoma. Entretanto estão contidas em outras regiões eucromáticas dos cromossomos *A*. Peacock (1981), também descreveu essa mesma particularidade da heterocromatina do complemento genômico *A* e *B* partilhando essas sequências repetitivas em comum.

Estudos recentes (Jauhar e Crane, 1990), mostraram o comportamento dos cromossomos *B* em *Festuca arundinacea* Shreb através da análise do efeito de dosagem dos cromossomos *B* na frequência de quiasmas e sua variação na célula. Observou-se um acréscimo na frequência de quiasmas nos cromossomos *A* com o aumento do número de cromossomos *B*. Porém, essa relação não foi linear,

havendo uma saturação ao redor de seis cromossomos *B*. Em milho, tanto os cromossomos *B* como o cromossomo 10 anormal que contém um grande *knob* heterocromático aumentam a frequência de quiasmas dos cromossomos *A* (Ward, 1976). Ainda quanto à relação do número de *B*s e outros genes em *A*, foi encontrada uma correlação do número desses cromossomos extranumerários e a perda do alelo *A* que condiciona cor de aleurona. Em plantas carregando baixo número de *B*s houve pouca ou nenhuma perda do marcador, enquanto que células com mais de dois cromossomos *B* apresentavam frequentemente deficiências para o loco *A* em torno de 20% dos micrósporos. Os dados sugerem, entretanto, não haver aumento na proporção de perda desse loco quando o número de cromossomos *B* nos indivíduos paternos não excede a quatro (Rhoades e Dempsey, 1972). Quanto ao emparelhamento, Jauhar e Crane (1990) mostraram que os cromossomos *B* se limitam a univalentes, bivalentes lineares e/ou bivalentes na forma de anel. A formação de multivalentes entre os *B*s parece ser um fenômeno geneticamente inibido. Do mesmo modo, não foi evidenciado emparelhamento entre os cromossomos *A* e *B*. O que se observa é uma certa migração precoce dos cromossomos *B* na anáfase I em relação ao comportamento regular dos cromossomos *A*, o que também deve favorecer seu acúmulo em determinadas progênies.

Acredita-se que os cromossomos *B* possam exercer alguma influência em determinadas espécies modificando a capacidade dos cromossomos *A* em produzir recombinação e formar quiasmas (Staub, 1987). Contudo esse fato não pode ser generalizado, havendo diferenças de comportamento entre os diversos cromossomos e segmentos cromossômicos. O grau de interação entre os três fatores,

posição proximal ou distal do centrômero, estado homomórfico ou heteromórfico dos *knobs* e números pares ou ímpares de cromossomos *B* é muito importante para se compreender o processo de aumento ou redução no nível de recombinação do material genético. Chang e Kikudome (1974) sugerem que há um efeito da quantidade de cromossomos *B* na célula para proporcionar recombinação. Eles observaram que quantidades ímpares de cromossomos *B* são mais efetivas do que números pares em causar aumento de recombinação em ambas regiões, proximal e distal, em plantas heteromórficas para um *knob* distal no cromossomo 9. Os estudos foram baseados na comparação do nível de recombinação analisado em três posições no cromossomo 9 contendo quatro diferentes marcadores genéticos e número de cromossomo *B* variando de zero a cinco no genoma. Eles concluíram que os *knobs* heterocromáticos e a heterocromatina do complemento extranumerário devem interagir no processo de *crossing-over* e o nível de recombinação deve ser determinado em parte pela constituição do *knob*.

3.3 Cultura de células e de tecidos.

Mecanismos intrínsecos à própria célula que podem se expressar em tecidos somáticos são responsáveis por parte da variação genética surgida em suas progênes de células. Alguns deles se manifestam na propagação de células em cultura de tecidos vegetais. Nas condições de cultura *in vitro*, uma série de novas características genéticas se expressam em indivíduos de várias espécies. A variação somaclonal não é aparentemente espécie ou órgão específica, e esse

termo, sugerido por Larkin e Scowcroft (1981), é empregado genericamente substituindo outros como "caliclonos" (Skirvin e Janick, 1976) e "protoclonos" (Shepard et al, 1980) empregados para cultura de caules e protoplastos, respectivamente. Os pioneiros na área de cultura de células e tecidos vegetais foram Gautheret (1939) e White (1939), que conseguiram com sucesso o crescimento *in vitro* de células de cenoura e tabaco, respectivamente. A partir de então, técnicas de cultura de tecidos têm sido aprimoradas para as diferentes espécies de plantas. Somente no final da década de 40 é que La Rue (1947; 1949) obteve culturas e subculturas de endosperma de milho. Mais tarde Reddy e Peterson (1987) estudaram o potencial de alguns genótipos para determinar o início de formação de calos em culturas em diferentes estágios de desenvolvimento do endosperma. Análises citológicas dos calos friáveis e duros evidenciaram a presença de células contendo variado número de cromossomos. Os calos com aspecto friável apresentaram no seu núcleo uma variação de 38 a 55 cromossomos. Já os calos considerados duros ou opacos carregavam de 30 a 38 cromossomos em suas células. Esses dados sugeriram que o efeito da composição do meio de cultura é importante para determinar novas variações. Células crescidas em alta concentração de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) foram as que apresentaram a maior variação no número de cromossomos.

Diante dessa nova fonte de variabilidade genética os cientistas buscaram, também aqui, encontrar dentro das células respostas para justificar a diversidade obtida em aglomerados celulares e em plantas regeneradas. Desses estudos sugere-se que a composição do meio de cultura, a idade da cultura, a frequência de

subculturas, a fonte do explante e o *background* genético do mesmo, são fatores que contribuem simultaneamente para o surgimento de tipos distintos de somaclones (McCoy et al, 1982; Orton, 1983; Benzion et al, 1986; D'Amato, 1986; Vasil e Vasil, 1986; Lee e Phillips, 1987b; Wilkinson e Thompson, 1987; Reddy e Peterson, 1987; Lee et al, 1988). Os dados obtidos por Benzion e Phillips (1988) sugerem que o efeito da idade da cultura não é diretamente proporcional ao aumento da taxa de mutação mas sim do acúmulo de células aberrantes ao longo do período de cultura.

Determinados variantes genéticos obtidos em cultura de tecidos são mais frequentes do que outros. Lee e Phillips (1987 b), estudando o efeito da idade da cultura para gerar variabilidade genética em plantas regeneradas e suas progênes observaram que em 44 variantes analisados o fenótipo *defective kernel* foi o predominante em dois períodos, ou seja, de 3 a 4 e de 8 a 9 meses. Essa alta frequência também havia sido encontrada por McCoy e Phillips (1982). Fenótipo semelhante é comumente encontrado em aplicações de etil metanosulfonato (EMS), para obtenção de mutantes induzidos (Neuffer e Sheridan, 1980).

Outros exemplos de variantes fenotípicos muito frequentemente encontrados em plantas regeneradas e suas progênes a partir da cultura de tecidos, são plântulas albinas e amarelas, plantas anãs, diversos padrões de estrias nas folhas, folhas amarrotadas, sementes na panícula, macho esterilidade, restauração da androesterilidade, sementes defeituosas, sementes opacas e sementes com variegação de pigmentos (Edallo et al, 1981; Larkin e Scowcroft, 1981; McCoy e Phillips, 1982; Umbeck e Gengenbach, 1983; Lee e

Phillips, 1987 b; Wilkinson e Thompson, 1987; Zehr et al, 1987; Armstrong e Phillips, 1988).

Recentemente, Bebeli et al (1990) detectaram, além de albinismo e variegação em diferentes frequências, variação nos cromossomos das linhagens de centeios. Mudanças genéticas e citogenéticas são frequentemente observadas em plantas obtidas a partir de cultura de tecidos (Larkin e Scowcroft, 1981). Alterações no número e forma dos cromossomos são mais comumente encontradas em análises citológicas das células em cultura e plantas regeneradas. A instabilidade citogenética em cultura de tecidos varia desde níveis variados de ploidia, aneuploidia (monossomia, trissomia) e rearranjos cromossômicos. Os tipos de aberrações mais comuns envolvem translocações, deleções, inversões e ocorrência de pares heteromórficos para deficiências ou duplicações de regiões cromossômicas, (Edallo et al, 1981; Mc Coy e Phillips, 1982; Mc Coy et al, 1982; Meins, 1983; Rhodes et al, 1986; Lee e Phillips, 1987a; Benzion e Phillips, 1988; Armstrong e Phillips, 1988; Lee e Phillips, 1988; Evans, 1989). Uma possível explicação para a alta ocorrência de quebras cromossômicas é a replicação tardia dos blocos de heterocromatina. Em milho, os pontos de quebras no DNA estão relacionados à regiões que apresentam *knobs* heterocromáticos ou regiões NOR (Benzion et al, 1986; Lee e Phillips, 1987a; Lee e Phillips, 1988; Benzion e Phillips, 1988). Casos de duplicação ou redução de cromossomos inteiros, ou segmentos cromossômicos, já são muito menos frequentes, provavelmente porque produtos de tais eventos não conseguem ser mantidos em cultura, e portanto não chegam a se expressar em plantas regeneradas e suas progênies (Benzion e Phillips,

1988; Lee e Phillips, 1988).

A replicação tardia da heterocromatina, que pode desencadear o ciclo denominado ponte-quebra-fusão, que tem sido associada a ocorrência de quebras cromossômicas em cultura de tecidos (Johnson et al, 1987; Benzion e Phillips, 1988), também está associada a ativação de elementos de transposição (Peschke et al, 1987). Análises de sementes que não sofreram o estresse proporcionado pela cultura de tecidos, não demonstraram qualquer atividade do elemento *Ac*, ao contrário das plantas regeneradas depois da cultura *in vitro*. Além do transposon *Ac*, o elemento *Spm*, também foi identificado em progênies oriundas a partir de cultura de tecidos (Peschke et al, 1989). Contudo, a atividade de ambos elementos de transposição (*Ac* e *Spm*), foi detectada em plantas que diferiam quanto a origem, ou seja, tipo do calo, meio utilizado para cultura e *background* genético, indicando que a ativação de tais elementos em cultura *in vitro* deve envolver diversas condições e não está limitada somente ao ambiente específico criado nesse tipo de experimento.

A presença do elemento de transposição *Mu* e sua atividade em células de calos oriundos a partir da cultura de células *in vitro*, também tem sido estudada (James e Stadler, 1989). Linhagens que apresentaram atividade mutagênica carregam pelo menos dez elementos *Mu* por genoma diplóide. A ativação de elementos de transposição através de quebras cromossômicas pode elucidar a ligação entre as aberrações cromossômicas analisadas e as mutações avaliadas (Peschke et al, 1987), pois as consequências da transposição de fragmentos de DNA podem gerar novos padrões de regulação, inativação ou reativação de genes, e rearranjos cromossômicos (Larkin

et al, 1984).

Também tem sido discutido o papel da metilação na regulação da expressão gênica em organismos superiores. A metilação consiste na ligação de grupo metil na base nitrogenada citosina. A hipótese geral para o controle da expressão gênica por metilação depende da especificidade da interação DNA-proteína. Supostamente existem fatores específicos para transcrição protéica que reconhecem sequências metiladas e não metiladas e que interagem com a RNA polimerase (Holliday, 1987). A metilação inibe interação DNA-proteína e conseqüentemente impede a transcrição do gene. A metilação deve estar envolvida no processo mutagênico observado em experimentos de cultura de células *in vitro*. Phillips et al, 1990 sugerem que mutações gênicas, ativação de elementos de transposição, alterações em número e estrutura de cromossomos normalmente observados como efeito da cultura de células *in vitro*, podem ter a metilação como causa em comum.

Holliday (1987) e Cedar (1988) sugerem a ocorrência de uma alta correlação negativa entre metilação de citosina e expressão gênica em eucariotos. O processo de metilação do DNA tem sido considerado um mecanismo epigenético de herança, regulando a transcrição de genes, a síntese de tipos específicos de proteínas, a diferenciação celular através da alteração do processo de tradução do RNA para proteína, ou ainda regulando a distribuição topográfica das proteínas no citoplasma (Rieger et al, 1976).

Uma vez que a sequência nucleotídica é metilada, pode ser mantida nesse estado inativo durante todo o desenvolvimento do organismo até a fase adulta, onde poderá ser

transmitida às gerações (Holliday, 1987), gerando novos padrões de variação genética.

3.4 Elementos de transposição.

Os elementos de transposição são componentes importantes dos mecanismos capazes de gerar variabilidade genética nova dentro das células. Foram descritos inicialmente em milho, denominados de elementos controladores (McClintock, 1951), e mais tarde ficaram conhecidos por transposons. McClintock mostrou que esses elementos transponíveis são capazes de se inserir em genes ou de se excisarem, produzindo mutações instáveis.

Embora os transposons tenham sido primeiramente identificados em milho, sabe-se hoje que ocorrem em todos organismos estudados e são considerados como componentes regulares do genoma (Gierl et al, 1989). Molecularmente, os elementos de transposição são sequências nucleotídicas ou fragmentos de DNA que são capazes de se inserir em genes alterando a função dos mesmos. A genética de diversas famílias dos elementos de transposição em plantas foi revisada por Federoff (1983). Em geral, os transposons são agrupados em duas classes distintas. As sequências com extremidades repetidas e invertidas (TIRs), que estão ligadas a regiões com função codificadora indispensável à transposição, e uma segunda classe representada pelos retrotransposons que são estruturalmente semelhantes aos retrovírus (Federoff, 1989). Essas duas categorias estão sendo bem estudadas em milho, bactérias, leveduras, homem e drosófila (Gierl et al, 1989; Federoff, 1989).

Saedler e Nevers (1985) propuseram um modelo molecular para explicar o mecanismo de transposição em plantas. Esse mecanismo se refere basicamente à excisão do elemento transponível de uma dada região e sua reinsersão num outro sítio do genoma. Este modelo é o mais comumente encontrado em milho, embora o mecanismo de transposição replicativa (com a duplicação do transposon antes do evento de transposição) não deve ser descartada. Dentro do crescente número de elementos de transposição conhecidos (Döring e Starlinger, 1986), as mais bem caracterizadas famílias em milho são *Ac/Ds* (Activator / Dissociation) *En/I* (Enhancer / Inhibitor) e *Spm/dSpm* (Suppressor-mutator / defective), sobre as quais há maiores informações genéticas e moleculares (Federoff, 1983; Federoff et al, 1983; Pereira et al, 1985).

A maioria das famílias de transposons em milho apresentam-se com um elemento autônomo ou regulador que é capaz de se transpor por si próprio dentro do genoma excisando-se de uma posição e reintegrando-se em outro lugar no genoma, e um outro denominado não autônomo ou receptor que somente mostra sua atividade na presença da sequência do elemento autônomo da família correspondente (Döring e Starlinger, 1986; Cormack et al, 1988).

As mutações causadas por transposons são mais facilmente reconhecidas quando seu efeito é drástico, resultando numa inativação do alelo. Entretanto, casos de redução ou aumento na expressão gênica também podem ser resultantes da atividade de transposição. O aspecto mais evidente desse tipo de mutação é a sua instabilidade. Mutações causadas pelos elementos transponíveis podem tanto reverter para o tipo selvagem através da excisão do elemento,

como também podem produzir um fenótipo recessivo estável devido a uma excisão irregular do mesmo (Döring e Starlinger, 1986).

Tem sido demonstrado que alguns elementos não autônomos já clonados e sequenciados são deleções derivadas do elemento autônomo, constituindo assim famílias como a *Ac/Ds Spm/dSpm*, *En/I* e outros (Federoff, 1989).

Os elementos da família *Ac/Ds*, foram clonados e sequenciados por Pohiman et al (1984) e Döring et al (1984), respectivamente. Um outro elemento de transposição capaz de gerar variabilidade genética em alta frequência em locos menos específicos, tem sido o fator *Mu*, descrito por Robertson (1978).

Inúmeros relatos da diversidade genética mediada pelas diversas famílias de transposons atualmente conhecidas têm sido apresentados como por exemplo no loco *waxy* (Schwarz-Sommer et al, 1985; Wessler et al, 1986; Schwartz, 1989), *yellow-green* (Robertson e Stinard, 1987), *bronze-1* (Schiefelbein et al, 1988) e outros (Wessler, 1988).

Os transposons parecem ser importantes também na evolução biológica, pois além de causarem mutações podem gerar uma variedade de rearranjos cromossômicos tais como duplicações, deleções, inversões e translocações (Federoff, 1983; Döring e Starlinger, 1984; McClintock, 1984; Finnegan, 1989). A sua inserção ou excisão frequentemente ocasiona alterações na sequência de pares de base do gene contribuindo para gerar polimorfismos e variabilidade genética em milho (McClintock, 1983; Cormack et al, 1988).

McClintock (1984), sugeriu que as células devem estar preparadas para responder à vários tipos de estresse e muitas

vezes o genoma deve reagir contra condições adversas e totalmente inesperadas.

Os mecanismos que ativam os transposons ainda não são conhecidos. Acredita-se entretanto, que são ativados em condições de estresse ou choque genômico imposto por infecções virais, quebras cromossômicas, irradiação e outros (Nevers et al, 1986; Gierl et al, 1989; Döring, 1989).

4. MATERIAIS E MÉTODOS.

O material genético bem como o método experimental foram escolhidos para testar a hipótese principal de que o cruzamento de linhagens puras distintas, não produz variação genética mendeliana nova em gerações avançadas derivadas de seus cruzamentos.

4.1 Germoplasma.

Para se ter um número adequado de casos de interações de linhagens distintas, foram escolhidas seis linhagens puras de milho bastante conhecidas, não aparentadas e estáveis, que sabidamente não segregam para loco algum.

As linhagens puras em uso intensivo em nosso laboratório de genética, por mais de uma dezena de anos, têm apresentado estabilidade fenotípica e também em cruzamentos com outras linhagens, produzem híbridos F₂ livres de instabilidades fenotípicas visíveis. As seis linhagens isogênicas foram escolhidas do acervo da coleção de germoplasma, do nosso laboratório, sintetizadas e mantidas sob orientação do Prof. Dr. William José da Silva, na Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP. Três delas, denominadas L902, L903 e L922, são derivadas da raça autóctone Cateto, variedade São Simão, portanto, de endosperma flint e cor laranja. As outras três, designadas L910, AST 86-4 e SAL 16, são derivadas da raça Tuxpeño e portanto apresentam endosperma do tipo dentado, todas de coloração

amarela. Essas linhagens foram também escolhidas por apresentarem alta heterose quando cruzadas entre si o que é uma clara evidência de que não são aparentadas. São linhagens que foram submetidas a mais de 15 gerações de autofecundação e submetidas a contínua seleção para eliminação de características agronômicas desfavoráveis, assim como de genes que promovem instabilidade gênica tais como variegação nas sementes, nas folhas e colmo, redução e variação no tamanho das sementes, cicatrizes nos grãos, manchas de vários pigmentos nos vários tecidos, sementes abortadas ou outro fator qualquer que cause desuniformidade. Como resultado dessa seleção visual cuidadosa, as linhagens puras escolhidas apresentaram evidências fenotípicas indicadoras da ausência de efeitos de elementos de transposição ou de alterações provocadas por anomalias cromossômicas que podem gerar instabilidade.

4.1.1 Cruzamento dialélico: Síntese das progênies F_1 .

Numa primeira fase foram efetuados os cruzamentos dialélicos das seis linhagens isogênicas, portanto, cruzamento das seis linhagens, duas a duas, visando a síntese de quinze grupos F_1 , denominados em genética e melhoramento de milho de híbridos simples. Foram produzidos três subconjuntos de acordo com o tipo de endosperma. Um constituído de três híbridos simples de endosperma flint, ou seja, L902 x L903, L902 x L922 e L903 x L922. Um formado de três híbridos simples de endosperma dentado AST 86-4 x SAL 16, AST 86-4 x L910, SAL 16 x L910 e um último subconjunto, constituído de nove híbridos simples de endosperma meio dente, ou seja, L902 x AST 86-4, L902 x SAL 16, L902 x L910, L903 x AST 86-4, L903 x SAL 16,

L903 x L910, AST 86-4 x L922, L922 x SAL 16 e L922 x L910. Além dos quinze F₁ foram também incluídos no projeto, dois cruzamentos recíprocos, L910 x L902 e AST 86-4 x L903, tomados ao acaso, para avaliação do efeito do genoma citoplasmático na geração de variabilidade genética.

4.1.2 Síntese e análise fenotípica da geração de sementes S₁.

Uma amostra de sementes das espigas F₁, de cada um dos dezessete cruzamentos, foram misturadas e plantadas em Outubro de 1987 abrangendo uma área de 340 m², do campo experimental da UNICAMP. Em Janeiro de 1988, esses dezessete grupos floresceram e cerca de 25 a 35 plantas em cada um foram autofecundadas para a obtenção das sementes F₂, daqui em diante designadas sementes S₁, por serem a primeira geração de autofecundação. Após a colheita, as espigas S₁ originadas das 17 famílias F₁ autofecundadas, tiveram suas sementes analisadas para a presença de características fenotípicas novas, supostamente de origem mendeliana que não ocorriam nas sementes das linhagens puras parentais.

Em Maio do mesmo ano, realizou-se o processamento do material colhido, contagem e preparo das sementes para plantio imediato, visando a próxima etapa. Características poligênicas e quantitativas que sabidamente surgem em função de mecanismos de recombinação homóloga na meiose não foram consideradas nesse estudo, pois são características que podem resultar facilmente da complementação de dois ou mais locos, cujos genes separados nas linhagens parentais podem se complementar no cruzamento ou em gerações

avançadas. Desse modo não foram consideradas características como porte da planta, comprimento e largura de folhas, número e comprimento de nódulos, coloração da planta para tonalidade de verde e roxo, diâmetro e comprimento de espiga, número de fileiras e grãos, tamanho de sementes, etc.

4.1.3 Síntese e análise fenotípica da geração de sementes S₂.

Para obtenção das sementes S₂ efetuou-se o plantio dos 17 lotes de sementes S₁, cada um envolvendo aproximadamente 1100 sementes coletadas de várias espigas e distribuídas em 15 linhas de 10m de comprimento. Essa fase foi realizada em Junho de 1988 com a colaboração do Biólogo João Rosolen, no Campo Experimental da Companhia de Sementes Colorado em Guaira - São Paulo. Na época do florescimento, Agosto de 1988, cerca de 300 plantas tomadas ao acaso, dentro de cada um dos 17 lotes, foram autofecundadas produzindo as sementes S₂. Mais de uma centena de espigas S₂ em cada um dos 17 grupos foram colhidas e analisadas para se detectar mutantes novos, que nunca haviam se expressado nas linhagens parentais. Todas as espigas foram em seguida expurgadas com fosfeto de alumínio para proteção dos grãos contra insetos e armazenadas em câmara seca para utilização subsequente.

4.1.4 Síntese e análise fenotípica da geração de sementes S₃.

Essa é a primeira geração de sementes obtidas em

progênies de plantas oriundas do cruzamento F1 de linhas puras. Essas sementes foram produzidas em plantas S2 para se analisar o efeito da complementação das linhas parentais na geração de novos mutantes que não ocorrem nos pais homozigotos. Nesse estágio, 2366 espigas S2 envolvendo os 17 grupos, foram preparadas para o plantio em Dezembro de 1988. Para tanto, cerca de 50.000 m² foram necessários para distribuir as 354.900 sementes em linhas de 20 m de comprimento. Como nos demais plantios, foram plantadas 3 sementes por cova que foram desbastadas a duas aos 20 a 25 dias do plantio. Utilizou-se o espaçamento de 1 m entre linhas e 0,40 m entre plantas dentro da linha. Usou-se cerca de 450 gramas de adubo NPK na formulação 4-14-8 em 10 m lineares. A operação de cobertura com aplicação do Sulfato de Amônio foi executada entre 35 a 40 dias do plantio, na base de 350 gramas por 10 m lineares. O pesticida Pentacloro Benzeno para a lagarta do cartucho, *Spodoptera frugiperda*, foi aplicado nas plantas com aproximadamente 45 dias após o plantio, numa proporção de 3 grânulos para cada cartucho. Foi usado Mirex para o controle de formiga saúva sempre que houve necessidade.

É nessa fase do processo endogâmico, que começa a segregação de progênies mais uniformes. Com isso aumenta a frequência dos homozigotos, e conseqüentemente a expressão dos genes recessivos novos. As progênies S2 oriundas de espigas que segregaram para algum mutante de frutos foram marcadas para serem novamente autofecundadas.

As progênies S2 que apresentavam algum tipo de mutante de planta foram etiquetadas para serem também autofecundadas. Aquelas que não mostraram mutantes nos frutos ou de plantas foram submetidas a polinização aberta (OP) devido a impossibilidade óbvia de se autofecundar cerca de 236.600 plantas que

compuseram a geração de plantas S². Todas as espigas autofecundadas, portanto com sementes S³, provenientes das 2366 progênies foram colhidas e analisadas para identificação de mutações monofatoriais e expressas nos frutos em consequência da homozigose. Também as progênies que sofreram polinização aberta, ou seja, que foram fecundadas por pólen das plantas adjacentes, foram colhidas e avaliadas. Fica evidente, que nesta fase, certos mutantes de endosperma e de plantas que poderiam ser detectados, deixaram de ser em consequência de ser o milho uma planta alógama e da não realização da autofecundação em todas as progênies do campo.

Após o término da colheita as espigas que revelavam alterações morfológicas nas sementes, ou provenientes de progênies que segregaram mutantes de planta, foram expurgadas e mantidas em câmara seca para posterior plantio.

4.1.5 Síntese da geração de sementes S¹, S³ e/ou S⁴.

Devido a expressiva quantidade de progênies apresentando novos mutantes de planta e principalmente de endosperma, dentro de cada um dos 17 grupos, estabeleceu-se um critério para escolher as progênies que deveriam ser selecionadas para a síntese da geração seguinte.

4.1.5.1 Mutantes de Planta.

Tanto o mutante como as plantas normais nas progênies S² que segregaram para algum tipo de mutante de planta foram autofecundadas. Dessas progênies foram selecionadas uma espiga do

mutante autofecundado e quatro espigas de plantas de fenótipo normal para o próximo plantio.

Nas progênies onde o mutante sofreu apenas polinização aberta, recorreu-se às sementes remanescentes da progênie, e/ou as sementes do próprio mutante em polinização aberta, adicionando-as ao conjunto de sementes oriundas de quatro espigas autofecundadas de plantas fenotipicamente normais, provenientes da mesma progênie em estudo. Em progênies cujo mutante foi autofecundado suas sementes foram usadas para a próxima geração.

Quando não foi possível autofecundar as espigas do mutante e das plantas normais da progênie S² segregante, recorreu-se às sementes remanescentes dessas progênies, além do plantio das sementes das espigas OP segregantes.

Nas progênies que apresentaram segregação de mutantes com macho esterilidade, as plantas normais dessas progênies foram simultaneamente autofecundadas e cruzadas com as macho estéreis. Esses cruzamentos pareados foram realizados na tentativa de se determinar o tipo de herança, genética ou genética-citoplasmática que condiciona a macho esterilidade.

4.1.5.2 Mutantes de Endosperma.

Como a maior parte dos mutantes de endosperma foi observado em espigas de polinização aberta, foi sempre necessário voltar às sementes da geração anterior. Nos casos de ausência de sementes remanescentes, foram plantadas as sementes da espiga que sofreu polinização aberta, uma vez que em média 10% dos frutos de uma espiga de milho são produto da autofecundação (Kahler et al, 1984).

Nos casos onde se efetuou a autopolinização artificial em progênies que segregaram mutantes de plantas e onde surgiram mutantes novos de endosperma, esses variantes logicamente também foram selecionados para prosseguir as análises.

4.1.6 Avaliação das progênies com os novos mutantes.

Todas as progênies S3 e variantes selecionadas foram plantadas em Dezembro de 1989 na Área Experimental da UNICAMP, ocupando uma área de aproximadamente 4.000 m². As progênies foram analisadas tanto para características de planta como de sementes, observando a performance de cada grupo para a confirmação da presença do mutante observado em OP, bem como para o surgimento de novos mutantes. O objetivo dessa avaliação foi o de criar condições para se poder separar as alterações genéticas daquelas causadas apenas por efeitos ambientais. Cerca de 19.000 plantas foram analisadas nas diversas fases de crescimento até o florescimento. Todas as progênies, portadoras ou não de novos mutantes de planta foram autofecundadas, para elevar o grau de endogamia, manter os mutantes em homozigose e proporcionar o aparecimento de novos mutantes de endosperma. Todas as progênies com mutantes novos sofreram mais um ciclo de autofecundação para confirmação da natureza genética dos mesmos. Esse procedimento foi crítico para permitir a análise genética dessas alterações e síntese de linhagens puras.

4.1.7 Análise fenotípica de sementes S1, S3 e/ou S4.

As espigas autofecundadas contendo as sementes

S1 oriundas de espigas OP, sementes S3 provenientes da autofecundação das plantas remanescentes S2 e sementes S4, foram individualmente colhidas e analisadas para estudar o tipo de herança dos novos mutantes e permitir a expressão de outros variantes.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.

5.1 Caracterização genética dos mutantes estudados.

Nas tabelas de número 1 a 14 estão listados os tipos de mutantes observados nas progêneses autofecundadas dos cruzamentos dialélicos das seis linhagens de milho estudadas e de dois cruzamentos recíprocos. A designação dos mutantes que surgiram da complementação de genes das seis linhagens foi feita baseada na semelhança fenotípica desses mutantes com características de mutantes já conhecidos e descritos na literatura (Coe et al, 1988; Neuffer et al, 1968). Nos grupos resultantes dos cruzamentos L903 x AST 86-4, L903 x L910 e L922 x SAL-16, não se conseguiu detectar mutante algum.

A tabela 1 mostra os tipos de mutantes que surgiram no cruzamento das linhagens de endosperma flint, L902 e L903. Todos os mutantes desse grupo envolveram alterações no endosperma. O mutante denominado *floury* apresenta endosperma farináceo ou opaco, à semelhança dos genes *opaque 2*, *opaque 7*, *floury*, ou *floury 2* (Glover e Mertz, 1987). São opacos com grãos um pouco enrugados, e com volume pouco maior que o dos tipos normais (Fig. 1). Esses genes reduzem o brilho das sementes devido a mudanças na porosidade do endosperma. Um outro mutante surgido em geração avançada do cruzamento de L902 x L903 foi o tipo que designamos *miniature opaque*. O aspecto apresentado por esse mutante difere um pouco dos tipos correspondentes descritos na literatura. O mutante *miniature seed*, ilustrado por Neuffer et al (1968) caracteriza-se pela redução de 20% do peso da semente e de

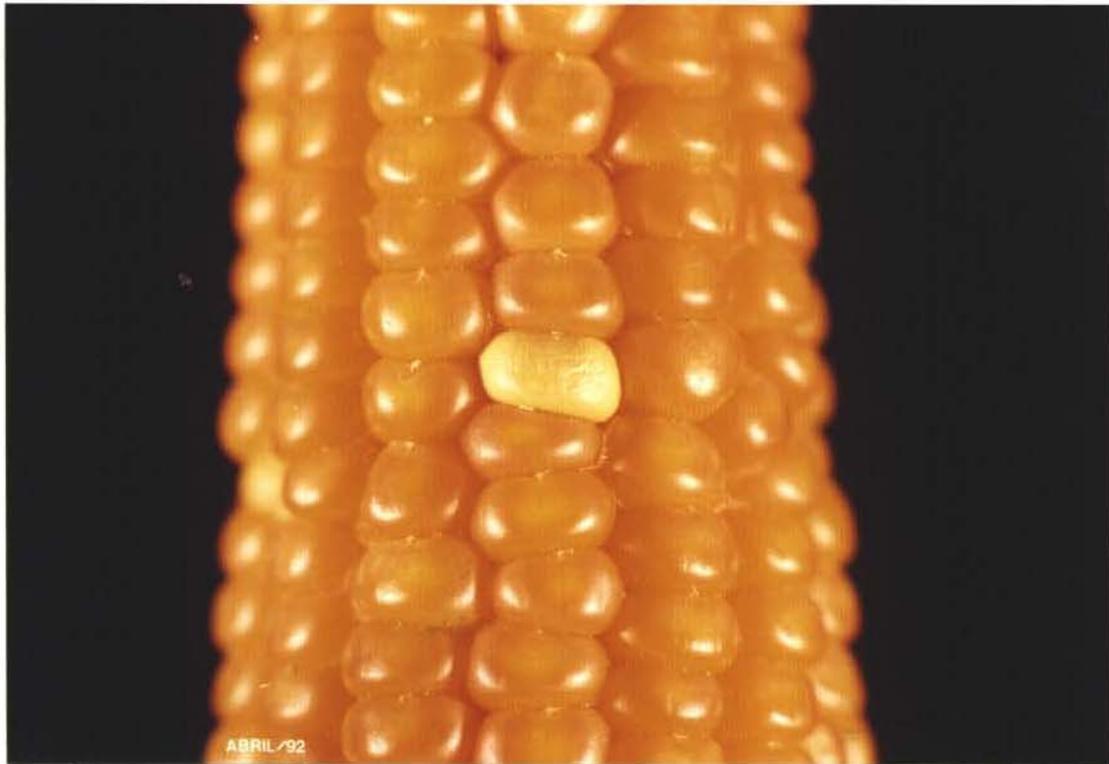


Fig. 1. Mutante *floury* surgido na geração S4 do cruzamento de L902 x L903 e em outras combinações.

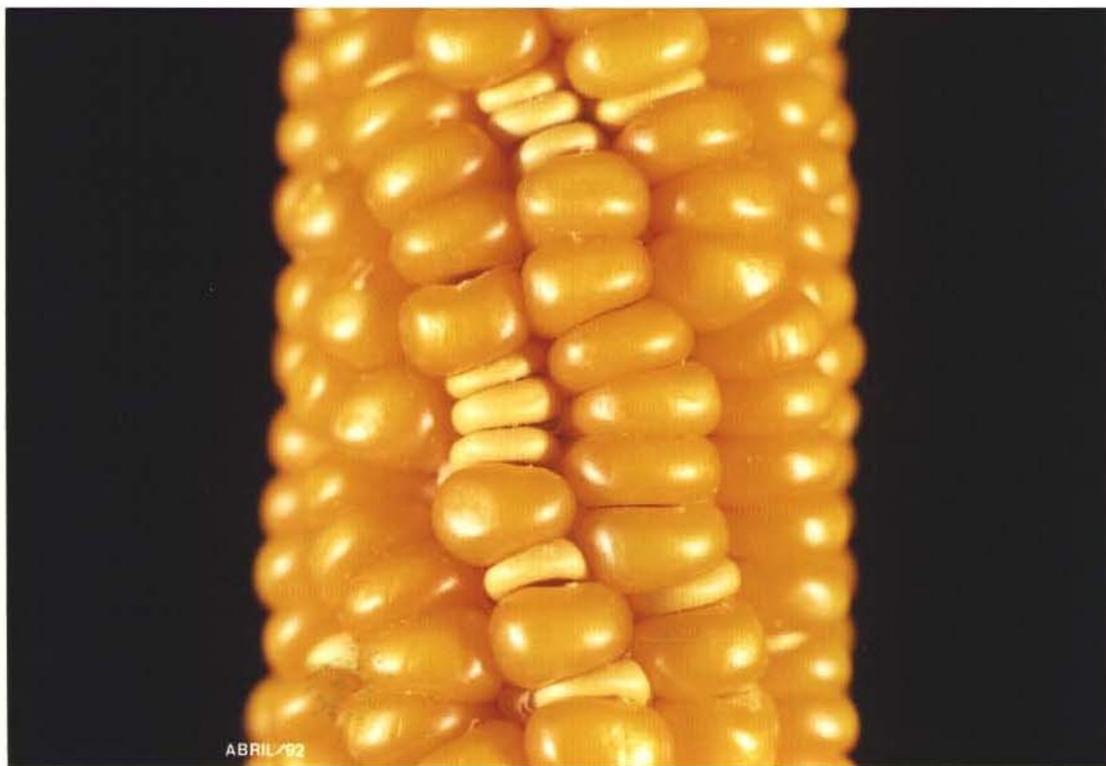


Fig. 2. Mutante *miniature opaque* surgido na geração S4 do cruzamento de L902 x L903 e em outras combinações.

aproximadamente um terço do tamanho do grão normal (Lowe e Nelson Jr., 1946). O mutante *miniature opaque* descrito neste trabalho apresenta as características fenotípicas acima descritas, e também uma alteração na cor das sementes reduzidas. Elas têm aspecto opaco o que as contrasta bastante do conjunto das sementes normais de uma mesma espiga (Fig. 2). Ainda na tabela 1, observa-se um terceiro tipo de mutante por nós designado *shrunken* que parece modificar a proporção de carboidratos no endosperma (Fig. 3). Esse mutante assemelha-se aos mutantes *shrunken 2*, *brittle*, *brittle 2*, etc, que produzem os milhos do tipo superdoce. No estágio de milho verde ficam bem túrgidos e quando seco mostra-se com aspecto enrugado (Neuffer et al, 1968; Glover e Mertz, 1987). Observa-se nesses mutantes uma clara redução na produção de amido com aumento subsequente do teor de açúcares, notadamente sacarose. Os três tipos de mutantes que surgiram em gerações subsequentes do cruzamento de L902 x L903 mostraram segregação monofatorial revelando a ação de apenas um loco condicionando essas alterações genéticas.

No cruzamento das linhagens L902 e AST 86-4, apenas um mutante foi detectado (tabela 2). Esse mutante se caracterizou pela redução drástica do porte da panícula e em alguns casos com aborto total da mesma, por isso o designamos *tasselless* (Fig. 4). Nesse caso há uma grande redução na produção de gametas masculinos, sem com isso afetar o desenvolvimento da espiga. A análise da segregação indicou tratar-se aqui também de herança monofatorial sendo o alelo recessivo responsável pela transformação de uma planta monóica em feminina apenas. Esse tipo de alteração de planta nessa família foi detectado na geração S3, ou seja, após o material genético ter sofrido três consecutivas gerações de autofecundação.



Fig. 3. Mutante *shrunken* surgido na geração 0P do cruzamento de L902 x L903.



Fig. 4. Mutante *tasselless* surgido na geração S3 do cruzamento de L902 x AST 86-4 e em outras combinações.

No cruzamento das linhagens de endosperma flint, L902 e L922 (tabela 3), foram observados dois tipos de mutantes. Um revelando plantas com esterilidade masculina e outro com ausência de dormência propriamente dita nas sementes. O tipo macho estéril (Fig.5), foi denominado *male sterile* por ser semelhante aos vários genes nucleares bem conhecidos em milho (Neuffer et al, 1968) e aos tipos que apresentam esterilidade masculina do tipo genético-citoplasmático com citoplasmas denominados Charrua, Texas, USDA, I, J, Vg, M1, e etc (Coe et al, 1988). Esse mutante, como os demais, não apresenta alteração no tamanho da panícula e geralmente logo após a extrusão da inflorescência as ramificações ficam juntas em forma de pavil, com as espiguetas carregando anteras não funcionais. Novas famílias a partir do material original segregante estão sendo sintetizadas para posteriormente serem testadas para identificação do mecanismo responsável pela macho-esterilidade expressa nesse grupo, ou seja, nuclear ou núcleo-citoplasmática. Observou-se (tabela 3) que todos os mutantes macho-estéreis surgiram na geração S². A progênie 4-2B representa a planta fenotipicamente normal da progênie segregante na geração S². Outro mutante que também surgiu da complementação entre as linhagens citadas foi o tipo com germinação precoce das sementes ainda quando estão em estágio imaturo nas espigas. Esse mutante está relacionado com alterações que afetam a dormência e a germinação dos frutos como aqueles que ocorrem em mutantes denominados *vivipary*. Esses mutantes provavelmente acumulam precursores de carotenóides no endosperma e por isso tornam as sementes amarelo pálidas ou de coloração limão como os tipos citados por Robertson (1975). A expressão da viviparidade (Fig. 6) é muito variável sendo possível encontrar nas espigas segregantes sementes distintas com vários graus

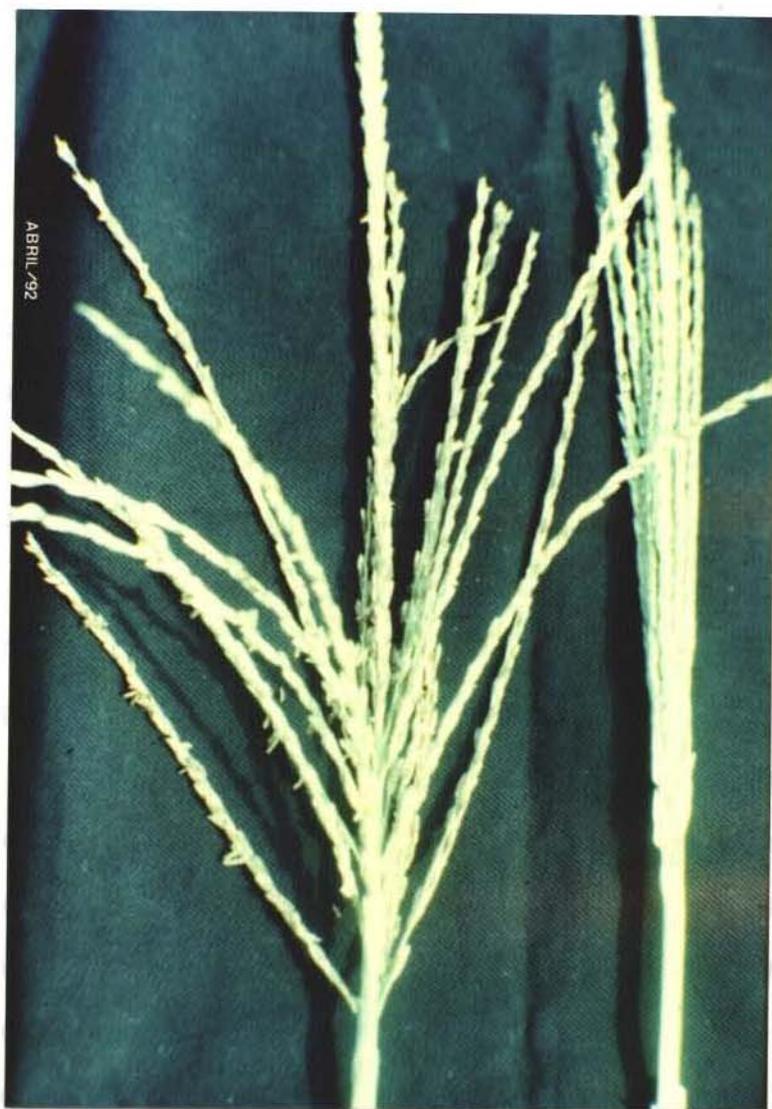


Fig. 5. Mutante *male sterile* surgido na geração S 2do cruzamento de L902 x L922.

de germinação precoce (Neuffer et al, 1968). Possivelmente, o embrião vivíparo é afetado por uma redução na concentração de ácido abscísico, ABA, (Sheridan, 1988). Essa alteração provavelmente acelera o processo de germinação logo após alguns dias da polinização impedindo dessa maneira que o mesmo entre em estado de dormência, fenômeno comum em sementes normais. A esterilidade masculina mostrou herança com possibilidade de envolver um ou dois pares de genes. A progênie segregando para o fator *vivipary* mostrou que essa alteração é condicionada por apenas um loco. A macho esterilidade ocorreu na segunda geração de plantas enquanto o vivíparo ocorreu após o quarto ciclo de autofecundação, ou seja, nas sementes S4.

Na tabela 4, estão relacionados os mutantes que foram encontrados como resultado da complementação genômica entre as linhagens L902 e SAL-16. O mutante com encurtamento de internódios do colmo denominado *brachytic* (Fig. 7), reduz o porte da planta como o causado pelos genes *br1* e *br2* (Goe et al, 1988). O mutante denominado *striate*, foi o único mutante de folhas detectado no presente trabalho. As plantas estriadas (Fig. 8) apresentam listras brancas ou verde-claras, contínuas ou segmentadas no limbo, ou às vezes próximas a lígula ou nas brácteas. A intensidade na coloração da faixa mutada se deve a diferentes arranjos das células mutadas com aquelas sem as alterações, que se dispõem em camadas constituindo o tecido. Quanto maior o número de células contendo os plastídeos mutados mais larga a faixa branca ou amarela da estria. Isso dá oportunidade para o surgimento de diversos padrões fenotípicos como notaram Neuffer et al (1968). Observa-se na tabela 4, que esses dois mutantes surgiram na geração S2. Outro mutante de planta detectado, ainda no cruzamento de L902 x SAL-16, foi o tipo denominado *tasselless*, cujo fenótipo se



Fig. 6. Mutante *vivipary* surgido na geração S 4 do cruzamento de L902 x L922.



Fig. 7. Mutante *brachytic* surgido na geração S₂ do cruzamento de L902 x SAL-16 e em outras combinações.



Fig. 8. Mutante *striate* surgido na geração S₂ do cruzamento de L902 x SAL-16 e em outras combinações.

assemelha ao mesmo mutante descrito na tabela 2. Outros mutantes encontrados foram os de endosperma, do tipo *floury* e *miniature opaque*, cujas características fenotípicas também já foram descritas no grupo L902 x L903 (tabela 1), havendo diferença somente quanto a geração de origem do mutante nas famílias citadas. Observou-se que todas as progênies deste grupo apresentaram desvios de segregação para herança monogênica. Como todos os tipos de mutantes descritos neste grupo são fenotipicamente muito semelhantes a outros mutantes das mesmas classes com segregação monofatorial em outros grupos, essa segregação alterada encontrada nas progênies talvez possa ser atribuída à instabilidade causada pelo próprio mecanismo gerador de tais mutações.

O único mutante que sistematicamente ocorreu em sucessivas gerações, permitindo uma análise genética, dentro da família L902 x L910, foi o tipo *miniature opaque* (tabela 5). Esse mutante, possivelmente semelhante ao já descrito na tabela 1, foi o único mutante de endosperma, cuja segregação em algumas progênies, foi detectada já na geração S². Quanto ao padrão de segregação, uma progênie apresentou segregação próxima a proporção mendeliana esperada e a outra não.

Em gerações avançadas do cruzamento entre L903 e L922 (tabela 6), foram encontrados mutantes de plastídeos por nós denominados de *luteus*, e o *striate* por serem semelhantes aos mutantes descritos por Coe et al (1988). O *luteus* é um mutante letal ainda no estágio de plântula. Esse mutante possivelmente causa alterações na via biossintética da clorofila ou carotenóides, inviabiliza a fotossíntese e conseqüentemente o desenvolvimento da planta. As plântulas apresentam coloração amarelada, não fazem fotossíntese e

desenvolvem-se até esgotarem as reservas do endosperma, quando então secam. Esse mutante foi detectado na geração S 3 e apresentou segregação monofatorial. O mutante denominado *striate*, apresentou fenótipo semelhante aos demais mutantes dessa mesma classe, descritos anteriormente na tabela 4 apresentando entretanto segregação distinta da monofatorial.

Na tabela 7, estão descritos os mutantes avaliados nas progênes do cruzamento entre L903 e SAL-16. Os mutantes designados *brachytic* e *striate*, são fenotipicamente parecidos com aqueles anteriormente descritos na tabela 4 dentro do grupo L902 x SAL-16. O tipo *brachytic* deu segregação monofatorial e entre os *striate*, um deu segregação monofatorial e o outro não.

Alguns mutantes foram encontrados apenas em uma determinada família. É o caso do tipo *germless*, que somente foi encontrado a partir da geração S4, no cruzamento de AST 86-4 com L922 (tabela 8). A denominação *germless*, foi feita para caracterizar sementes que apresentam ausência do eixo embrionário, mas que são indistinguíveis das sementes normais quanto aos tecidos do endosperma. A progênie 91-176 (tabela 8) em que ocorreu, o mutante *germless* apresentou também uma outra alteração no endosperma. Análise na lupa de sementes secas revela com clareza a cavidade onde se aloja o tecido embrionário (Fig. 9). Esse é mais um mutante de endosperma que surgiu a partir do terceiro ciclo de autofecundação e cuja segregação observada e avaliada pelo teste de χ^2 indica a origem monogênica desse mutante.

No grupo formado pelo cruzamento das linhas AST 86-4 e SAL-16 (tabela 9), foram observadas progênes segregando para diferentes tipos de mutantes. O tipo *tasseless* mostrou características



Fig. 9. Mutante *germless* surgido na geração S 4 do cruzamento de
AST 86-4 x L922.

fenotípicas semelhantes às já descritas na tabela 2. As duas progênies neste grupo apresentaram segregação discrepante daquela condicionada por fator monogênico. O mutante do tipo *etched* caracteriza-se por apresentar sementes com desenvolvimento praticamente normal, considerando as dimensões dos frutos (Neuffer et al, 1968). Estes podem ou não apresentar o tecido embrionário normal mas sua característica mais acentuada é a presença de reentrâncias ou cicatrizes, distribuídas por toda a superfície externa do grão (Figura 10). Esse mutante de endosperma foi somente detectado em geração avançada após o terceiro ciclo de autofecundação e nesse grupo todas as progênies segregantes para *etched* apresentam desvios significativos para a segregação monofatorial.

O mutante denominado *shriveled kernel* (Fig. 11), é semelhante a outros mutantes (Neuffer et al, 1968) que apresentam alterações no número de cromossomos das células. Os mutantes fenotipicamente semelhantes descritos na literatura foram caracterizados por uma deficiência na condensação dos cromossomos na metáfase, causando quebras cromossômicas durante a migração dos cromossomos para os pólos, no final da anáfase. (Neuffer et al, 1968). Esse mutante de endosperma foi observado em geração avançada (4), e na progênie estudada a relação entre sementes normais e mutantes não obedece à segregação esperada para um caracter monofatorial, como seria esperado se envolvesse alterações cromossômicas como o mutante citado por Neuffer et al (1968).

Num outro grupo, AST 86-4 x L910 (tabela 10), somente o mutante do tipo *brachytic* foi encontrado. Também o *brachytic* desse grupo, é fenotipicamente semelhante aos demais mutantes da mesma classe, descritos em outros grupos como o mostrado na tabela 4. O



Fig. 10. Mutante *etched* surgido na geração S 3 do cruzamento de AST 86-4 x SAL-16 e em outras combinações.



Fig. 11. Mutante *shriveled kernel* surgido na geração S 4 do cruzamento de AST 86-4 x SAL-16.

tipo *brachytic* desse conjunto foi detectado já na geração S² e mostrou segregação dentro dos padrões mendelianos para caracter simples.

O mutante expressando fenótipo do tipo *albino* foi encontrado apenas no grupo envolvendo as linhagens L922 e L910 (Tabela 11). Foi denominado *albino* pela sua semelhança fenotípica aos genes *w1*, *w2*, descritos na literatura (Coe et al, 1988). O *albino* (Fig. 12) é um mutante do tipo letal e caracteriza-se por apresentar ausência de clorofila e carotenóides, por isso com coloração branca. O albino foi observado a partir da geração S² de planta e de acordo com a segregação encontrada trata-se de alteração controlada por apenas um loco.

Os mutantes de planta do tipo *brachytic* e *tasseless* detectados no grupo composto pelas linhagens SAL-16 x L910 (tabela 12), já foram descritos anteriormente nas tabelas 2 e 4. O *tasseless* deste grupo foi observado já em plantas S² revelando ser uma característica monogênica. Ainda nessa família, foi detectado o mutante do tipo *tassel seed* (Fig.13). Nos primeiros estágios de desenvolvimento da planta a panícula e as espigas são morfologicamente indistinguíveis, exceto pelos primórdios das hastes na panícula (Cheng et al, 1983). Com o crescimento da planta, pistilos na inflorescência masculina e estames na inflorescência feminina, são abortados e degenerados. Há evidências que giberilinas exercem um papel importante no processo para suprimir o aparecimento de determinados órgãos sexuais, tanto na panícula como na espiga. A concentração de giberilina, é aparentemente monitorada por genes relacionados ao sexo, que ativam o curso para diferenciação de estruturas masculinas e femininas (Irish e Nelson, 1989). O fenótipo do mutante *tassel seed* mostra claramente a transformação das hastes da panícula em



Fig. 12. Mutante *albino* surgido na geração S₂ do cruzamento de L922 x L910.



Fig. 13. Mutante *tassel seed* surgido na geração S₂ do cruzamento de SAL-16 x L910.

pseudoespigas onde são encontrados alguns pistilos viáveis, permitindo a formação de frutos. Esse mutante é semelhante ao mutante *tassel seed -2* descrito na literatura (Neuffer et al, 1968, Coe et al, 1988), apresentando também padrão de segregação, aos moldes de herança monogênica. Esse mutante de planta foi aqui detectado na geração S² como a maioria dos mutantes de plantas estudados. O mutante denominado *thin endosperm*, encontrado no cruzamento de SAL-16 x L910, caracteriza-se pela ausência de vários tecidos no fruto. O embrião e os tecidos de reserva não são formados durante a morfogênese. A Fig. 14 revela o aspecto fenotípico do mutante podendo ser notado somente uma fina lâmina de tecido materno, notadamente o pericarpo, ao invés do grão normal. Mutantes com esse fenótipo não foram reportados até o momento. Trata-se em nosso caso de um mutante de fruto com segregação monogênica. Foi detectado na geração S³, a semelhança do que ocorreu com a maioria dos mutantes de endosperma.

A tabela 13, mostra os mutantes obtidos no grupo do cruzamento L910 x L902, representando um dos cruzamentos recíprocos estudados. Os mutantes de planta do tipo *brachytic* e *luteus* são fenotipicamente muito semelhantes aos demais mutantes dessas mesmas classes já descritos nas tabelas 4 e 6 respectivamente, diferindo apenas quanto ao padrão de segregação avaliado com o teste de χ^2 . O mutante de endosperma denominado *miniature opaque* é semelhante aos mutantes dessa mesma classe de mutantes de endosperma descritos em progênies de outros grupos, como no próprio grupo envolvendo as linhagens citadas. Embora semelhantes fenotipicamente apresentam discrepâncias quanto à geração de origem e ao padrão mendeliano de segregação monofatorial. A descrição desse mutante aparece na tabela 1 apresentando semelhança quanto à geração que se



Fig. 14. Mutante *thin endosperm* surgido na geração S 3 do cruzamento de SAL-16 x L910.

expressou a primeira vez (S4) e também ao padrão de segregação mendeliana.

O outro cruzamento recíproco avaliado nesse projeto envolveu as linhas AST 86-4 e L903 que apresentam os mutantes relacionados na tabela 14. Os mutantes do tipo *etched* e *floury*, presentes como resultado desse cruzamento, foram também detectados como variantes de outros grupos, por exemplo AST 86-4 x SAL-16 (tabela 9) e L902 x L903 (tabela 1) onde estão descritos. Esses dois mutantes não apresentaram um comportamento definido nas diversas progênies onde foram encontrados, considerando o padrão de segregação mendeliana, ora estável ora instável, e as gerações onde foram visualizados primeiramente. Mas ambos mostram a tendência dos mutantes de endosperma em surgir em gerações avançadas no processo para obtenção de linhagens puras.

Os dados apresentados, nos levam a concluir que o padrão de segregação nas progênies avaliadas não parece seguir um determinado modelo. É possível encontrar desvios de segregação mendeliana em progênies segregando para um mesmo mutante dentro de uma única família. Esses desvios de segregação não devem ser atribuídos a herança quantitativa, mas sim, ao próprio sistema mutacional envolvido na origem e expressão desses mutantes. Também não se observa um determinado padrão quanto ao número de gerações de autofecundação necessária para o surgimento dos diferentes tipos de mutantes estudados. Nota-se, uma certa tendência entre os mutantes de planta de se expressarem na geração S² e para os mutantes de endosperma na geração S³ ou S⁴.

A frequência dessas mutações também parece não estar relacionado com efeitos máximos da heterose, pois a maioria dos

mutantes somente foram detectados após dois ou três ciclos de autofecundação, quando o efeito de heterose é reduzido de 25 e 12,5%. Por outro lado, mostra que a endogamia é importante para o aparecimento dessas alterações quer proporcionando aumento no número de cópias de elementos que promovem mutações, quer pela sua capacidade de expressar o efeito de genes recessivos.

É interessante notar que grande parte dos mutantes estudados são fenotipicamente semelhantes aos variantes genéticos mais frequentemente obtidos através de estresse genômico. Assim em cultura de células *in vitro* (Edallo et al, 1984; Zehr et al, 1987; Lee e Phillips, 1987b; Prioli, 1987), pela presença quantitativa de cromossomos *B* no genoma (Staub, 1987), ou ainda pela ativação do elemento de transposição *Spm* em experimentos de *transposon tagging* (Schmidt et al, 1987) tem sido encontrados mutantes como *albino*, *brachytic*, *luteus*, *male sterile*, *dwarf*, *striate leaves*, *narrow leaf*, *tasselless*, *tassel seed*, *defective kernel*, *opaque seeds*, *germless*, *miniature opaque*, *shrunken seeds* e *vivipary*. Obviamente não se tem aqui um mínimo de informação para inferir que esses mecanismos geradores de diversidade genética sejam os mesmos que foram ativados na interação dos genomas das linhagens estudadas. Vários mecanismos poderiam ser acionados nesses cruzamentos. Elementos de transposição como já vimos, são comumente ativados em genomas que apresentam quebras cromossômicas (McClintock, 1984; Döring, 1989; Gierl et al, 1989). Há também observações que indicam que os elementos de transposição *Ds* podem ser responsáveis por quebras cromossômicas quando um elemento regulatório *Ac* está presente no genoma (Nevers et al, 1986). O evento quebras cromossômicas, que em alguns casos precede a ativação dos transposons, deve por sua vez

ocorrer devido a outros estímulos como a replicação tardia de blocos de heterocromatina (Peschke et al, 1987), pela presença de cromossomos *B* no genoma, que podem interagir fisicamente com algumas seqüências dos cromossomos do conjunto A (Rhoades e Dempsey, 1973; Lee e Phillips, 1987a). A presença de cromossomos com extremidades rompidas que tendem a adquirir a forma de anel podem formar pontes na anáfase, resultando também em quebras cromossômicas (McClintock, 1984).

Um outro exemplo de estresse também importante que é citado por McClintock (1984) e Nevers et al (1986), é aquele conseguido através de cruzamentos entre espécies. O cruzamento de linhagens distintas não poderia ser aqui também considerado um tipo de estresse? O cruzamento de várias linhas puras distintas de uma mesma espécie produzindo heterose não poderia também se constituir num choque genômico e promover a ativação de mecanismos intrínsecos geradores de variabilidade genética? A resposta a essas questões deve ser procurada numa fase seguinte através de análises citogenéticas, para se tentar identificar a presença de anomalias cromossômicas, presença de cromossomos *B*, ou aspectos relacionados à replicação dos *knobs* heterocromáticos e correlacionar esses eventos com as mutações encontradas. Paralelamente, devem ser feitos testes de alelismo para verificar se as mutações encontradas são as já conhecidas ou se são novas para serem mapeadas. É importante também que se analise as mutações que já tenham sondas disponíveis para se proceder uma análise molecular para investigar a natureza dessas mudanças estruturais dos genes sofridas em consequência desses cruzamentos.

Tabela 1. Número e porcentagem de mutantes encontrados em progênies derivadas do cruzamento F1 (L902 x L903). A sequência de gerações com a letra grifada se refere à geração onde o mutante de endosperma (e) ou de planta (p) se expressou pela primeira vez.

Progênie	¹ Gerações	Mutantes	Total	Porcentagem	²
L 99-15	F1-S1-S2-S3-S4	floury	(e) 176	22,7	NS
L 74-08	F1-S1-S2-S3-S4	miniature opaque	(e) 200	22,0	NS
L 76-09	F1-S1-S2-OP-S1	shrunken	(e) 1714	26,3	NS

1. F1, S1, S2, S3, S4 e OP se referem, respectivamente, ao cruzamento das duas linhagens, progênie com uma, duas, três e quatro autofecundações e progênie obtida com polinização aberta.

2. NS. Não significativo para teste de χ^2 (Qui-quadrado) para hipótese de herança monofatorial.

Tabela 2. Número e porcentagem de mutantes encontrados em progênies derivadas do cruzamento F1 (L902 x AST 86-4). A sequência de gerações com a letra grifada se refere à geração onde o mutante de endosperma (e) ou de planta (p) se expressou pela primeira vez.

Progênie	Gerações ¹	Mutantes	Total	Porcentagem
L 144-48	F1-S1-S2-S3	tasseless (p)	33	24,2 NS ²

1. F1, S1, S2, S3 se referem, respectivamente, ao cruzamento das duas linhagens, progênie com uma, duas e três autofecundações.

2. NS. Não significativo para teste de χ^2 (Qui-quadrado) para hipótese de herança monofatorial.

Tabela 3. Número e porcentagem de mutantes encontrados em progênies derivadas do cruzamento F1 (L902 x L922). A sequência de gerações com a letra grifada se refere à geração onde o mutante de endosperma (e) ou de planta (p) se expressou pela primeira vez.

Progênie	¹ Gerações	Mutantes	Total	Porcentagem
L 4-28	F1-S1-S2-S3	male sterile (p)	27	18,5 NS
L 4-29	F1-S1-S2-ms x normal	male sterile (p)	48	50,0 NS
L 72-30	F1-S1-S2-OP	male sterile (p)	49	6,1 NS*
L 202-38	F1-S1-S2-OP	male sterile (p)	16	31,2 NS
L 174-35	F1-S1-S2-S3-S4	vivipary (e)	151	25,8 NS

1. F1, S1, S2, S3, S4 e OP se referem, respectivamente, ao cruzamento das duas linhagens, progênie com uma, duas, três e quatro autofecundações e progênie obtida com polinização aberta.

2. NS. Não significativo para teste de χ^2 (Qui-quadrado) para hipótese de herança monofatorial a nível de 5% de probabilidade.

NS *, Não significativo para teste de χ^2 (qui-quadrado) para hipótese de herança bifatorial.

Tabela 4. Número e porcentagem de mutantes encontrados em progênie derivadas do cruzamento F1 (L902 x SAL 16). A sequência de gerações com a letra grifada se refere à geração onde o mutante de endosperma (e) ou de planta (p) se expressou pela primeira vez.

Progênie	1		Total	Porcentagem	2
	Gerações	Mutantes			
L 55-106	F1-S1-S2-OP	brachytic	(p) 48	4,2	*
L 24-100	F1-S1-S2-S3	striate	(p) 27	3,7	*
L 55-107	F1-S1-S2	tasseless	(p) 40	5,0	*
L 86-116	F1-S1-S2-S3	floury	(e) 1089	21,2	*
L 95-120	F1-S1-S2-S3-S4	floury	(e) 322	20,2	*
L 01-099	F1-S1-S2-S3	miniature opaque	(e) 372	17,5	*

1. F1, S1, S2, S3, S4 e OP se referem, respectivamente, ao cruzamento das duas linhagens, progênie com uma, duas, três e quatro autofecundações e progênie obtida com polinização aberta.

2. * significativo a nível de 5% no teste de χ^2 para herança monofatorial.

Tabela 5. Número e porcentagem de mutantes encontrados em progênies derivadas do cruzamento F1 (L902 x L910). A sequência de gerações com a letra grifada se refere à geração onde o mutante de endosperma (e) ou de planta (p) se expressou pela primeira vez.

Progênie	¹ Gerações	Mutantes	Total	Porcentagem	²
L 1-53	F1-S1-S2-S3	miniature opaque (e)	695	21,4	*
L 1-54	F1-S1-S2-OP-S1	miniature opaque (e)	1843	24,4	NS

1. F1, S1, S2, S3, S4 e OP se referem, respectivamente, ao cruzamento das duas linhagens, progênie com uma, duas, três e quatro autofecundações e progênie obtida com polinização aberta.

2. NS significa não significativo para teste de χ^2 (Qui-quadrado) para hipótese de herança monofatorial.

* significativo a nível de 5% no teste de χ^2 para herança monofatorial.

Tabela 6. Número e porcentagem de mutantes encontrados em progênies derivadas do cruzamento F1 (L903 x L922). A sequência de gerações com a letra grifada se refere à geração onde o mutante de endosperma (e) ou de planta (p) se expressou pela primeira vez.

Progênie	¹ Gerações	Mutantes	Total	Porcentagem	²
L 11-133	F1-S1-S2-S3	luteus (p)	59	27,1	NS
L 11-132	F1-S1-S2-S3	striate (p)	31	3,2	*

1. F1, S1, S2 e S3 se referem, respectivamente, ao cruzamento das duas linhagens, progênie com uma, duas e três autofecundações.

2. NS. Não significativo para teste de χ^2 (Qui-quadrado) para hipótese de herança monofatorial.

* significativo a nível de 5% no teste de χ^2 para herança monofatorial.

Tabela 7. Número e porcentagem de mutantes encontrados em progênies derivadas do cruzamento F1 (L903 x SAL 16). A sequência de gerações com a letra grifada se refere à geração onde o mutante de endosperma (e) ou de planta (p) se expressou pela primeira vez.

Progênie	¹ Gerações	Mutantes	Total	Porcentagem
L 62-222	F1-S1-S2-S3	brachytic (p)	22	9,1 NS
L 62-222	F1-S1-S2-S3	striate (p)	22	9,1 NS
L 75-226	F1-S1-S2-OP	striate (p)	36	2,8 *

1. F1, S1, S2, S3 e OP se referem, respectivamente, ao cruzamento das duas linhagens, progênie com uma, duas, três autofecundações e progênie obtida com polinização aberta.

2. NS. Não significativo para teste de χ^2 (Qui-quadrado) para hipótese de herança monofatorial.

* significativo a nível de 5% no teste de χ^2 para herança monofatorial.

Tabela 8. Número e porcentagem de mutantes encontrados em progênies derivadas do cruzamento F1 (AST 86-4 x L922). A sequência de gerações com a letra grifada se refere à geração onde o mutante de endosperma (e) ou de planta (p) se expressou pela primeira vez.

1				
Progênie	Gerações	Mutantes	Total	Porcentagem
L 91-176	F1-S1-S2-S3-S4	germlless (e)	206	24,7 NS

1. F1, S1, S2, S3 e S4 se referem, respectivamente, ao cruzamento das duas linhagens, progênie com uma, duas, três e quatro autofecundações.

2. NS. Não significativo para teste de χ^2 (Qui-quadrado) para hipótese de herança monofatorial.

Tabela 9. Número e porcentagem de mutantes encontrados em progênies derivadas do cruzamento F1 (AST 86-4 x SAL 16). A sequência de gerações com a letra grifada se refere à geração onde o mutante de endosperma (e) ou de planta (p) se expressou pela primeira vez.

Progênie	¹ Gerações	Mutantes	Total	Porcentagem	²
L 10-261	F1-S1-S2	tasseless (p)	39	2,6	*
L 10-262	F1-S1-S2-OP	tasseless (p)	25	8,0	*
L 02-253	F1-S1-S2-S3	etched (e)	747	5,5	*
L 02-255	F1-S1-S2-S3-S4	etched (e)	266	38,3	*
L 66-268	F1-S1-S2-S3	etched (e)	978	20,1	*
L 02-255	F1-S1-S2-S3-S4	shriveled kernel (e)	246	45,9	*

1. F1, S1, S2, S3, S4 e OP se referem, respectivamente, ao cruzamento das duas linhagens, progênie com uma, duas, três e quatro autofecundações e progênie obtida com polinização aberta.

2. * significativo a nível de 5% no teste de χ^2 para herança monofatorial.

Tabela 10. Número e porcentagem de mutantes encontrados em progênies derivadas do cruzamento F1 (AST 86-4 x L910). A sequência de gerações com a letra grifada se refere à geração onde o mutante de endosperma (e) ou de planta (p) se expressou pela primeira vez.

Progênie	¹ Gerações	Mutantes	Total	Porcentagem
L 129-298	F1-S1-S2-OP	brachytic (p)	5	² 20,0 NS

1. F1, S1, S2 e OP se referem, respectivamente, ao cruzamento das duas linhagens, progênie com uma e duas autofecundações e progênie obtida com polinização aberta.

2. NS. Não significativo para teste de χ^2 (Qui- quadrado) para hipótese de herança monofatorial.

Tabela 11. Número e porcentagem de mutantes encontrados em progênie derivadas do cruzamento F1 (L922 x L910). A sequência de gerações com a letra grifada se refere à geração onde o mutante de endosperma (e) ou de planta (p) se expressou pela primeira vez.

Progênie	¹ Gerações	Mutantes	Total	Porcentagem	²
L 43-307	F1-S1- <u>S2</u> -S3	albino (p)	52	25,0	NS

1. F1, S1, S2, S3 se referem, respectivamente, ao cruzamento das duas linhagens, progênie com uma, duas e três autofecundações.

2. NS. Não significativo para teste de χ^2 (Qui- quadrado) para hipótese de herança monofatorial.

Tabela 12. Número e porcentagem de mutantes encontrados em progênies derivadas do cruzamento F1 (SAL 16 x L910). A sequência de gerações com a letra grifada se refere à geração onde o mutante de endosperma (e) ou de planta (p) se expressou pela primeira vez.

Progênie	1		Total	Porcentagem	2
	Gerações	Mutantes			
L 31-234	F1-S1-S2	brachytic (p)	20	5,0	*
L 43-236	F1-S1-S2-#	tasseless (p)	9	33,3	NS
L 11-229	F1-S1-S2	tassel seed (p)	12	8,3	NS
L 08-228	F1-S1-S2-S3	thin endosperm (e)	390	21,8	NS

1. F1, S1, S2 e S3 se referem, respectivamente, ao cruzamento das duas linhagens, progênie com uma, duas e três autofecundações e # significa cruzamento entre plantas de uma progênie.

2. NS. Não significativo para teste de χ^2 (Qui-quadrado) para hipótese de herança monofatorial.

* significativo a nível de 5% no teste de χ^2 para herança monofatorial.

Tabela 13. Número e porcentagem de mutantes encontrados em progênies derivadas do cruzamento F1 (L910 x L902). A sequência de gerações com a letra grifada se refere à geração onde o mutante de endosperma (e) ou de planta (p) se expressou pela primeira vez.

Progênie	1		Total	Porcentagem	2
	Gerações	Mutantes			
L 72-77	F1-S1-S2-S3	brachytic (p)	11	100,0	NS
L 109-92	F1-S1-S2-OP	luteus (p)	65	6,1	*
L 72-78	F1-S1-S2-S3-S4	miniature opaque (e)	158	21,5	NS

1. F1, S1, S2, S3, S4 e OP se referem, respectivamente, ao cruzamento das duas linhagens, progênie com uma, duas, três e quatro autofecundações e progênie obtida com polinização aberta.

2. NS. Não significativo para teste de χ^2 (Qui-quadrado) para hipótese de herança monofatorial.

* significativo a nível de 5% no teste de χ^2 para herança monofatorial.

Tabela 14. Número e porcentagem de mutantes encontrados em progênies derivadas do cruzamento F1 (AST 86-4 x L903). A sequência de gerações com a letra grifada se refere à geração onde o mutante de endosperma (e) ou de planta (p) se expressou pela primeira vez.

		1			
Progênie	Gerações	Mutantes	Total	Porcentagem	
L 2-159	F1-S1-S2-S3	etched (e)	337	27,6	NS
L 5-160	F1-S1-S2-S3	etched (e)	298	10,7	*
L 23-161	F1-S1-S2-S3	etched (e)	391	7,7	*
L 5-160	F1-S1-S2-S3	floury (e)	267	23,6	NS

1. F1, S1, S2 e S3 se referem, respectivamente, ao cruzamento das duas linhagens, progênie com uma, duas e três autofecundações.

2. NS. Não significativo para teste de χ^2 (Qui-quadrado) para hipótese de herança monofatorial.

* significativo a nível de 5% no teste de χ^2 para herança monofatorial.

5.2 Ocorrência de mutantes em gerações avançadas dos cruzamentos das seis linhagens estudadas.

As tabelas 15 a 20 mostram os resultados obtidos para frequências dos vários tipos de mutantes observados nos cruzamentos envolvendo uma mesma linhagem. Isso é interessante para estimar o efeito específico de uma dada linhagem em promover alterações genéticas em gerações avançadas de autofecundação de seus cruzamentos com linhagens distintas. Na tabela 15, são mostradas as mutações envolvendo o cruzamento da linhagem L902 com as outras cinco linhagens estudadas. Das várias combinações obtidas com a participação da linhagem L902 nos cruzamentos dialélicos verifica-se que o mutante do tipo *miniature opaque*, ocorreu em três cruzamentos distintos enquanto que *tasseless* e o tipo *floury*, ocorreram em dois dos cinco cruzamentos possíveis. Os outros mutantes do tipo *brachytic*, *male sterile*, *striate*, *shrunken* e *vivipary*, ocorreram em apenas um cruzamento específico. Observa-se ainda, que a linhagem L902 produziu doze tipos de mutações nos vários tipos de cruzamentos que participou, sendo oito deles fenotipicamente diferentes.

Ainda na tabela 15, observa-se a superioridade do cruzamento L902 x SAL-16 em produzir 5 tipos de alterações genéticas. Por outro lado, o cruzamento das linhagens L902 x AST 86-4, produziu somente uma variante, a mutação *tasseless*, o mesmo ocorrendo com o mutante *miniature opaque* para o grupo L902 x L910.

Os mutantes selecionados dos cruzamentos em que a Linhagem L903 foi empregada como um dos tipos parentais, estão na tabela 16. Nota-se que ocorreu uma frequência média de mutações variando

entre zero e três. Em dois dos cruzamentos L903 x AST 86-4 e L903 x L910 não foi detectado nenhum mutante. O tipo *striate* foi o único encontrado em dois cruzamentos distintos.

Na tabela 17 estão indicados os tipos de mutantes originários da complementação entre a linhagem AST 86-4 com as demais linhagens escolhidas para o estudo. Aqui também se observou uma frequência média de alterações com um máximo de três no cruzamento de AST 86-4 x SAL-16. Os mutantes *tasseless* e o *etched* foram observados em dois grupos diferentes envolvendo a linhagem AST- 86-4.

De todas as combinações estudadas envolvendo a linhagem L922 (tabela 18), somente um grupo, o L922 x SAL-16, não expressou aparentemente potencialidades para gerar variantes genéticas. Nenhum dos grupos envolvendo a L922, entretanto, mostrou frequência expressiva de mutantes.

Já na tabela 19, envolvendo cruzamentos da linhagem SAL-16 observou-se uma alta taxa de mutações induzidas pela complementação dessa linhagem com as demais estudadas. A SAL-16 é uma das linhagens que mais contribuiu para gerar variabilidade genética principalmente quando combinada com a L902 e L910, produzindo 5 e 4 tipos de mutações distintas, respectivamente. Verifica-se também, que os mutantes de planta, *brachytic* e *tasseless*, ocorreram em 3 dos cinco cruzamentos possíveis. A linhagem SAL-16 produziu a maior frequência de mutantes, ou seja, quatorze tipos em cinco cruzamentos. Nove são de tipos distintos e sete desses estão distribuídos nos grupos SAL-16 x L902 e SAL-16 x L910. Essas linhagens ao se complementarem devem ter gerado condições propícias à ativação e expressão de agentes mutagênicos naturais responsáveis pelas mutações observadas.

A tabela 20, finalmente, resume as mutações encontradas quando a linhagem L910 é usada em cruzamentos com as cinco outras linhagens. A L910 gerou cerca de nove tipos de mutantes nos vários cruzamentos, sendo sete destes fenotipicamente distintos. Observa-se também que a maior frequência de mutações foi detectada na combinação entre a linhagem L910 e SAL-16. Interessante notar que o mutante *brachytic* foi encontrado em três dos cinco cruzamentos possíveis.

Da contribuição de cada uma das seis linhagens para produzir mutantes em gerações derivadas de seus cruzamentos pode-se concluir que as linhagens SAL-16 e L902 têm maior capacidade que as outras para gerar mutantes em suas progênies. O termo capacidade geral de combinação foi criado por Jenkins e Brunson (1932) para caracterizar linhagens ou progênies de milho que em cruzamentos com outras linhagens, ou progênies não aparentadas, produzem sempre famílias com alta heterose. Obviamente se uma linhagem em cruzamento com outras sempre produz progênies com alto vigor é ela a que mais contribui para produzir heterose. Comstock et al (1949) mostraram que esses genes são preponderantemente de efeitos aditivos. Tratamento corresponde queremos fazer no presente trabalho dizendo que são os genes ou fragmentos de DNA presentes nas linhagens SAL-16 e L902 é que são as principais responsáveis pela maior capacidade mutagênica dessas linhagens. Daí dizermos que as linhagens SAL-16 e L902 tem aparentemente a maior capacidade geral mutagênica das seis linhagens estudadas. A linhagem L902 parece ter o potencial para produzir na descendência mutantes do tipo *miniature opaque*, enquanto SAL-16 parece aumentar a probabilidade de ocorrência de mutantes do tipo *tasseless* e *brachytic* e a linhagem L910, o mutante do tipo *brachytic* na descendência. Além de L902 e SAL-16 terem um efeito aditivo para

produção de mutantes em suas descendências o cruzamento específico L902 x SAL-16 apresentou ainda o maior poder em gerar mutantes em gerações avançadas de autofecundação, seguido da SAL-16 x L910.

Tabela 15. Mutantes de plantas e de endosperma em gerações derivadas de cruzamentos envolvendo a linhagem L 902 e as cinco restantes.

Linhagem	Tipos de Mutantes	Linhagens				
		L903	AST86-4	L922	SAL16	L910
L902	Brachytic				x	
	Male Sterile			x		
	Striate				x	
	Tasseless		x		x	
	Floury	x			x	
	Miniature Opaque	x			x	x
	Shrunken	x				
	Vivipary			x		
Total		3	1	2	5	1

Tabela 16. Mutantes de plantas e de endosperma em gerações derivadas de cruzamentos envolvendo a linhagem L 903 e as cinco restantes.

Linhagem	Tipos de Mutantes	Linhagens				
		L902	AST86-4	L922	SAL16	L910
L903	Brachytic				x	
	Luteus			x		
	Striate			x	x	
	Floury	x				
	Miniature Opaque	x				
	Shrunken	x				
Total		3	0	2	2	0

Tabela 17. Mutantes de plantas e de endosperma em gerações derivadas de cruzamentos envolvendo a linhagem AST 86-4 e as cinco restantes.

Linhagem	Tipos de Mutantes	Linhagens				
		L902	L903	L922	SAL16	L910
AST 86-4	Brachytic					x
	Tasseless	x			x	
	Etched		x		x	
	Floury		x			
	Germless			x		
	Shriveled Kernel				x	
Total		1	2	1	3	1

Tabela 18. Mutantes de plantas e de endosperma em gerações derivadas de cruzamentos envolvendo a linhagem L 922 e as cinco restantes.

Linhagem	Tipos de Mutantes	Linhagens				
		L902	L903	AST86-4	SAL16	L910
L 922	Albino					x
	Male Sterile	x				
	Luteus		x			
	Striate		x			
	Germless			x		
	Vivipary	x				
Total		2	2	1	0	1

Tabela 19. Mutantes de plantas e de endosperma em gerações derivadas de cruzamentos envolvendo a linhagem SAL -16 e as cinco restantes.

Linhagem	Tipos de Mutantes	Linhagens				
		L902	L903	AST86-4	L922	L910
SAL 16	Brachytic	x	x			x
	Striate	x	x			
	Tasseless	x		x		x
	Tassel Seed					x
	Etched			x		
	Floury	x				
	Miniature Opaque	x				
	Shriveled Kernel			x		
	Thin Endosperm					x
Total		5	2	3	0	4

Tabela 20. Mutantes de plantas e de endosperma em gerações derivadas de cruzamentos envolvendo a linhagem L 910 e as cinco restantes.

Linhagem	Tipos de Mutantes	Linhagens				
		L902	L903	AST86-4	L922	SAL16
L910	Albino				x	
	Brachytic	x		x		x
	Luteus	x				
	Tasseless					x
	Tassel Seed					x
	Miniature Opaque	x				
	Thin Endosperm					x
Total		3	0	1	1	4

Uma outra forma de resumir os dados para permitir o estudo da interação entre linhagens e para produção de mutantes em seus cruzamentos encontra-se na tabela 21. Pode-se aqui observar também a superioridade das linhagens L902 e SAL-16, em gerar variabilidade genética produzindo cerca de quatorze tipos de mutações. Essas linhagens aparentemente carregam fatores genéticos ou fragmentos de DNA que em condições propícias isto é, em cruzamentos específicos se complementam de forma a induzir uma alta frequência de mutações em sua descendência. Entre as seis linhagens estudadas a linhagem L922 produziu cerca de seis mutações e aparentemente é aquela que tem a menor capacidade de induzir mutações. Observa-se também que os mutantes do tipo *brachytic* e *tasselless* ocorreram, respectivamente em 5 e 4 cruzamentos distintos dos 15 possíveis, sendo portanto os mais frequentes de todos os tipos analisados.

Tabela 21. Distribuição dos tipos de mutantes detectados nos diversos cruzamentos e a frequência de contribuição de cada linhagem para o surgimento dos mutantes apresentados.

Tipos de Mutantes	Cruzamentos distintos	Linhagens envolvidas					
		L902	L903	AST86-4	L922	SAL-16	L910
Albino	(p) 1				1		1
Brachytic	(p) 5	2	1	1		3	3
Luteus	(p) 2	1	1		1		1
Male Sterile	(p) 1	1			1		
Striate	(p) 3	1	2		1	2	
Tasseless	(p) 4	2		2		3	1
Tassel Seed	(p) 1					1	1
Etched	(e) 2		1	2		1	
Floury	(e) 3	2	2	1		1	
Germless	(e) 1			1	1		
Miniature opaque	(e) 3	3	1			1	1
Shriveled kernel	(e) 1			1		1	
Shrunken	(e) 1	1	1				
Thin endosperm	(e) 1					1	1
Vivipary	(e) 1	1			1		
Total		14	9	8	6	14	9

Como três das linhagens, L902, L903 e L922 são de endosperma flint, derivadas de Cateto e três, AST 86-4, SAL-16 e L910 são de endosperma dente provenientes da raça Tuxpeño, os dados foram também resumidos de outra forma para se verificar a contribuição do germoplasma em produzir variabilidade genética. A tabela 22 mostra a relação entre o mutante estudado e a raça das linhagens, monitorados pelo seu tipo de endosperma. A porcentagem média de mutantes obtida nos três grupos, foi de 2,3; 1,7; e 2,7 %, mostrando que a frequência de mutações obtidas em gerações derivadas dos vários híbridos parece ser independente do germoplasma das raças.

Tabela 22. Frequência dos mutantes encontrados nos grupos de cruzamentos envolvendo cruzamentos de linhagens flint e dente, caracterizando as raças Cateto e Tuxpeño, respectivamente.

Mutantes	Grupos		
	Flint x Flint	Flint x Dente	Dente x Dente
Albino		1	
Brachytic		3	2
Luteus	1	1	
Male Sterile	1		
Striate	1	2	
Tasseless		2	2
Tassel Seed			1
Etched		1	1
Floury	1	2	
Germless		1	
Miniature opaque	1	2	
Shriveled Kernel			1
Shrunken	1		
Thin endosperm			1
Vivipary	1		
Total	7	15	8
Média por grupo	2,3	1,7	2,7

5.3 Frequência de Mutação.

Para se detectar a ocorrência de mutações, seja espontânea ou induzida por agentes mutagênicos, tem-se que amostrar um grande número de progênies através da análise de plantas, sementes, grãos de pólen, células e etc. Isso é necessário para que a taxa de mutação possa ser medida com precisão. Outro ponto importante é que o loco onde se pretende estimar a taxa de mutação condicione características com alta herdabilidade, isto é, a presença do gene tem que ser monitorada com precisão pela expressão clara de seu fenótipo. Ilustrando esses pontos Stadler (1942) estudou a taxa de mutação no loco *Waxy* que condiciona a concentração de amilopectina no endosperma do milho. Analisou 1.503.744 sementes e não encontrou nenhum mutante *waxy* (*wx*) responsável pela produção de 100% de amilopectina na semente. Para obter 3 mutantes *shrunken* (*sh*), gene que produz um bloqueio parcial na síntese de amido, foi necessária a coleta e análise de 2.469.285 sementes. No primeiro caso, a taxa de mutação se refere à alteração do gene *Wx* responsável pela síntese de endosperma com amido comum que contém aproximadamente 75% de amilopectina e 25% de amilose, no alelo *wx* que produz sementes com apenas amilopectina. As sementes com o gene *Wx* são facilmente distinguidas das sementes homozigotas para o gene *wx*. As primeiras são brilhantes enquanto as segundas são opacas. No segundo exemplo, o *Shrunken* (*Sh*) também condiciona amido comum enquanto o *sh* em homozigose produz uma redução do teor de amido e um aumento de açúcares. As primeiras têm sementes comuns, cheias, enquanto as sementes mutantes apresentam depressões com redução clara no seu

volume.

Além da avaliação da frequência de mutação de características monofatoriais de alta herdabilidade, outros métodos tem sido usados em milho. Robertson (1978) por exemplo, trabalhou com o sistema 'Mutator' (*Mu*), que tem a propriedade de aumentar em 30 vezes a taxa de mutação espontânea e que surpreendentemente deixa de atuar após, aproximadamente, duas gerações ou mais de autofecundação. A evidência da presença de *Mu* tem sido obtida através do fenótipo de plântulas em progênie F₂ do cruzamento da linhagem contendo o fator *Mu* com linhagens comuns de milho. Mutantes tais como *albino*, *luteus*, *virescent*, *dwarf*, *narrow-leaf-white*, *small seeds*, *opaque seeds*, *shrunken seeds*, *tassel seeds*, *white stripe* entre outros têm sido encontrados mostrando que a taxa de mutação em plantas heterozigotas oscila ao redor de 6,9% sendo 34,5 vezes superior a taxa do controle.

Já em experimentos de cultura de tecidos a taxa de mutação conseguida tem sido estimada pela relação entre plantas expressando um ou mais tipos de mutantes e o total de plantas F₂ regeneradas a partir da cultura de embriões imaturos. A taxa de mutação relatada por diversos autores varia de 0,1 a 1,3 mutações entre as plantas regeneradas (Edallo et al, 1981; Mc Coy e Phillips, 1982; Prioli, 1987; Zehr et al, 1987; Lee e Phillips, 1987b).

No presente caso, houve a preocupação de se avaliar a frequência de alterações genotípicas mendelianas que poderiam surgir na descendência de quinze cruzamentos F₁ obtidos do dialélio de seis linhagens puras. Aqui não houve preocupação de se estimar a taxa de mutação em locos específicos mas sim de estudar a possibilidade da geração de variabilidade genética nova decorrente da complementação de genes resultantes do cruzamento de duas linhagens não aparentadas.

Para se ter um sistema que permitisse uma análise comparativa desses dados com observações que poderão ser coletadas no futuro, em cruzamentos de outras linhagens, usou-se uma metodologia onde a geração S² é usada como referência para estimativa da frequência de mutações registradas nas suas progênes obtidas por autofecundação. Os dados obtidos seguindo essa metodologia são mostrados na tabela 23. Observa-se que apesar do número de progênes S² em cada grupo ter sido reduzido (97 a 290) a frequência de progênes derivadas com pelo menos uma mutação nova variou de 8,8 a 60,6 com uma média de 21,6% indicando que a simples complementação de genes em cruzamentos de linhagens não aparentadas parece ser suficiente para produzir uma significativa quantidade de variação genética nova, que não pode ser atribuída aos mecanismos bem conhecidos de recombinação homóloga da meiose.

Tabela 23. Total de progênies S₂ estudadas e frequência daquelas que em progênies por autofecundação apresentaram pelo menos uma mutação mendeliana nova.

Grupos	Progênies S ₂	
	Total	Com alteração genética
	no.	%
L 902 x L 903	189	12,7
L 902 x AST 86-4	215	8,8
L 902 x L 922	227	11,5
L 902 x SAL-16	178	24,2
L 902 x L 910	290	12,8
L 903 x AST 86-4	126	14,3
L 903 x L 922	155	46,5
L 903 x SAL-16	113	33,6
L 903 x L 910	99	60,6
AST 86-4 x L 922	123	13,0
AST 86-4 x SAL-16	110	35,5
AST 86-4 x L 910	136	10,3
L 922 x SAL-16	146	15,1
L 922 x L 910	162	11,7
SAL-16 x L910	97	13,4
Média	157,7	21,6

5.4 Teste de Alelismo.

Os mutantes aqui descritos foram designados de acordo com sua semelhança com outros mutantes já estudados e descritos na literatura. Um próximo passo importante será o de determinar a localização desses genes nos cromossomos. Dentre os vários métodos disponíveis está o teste de alelismo do mutante desconhecido com aqueles conhecidos que produzem fenótipo idêntico. Uma demonstração dessa abordagem foi feita com o mutante *vivipary* que apareceu em geração avançada do cruzamento L902 x L922 e que tem fenótipo muito semelhante aos já relatados na literatura (Robertson, 1975). Seis estoques testadores contendo os genes *vivipary*, ou sejam, *vp2*, *vp5*, *vp9*, *al*, *w3* e *y9*, foram utilizados para o teste de alelismo. Progênes F₂ de cruzamentos entre tais estoques e uma linhagem contendo o gene *vp12* (Maluf, 1991) foram usadas em cruzamentos com o estoque L35, que carrega o gene *vivipary* desconhecido.

Como se trata de genes letais quando na condição homocigota recessiva, os genes *vp* são mantidos na população através dos indivíduos heterocigotos. Assim sendo os vários genes *vp* dos estoques para o teste de alelismo, bem como da linhagem L35, com o *vp* desconhecido segregam em progênes de indivíduos heterocigotos autofecundados. Cerca de 2/3 das plantas derivadas desses indivíduos segregarão *vp* em suas progênes uma vez que os homocigotos recessivos são letais e desaparecem no estágio de plântulas. Portanto progênes resultantes do teste de alelismo carregando o mesmo gene *vp* encontrado na linhagem L35 são esperadas apresentar $2/3 \times 2/3 = 4/9$ de espigas segregando sementes *vivipary*. Os resultados mostrados na

tabela 24 indicam que o gene *vp* desconhecido que surgiu da complementação de genes no cruzamento de L902 x L922 é o gene *vp9*, pois somente espigas oriundas desse cruzamento apresentaram segregação do mutante. O mutante *vp9*, caracteriza-se pelo acúmulo de precursores de carotenóide, o fitoeno, fitoflueno e ζ -caroteno, (Anderson e Robertson, 1963) e localiza-se no braço curto do cromossomo 7. Produz sementes com endosperma amarelo pálido e as plântulas são albinas ou verde claro (letais).

A progênie L35, como as outras que carregam os novos mutantes, foi autofecundada por mais uma geração para elevar o grau de endogamia na progênie visando a síntese de linhagens puras que segregam apenas no loco mutado. O padrão de segregação na autofecundação e no teste de alelismo é mostrado na tabela 25. Interessante notar que apesar de se saber que o mutante *vp9* mostra segregação monofatorial o teste de χ^2 indicou um desvio significativo a nível de 5% da proporção esperada de 25%. Esse desvio de segregação pode ser atribuído a alguma deficiência na expressividade do gene *Vp9* como foi notado por Robertson (1978) e Maluf (1991) em análises de segregação de genes *vp*. Desvios como esse ou causado por interações com outros genes podem muito bem ter ocorrido em proporções esperadas dos mutantes encontrados em segregações estudadas no presente trabalho.

Tabela 24. Teste de Alelismo. Número de espigas observadas e esperadas segregando fenótipo *vivipary*, em progênies resultantes do cruzamento de plantas portadoras do gene *vivipary* desconhecido com plantas portadoras dos sete genes vivíparos testadores.

Genes testadores	Total	Observadas	Esperadas*
<i>vp12</i>	25	0	0
<i>vp12</i> e <i>vp2</i>	13	0	0
<i>vp12</i> e <i>vp5</i>	30	0	0
<i>vp12</i> e <i>vp9</i>	24	12	11
<i>vp12</i> e <i>al</i>	14	0	0
<i>vp12</i> e <i>w3</i>	21	0	0
<i>vp12</i> e <i>y9</i>	18	0	0

* determinado com base na segregação observada

Tabela 25. Segregação observada para o loco *Vp9* na progênie L35 autofecundada, onde o mutante foi encontrado, e no cruzamento com o estoque de *vp9* do teste de alelismo.

Genótipo da progênie	Sementes	
	Total no.	Mutante %
S5 [S4 ⊗ -L35 <i>Vp9 vp9</i>]	5269	23,5 *
F1 [L35 <i>Vp9 vp9</i> x F2(L477 x L707E) <i>Vp9 vp9</i>]	2492	24,3 NS

* significativo a nível de 5% no teste de χ^2 para teste de herança monofatorial.

6. CONCLUSÕES.

1. A complementação do material genético em cruzamentos dialélicos de seis linhagens puras de milho foi capaz de produzir variabilidade genética nova em progênies desses cruzamentos derivadas por autofecundação.

2. As linhagens SAL-16 e a L902 apresentaram a maior capacidade geral mutagênica das seis linhagens envolvidas nos cruzamentos dialélicos.

3. Entre os quinze diferentes tipos de mutantes surgidos ao longo das gerações analisadas os mais frequentes foram os mutantes de planta denominados *brachytic* e *tasseless*.

4. O teste de alelismo realizado para o mutante *vivipary* mostrou que o gene responsável por essa característica é o gene *vp9*.

7. RESUMO.

A principal fonte de variabilidade genética natural em organismos superiores é consequência da recombinação homóloga do material genético na meiose. Nas últimas décadas, entretanto, outros mecanismos têm sido identificados com capacidade de promover variabilidade genética em plantas. Entre eles destacam-se os elementos de transposição, a ação de cromossomos *B* extranumerários, efeitos de *knobs* heterocromáticos e variação somaclonal.

Elementos responsáveis por tais mecanismos estão presentes nas células e devem exercer um importante papel na evolução. Na tentativa de demonstrar a presença de mecanismos com função semelhante, isto é, com capacidade de produzir variabilidade genética nova em indivíduos de uma população, estudou-se uma situação muito específica, ou seja, a presença desses elementos em populações derivadas do cruzamento de linhagens puras sabidamente estáveis ao longo de vários anos. Foram escolhidas para esse estudo seis linhas puras que em cruzamentos produzem híbridos F_1 's com alto vigor e conhecida estabilidade. Essas seis linhagens, foram cruzadas num esquema dialélico, produzindo quinze F_1 's que foram autofecundados por quatro gerações.

Nas progênes resultantes foram procurados mutantes de herança mendeliana que não podem ser explicados como resultantes de simples recombinação do material genético presente nos parentais envolvidos em cada cruzamento. Nessa categoria foram identificados vários mutantes de plantas e de sementes, tais como *albino e luteus, brachytic, male sterile, striate, tasseless, tassel*

seed, etched, floury, germless, miniature opaque, shriveled kernel, shrunken, thin endosperm e vitipary. Entre os quinze diferentes tipos de mutantes surgidos ao longo das gerações analisadas os mais frequentes foram os mutantes de planta denominados *brachytic* e *tasseless*.

As linhagens SAL-16 e a L902 apresentaram a maior capacidade geral mutagênica das seis linhagens envolvidas nos cruzamentos dialélicos.

Esse trabalho sugere a presença de elementos nas linhagens parentais que são ativados por ocasião dos cruzamentos. A complementação desses elementos é capaz de gerar variabilidade genética nova em populações.

B. ABSTRACT.

The natural genetic variability in higher organisms is mainly a consequence of the homologous recombination of genetic material during meiosis. In the past decade, however, other mechanisms capable to promote genetic variability have been identified in higher plants. Among those mechanisms, should be considered the action of the transposable elements, extranumerary *B* chromosomes, effects of heterochromatic knobs, and somaclonal variation.

The elements responsible for mechanisms capable to generate genetic variability are already present in the cells and may play an important role in plant evolution. The objective of this work was to demonstrate the existence of mechanisms with similar function, i.e., capable to produce new genetic variability in organisms of a population. The presence of those mechanisms was evaluated in populations derived from crosses between pure lines. This hypothesis was tested by using six inbred lines known to be stable for many years and that in crosses produce F_1 hybrids with high vigor and high stability. The six inbred lines were crossed in a diallel design producing fifteen F_1 hybrids that were selfcrossed to obtain fifteen families of selfed progenies.

The F_1 hybrid and S_1 - S_4 progenies had been evaluated only for Mendelian trait mutants that could not be explained as a product of genetic recombination in parental lines. Many mutants of plant and seed traits were identified, such as *albino* and *luteus seedlings*, *brachytic*, *male sterile*, *striate*, *tasseless*, *tassel*

seed, etched, floury, germless, miniature opaque, shriveled kernel, shrunken, thin endosperm and vivipary. A total of fifteen different mutants were observed among S²-S⁴ progenies of fifteen families. The *brachytic* and *tasseless* were the most frequent mutants observed among those families. The inbred lines designated SAL- 16 and L902 showed the higher general mutagenic capability of the six lines involved in the diallel crosses.

The results obtained in the present work suggest that elements capable to generate genetic variability are present in inbred lines and they are activated when the lines are crossed. Apparently, the complementation of those elements can promptly generate genetic variability in populations.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- AGUIAR-PERECIN, M.L.R. Estrutura dos cromossomos do milho. In: PATERNIANI, E., VIÉGAS, G.P. (Eds) Melhoramento e produção de milho. 2.ed. Campinas: Fundação Cargil, 1987. p. 81-108.
- ANDERSON, I.C., ROBERTSON, D.S. Chlorophyll and carotenoid contents of some pigment mutants in corn. Plant Physiol., 38:iii. 1963.
- ARMSTRONG, C.L., PHILLIPS, R.L. Genetic and cytogenetic variation in plants regenerated from organogenic and friable, embryogenic tissue cultures of maize. Crop Science, 28:363-369. 1988.
- BEBELI, P. J., KARP, A., KALTSIKES P.J. Somaclonal variation from cultured immature embryos of sister lines of rye differing in heterochromatic content. Genome, 33:177-183. 1990.
- BENZION, G., PHILLIPS, R. L. Cytogenetic stability of maize tissue cultures: a cell line pedigree analysis. Genome, 30:318-325. 1988.
- BENZION, G., PHILLIPS, R.L., RINES, H.W. Case histories of genetic variability *in vitro*: Oat and maize. In: VASIL, I.K. (ed). Plant Regeneration and Genetic Variability. New York: Academic Press, 1986.
- GEDAR, H. DNA methylation and gene activity. Cell, 53:3-4. 1988.
- CHANG, C.C., KIKUDOME, G.Y. The interaction of knobs and B chromosomes of maize in determining the level of recombination. Genetics, 77:45-54. 1974.
- CHENG, P.C., GREYSON, R.I., WALDEN, D.B. Organ initiation and the development of unisexual flowers in the tassel and ear of *Zea mays*. Am. J. Bot., 70:450-462. 1983

- CHUGHTAI, S.R., STEFFENSEN, D.M. Heterochromatic knob composition of commercial inbred lines of maize. Maydica, 32:171-187. 1987.
- COE Jr., E.H., NEUFFER, M.G., HOISINGTON, D.A. The genetics of corn. In: SPRAGUE, G.F., DUDLEY, J.W. (Eds). Corn and Corn Improvement. 3.ed. Madison: Am. Soc. Agron. 1988. p 81-258.
- COMSTOCK, R.E., ROBINSON, H.F., HARVEY, P.H. A breeding procedure designed to make maximum use of both general and specific combining ability. Agron. J., 41: 360-367. 1949.
- CORMACK, J.B., COX, D.F., PETERSON, P.A. Presence of the transposable element Uq in maize breeding material. Crop Science, 18:941-944. 1988.
- D'AMATO, F. Spontaneous mutations and somaclonal variation. In: Nuclear Techniques and In Vitro Culture for Plant Improvement. Proceedings of an International Symposium on Nuclear Techniques and In Vitro Culture for Plant Improvement. International Atomic Energy Agency. Vienna. 1986. p.3-9.
- DENNIS, E.S., PEACOCK, W.J. Knob heterochromatin homology in maize and its relatives. J. Mol. Evol., 20:341-350. 1984.
- DOERSCHUG, E.B. Studies of Dotted, a regulatory element in maize. Theor. Appl. Genet., 43:182-189. 1973.
- DÖRING, H.P. Tagging genes with maize transposable elements. An Overview. Maydica, 34:73-88. 1989.
- DÖRING, H.P., STARLINGER, P. Barbara McClintock's controlling elements: Now at the DNA level. Cell, 39:253-259. 1984.
- DÖRING, H.P., STARLINGER, P. Molecular Genetics of transposable elements in plants. Ann. Rev. Genet., 20:175-200. 1986.
- DÖRING, H.P., TILLMANN, E., STARLINGER, P. DNA sequence of the maize transposable element dissociation. Nature, 307:127-130. 1984.

- EDALLO, S., ZUCCHINALI, G., PERENZIN, M., SALAMINI, F. Chromosomal variation and frequency of spontaneous mutation associated with *in vitro* culture and plant regeneration in maize. Maydica, 26:39-56. 1981.
- EVANS, D.A. Somaclonal variation - genetic basis and breeding applications. Trends in Genetics, 5:46-50. 1989.
- FEDEROFF, N.V. Controlling elements in maize. In: SHAPIRO, J.A. (Ed.) Mobile Genetics Elements. New York: Academic Press. 1983. p.1-63.
- FEDEROFF, N.V. About maize transposable elements and development. Cell, 56:181-191. 1989.
- FEDEROFF, N.V., WESSLER, S., SHURE, M. Isolation of the transposable maize controlling elements Ac and Ds. Cell, 35:235-242. 1983.
- FINNEGAN, D.J. Eukaryotic transposable elements and genome evolution. Trends in Genetics, 5:103-107. 1989.
- FREELING, M., Plant transposable elements and insertion sequences. Ann. Rev. Plant Physiol., 35:277-298. 1984.
- GAUTHERET, R.J. Sur la possibilité de réaliser la culture indéfinie des tissus de turbeccules de carotte. C. R. Acad. Science, 208:118-120. 1939.
- GIERL, A., SAEDLER, H., PETERSON, P.A. Maize transposable elements. Ann. Rev. Genet., 23:71-85. 1989.
- GLOVER, D.V., MERTZ, E.T. Corn. In: Nutritional quality of cereal grains: Genetic and Agronomic Improvement. Madison. 1987. p.183-335.
- HOLLIDAY, R. The inheritance of epigenetic defects. Science, 238:163-170.
- IRISH, E.E., NELSON T. Sex determination in monoecious and dioecious plants. The Plant Cell, 1:737-744. 1989.
- JAMES, M.G., STADLER, J. Molecular characterization of mutator

- systems in maize embryogenic callus cultures indicates Mu elements activity in vitro. Theor. Appl. Genet., 77:383-393. 1989.
- JAUHAR, P.P., CRANE, C.F. Meiotic Behavior and effects of B chromosomes in *Tall fescue*. J. Heredity, 81:156-159. 1990.
- JENKINS, M.T., BRUNSON A.M. Methods of testing inbred lines of maize in crossbred combinations. J. Am. Soc. Agron., 24: 523-530. 1932.
- JOHNSON, S.S., PHILLIPS, R.L., RINES, H.W. Possible role of heterochromatin in chromosome breakage induced by tissue culture in oats (*Avena Sativa L.*). Genome, 29:439-446. 1987.
- JONES, K. Heterochromatin- Molecular and Structural aspects. Trends in Genetics, 5:62-63. 1989.
- JONES, R.N., REES, H. B Chromosomes. London: Academic Press. 1982.
- KAHLER, A.L., GARDNER, C.O., ALLARD, R.W. Nonrandom mating in experimental populations of maize. Crop Science, 24:350-354. 1984.
- KATO, Y.-T.A. Cytological studies of maize (*Zea mays L.*) and teosinte (*Zea mexicana Schrader kuntze*) in relation to their origin and evolution. In: Massachusetts Agricultural Experiment Station Bulletin. n. 635. University of Massachusetts, Amherst. 1976.
- KUNZ, B.A. Genetic effects of deoxyribonucleotide pool imbalance. Environ. Mutagen, 4:695-725. 1982.
- LAPITAN, N.L.V., SEARS, R.G., GILL, B.S. Translocation and other karyotypic structural changes in wheat x rye hybrids regenerated from tissue culture. Theor. Appl. Genet., 68:547-554. 1984.
- LARKIN, P.J., RYAN, S.A., BRETTELL, R.I.S., SCOWCROFT, W.R. Heritable somaclonal variation in wheat. Theor. Appl. Genet., 67:443-455. 1984.
- LARKIN, P.J., SCOWCROFT, W.R. Somaclonal variation- a novel source of variability from cell cultures for plants improvement. Theor.

- Appl. Genet., 60:197-214. 1981.
- LA RUE, C.D. Growth and regeneration of the endosperm of maize in culture. Am. J. Bot., 34:585-586. 1947.
- LA RUE, C.D. Culture of the endosperm of maize. Am. J. Bot., 36:798. 1949.
- LEE, M., GEADELMANN J.L., PHILLIPS, R.L. Agronomic evaluation of inbred lines derived from tissue cultures of maize. Theor. Appl. Genet., 75:841-849. 1988.
- LEE, M., PHILLIPS, R.L. Genomic rearrangements in maize induced by tissue culture. Genome, 29:122-128. 1987a.
- LEE, M., PHILLIPS, R.L. Genetics variants in progeny of regenerated maize plants. Genome, 29:834-838. 1987b.
- LEE, M., PHILLIPS, R.L. The chromosomal basis of somaclonal variation. Ann. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol., 39:413-437. 1988.
- LOEB, L.A., CHENG, K.C. Errors in DNA synthesis: A source of spontaneous mutations. Mutation Research, 238:297-304. 1990.
- LONGLEY, A.E. Supernumerary chromosomes in *Zea mays*. J. Agr. Res., 35:769-784. 1927.
- LOWE, J., NELSON Jr, O.E. Miniature seed- a study in the development of a defective caryopsis in maize. Genetics, 31:525-533. 1946.
- MALUF, M.P. Estudo de um mutante de carotenóide e vivíparo causado por transposon em Zea mays. Campinas: UNICAMP, 1991. p. 102. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas.
- McCLINTOCK, B. Chromosome morphology in *Zea mays*. Science, 69:629. 1929.
- McCLINTOCK, B. Chromosome organization and genic expression. Cold

- Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 16:43-47. 1951.
- McCLINTOCK, B. Mutations in maize and chromosomal aberrations in neurospora. Carnegie Inst. Washington Yearbook 53:254-260. 1954.
- McCLINTOCK, B. Trauma as a means of initiating change in genome organization and expression. In vitro, 19:283-284. 1983.
- McCLINTOCK, B. The significance of responses of the genome to challenge. Science, 226:792-804. 1984.
- McCLINTOCK, B., Kato Y., T.A., Blumenshein, A. Chromosome constitution of races of maize. Chapingo: Colégio de PostGraduados, Mexico. 1981.
- McCOY, T.J., PHILLIPS, R.L. Chromosome stability in maize (*Zea mays*) tissue cultures and sectoring in some regenerated plants. Can. J. Genet. Cytol., 24:559-565. 1982.
- McCOY, T.J., PHILLIPS, R.L., RINES, H.W. Cytogenetic analysis of plants regenerated from oat (*Avena sativa*) tissue cultures; high frequency of partial chromosome loss. Can. J. Genet. Cytol., 24:37-50. 1982.
- MEINS, F. Jr. Heritable variation in plant cell culture. Ann. Rev. Plant. Physiol., 34:327-346. 1983.
- MOLL, R.H., HANSON, W.D., LEVINGS III, C.S., Ohta, Y. Associations between chromosomal knobs of *Zea mays* L. and agronomic performance. Crop Science, 12:585-589. 1972.
- NEUFFER, M.G. Stability of the suppressor element in two mutator system at the *Az* locus in maize. Genetics, 53:541-549. 1966.
- NEUFFER, M.G., JONES, L., ZUBER, M.S. The mutants of maize. Madison: The Crop Science Society of America. 1968.
- NEUFFER, M.G., SHERIDAN, W.F. Defective kernel mutants of maize I. Genetic and lethality studies. Genetics, 95:929-944. 1980.
- NEVERS, P., SHEPHERD, N.S., SAEDLER, H. Plant transposable elements.

- Adv. Bot. Res.*, 12:102-203. 1986.
- ORTON, T.J. Experimental approaches to the study of somaclonal variation. *Plant Mol. Biol. Rep.*, 1:67-76. 1983.
- PATROSSO, M.C., POGNA, N.E., BERNARD, L., VIOTTI, A. Presence and cytological location of Mu transposable element in A and B chromosomes of maize. *Maydica*, 33:139-149. 1988.
- PEACOCK, W.J., DENNIS, E.S., RHOADES, M.M., PRYOR, A.J. Highly repeated DNA sequence limited to knob heterochromatin in maize. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 78:4490-4494. 1981.
- PEREIRA, A., SCHWARZ-SOMMER, Z., GIERL, A., BERTRAM, I., PETERSON, P.A., SAEDLER, H. Genetic and molecular analysis of the Enhancer (En) transposable element system of *Zea mays*. *Embo J.*, 4:17-23. 1985.
- PESCHKE, V.M., PHILLIPS, R.L., GENGENBACH, B.G. Discovery of transposable element activity among progeny of tissue culture-derived maize plants. *Science*, 238:804-807. 1987.
- PESCHKE, V.M., PHILLIPS, R.L., PRITCHARD, L. Activation of the Spm transposable element in a tissue-cultured-derived plant. *Maize Genetics Coop. Newsletter*, 63:103. 1989.
- PETERSON, P.A. A mutable pale green locus in maize. *Genetics*, 38:682-683. 1953.
- PHILLIPS, R.L., KAEPLER, S.M., PESCHKE, V.M. Do we understand somaclonal variation? In: NIJKAMP, H.J.J., VAN DER PLAS, L.H.W., VAN AARTRIJK, J. (Eds.) *Progress in Plant Cellular and Molecular Biology*. Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture. Kluwer Academic Publishers. 1990. p.131-144.
- POHMAN, R.F., FEDEROFF, N.V., MESSING, J. The nucleotide sequence of the maize controlling element activator. *Cell*, 37:635-643. 1984.

- PRIOLI, L.M. Cultura de tecidos e células, controle genético da embriogênese somática e variação somaclonal em milho (Zea mays L.) Campinas: UNICAMP, 1987. p.232 Tese (Doutorado em Ciências Biológicas)- Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas.
- PRYOR, A., FAULKNER, K., RHOADES, M.M., PEACOCK, W.J. Asynchronous replication of heterochromatin in maize. Proc. Natl. Acad. Sci., 77:6705-6709. 1980.
- RAMEL, C. The nature of spontaneous mutations. Mutation Research, 212:33-42. 1989.
- RANDOLPH, L.F. Types of supernumerary chromosomes in maize. Anat. Rec., 41:102. 1928.
- RANDOLPH, L.F. Genetics characteristics of the B chromosomes in maize. Genetics, 26:608-631. 1941.
- REDDY, L.V., PETERSON, P.A. Effect of age and genetic background on the *in vitro* maize endosperm callus initiation. Maydica, 32:151-161. 1987.
- RHOADES, M.M. The genetic control of mutability in maize. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 9:138-144. 1941.
- RHOADES, M.M. Genetic effects of heterochromatin in maize. In: WALDEN, D.B., JOHN WILEY and SONS (Eds.) Maize breeding and genetics. New York. p. 641-671. 1970.
- RHOADES, M.M., DEMPSEY, E. The effect of abnormal chromosome 10 on preferential segregation and crossing-over in maize. Genetics, 53:989-1020. 1966.
- RHOADES, M.M., DEMPSEY, E. On the mechanism of chromatin loss induced by the B chromosome of maize. Genetics, 71:73-96. 1972.
- RHOADES, M.M., DEMPSEY, E. Chromatin elimination induced by the B

- chromosome of maize. *J. of Heridity*, 64:12-18. 1973.
- RHODES, C.A., PHILLIPS, R.L., GREEN, G.E. Cytogenetic stability of aneuploid maize tissue cultures. *Can. J. Genet. Cytol.*, 28:374-384.. 1986.
- RIEGER, R., MICHAELIS, A., GREEN, M.M. *Glossary of genetics and cytogenetics*. Springer-Verlag. Berlin Heidelberg New York. 4 ed.
- ROBERTSON, D.S. Survey of the albino and white endosperm mutants of maize: their phenotypes and gene symbols. *J. Heridity*, 66:67-74. 1975.
- ROBERTSON, D.S. Characterization of mutator system in maize. *Mutation Research*, 51:21-28. 1978.
- ROBERTSON, D.S., STINARD, P. S. Genetic evidence of mutator-induced deletions in the short arm of chromosome 9 of maize. *Genetics*, 115:353-361. 1987.
- SAEDLER, H., NEVERS, P. Transposition in plants: A molecular model. *Embo J.*, 4:585-590. 1985.
- SARGENTINI, N.J., SMITH, K.G. Spontaneous mutagenesis: the role of DNA repair, replication and recombination. *Mutation Research*, 154:1-27. 1985.
- SCHIEFELFEIN, J.W., FURTEK, D.B., DOONER, H.K., NELSON, O.F.Jr. Two mutations in a maize bronze-1 allele caused by transposable elements of the Ac-Ds family alter the quantity and quality of the gene product. *Genetics*, 120:767-777. 1988.
- SCHMIDT, R.J., BURR, F.A., BURR, B. Transposon tagging and molecular analysis of the maize regulatory locus opaque-2. *Science*, 238:960-963. 1987.
- SCHWARTZ, D. Pattern of Ac transposition in maize. *Genetics*, 121:125-128. 1989.

- SCHWARZ-SOMMER, Z., GIERL, A., CUYPERS, H., PETERSON, P.A., SAEDLER, H. Plant transposable element generate the DNA sequence diversity needed in evolution. Embo J., 4:591-597. 1985.
- SHEPARD, J.F., BIDNEY, D., SHAHIN, E. Potato protoplasts in crop improvement. Science, 28:17-24. 1980.
- SHERIDAN, W.F. Maize developmental genetics : Genes of morphogenesis. Ann. Rev. Genet., 22:353-385. 1988.
- SKIRVIN, R.M., JANICK, J. Tissue culture- induced variation in scented *Pelargonium ssp.* J. Amer. Soc. Hort. Sci., 101:281-290. 1976.
- STADLER, L.J. Some observations on gene variability and spontaneous mutation. In: Spragg memorial lectures on plant breeding. 3. series. Michigan State College East Lansing. 1942.
- STAUB, R.W. Leaf striping correlated with the presence of B chromosomes in maize. The Journal of Heredity, 78:71-74. 1987.
- UMBECK, P.R., GENGENBACH, B.G. Reversion of male-sterile T-cytoplasm maize to male fertility in tissue culture. Crop Science, 23:584. 1983.
- VASIL, V., VASIL, I.K. Plant regeneration from friable embryogenic callus and cell suspension cultures of *Zea mays L.* J. Plant Physiol., 124:399-408. 1986.
- VIOTTI, A., PRIVITERA, E., SALA, E., POGNA, N. Distribution and clustering of two highly repeated sequences in the A and B chromosomes of maize. Theor. Appl. Genet., 70:234-239. 1985.
- WALBOT, V., CULLIS, C.A. Rapid genomic change in higher plants. Ann. Rev. Plant Physiol., 36:367-396. 1985.
- WARD, E.J. The effect of accessory chromatin on chiasma distribution in maize. Can. J. Genet. Cytol., 18:479-484. 1976.

- WARD, E.J. A postulated origin of the B chromosome. Maize Genetics Coop. Newsletter, 53:100-102. 1979.
- WESSLER, S.R. Phenotypic diversity mediated by the maize transposable elements Ac and Spm. Science, 242:399-405. 1988.
- WESSLER, S.R., BARAN, G., VARAGONA, M., DELLAPORTA, S.L. Excision of Ds produces waxy proteins with a range of enzymatic activities. Embo J., 5:2427-2432. 1986.
- WHITE, P.R. Potentially unlimited growth of excised plant callus in an artificial nutrient. Am. J. Bot., 26:59-64. 1939.
- WILKINSON, T.C., THOMPSON, S.A. Genotype, medium and genotype x medium effects on the establishment of regenerable maize callus. Maydica, 32:89-105. 1987.
- ZEHR, B.E., WILLIAMS, M.E., DUNCAN, D.R., WIDHOLM, L.M. Somaclonal variation in the progeny of plants regenerated from callus cultures of seven inbred lines of maize. Can. J. Bot., 65:491-499. 1987.