ANÁLISE CITOLÓGICA DE CALOS E PLANTAS REGENERADAS **IN VITRO**
DE VARIEDADES DE CANA-DE-AÇÚCAR (*Saccharum* spp)

MARIA BERNADETE SILVAROLLA
(Engenheiro Agrônomo)

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

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

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Setembro - 1989

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

Silvarolla, Maria Bernadete

S586a Análise citológica de calos e plantas regeneradas
"in vitro" de variedades de cana-de-açúcar(Saccharum
SPP). Piracicaba, 1989.
160p. ilustr.

Diss.(Mestre) - ESALQ
Bibliografia.

1. Cana-de-açúcar - Calo - Análise 2. Cana-de-açúcar - Citogenética 3. Cana-de-açúcar - Cultura de tecido 4. Cana-de-açúcar - Regeneração "in vitro" - Análise 5. Cana-de-açúcar - Variedade I. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba

CDD 633.61

ANÁLISE CITOLOGICA DE CALOS E PLANTAS REGENERADAS **IN VITRO**
DE VARIEDADES DE CANA-DE-AÇÚCAR (*Saccharum* spp.)

Maria Bernadete Silvarolla

Aprovada em: 12/03/90

Comissão Julgadora:

Profª Drª Margarida Lopes Rodrigues de Aguiar-Perecin ESALQ/USP

Prof. Dr. Antonio Natal Gonçalves ESALQ/USP

Prof. Dr. Rolf Dieter Illg UNICAMP

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

A minha querida família,

Com carinho

DEDICO

Ao Pesq. Científico Dr. Raphael Alvarez.

melhorista da cana-de-açúcar, que pela sua competência,
dedicação e entusiasmo constantes, será sempre
um exemplo.

MINHA HOMENAGEM

AGRADECIMENTOS

Meu reconhecimento às pessoas e às instituições que comigo colaboraram de modo a tornar possível a realização deste trabalho:

- À Profª Drª Margarida Lopes Rodrigues de Aguiar-Perecin, pela segura orientação e confiança em mim depositada.
- À Profª Beatriz Appezato da Glória pela inestimável ajuda no estudo histológico de calos e especialmente pela atenção que sempre me foi dispensada.
- Aos Pesquisadores Científicos da Seção de Genética do IAC Dr. Alcides Carvalho, Drª Marinez Muro Alves de Lima e Dr. Walter José Siqueira, pela paciente leitura de parte deste trabalho e valiosas sugestões oferecidas.
- À Engº Agrº Therezinha de Jesus Silveira pela amizade, incentivo e efetivo auxílio na condução da parte referente a cultura de tecidos.
- À Engº Agrº Anete Pereira de Souza pela amizade, sugestões e colaboração prestada.
- À Ana Lúcia Pires Cotias de Oliveira, Benedita Aparecida da Silva, Claudete de Fátima Ruas, Ingrid B.I. de Barros, Karla Avedikian, Maria Juliana U. Decico, Mônica Rosa Bertão, amigas em todos os momentos.
- À Bibliotecária Nilce Terezinha Puga pela revisão das citações da literatura.

- À minha família, pela compreensão de tantos momentos de ausência.
- Ao Engº Agrº José Carlos R. Macedo e Sr. Antonio Nunes de Mattos pelo atencioso e paciente atendimento na reprodução dos desenhos e fotografias, respectivamente, apresentados neste trabalho.
- Ao Sr. Jorge Luiz Diorio pelo excelente trabalho datilográfico e atencioso atendimento.
- Ao Instituto Agronômico de Campinas pela autorização concedida para a realização do mestrado.
- À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de mestrado.

*"Os céus proclamam a glória de Deus e o
firmamento anuncia as obras
das suas mãos".*

Salmo 19:1

ÍNDICE

Página

LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE FIGURAS	xii
RESUMO	xvi
SUMMARY	xx
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	5
2.1. Citogenética de Cana-de-açúcar	5
2.1.1. Caracterização citotaxonômica de es	
pécies do gênero <i>Saccharum</i>	5
2.1.2. Cruzamentos interespecíficos	11
2.1.3. Cromossomos somáticos de clones de	
cana-de-açúcar	16
2.1.4. Pré-tratamentos utilizando inibido-	
res de fuso e de síntese proteica	
para a determinação do número de	
cromossomos somáticos de cana-de-açú	
car	19
2.2. Cultura de tecidos	20
2.2.1. Variação somaclonal	20
2.2.1.1. Genótipo	23
2.2.1.2. Fonte de explantes	23
2.2.1.3. Condições de cultura	24
2.2.1.4. Duração da cultura	34
2.2.2. Bases genéticas da variação somaclo	
nal	34
2.3. Cultura de tecidos de cana-de-açúcar	36
2.3.1. Estudos histológicos em calos de ca	
na-de-açúcar	40

2.3.2. Variabilidade genética em cultura de tecidos de cana-de-açúcar	47
3. MATERIAL E MÉTODOS	54
3.1. Variedades doadoras de tecidos somáticos ..	54
3.1.1. Análise do número de cromossomos das variedades doadoras	55
3.1.2. Avaliação preliminar do número de núcleolos em variedades de cana-de-açúcar	58
3.2. Subclones de cultura de tecidos	61
3.2.1. Análise do número de cromossomos de subclones derivados de cultura de tecidos	63
3.3. Estudo histológico dos calos	66
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	69
4.1. Análise do número de cromossomos das variedades doadoras	69
4.1.1. Avaliação preliminar do número de núcleolos em variedades de cana-de-açúcar	91
4.2. Análise do número de cromossomos de subclones derivados de cultura de tecidos	96
4.3. Estudo histológico dos calos	114
4.3.1. Calos mantidos em presença de 2,4-D.	114
4.3.2. Calos em meio de regeneração (6-BA).	129
5. CONCLUSÕES	138
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	141

LISTA DE TABELAS

TABELA N°		Página
01	Pré-tratamentos utilizados no estudo de cromossomos somáticos de cana-de-açúcar	21
02	Identificação das variedades doadoras de tecidos somáticos utilizadas na cultura de tecidos	54
03	Subclones de cana-de-açúcar, provenientes da regeneração de calos, analisados citologicamente	64
04	Avaliação dos pré-tratamentos testados em pontas de raízes de cana-de-açúcar, variedade NA56-79	71
05	Avaliação dos pré-tratamentos testados para a variedade POJ2878	75
06	Avaliação dos pré-tratamentos testados para a variedade Co419	79
07	Avaliação dos pré-tratamentos testados para a variedade IAC68-12	82
08	Avaliação dos pré-tratamentos testados para a variedade IAC68-144	86
09	Avaliação dos pré-tratamentos testados para o subclone 94 (NA56-79)	97

TABELA Nº

Página

10	Avaliação dos pré-tratamentos testados para o subclone 250 (NA56-79)	97
11	Avaliação dos pré-tratamentos testados para o subclone 315 (NA56-79)	97
12	Avaliação dos pré-tratamentos testados para o subclone 600 (NA56-79)	98
13	Avaliação dos pré-tratamentos testados para o subclone 1325 (NA56-79)	99
14	Avaliação dos pré-tratamentos testados para o subclone 1518 (NA56-79)	99
15	Avaliação do pré-tratamento testado para o subclone 2050 (NA56-79)	99
16	Avaliação dos pré-tratamentos testados para o subclone 2071 (POJ2878)	103
17	Avaliação dos pré-tratamentos testados para o subclone 2060 (Co419)	104
18	Avaliação do pré-tratamento testado para o subclone 2061 (Co419)	105
19	Avaliação dos pré-tratamentos testados para o subclone 1062 (IAC68-12)	106
20	Avaliação dos pré-tratamentos testados para o subclone 1351 (IAC68-12)	106

TABELA Nº

Página

21	Avaliação dos pré-tratamentos testados para o subclone 1647 (IAC68-12)	107
22	Avaliação dos pré-tratamentos testados para o subclone 1214 (IAC68-144)	111

LISTA DE FIGURAS

FIGURA Nº		Página
01	Explantos utilizados para a indução de calos em cana-de-açúcar	62
02	Metáfase mitótica em ponta de raiz da variedade de cana-de-açúcar NA56-79 ..	72
03	Distribuições dos números de cromossomos somáticos determinados em raízes da variedade NA56-79 e sete subclones.	73
04	Metáfase mitótica em ponta de raiz da variedade POJ2878	76
05	Distribuições dos números de cromossomos somáticos determinados em raízes da variedade POJ2878 e um subclone ...	78
06	Metáfase mitótica em ponta de raiz da variedade Co419	80
07	Distribuições dos números de cromossomos somáticos determinados em raízes da variedade Co419 e dois subclones ..	81
08	Metáfase mitótica em ponta de raiz da variedade IAC68-12	83
09	Distribuições dos números de cromossomos somáticos determinados em raízes da variedade IAC68-12 e três subclones	84

FIGURA N°

Página

10	Metáfase mitótica em ponta de raiz da variedade IAC68-144	87
11	Distribuições dos números de cromossomos somáticos determinados em raízes da variedade IAC68-144 e um subclone ..	88
12	Metáfase mitótica da variedade NA56-79 com marcação de bandas NOR	92
13	Distribuição dos números de nucléolos determinados em núcleos interfásicos das variedades IAC68-144, NA56-79 e IAC68-12	94
14	Núcleos interfásicos de células de cana-de-açúcar mostrando nucléolos	95
15	Metáfase mitótica em ponta de raiz do subclone 600	101
16	Metáfases mitóticas do subclone 600 mostrando pequena instabilidade quanto ao número de cromossomos	102
17	Metáfase mitótica do subclone 1351	108
18	Metáfase mitótica do subclone 1647	109
19	Tipos celulares observados em calos de cana-de-açúcar cultivados em meio de cultura contendo 2,4-D	115

FIGURA Nº

Página

20	Esquema de corte histológico do explante folhas jovens, após 1 mês em meio de cultura contendo 2,4-D	117
21	Esquemas dos cortes histológicos do explante folhas jovens, após 3 e 6 meses em meio de cultura contendo 2,4-D	119
22	Esquemas dos cortes histológicos do explante folhas jovens, após 9 e 12 meses em meio de cultura contendo 2,4-D.....	121
23	Secção de um calo formado a partir do explante folhas jovens, após 1 mês em meio de cultura contendo 2,4-D	122
24	Esquemas dos cortes histológicos do explante submeristemático após 1 e 2,5 meses em meio de cultura contendo 2,-D.....	126
25	Esquemas dos cortes histológicos do explante submeristemático após 4 e 5 meses em meio de cultura contendo 2,4-D.....	127
26	Secção de um calo formado a partir do explante submeristemático, após 2,5 meses em meio de cultura contendo 2,4-D.....	128
27	Secção de um calo formado em meio de cultura contendo 6-BA apresentando a região periférica organizada	131

FIGURA Nº

Página

28	Secção de um calo formado em meio de cultura contendo 6-BA mostrando área contendo células com citoplasma rico em grânulos de amido	132
29	Secção de um calo formado em meio de cultura contendo 6-BA com células organizadas em estratos	133
30	Secções de calos formados em meio de cultura contendo 6-BA observando-se a presença de regiões com princípio de organização ..	134
31	Secção de um calo formado em meio de cultura contendo 6-BA mostrando em aumentos progressivos, regiões compostas por células arranjadas em estratos associadas a elementos traqueais	135

ANÁLISE CITOLÓGICA DE CALOS E PLANTAS REGENERADAS **IN VITRO**
DE VARIEDADES DE CANA-DE-AÇÚCAR (*Saccharum* spp)

Autora: Maria Bernadete Silvarolla

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

RESUMO

As variedades de cana-de-açúcar em cultivo, caracterizam-se por apresentarem cromossomos pequenos e em número elevado. Estas características dificultam a determinação segura do número de cromossomos das variedades, sendo comuns referências a mosaicismo cromossômico. Dessa maneira, torna-se necessário estabelecer metodologias específicas para a obtenção das preparações e critérios para sua avaliação, de modo a se distinguir a variação real daquela devida a erros de interpretação.

Neste estudo analisaram-se plantas regeneradas **in vitro** quanto ao número de cromossomos, comparativamente às respectivas variedades doadoras, que também foram avaliadas acerca de sua estabilidade cromossômica. Foram testadas metodologias para a obtenção de preparações onde os cromossomos metafásicos estivessem nítidos, dispersos e contidos em células intactas, baseadas na utilização de pré-tratamentos com inibidores do fuso mitótico e de síntese proteica, isolados ou combinados, bem como no emprego de macera-

ção enzimática. Além das distribuições de frequências de contagens dos números de cromossomos, foi estabelecido ainda, um critério para a seleção das metáfases segundo sua qualidade, de modo a se obter uma avaliação confiável do número de cromossomos.

Deste modo verificou-se que as variedades doadoras, POJ2878, NA56-79, Co419, IAC68-12 e IAC68-144, nas condições do presente estudo, não apresentaram mosaicismo cromossômico, tendo respectivamente, 118, 114, 113, 112 e 115 cromossomos.

Os subclones analisados citologicamente foram obtidos pela regeneração de calos obtidos a partir de dois tipos de explantes, cultivados por períodos variáveis, em meios de cultura sólidos contendo 2,4-D. Entre os quatorze subclones analisados quanto ao número de crosomos, treze apresentaram as maiores frequências de metáfases de melhor qualidade coincidentes com o número de cromossomos obtido por sua respectiva variedade doadora, não se detectando variação quanto ao parâmetro avaliado. Apenas um subclone, derivado da variedade NA56-79, aparentou ser portador de certa instabilidade cromossômica.

Os agentes de pré-tratamento testados para as doadoras e maioria dos subclones, somente se mostraram eficientes na obtenção de metáfases com cromossomos dispersos e nítidos, quando utilizados de forma a conjugar a ação do inibidor de síntese proteica, cicloheximida e um dos inibidores de fuso, 8-hidroxiquinolina ou 1-bromonaftaleno. Para a ob-

tenção de metáfases contidas em células intactas teve fundamental importância a maceração enzimática.

Na tentativa de se dispor de um marcador citológico auxiliar na identificação de variantes somaclonais foram testadas duas metodologias de bandamento NOR nas variedades NA56-79, IAC68-12 e IAC68-144. Verificou-se que, apesar de um dos métodos ter produzido bandas NOR, a qualidade das metáfases não foi satisfatória indicando a necessidade de adequações para se obter um padrão nítido de bandas NOR em cana-de-açúcar. Assim, foi possível somente a avaliação preliminar do número de nucleólos presentes em núcleos interfásicos, a qual indicou 1 a 9 nucleólos por célula.

Visando futuras análises citológicas na fase de calo, realizou-se o estudo histológico de calos de diferentes subculturas em presença de 2,4-D e também uma observação da fase de regeneração (6-BA).

No que se refere aos calos mantidos em 2,4-D verificou-se que a proliferação celular que resultou na formação dos calos ocorreu a nível dos feixes vasculares, compondo-se de células de aspecto meristemático com alto índice mitótico. Estas regiões situavam-se mais internamente no calo até aproximadamente 6 meses de cultura, sugerindo amostragens internas para a obtenção de maior número de divisões. Posteriormente, as regiões mais internas passaram a ser constituídas de células onde não se observaram divisões celulares, resul

tando então, numa inversão das regiões de coleta, que seriam mais externas, onde ocorreram células com aspecto meristemático e/ou parenquimático.

Quanto aos calos em meio de regeneração não foi possível definir claramente as regiões ideais de coleta nem ainda se a morfogênese se processava via organogênese ou embriogênese somática, embora os calos evidenciassem potencial morfogenético.

CYTOLOGICAL ANALYSIS OF CALLUS AND PLANTS REGENERATED *IN VITRO*
FROM SUGARCANE VARIETIES (*Saccharum* spp)

Author: Maria Bernadete Silvarolla

Adviser: Profa Drª Margarida L.R. de Aguiar Perecin

SUMMARY

Sugarcane varieties cultivated nowadays are characterized by presenting high number of small chromosomes. These characteristics difficult the consistent determination of chromosome number of the varieties and many cases of chromosome mosaicism have been reported in the literature. Therefore, it becomes necessary to establish proper methodologies for slides preparation and evaluation criteria to distinguish the real variation from those due to interpretation errors.

The present study aimed to analyse the chromosome number of plants regenerated *in vitro* comparatively to their respective donor varieties, that were also evaluated for their chromosomal stability. It was tested methods to obtain preparations with distinct, spread and intact metaphase figures, based on the use of pre-treatments with mitotic spindle and proteic synthesis inhibitors, isolately or combined, and on the use of enzymatic maceration. Beyond the distribution of counting frequencies of chromosome number, it was also

established a criterion to select the metaphases according to their quality, in order to obtain a secure evaluation of chromosome number.

In the present study conditions, the donor varieties POJ2878, NA56-79, Co419, IAC68-12 and IAC68-144, showed no chromosomal mosaicism comprising 118, 114, 113, 112 and 115 chromosomes, respectively.

The subclones cytologically evaluated were obtained by regeneration of calli that were induced and maintained during variable periods on solid medium in presence of 2,4-D. Among 14 subclones analysed for chromosome number, 13 showed the higher frequencies of metaphases of the best quality, coincident with the chromosome number verified for its respective donor variety, not presenting, therefore, variation on the evaluated parameter. Only one subclone, derived from NA56-79, showed some instability related to chromosome number.

To the donor and most of subclones, the pretreatments agents tried were efficient to obtain metaphases with disperse and distinct chromosomes when utilized conjugating the action of the inhibitor of proteic synthesis, cycloheximide and one of the spindle inhibitors, 8-hydroxiquinoline or 1-bromonaftalene. Enzymatic maceration was of fundamental importance to obtain intact metaphases figures.

It was also tested two methods of NOR banding with the varieties NA56-79, IAC68-12 and IAC68-144, as an

auxiliary cytological marker in the identification of somaclonal variants. In spite of one of the methods had produced NOR banding marks, it was verified that, the quality of the metaphases was not satisfactory, indicating a need for adaptations to obtain a clear pattern of NOR banding in sugarcane. So, it was only possible a preliminar evaluation of the number of nucleoli present in the interphasic nuclei, indicating the occurrence of 1 to 9 nucleoli per cell.

As an aid to the cytological analysis in the callus stage, a histological study of the calli in different subcultures in presence of 2,4-D was carried out, including an observation during the regeneration stage (6-BA), as well.

Regarding to the calli maintained in 2,4-D in was found that the cellular proliferation resulting in callus formation originated from the vascular bundles and was composed of meristematic-like cells, with high mitotic index. Those regions were located inside the callus mass until approximately 6 months of culture, suggesting that internal samples should be taken in order to obtain a major number of divisions. Later it was observed that the most inner regions were composed of cells where it was not observed cellular divisions resulting therefore in an inversion of the regions to be sampled, which should be more external where it was observed the presence of meristematic and/or parenchymatic-like cells.

With reference to calli on regeneration medium

it was not possible to define the ideal regions to collect samples in order to proceed a cytological analysis, nor define if the morphogenesis occurred via organogenesis of somatic embryogenesis, although the calli had showed morphogenetical potential.

1. INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar, gramínea valiosa por sua eficiente síntese, translocação e armazenamento de sacarose em grandes quantidades, é de cultivo tradicional no Brasil. Ao longo da história do país a intensidade de plantio dessa cultura estabeleceu ciclos de grande importância econômica. Atualmente sua influência está se fazendo sentir de modo acentuado, num enfoque energético dentro do Programa Nacional do Alcool (Prô-Alcool), iniciado na safra de 1976/77. Neste sentido, a importância da cultura pode ser avaliada pelo fato de que na safra de 87/88 o Estado de São Paulo produziu quase 46% (3,64 milhões de toneladas) da produção nacional de açúcar e 64% (7,33 bilhões de litros) da de álcool. Dos 4 milhões de hectares cultivados com cana-de-açúcar no Brasil, mais da metade está em São Paulo, sendo que da moagem total de 224 milhões de toneladas, o volume de cana moída no Estado foi de 123 milhões de toneladas, segundo o PROGNÓSTICO AGRÍCOLA 88/89. ?

O Instituto Agronômico de Campinas iniciou pio

neiramente no Estado de São Paulo as atividades de melhoramento da cana-de-açúcar, já em 1934, segundo AGUIRRE Jr. (1936). Desde então vem contribuindo significativamente com a cultura canavieira através da liberação de importantes variedades, tendo NUNES Jr. (1987) citado as seguintes: IAC48-65, IAC49-131, IAC50-134, IAC51-205, IAC52-150 (5ª em área plantada em São Paulo), IAC52-179, IAC52-326, IAC58-480 e IAC64-257, cujo plantio encontra-se em expansão e mais recentemente foram liberadas ainda, as variedades IAC68-12 e IAC68-144 (ALVAREZ et alii, 1981), em início de plantio.

Numa abordagem biotecnológica do programa de melhoramento de cana-de-açúcar do IAC, iniciou-se em 1982 um projeto visando a obtenção e o estudo de subclones originados da cultura de tecidos somáticos desta espécie. No momento, as atividades se concentram na avaliação das plantas regeneradas, em termos de sua utilidade para o melhoramento, assim como na avaliação da ocorrência da variação somaclonal e caracterização de sua natureza.

Contudo, para a realização de estudos básicos em cana-de-açúcar é necessário considerar que as variedades atualmente em cultivo apresentam particularidades importantes na constituição cromossômica de suas células somáticas, a saber: pequenos cromossomos em números elevados aliado à possibilidade de algumas delas apresentarem mosaicismos cromossômicos isto é, células com diferentes números de cromossomos.

Entretanto, o mosaicismos cromossômico pode in-

fluir de maneiras diferenciadas dependendo dos objetivos de estudo propostos. Assim, ao se utilizar da técnica de cultura de tecidos, com vistas à obtenção de variabilidade, em uma variedade de cana-de-açúcar portadora deste fenômeno, este poderia representar uma fonte adicional de variação, somando-se à possibilidade da ocorrência de variações durante a fase de calo.

Quando por outro lado, se pretende analisar regenerantes de cultura de tecidos sob o ponto de vista citogenético, principalmente quanto ao número de cromossomos somáticos, o mosaicismo em uma espécie de alto número de cromossomos pode dificultar tais investigações implicando na determinação de metodologias adequadas para a obtenção de preparações contendo metáfases somáticas nítidas. Tais metodologias visam em última análise, diferenciar variações reais de variações determinadas pela utilização de metodologias insuficientemente dominadas, aplicando-se tanto às investigações com as variedades doadoras quanto com os regenerantes.

Assim, boa parte das variedades de cana-de-açúcar cultivadas, especialmente as brasileiras, não têm sido objeto de estudos básicos tais como contagens do número somático de cromossomos ou estudos de cariótipo, devido ao elevado número de cromossomos. Do mesmo modo, estudos mais detalhados também não têm sido feitos como por exemplo, determinação do número de regiões organizadoras do nucléolo presentes no cariótipo ou ainda do número de nucléolos em núcleos interfá-

sicos. Considerando-se o aspecto das avaliações citogenéticas na fase de calo, as amostragens de regiões onde se processam as divisões celulares implicam em um conhecimento dos tipos celulares que o compõem bem como de sua disposição na massa do calo, ao longo das diversas subculturas.

Levando-se em conta as considerações anteriores e objetivando-se analisar aspectos da variabilidade induzida *in vitro*, do ponto de vista citogenético em cana-de-açúcar é que foram realizados, no presente trabalho, os seguintes estudos:

- . caracterização dos números de cromossomos somáticos das variedades utilizadas como doadoras de tecidos visando investigar sua estabilidade quanto ao número de cromossomos;

- . avaliação preliminar de metodologias para determinação do número de nucléolos presentes em núcleos interfásicos assim como de marcação de regiões organizadoras do nucléolo em cromossomos metafásicos;

- . estudo citológico de regenerantes de cultura de tecidos, comparativamente à suas variedades doadoras;

- . estudo histológico dos calos provenientes das fontes de explantes utilizadas para a cultura *in vitro*, induzidos e mantidos por períodos de tempo variáveis em presença de 2,4-D, assim como daqueles transferidos para meio de regeneração contendo 6-BA, visando orientar futuras amostragens na fase de calo de modo a permitir a coleta de regiões com maiores índices mitóticos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. CITOGENÉTICA DE CANA-DE-AÇÚCAR

2.1.1. Caracterização citotaxonômica de espécies do gênero *Saccharum*

A cana-de-açúcar pertence ao gênero *Saccharum*, tribo Andropogoneae, da subfamília Panicoideae, família Gramineae, veja ROACH & DANIELS (1987). A tribo Andropogoneae é caracteristicamente tropical, sendo abundante nas savanas tropicais do velho e novo mundo. HARTLEY (1958) identificou como regiões de alta concentração de gêneros desta tribo a Índia e a Indonésia.

A tribo Andropogoneae contém onze grupos de subtribos, sendo o grupo Saccharinae composto por dois agrupamentos naturais, denominados "Saccharastrae" e "Eulaliastrae", sinônimas de "Saccharininae" e "Eulaliininae", os quais não são unidades formais e cuja distinção é feita pelas inflorescências. O agrupamento "Eulaliastrae" é composto por nove

gêneros não relacionados com cana-de-açúcar e o agrupamento "Saccharastrae" compreende, além do gênero Saccharum, os seguintes: Imperata, Eriochrysis, Eccoilopus, Spodiopogon, Miscanthidium, Erianthus, Miscanthus, Sclerostachya e Narenga, veja em ROACH & DANIELS (1987).

Existe, ainda, uma outra designação não formal, comumente referida na literatura, o "complexo Saccharum", termo proposto por MUKHERJEE (1957) em revisão sobre a origem e distribuição de Saccharum. O autor demonstrou que os gêneros Saccharum, Erianthus seção Ripidium, Sclerostachya e Narenga formavam um grupo mais interrelacionado, envolvido na origem da cana-de-açúcar. Posteriormente, DANIELS et alii, 1975 incluíram no complexo Saccharum o gênero Miscanthus seção Diandra.

A origem e a evolução de S. officinarum são aspectos bastante complexos e cheios de controvérsias entre os autores, uma vez que estão, provavelmente, envolvidas em tal processo a hibridação entre as espécies selvagens S. spontaneum e S. robustum, assim como hibridações naturais com os gêneros envolvidos ou não no complexo Saccharum e ainda espécies desconhecidas ou extintas.

O centro de diversidade de Saccharum officinarum é, sem dúvida, a Nova Guiné, mas o centro de origem não está assim tão claro (ROACH & DANIELS, 1987), supondo-se que tenha se originado na região leste da Indonésia e Nova Guiné.

O gênero *Saccharum* incluiria, segundo STEVENSON (1965), as espécies *S. spontaneum* e *S. robustum* que, apesar de não conterem açúcar, foram usadas em cruzamentos com *S. officinarum*, produzindo as atuais variedades comerciais. *S. edule*, *S. sinense* e *S. barberi* também são incluídas no grupo das canas-de-açúcar. O mesmo autor concluiu, ainda, que todas as formas cultivadas de *Saccharum* são de origem híbrida, sendo as espécies selvagens *S. spontaneum* e *S. robustum* as únicas espécies botânicas verdadeiras.

GRASSL (1977) propôs que *S. sinense*, *S. barberi* e *S. edule* não fossem consideradas espécies distintas, já que suas origens híbridas foram comprovadas. Ainda o autor considera que o gênero *Saccharum* consiste de quatro espécies, ou seja, *S. officinarum* L., *S. spontaneum* L., *S. robustum* Brandes et Jeswiet ex Grassl e *S. sanguineum* (Grassl) Grassl, classificação esta pouco aceita.

SREENIVASAN et alii (1987) consideram o gênero *Saccharum* composto pelas seguintes espécies:

- *S. officinarum* L., a chamada "cana nobre" expressão usada por cientistas holandeses em Java, havendo concordância entre os autores de que o número cromossômico é $2n = 80$, geralmente formando 40 bivalentes na meiose. Apresenta as seguintes qualidades desejáveis: alto conteúdo de sacarose, baixo teor de fibra e amido e alta produtividade agrícola. Como aspecto indesejável pode-se citar a suscetibilidade

a moléstias. Estão incluídas aqui as primeiras variedades cultivadas nas ilhas do Pacífico, como Yellow Caledonia, Badila, Lahaina, Black Cheribon, Louisiana Purple e Louisiana Striped, assim como as da Índia, tais como Vellai, Poovan, Chittan, Karun e Kaludai Boothan.

- *S. sinense* Roxb. e *S. barberi* Jesw. eram cultivadas na Índia e na China, respectivamente, até o advento dos híbridos artificiais. Em conjunto apresentam alto teor de fibra, baixo a moderado conteúdo de sacarose, colmos de diâmetro fino e médio, baixa produtividade, grande tolerância a condições adversas, apresentando muitos clones tolerantes às principais moléstias. BREMER (1966) distinguiu cinco grupos em *S. barberi*, ou seja, Sunnabile ($2n = 82$ a 116); Mungo ($2n = 82$); Nargori ($2n = 107$ a 124) e Saretha ($2n = 90$ a 92). O grupo Pansahi ($2n = 118$) foi deixado como *S. sinen*se. Entre as variedades comerciais naturais mais conhecidas estão Uba e Tecka de *S. sinense* e Chunnee e Saretha de *S. barberi*.

- *S. robustum* Brandes et Jeswiet ex Grassl, é natural da Nova Guiné e ilhas adjacentes da Melanesia. Em seu habitat natural é extremamente vigorosa formando moitas compactas. Os colmos têm diâmetro maior próximo aos nós, são duros e com baixo conteúdo de sacarose, além de serem adaptadas às condições de alta umidade. Baseado na morfologia e nú

mero cromossômico Price*, citado por SREENIVASAN et alii (1987), reconheceu cinco grupos de *S. robustum*. grupo Port Moresby ($2n = 80$); grupo Goroka ($2n = 80$); grupo "red fleshed" ($2n = 60$); grupo Teba Salah ($2n = 60$) e grupo Wau-Bulolo ($2n = 60$).

- *S. spontaneum* L. De todas as espécies de *Saccharum* é a que apresenta a mais ampla distribuição ecogeográfica, ocorrendo desde o Japão e Indonésia até Índia e África. Seus ecotipos incluem tipos anuais, perenes, adaptados aos mais diversos ambientes. A variação morfológica também é muito ampla indo desde os tipos baixos, com folhas reduzidas praticamente à nervura e sem formação de cana, até tipos altos, eretos, de folhas largas e com internós longos. As variações quanto aos números somáticos também são muito amplas ocorrendo nesta espécie, segundo PANJE & BABU (1960), clones apresentando todos os números cromossômicos na faixa de $2n = 40$ a 128. Ainda os autores, simplificadamente, agruparam os clones existentes nos seguintes grupos citogeográficos naturais: setor central compreendendo a Índia, Nepal, Bangladesh e Ceilão incluindo clones cujos números cromossômicos vão desde $2n = 40$ até 80, setor oriental abrangendo Bur-

* PRICE, S. Cytology of *Saccharum robustum* and related sympatric species and natural hybrids. U.S. Dep. Agric. Res. Serv., Tech. Bull, 1337, 1965. 47p.

ma, China, Indo-China, Indonésia, Japão e Taiwan, contendo clones cujos números somáticos vão desde $2n = 80$ a 112 e o setor ocidental, compreendendo a região da África mediterrânea e Afeganistão, ocorrendo clones com números cromossômicos desde $2n = 104$ até 128.

ROACH & DANIELS (1987) comentam em sua revisão que há bastante concordância em que tanto o centro de origem, como o centro de diversidade de *S. spontaneum* ocorram na Índia. O clone comercial mais conhecido desta espécie é Glaghah.

No que se refere ao número básico de cromossomos de *Saccharum*, as opiniões dos autores divergem bastante, principalmente considerando-se que não foi encontrada, ainda, uma planta diplóide, segundo NISHIYAMA (1956).

BREMER (1961a) sugeriu que existiriam três números básicos, $x = 6, 8$ e 10, para espécies de *Saccharum*. RAGHAVAN (1961) sugeriu o número 5, DUTT & RAO (1933) o número 8 e JAGATHESAN (1971) os números 5, 6, 8 e 10. NISHIYAMA (1956) concluiu após analisar a homologia de cromossomos em vários híbridos, que para *Saccharum* existiriam dois números básicos 8 e 10, consistindo a poliploidia no gênero de múltiplos e combinação destes dois números básicos.

SREENIVASAN et alii (1987) concluíram este assunto, em sua revisão, colocando que parece ter havido uma evolução paralela de genomas e suas séries poliplóides nos diferentes grupos de *Saccharum*, sendo os números básicos $x = 8, 10$ e 12.

2.1.2. Cruzamentos interespecíficos

O interesse pelos cruzamentos interspecíficos em cana-de-açúcar existe há muito tempo. Já em 1893, Moquette e Wakker, da Estação de Midden Java, obtiveram híbridos do cruzamento da cana nobre *S. officinarum*, Black Cheribon com Kassoer, na época considerada *S. spontaneum*. Posteriormente, através de investigações morfológicas e citológicas esta última foi considerada como um híbrido espontâneo entre *S. officinarum* e *S. spontaneum*.

O cruzamento de *S. officinarum* com *S. spontaneum* e os retrocruzamentos para a primeira foram denominados pelos melhoristas holandeses de Java como "nobilização" de *S. spontaneum* por *S. officinarum*. Denominou-se o primeiro cruzamento de "primeira nobilização"; o primeiro retrocruzamento para *S. officinarum* (BC_1) de "segunda nobilização", e assim por diante.

Os estudos citológicos de BREMER (1961a,b, c, d; 1962, 1963) iniciados desde a década de 20, revelaram que o cruzamento onde *S. officinarum* era o progenitor feminino e *S. spontaneum* o masculino, produzia uma progênie tendo o complemento somático do parental feminino (80 cromossomos) mais o número gamético do masculino, ou seja, do tipo $2n+n$. O cruzamento recíproco, contudo, dava o número normal esperado ($n+n$). Este comportamento, segundo SIMMONDS (1979), implicaria em algum tipo de núcleo de restituição no lado feminino e tam

bém numa intensa seleção para os produtos da restituição.

O processo de formação de gametas $2n$ em cana-de-açúcar é controvertido e, embora se trate de fenômeno confirmado por vários autores (RAGHAVAN, 1954; PRICE, 1961), além do próprio BREMER (1961a), existem somente sugestões sobre os possíveis mecanismos responsáveis. As principais consequências da ocorrência da formação de gametas $2n$ em *S. officinarum* são o aumento do número de cromossomos e a aceleração na convergência fenotípica para o parental recorrente. Além disso, o fenômeno ocorre por duas gerações, na maioria das vezes (BREMER, 1961c), supondo-se que haja um limite para o aumento no número de cromossomos. Esta suposição é baseada no fato de que o mesmo autor observou, em progênies de BC_2 , algumas plantas que teriam tido transmissão $2n$ de *S. officinarum*, contudo tais plantas cresceram lentamente e eram pouco vigorosas.

Os estudos de BREMER (1961d) conduziram-no a determinar que a causa do aumento no número de cromossomos entre espécies híbridas de *Saccharum* era o fenômeno da endoreduplicação dos cromossomos nas células germinativas femininas. Constatou-se que a primeira divisão meiótica, divisão reducional, em células mãe do saco embrionário ocorria normalmente em todos os clones de *Saccharum* estudados. Após esta redução, poderiam ocorrer as seguintes alternativas:

- 1) O número cromossômico permanece reduzido nos

casos onde a primeira e segunda divisões meióticas são seguidas da passagem do megásporo chalazal da tétrade para um estado de latência;

2) O óvulo pode tornar-se estéril nos casos onde, além das três células mais externas, degenerar também a célula chalazal;

3) O número de cromossomos reduzidos se reduplica no núcleo chalazal da tétrade pela divisão de todos os cromossomos, restaurando o número diplóide;

4) Alguns cromossomos se reduplicam no núcleo chalazal, porém, não todos;

5) O número cromossômico reduzido pode ser restaurado ao número diplóide pela divisão de todos os cromossomos do núcleo mais interno da díade. Em tais casos, o núcleo chalazal da díade dá origem ao núcleo primário do saco embrionário, sem a segunda divisão meiótica;

6) Em poucos casos os cromossomos que se dividem no núcleo mais interno da díade podem se dividir novamente neste núcleo. Assim, o núcleo chalazal da díade torna-se tetraplóide e pode desenvolver-se em um núcleo primário tetraplóide do saco embrionário.

Um caso extremo relatado por BREMER (1961d), foi o da variedade POJ2875, onde ocorreram as seis possibilidades no desenvolvimento do saco embrionário.

Anteriormente, NARAYANASWAMI (1940) também estudou a formação dos gametas femininos em cana e detectou vá-

rias anormalidades durante a formação do saco embrionário. Este autor considerou que a formação dos gametas $2n$ seria resultante da fusão de dois núcleos dos megásporos mais internos, portanto, após a segunda divisão meiótica.

Contudo, estas hipóteses explicam somente a ocorrência de zigotos $2n + n$ resultantes do cruzamento de *S. officinarum* x *S. spontaneum*, ficando sem explicação a ocorrência de descendência $n + n$ nos cruzamentos de *S. officinarum* x *S. officinarum* e *S. officinarum* x *S. robustum*.

PRICE (1961) propôs então que *S. officinarum* produziria tanto oosferas haplóides como diplóides, mas aqui também permanece sem justificativa a não ocorrência de híbridos $n + n$ no cruzamento *S. officinarum* x *S. spontaneum*, assim como a falta de descendência $2n + n$ nos cruzamentos de *S. officinarum* x *S. officinarum* e *S. officinarum* x *S. robustum*. Duas possíveis explicações para isto seriam ou que as oosferas $2n$ e n seriam seletivamente fertilizadas (PRICE, 1961), ou ainda que a duplicação cromossômica na oosfera ocorreria por ocasião de sua fertilização pelo núcleo masculino de *S. spontaneum*.

Parthasarathy*, citado por ROACH (1968) levanta a hipótese de que os gametas reduzidos funcionariam quando o relacionamento genético ou familiar fosse próximo. Quando es

* PARTHASARATHY, N. The probable origin of North Indian sugarcane. J. Indian Bot. Soc., M.O.P. Iyengar Commem. Vol. 133.150, 1946.

te relacionamento fosse mais distante, a compatibilidade do cruzamento seria garantida pelo funcionamento dos gametas não reduzidos.

Em um enfoque genético BHAT & GILL (1985) chamaram a atenção para o significado do gameta $2n$ no processo de nobilização e, conseqüentemente, para o melhoramento em cana-de-açúcar. Desde modo, se o gameta $2n$ for resultante ou da endorreduplicação ou da fusão de dois núcleos depois da segunda divisão meiótica, eles são qualitativamente bem diferentes. Assim, no caso da endorreduplicação haveria recombinação normal durante a meiose e a subsequente duplicação resultaria em gametas 100% homozigotos. No segundo caso, o gameta $2n$ seria geneticamente equivalente aos produtos de SDR (second division restitution). Segundo os autores, admite-se que mais de 50% dos loci sejam homozigotos em gametas SDR, tendendo esta proporção a aumentar para genes situados próximo ao centrômero.

Por outro lado, há muito tempo foi notada a importância do gameta $2n$ em batata, tanto que Peloquin e seu grupo têm estudado sistematicamente sua origem, controle genético e implicações no melhoramento da transmissão deste tipo de gameta (MENDIBURU & PELOQUIN, 1977). Está bem definido que os gametas $2n$ em batata são geneticamente equivalentes aos produtos de restituição de primeira divisão (FDR) ou de segunda divisão (SDR), diferindo entre si na quantidade de heterozigosidade transmitida do parental à descendência.

Segundo BHAT & GILL (1985), para que em cana-de-açúcar se possa explorar convenientemente os gametas $2n$, em termos de melhoramento, há necessidade de novas investigações sobre a origem daqueles gametas, bem como de se determinar se os dois mecanismos de formação se excluem mutuamente.

2.1.3. Cromossomos somáticos de clones de cana-de-açúcar

As variedades de cana-de-açúcar atualmente cultivadas poderiam ser descritas como aneuplóides complexos, devido ao alto grau de ploidia e origem interespecífica de seus ancestrais. Os números cromossômicos dos materiais em cultivo variam de $2n = 100$ a 130 (SREENIVASAN et alii, 1987). Além disso, a literatura comumente se refere à cana-de-açúcar como sendo portadora de mosaicismo cromossômico. Este termo criado por FANKHAUSER (1945), refere-se à variação nos números cromossômicos em um mesmo indivíduo, resultantes de anormalidades no fuso, ou não disjunção cromossômica, sendo às vezes usado referindo-se a células somáticas ou germinativas.

Segundo D'AMATO (1978), o mosaicismo em cana seria expressão de instabilidade genética muitas vezes associada à hibridação. De um modo geral, a literatura de cana-de-açúcar refere-se a mosaicos cromossômicos em células em suspensão (LIU & SHIH, 1983); em plantas regeneradas de calos (KRISHNAMURTHI & TLASKAL, 1974) e em variedades comerciais estabelecidas, como a H50-7209 (HEINZ et alii, 1969).

Entretanto, como bem colocado por TLASKAL & HUTCHINSON (1973) para se demonstrar a instabilidade cromossômica em cana-de-açúcar há necessidade de precauções especiais, de modo a se obterem estimativas objetivas dos números cromossômicos, face ao grande número de pequenos cromossomos. Segundo os autores, seriam três as fontes de variabilidade em contagens de cromossomos de cana, a saber:

1 - O fato de que as células em exame podem não ter um complemento completo, ou seja, podem não estar intactas;

2 - Erros de interpretação devidos à sobreposição dos cromossomos;

3 - Ocorrência de mosaicos cromossômicos.

Deste modo, torna-se impossível demonstrar a última fonte de variabilidade se houver dúvida acerca das duas primeiras.

São poucos os estudos onde se analisou o cariótipo de cana-de-açúcar encontrando-se na literatura os trabalhos de JAGATHESAN & RATNAMBAL (1967, 1969). No primeiro, foram analisados os cariótipos de 16 clones de *S. officinarum* ($2n = 80$) e as diferenças foram avaliadas pela análise D^2 de Mahalanobis. As condições relativamente simétricas do cariótipo, de acordo com os autores, seriam devidas à falta de recombinação pela ausência de reprodução sexual. No trabalho de 1969, foram analisados 12 clones de *S. robustum* com números somáticos de 60 e 80 cromossomos. Todos os cromossomos do com

plemento eram metacêntricos, à semelhança dos cromossomos de *S. officinarum*.

Outro estudo do cariótipo foi o realizado por TLASKAL et alii (1971) com o clone Korpi, presumivelmente de *S. officinarum*, tendo os autores observado um par de cromossomos telocêntricos, dois pares subtelocêntricos e um par de metacêntricos grandes, destacando-se entre os cromossomos do complemento.

Com relação às variedades utilizadas nesta dissertação, foi feito um levantamento dos trabalhos onde se relata seu número somático. Para a variedade POJ2878 a literatura apresenta resultados de contagens variáveis. Assim, PRICE (1963) observou para esta variedade o número somático de 117 - 121 cromossomos; BREMER (1961b) 119; BARRETO & SIMON (1982) 117 - 124 e FERNANDEZ et alii (1978) obtiveram uma variação de 84 - 119.

A variedade Co419, originada do cruzamento de POJ2878 com Co290, apresenta $2n = 118$, de acordo com DUTT & RAO (1956). A variedade Co419 por sua vez originou por autofecundação a variedade NA56-79. Esta última mostrou-se bastante estável com relação ao número de cromossomos conforme estudos preliminares realizados por KUNIEDA et alii (1984) e aos quais se deu continuidade nesta dissertação. O número somático desta variedade foi de 114 cromossomos. Por outro lado, FERNANDEZ et alii (1978) obtiveram 90 - 122 cromossomos, o que caracterizou, segundo os autores, a ocorrência de mosaicismos cromossômicos para a variedade NA56-79.

2.1.4. Pré-tratamentos utilizando inibidores de fuso e de síntese proteica para a determinação do número de cromossomos somáticos de cana-de-açúcar

Devido ao grande número de pequenos cromossomos em cana-de-açúcar torna-se imprescindível a utilização de pré-tratamentos adequados para que se obtenham preparações onde os cromossomos somáticos se apresentem bem dispersos, com boa morfologia e contidos em células intactas.

Entre os agentes de pré-tratamento, os inibidores de fuso são comumente usados em trabalhos de citogenética e particularmente para cana-de-açúcar, a literatura registra o uso da colchicina, da 8-hidroxiquinolina e do 1-bromonaftaleno, conforme a Tabela 1. Seu princípio de ação, segundo SHARMA & SHARMA (1980), baseia-se na alteração da viscosidade do citoplasma que leva à destruição do mecanismo de formação do fuso, de modo a permitir que os cromossomos fiquem livres e passíveis de dispersão durante o processo de preparo da lâmina. Além disso, os agentes usados devem conferir aos cromossomos um grau de condensação adequado à manutenção de morfologia nítida, essencial à análise do material.

Outro agente de pré-tratamento utilizado no preparo de lâminas em citogenética é a cicloheximida, que inibe a síntese proteica em eucariotos, e cujos efeitos sobre mitoses foram registrados por WILSON (1950). TLASKAL (1980) ressalta que no caso específico da cana-de-açúcar a ciclohe-

ximida é um tratamento particularmente útil, pois provoca a contração dos cromossomos tanto em prófase como em metáfase, permitindo portanto, sua contagem também em prófase. Isto é vantajoso para espécies com grande número de cromossomos pois nesta fase o fuso ainda não está perfeitamente organizado, permitindo melhor dispersão dos cromossomos. Os pré-tratamentos mais utilizados em cana-de-açúcar encontram-se sumarizados na Tabela 1.

2.2. CULTURA DE TECIDOS

2.2.1. Variação somaclonal

Vêm se acumulando, na literatura, exemplos onde se relata que plantas regeneradas através de cultura de tecidos somáticos, não se mantiveram geneticamente uniformes. Para ilustrar esta constatação pode ser citado o trabalho de EVANS & SHARP (1986) que, em um levantamento de literatura de 1982 a 1984, encontraram cerca de 50 referências relativas à ocorrência de variações entre plantas regeneradas de cultura de tecidos somáticos, envolvendo as mais diversas espécies. Esta variação vem sendo denominada de "variação somaclonal", termo sugerido por LARKIN & SCOWCROFT (1981).

Tabela 1. Pré-tratamentos utilizados no estudo de cromossomos somáticos de cana-de-açúcar.

Agentes utilizados	Duração do tratamento (horas)	Temperatura (°C)	Órgão	Referência
Solução aquosa de colchicina 0,2% aerada	2 a 2,30	-	folhas jovens	PRICE (1962)
Solução saturada de α -bromonaftaleno	2	25	raízes	JAGATHESAN & RATNAMBAL (1967)
Solução saturada de α -bromonaftaleno em saponina 0,05%	3	8-10	raízes	SISODIA (1968)
Colchicina 1 g/l) e 8-hidroxiquinolina (280 mg/l)	3 1	-	raízes	TLASKAL et alii (1970)
Cicloheximida (70 mg/l) e 8-hidroxiquinolina (280 mg/l)	3 1	-	raízes	TLASKAL et alii (1970)
Mistura aerada de 8-hidroxiquinolina (250mg/l) e cicloheximida (70mg/l)	4,30	35 caindo até 18	raízes	TLASKAL et alii (1971) TLASKAL & HUTCHINSON (1974)
Colchicina 0,02%	5	5	raízes	FERNANDEZ et alii (1978)
Mistura de cicloheximida (70 ppm) e 8-hidroxiquinolina (250 ppm)	5	30 caindo até 24	raízes	TLASKAL (1980)
Colchicina 0,4%	3,30	25	gemas apicais	BARRETO & SIMON (1982)
Colchicina 0,1%	4	-	raízes	KUNIEDA et alii (1984)
Colchicina 0,02%	3 a 4	-	raízes	KINOJO et alii (1985)

Coincidentemente, os primeiros trabalhos onde se relata e avalia citologicamente as alterações surgidas em cultura de tecidos foram feitos em cana-de-açúcar (HEINZ & MEE, 1969, 1971). Outra espécie onde a seguir se constatou a ocorrência de variações foi em batata (SHEPARD et alii, 1980). Como bem colocado por EVANS & SHARP (1986) esses trabalhos originais sobre variação somaclonal foram feitos com duas culturas que não permitem uma análise genética convencional, detalhada. O fato de a cana-de-açúcar ser portadora de mosaicismo cromossômico, ou seja, presença simultânea de células com diferentes números cromossômicos aneuplóides e de células euplóides, de acordo com D'AMATO (1978) e altamente poliplóide e de a variedade de batata usada originalmente tratar-se de tetraplóide estéril levou, pelo menos inicialmente, a algumas suposições equivocadas. Um exemplo, seria de que os somaclones só seriam úteis em espécies de propagação assexual, uma vez que aqueles propagados sexualmente não tolerariam mudanças cromossômicas. Mas, nos anos seguintes, vários laboratórios estudaram a regeneração de plantas propagadas sexualmente e têm documentado a transmissão de características variantes para a progênie autofecundada (EVANS & SHARR, 1983; EARLE & GRACEN, 1985; ZEHR et alii, 1987).

EVANS & SHARP (1986) em sua revisão fazem referência a quatro condições que devem ser consideradas quando se procura variação somaclonal, a saber: genótipo, fonte de explante, condições e duração da cultura, uma vez que estes

fatores influenciam tanto a capacidade de regeneração de plantas como a frequência de variantes produzidos.

2.2.1.1. Genótipo

A influência do genótipo foi bem demonstrada em batata, onde grande número de variedades é utilizado em vários laboratórios. GUNN & SHEPARD (1981) obtiveram diferentes números de plantas regeneradas a partir de dois cultivares de batata, sob as mesmas condições de cultivo. Contudo, como discussão de MORRISH et alii (1987) o efeito aparente do genótipo, por exemplo, na capacidade de regeneração pode, na realidade, ser uma combinação de influências genotípicas e epigenotípicas, incluindo-se nesta última influências ambientais e ontogenéticas. Além disso, a literatura também sugere que plantas de diferentes genótipos apresentam diferentes frequências de variação somaclonal. Um exemplo bastante típico é o da cana-de-açúcar em que LIU & CHEN (1976) encontraram para a variedade F146 uma frequência de 1,8% de variantes morfológicas entre os regenerantes, enquanto que para a variedade F156, esta frequência foi de 34,0%.

2.2.1.2. Fonte de explantes

Parece bem firmada a idéia de que a variação somaclonal pode resultar tanto da variação genética intrínseca

ca ao explante, e que se expressaria nas plantas regeneradas, como da variação induzida pelo próprio processo de cultura de tecido, de onde se pode deduzir a importância da variável fonte de explantes.

De acordo com CONSTANTIN (1981) as variações genéticas intrínsecas ao explante podem ser justificadas pelo fenômeno do polissomatismo, ou seja, a ocorrência de células poliplóides intercaladas às diplóides em tecidos somáticos. As células somáticas diplóides podem se poliploidizar, por exemplo, por endoreduplicação; fusão de fusos; c-mitoses e endomitoses. Assim, quando os explantes são inoculados *in vitro*, as mitoses iniciais refletiriam a distribuição das células de várias ploidias presentes nos tecidos *in vivo*, até que determinada classe de células passe a predominar quando favorecida por condições ambientais e/ou nutricionais.

Em gerânio (*Pelargonium* spp), SKIRVIN & JANICK (1976) compararam plantas originadas da produção de mudas *in vivo* a partir de caule, raízes e pecíolos. As plantas obtidas do caule, método de propagação usual, foram uniformes, enquanto que as plantas originadas a partir de raízes e pecíolos foram variáveis. Similarmente, as plantas regeneradas de calos também foram variáveis.

2.2.1.3. Condições de cultura

Dos pontos a se considerar na busca da varia-

ção somaclonal, o aspecto relativo às condições de cultura é certamente o mais complexo à medida que essas condições envolvem múltiplas variáveis que, além de seus efeitos individuais, interagem entre si. Assim sendo, entre estas variáveis, seguramente, a composição do meio de cultura é fator altamente significativo, e entre seus componentes merecem especial atenção os reguladores de crescimento exógenos, uma vez que são imprescindíveis na iniciação e manutenção das culturas de tecidos de plantas (SINGH & HARVEY, 1975a).

Entre toda a gama de auxinas ativas na indução de calos, o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) é certamente o agente sintético mais comumente utilizado, uma vez que atua como análogo de auxina. A esse regulador maior atenção será dedicada nesta revisão.

WAREING & PHILLIPS (1981) analisam o mecanismo de ação dos hormônios vegetais em plantas intactas, enfocando-o sob o aspecto do crescimento celular e da divisão celular. No primeiro caso, parece bem estabelecido que as auxinas e outros hormônios, podem causar mudanças nas propriedades mecânicas da parede celular vegetal, ou seja, aumentam a plasticidade das paredes celulares, existindo, contudo, muitas dúvidas quanto à cinética desta ação. Quanto à divisão celular, ainda segundo os autores, os estudos iniciais, por sinal realizados em culturas assépticas de medula de fumo, sugeriram que uma auxina poderia estimular a síntese de DNA, mas que esta não seria, necessariamente, seguida pela mitose ou

citocinese, as quais seriam reguladas pelas citocininas. Contudo, desconhece-se ainda os mecanismos pelos quais uma auxina pode estimular a síntese de DNA, embora haja evidências de que a atividade da DNA polimerase possa ser regulada pelas auxinas.

LIAO & HAMILTON (1966) estudaram a localização do 2,4-D fornecida exogenamente na forma de 2,4-D-C¹⁴ a raízes de *Allium cernuum* e *Vicia faba*, por meio de técnicas autorradiográficas, constatando que essa substância se localizava no citoplasma e núcleo de algumas células meristemáticas das raízes. As marcações foram avaliadas ao longo do tempo, decrescendo no citoplasma até não mais serem observadas nas preparações após 120 horas. Contudo, as marcações nucleares puderam ser observadas em todos os intervalos depois da remoção do 2,4-D-C¹⁴. Também em células em mitose as marcações nucleares estavam localizadas nos cromossomos, não se podendo precisar se ligadas a RNA, DNA, a proteínas histônicas ou não histônicas.

Nota-se, portanto, que, mesmo quando se trata de plantas intactas, o conhecimento dos mecanismos e modos de ação das auxinas está ainda incompleto. Esse quadro se agrava mais quando se considera os sistemas de cultura de tecidos, uma vez que são pouco entendidos os mecanismos bioquímicos básicos pelos quais tanto auxinas como citocininas alteram as respostas de crescimento e organização em culturas.

De acordo com CARUSO (1987) o conhecimento sobre o relacionamento entre formas livres e conjugadas de ácido indol-3-acético (IAA) está um pouco mais esclarecido em virtude de haver mais trabalhos com o mesmo, o que não ocorre com os demais fitorreguladores.

Segundo BAYLISS (1980), supõe-se que o 2,4-D seja o principal responsável por atuar na frequência de aberrações mitóticas em culturas de tecidos, tendo sido seus efeitos analisados em várias espécies.

Em trabalho de SINGH & HARVEY (1975a) verifica-se que o 2,4-D não induziu irregularidades mitóticas em suspensões celulares de *Vicia hajastana*, nas concentrações de 0,1 a 10 µg/ml, e de *Haplopappus gracilis*, nas concentrações de 0,1 a 5,0 µg/ml. Na realidade, ocorreu menor frequência de irregularidades mitóticas quanto maior a concentração de 2,4-D no meio, sendo esta conclusão obtida através da análise de anáfases. Em outro trabalho, SINGH & HARVEY (1975b) relataram, para as mesmas espécies, que a frequência de células poliploides esteve negativamente correlacionada com as concentrações de 2,4-D do meio.

Em estudo com *Vicia hajastana*, SINGH et alii (1972) estabeleceram culturas em suspensão, a partir de tecidos de sementes maduras, em meio B₅ acrescido de 1,0 ppm de 2,4-D (4,5 µM). Inicialmente, verificaram que as culturas apresentavam 32,2% de células diplóides e 37,3% de células hiperdiploides, aos 31 dias de cultura. Quando porém, a cultura foi

avaliada após 295 dias encontraram 91,7% de células diplóides, concluindo que houve uma forte seleção favorecendo as células diplóides, embora sem levantar uma hipótese explicativa para tal constatação.

BAYLISS (1973) relatou aumentos na frequência de segregações multipolares na anáfase, cromossomos atrasados e pontes em suspensões celulares de cenoura, as quais eram predominantemente diplóides, em presença de 0,1 mg/l de 2,4-D (0,45 μ M). Foi observado, ainda, que a indução de diferenciação na cultura teve a tendência de reduzir a incidência das anormalidades mitóticas, passando para um nível semelhante ao encontrado em meristemas radiculares, embora não se pudessem separar os efeitos do aumento de organização causado pela embriogênese daqueles causados pela ausência do 2,4-D.

Ainda, BAYLISS (1980), relata que utilizou culturas de células hipotetraplóides auto-suficientes, ou seja, que poderiam continuar mantendo-se indiferenciadas na ausência de 2,4-D, na tentativa de separar os efeitos mencionados anteriormente. Assim, neste caso, a omissão do 2,4-D do meio não provocou a redução da frequência de configurações multipolares, concluindo que a regularidade da mitose seria determinada muito mais pelo grau de organização do tecido do que pela presença do 2,4-D em si. Em outras palavras, seria o crescimento desorganizado que levaria a anormalidades mitóticas e não qualquer efeito direto do 2,4-D sobre a mitose que induziria anormalidades mitóticas.

O trabalho de NAGL et alii (1985) com suspensões celulares de *Nicotiana* e *Crepis* demonstrou que a composição de reguladores de crescimento do meio de cultura exerceu significativo efeito sobre o conteúdo de DNA dos núcleos celulares. Neste trabalho foram testados vários níveis de IAA, 2,4-D e cinetina ou ácido giberélico (GA_3) e cinetina. Segundo os autores, os fitorreguladores influenciariam o conteúdo de DNA de duas maneiras prováveis: na replicação diferencial do DNA e na produção de mudanças no cariótipo.

Fato interessante demonstrado por ZWAR & BROWN (1968) foi o aspecto da localização do 2,4-D em culturas de tecidos de alcachofra. Utilizando-se de 2,4-D marcado com C^{14} observaram que o produto acumulou-se no nucléolo de células passíveis de divisão, levantando a hipótese de que existiria um inibidor no núcleo, associado aos nucléolos, que seria removido pelos fitorreguladores, ficando a célula livre para entrar em divisão, originando o calo.

Segundo BAYLISS (1985) existem indicações de que a duração total do ciclo celular em cultura seria prolongada, principalmente pela extensão de G_1 , residindo aí o principal ponto de controle, que seria especificamente modulado por auxinas e citocininas. Em cenoura BAYLISS (1975) observou que suspensões celulares mantidas em presença de 2,4-D tiveram a duração total do ciclo celular aumentada, devido quase que totalmente a mudanças na duração de G_1 .

DEAMBROGIO & DALE (1980) associaram o aumen-

to da variabilidade genética entre plantas regeneradas de *Hordeum* com as altas concentrações de 2,4-D no meio de cultura. As culturas de embriões imaturos de *Hordeum* foram expostas a 4,5-18,0 μM de 2,4-D (ou 1 a 4 mg/l) pelo período de 4 a 56 dias. A variação genética foi detectada pelo exame da progênie das plantas regeneradas. As variações ocorreram somente na concentração de 18,0 μM de 2,4-D para características como albinismo e forma de folha. O número de cromossomos permaneceu inalterado.

Outros exemplos na literatura reforçam a idéia de que os fitorreguladores e, em particular o 2,4-D, teriam participação ativa na indução de variabilidade. SHEPARD (1981) relatou que o uso do 2,4-D em lugar do ácido 1-naftalenoacético (NAA) no meio de cultura aumentou a frequência de plantas anormais em batata.

Em culturas de calos de *Haworthia* mantidas em meio NK, contendo 26,8 μM de NAA e 0,46 μM de cinetina e no meio I, contendo 0,57 μM de IAA, constatou-se que o meio NK tendia a regenerar mais plantas tetraplóides e menos plantas portadoras de translocações que o meio I (OGIHARA, 1981).

Outro ponto a ser considerado é a interação genótipo-tratamento hormonal demonstrada por NUTTI-RONCHI et alii (1976). Dois genótipos de *Nicotiana* spp foram submetidos ao 2,4-D (0,4 ppm ou 1,81 μM) e observou-se a frequência de indução de aberrações cromossômicas. Verificou-se uma interação altamente significativa para o componente genótipo - tratamen

to , em todos os parâmetros analisados, ou seja, porcentagem de anáfases aberrantes, frequência de aberrações cromatídicas e cromossômicas na anáfase.

A ação mutagênica do 2,4-D em pontas de raízes foi avaliada por MOHANDAS & GRANT (1972) através da análise citogenética em 12 espécies vegetais tratadas com aquele agente. Entre as anormalidades observadas constaram-se pontes cromossômicas, fragmentos, cromossomos atrasados e regiões condensadas de cromatina além de contração cromossômica e c-mitoses. Neste caso, as concentrações de produto utilizadas foram de 50 e 100 ppm (226,2 e 452,5 μ M).

Entre os trabalhos citados envolvendo cultura *in vitro* alguns relatam que o 2,4-D não induziu irregularidades mitóticas, ocorrendo inclusive menor frequência delas quanto maior a concentração de 2,4-D no meio de cultura (SINGH & HARVEY, 1975a). Os mesmos autores reconhecem que se torna difícil explicar a discrepância entre os sistemas *in vivo* e *in vitro*. Por outro lado, consideram que são muitas as diferenças entre eles, como por exemplo, o balanço hormonal, que talvez diminua a validade das comparações entre os dois sistemas. Outro ponto a considerar é a grande diferença de concentração da auxina utilizada, ou seja, em pontas de raízes as concentrações foram muito maiores que as utilizadas em culturas (SINGH & HARVEY, 1975a).

Por outro lado, as referências da literatura sobre a ação mutagênica do 2,4-D *in vitro* são muito contraditórias.

rias e heterogêneas, não permitindo comparações corretas, uma vez que se encontram em jogo outras variáveis, além do elemento em foco, como por exemplo o meio de cultura utilizado, condições de crescimento da cultura, tais como luminosidade, aeração e temperatura, entre outras. As poucas variáveis citadas como exemplo nem sempre têm sua ação definida e conhecida e, muito menos as interações entre si e com o genótipo em cultura. Deste modo, não se pode ainda definir o 2,4-D como um indutor de variações *in vitro* de um modo geral, uma vez que cada sistema de cultura representa um caso particular, por sinal muito complexo e pouco elucidado, que pode reagir de diferentes maneiras. Deve ser lembrado, ainda, que as variações *in vitro* podem ter diversas causas, desde as mais evidentes como alterações cromossômicas numéricas até as sutis como mutações do DNA mitocondrial e cloroplastidial, como serão vistas mais adiante, exigindo, portanto, diferentes metodologias de avaliação.

Outros componentes do meio de cultura além dos fitorreguladores, tais como hidrolizado de caseína e extrato de levedura também foram analisados quanto aos seus efeitos sobre a composição cariotípica de calos de *Haplopappus gracilis*, mantidos em meio de cultura B₅ contendo 1ppm de 2,4-D ou 4,5 μ M (SINGH, 1976). Neste estudo, demonstrou-se que o hidrolizado de caseína não teve efeito significativo na composição cariotípica, enquanto a cinetina e o extrato de levedura conduziram a poliploidia, provavelmente, devido a endoreduplicação. Tam-

bém, as populações celulares mantidas em meio de cultura B₅ com cinetina e extrato de levedura tiveram maior frequência de células aneuplóides que as mantidas em meio de cultura B₅ ou B₅ com hidrolizado de caseína. A análise morfológica dos cromossomos indicou maior frequência de fragmentos no meio de cultura B₅+extrato de levedura + cinetina, do que nos demais, ou seja, B₅; B₅ + cinetina; B₅ + hidrolizado de caseína; B₅ + hidrolizado de caseína + cinetina ou B₅ + extrato de levedura.

Também TORREY (1958) relatou a predominância de mitoses tetraplóides em meio de cultura contendo auxina e extrato de levedura em culturas de calos de raízes de ervilha, as quais naturalmente contêm células diplóides e poliplóides. Entretanto, em meio de cultura contendo 2,4-D, mas onde o extrato de levedura foi substituído por mistura de vitaminas e fontes de nitrogênio orgânico, somente foram encontradas mitoses diplóides.

Outro componente, às vezes utilizado em meios de cultura como antioxidante, mas sem uma completa análise de seus efeitos secundários é o carvão ativado. FRIDBORG & ERIKSON (1975) e FRIDBORG et alii (1978) concluíram que além de remover substâncias como ácido fenilacético e ácido p-OH-benzóico (cenoura); ácido 2,6-OH-benzóico (*Allium*) e ácidos benzóico, pelargônico e caprílico (*Haplopappus*) do meio de cultura, o carvão ativado poderia remover também as auxinas do meio de cultura.

2.2.1.4. Duração da cultura

Embora haja indicações de que a estabilidade cromossômica possa ser alcançada em culturas prolongadas de células (EVANS & GAMBORG, 1982), também é amplamente aceito que muitas culturas prolongadas sejam variáveis cromossomicamente.

EVANS & SHARP (1986) citam que os primeiros a correlacionar a duração da cultura e o acúmulo de variantes cromossômicos foram SMITH & STREET (1974) em *Daucus carota*. Posteriormente, outros trabalhos vieram confirmar esta correlação, como por exemplo, LORZ & SCOWCROFT (1983) que utilizando protoplastos de um doador heterozigoto (*Nicotiana* spp), após dobrarem a duração da cultura, obtiveram as frequências de alterações genéticas aumentadas de 1,4 para 6%.

Deve ser mencionado, ainda que, embora as culturas de células possam conter muitas células anormais, a regeneração age como um crivo, reduzindo a frequência de plantas anormais.

2.2.2. Bases genéticas da variação somaclonal

Como muito bem colocado por MARETZKI (1987), os elos perdidos entre as variações fenotípicas observadas e suas causas genéticas estão entre as principais frustrações dos pesquisadores que tentam dominar a variação somaclonal. Ain

da não se dispõem de evidências experimentais suficientes favorecendo um ou outro mecanismo genético, ficando as discussões sobre os possíveis mecanismos causadores da variação somaclonal em um plano ainda especulativo.

Assim, nas várias revisões sobre as origens da variação somaclonal, são citadas diversas prováveis causas como, alterações cariotípicas numéricas e estruturais; depleções e amplificações gênicas; ativação de elementos transponíveis; rearranjos gênicos somáticos; permuta somática e troca entre cromátides irmãs; eliminação de vírus crípticos (LARKIN & SCOWCROFT, 1981); mutações no DNA cloroplastidial e mitocondrial (ORTON, 1984 e WALBOT & CULLIS, 1985).

Mais recentemente, também LEE & PHILLIPS (1988) em sua revisão, consideram a variação somaclonal do ponto de vista das variações cromossômicas numéricas e estruturais, em células em cultura e plantas regeneradas e lembram dois mecanismos que as explicariam, o primeiro baseado na replicação tardia da heterocromatina e, o segundo, como resultado do desbalanço no "pool" de nucleotídeos.

De maneira resumida, pode-se dizer que as variações induzidas **in vitro** podem resultar de mudanças genéticas, epigenéticas ou não genéticas (MEINS, 1983). As variações não genéticas incluem, por exemplo, efeitos fisiológicos, eliminação de vírus ou agentes similares.

As mudanças epigenéticas **in vitro**, de acordo

com MEINS (1983), não têm, ainda, seus mecanismos básicos completamente entendidos no sentido de que, nos eucariotos a epi~~gênese~~gênese compreende a regulação da atividade efetiva do gene, a qual pode ocorrer em diferentes níveis, sendo portanto, proce~~so~~so bastante complexo. São relatados na literatura comumente como exemplos de mudanças epigenéticas induzidas in vitro, os da auto-suficiência em auxinas e citocininas.

É preciso citar que, quando se trata das causas da variação somaclonal, deve se ter em mente que o genoma vegetal é dotado de duas características extremamente importantes e não conhecidas em toda sua extensão, que são a sua plasticidade e seu dinamismo. -Neste sentido, a colocação de McCLINTOCK (1984) de que a cultura de tecidos ao proporcionar ambientes alterados provoca "choques" no genoma, que é levado a responder e o faz muitas vezes, de modo bastante incomum, é muito pertinente e reflete a complexidade da questão.

2.3. CULTURA DE TECIDOS DE CANA-DE-AÇÚCAR

Conforme citado por MARETZKI (1987), quase todos os programas de melhoramento de cana-de-açúcar em realização nos centros experimentais incluem como componente de suas pesquisas um ou mais aspectos do cultivo de células e tecidos, tendo esta tendência se acentuado nos últimos anos. Em-

bora não se espere que as manipulações in vitro venham a substituir as práticas convencionais do melhoramento, as técnicas emergentes são vistas como um complemento valioso no programa de melhoramento de cana-de-açúcar. Neste sentido, a cultura de tecidos pode ser vista como uma ferramenta a ser utilizada tanto para a propagação clonal de variedades, associada à limpeza de patógenos, como para a indução de variabilidade passível de ser aproveitada no melhoramento.

No que se refere à propagação clonal de cana-de-açúcar MARETZKI (1987) cita algumas áreas que podem ser consideradas, tais como:

- a eliminação dos patógenos sistêmicos da cana a ser usada no plantio;
- a preservação de germoplasma na forma de plantas jovens;
- e o intercâmbio de variedades de cana livres de doenças, eliminando-se as exigências de quarentena.

LEE (1984 e 1986) menciona que um sério problema enfrentado pelos programas de melhoramento de cana através de métodos convencionais é o que se refere ao tempo gasto na produção em grande escala de mudas de uma nova variedade. Deste modo, o emprego da micropropagação da cana a partir de meristemas apicais teria sua utilidade em programas de melhoramento, devido à economia de tempo que pode representar na multiplicação de variedades e também de clones promissores.

De qualquer maneira, o teste crítico para a mi-

cropropagação é se a mesma pode ocorrer sem perda do controle genético, de modo que as plantas recuperadas não se desviem da planta parental doadora.

Quanto ao aspecto de indução de variabilidade, este tem sido explorado em cana desde 1964 e 1965 por NICKELL, seguindo-se os trabalhos de HEINZ & MEE (1969 e 1971), todos do Hawaii. Paralelamente, surgiram trabalhos do grupo de Formosa a exemplo do de LIU (1971) e do grupo de Fiji, citando-se o trabalho de KRISHNAMURTHI (1974). Na segunda metade da década de 70 e início de 80, vários outros grupos passaram a trabalhar na área, como por exemplo na Flórida, LY RENE (1976) e VASIL et alii (1979); nas Filipinas, LAT & LANTIN (1976); na França, SAUVAIRE & GALZY (1980) e no Brasil, CROCOMO et alii (1979) e EVANS et alii (1980).

No que se refere ao estabelecimento de culturas de calos com vistas à obtenção de variantes, LIU (1984) destaca como principais tipos de tecidos usados o meristemático subapical, folhas mais internas que circundam o ápice e inflorescências imaturas. Os meios de cultura mais utilizados para induzir a formação de calos são modificações do meio de MURASHIGE & SKOOG (1962), acrescidos de 2,4-D em concentrações em torno de 2 a 3 mg/l de meio de cultura (9,1 a 13,5 μ M) a exemplo dos trabalhos de HEINZ & MEE (1969); KRISHNAMURTHI & TLASKAL (1974), LIU (1984) e outros, envolvendo as mais diversas variedades doadoras de tecidos somáticos.

Ainda no contexto da indução de variabilidade

de através da cultura de tecidos, pode ser mencionado também que, a referida técnica oferece a vantagem adicional de permitir o uso de agentes estressantes no meio de cultura, de modo a se proceder a uma pré-seleção *in vitro*. Tal linha de pesquisa em cana-de-açúcar tem sido desenvolvida por CROCOMO et alii (1985) empregando como agentes estressantes os herbicidas Ametrin e Dalapon.

Em trabalho de LINGA-MORALES & BARBA (1980) foram testados, para a indução de calos em cana-de-açúcar os fitorreguladores GA_3 , NAA, IAA e 2,4-D nas concentrações de 1, 5 e 20 mg/l, além do controle. Todas as auxinas usadas promoveram a formação de calo, mas entre todas, a mais eficiente foi o 2,4-D. O maior número de plantas regeneradas foi obtido nos calos cultivados em meio de cultura com 5 mg/l de 2,4-D (22,6 μM) e, em segundo lugar com a dose de 1 mg/l de 2,4-D (4,5 μM). O mesmo padrão de resposta foi observado com o NAA. Com a dose de 20 mg/l de 2,4-D ou NAA ocorreu uma diminuição na regeneração de plantas, embora somente com o 2,4-D tenha ocorrido um aumento na proporção de plantas albinas da concentração de 1 mg/l para 20 mg/l. O GA_3 não promoveu a formação de calo em nenhuma das concentrações usadas.

Em outro estudo, IRVINE et alii (1983) testaram a ação indutora de calos de 79 compostos em folhas imaturas de cana, nas concentrações de 2, 4 e 20 mg/l. Destes, 25 compostos induziram calos e os demais foram ineficientes. Dentre os que induziram calos, 86% pertenciam ao grupo químico com atividade auxínica. Aqui, também, o grupo mais ativo de

compostos, os ácidos clorofenoxiacéticos, mostraram-se mais efetivos em concentrações menores (2 e 4 mg/l) do que nas dosagens mais elevadas (20 mg/l). O único produto que competiu em efetividade com o 2,4-D foi o ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico (picloram).

MARETZKI (1987) revendo as condições gerais de cultura comenta que embora alguns pesquisadores conduzam a iniciação dos calos em condições de escuro, a incubação sob luz fluorescente constante parece ser satisfatória. As temperaturas mais comumente empregadas variam de 22 a 26°C. A completa retirada do análogo de auxina ou inclusão de NAA (1 mg/l ou 5,4 μ M) induz o calo à regeneração via organogênese ou embriogênese, segundo o mesmo autor.

2.3.1. Estudos histológicos em calos de cana-de-açúcar

Os estudos histológicos envolvendo calos de cana-de-açúcar, relatados na literatura, têm sido conduzidos com os objetivos principais de se determinar a origem da proliferação celular formadora dos calos assim como de elucidar a via predominante de regeneração nesta espécie. Esta revisão abordará então, os principais trabalhos que contribuíram para a evolução dos conhecimentos nesta área.

LIU et alii (1980) realizaram estudo histológico com explantes da variedade Fl68, inoculados em meio de cultura contendo 3 mg/l de 2,4-D (13,6 μ M), os quais originaram calos que foram fixados

dos aos 40 dias. Os explantes utilizados pelos autores foram o ápice caulinar, entre o 1º e 9º internós, e a segunda folha mais jovem. Neste estudo os autores observaram que a origem dos calos sempre esteve associada, direta ou indiretamente, aos feixes vasculares, pois houve desenvolvimento de calo somente a partir dessas regiões. Estas observações foram justificadas pelos autores através do estudo de ARTSCHWAGER, realizado em 1925, onde o autor demonstrou que, nas bainhas de folhas jovens em desenvolvimento de cana-de-açúcar, ocorrem células semelhantes às do câmbio entre o xilema e o floema primários dos feixes vasculares.

Também MORELAND & FLINT (1942) demonstraram vestígios de atividade cambial nos feixes vasculares das bainhas foliares de cana-de-açúcar, além do desenvolvimento de um meristema interfascicular composto de células semelhantes às cambiais entre os feixes vasculares. Este meristema interfascicular foi confirmado mais recentemente também por BONNEL (1980).

LIU et alii (1982) realizaram um outro estudo histológico da formação de calos aos 0, 4, 8, 12 e 40 dias, na variedade ROC5, utilizando os mesmos tipos de explantes e condições de cultura citados em LIU et alii (1980). Os autores observaram que, no 4º dia de cultura do explante de folha jovem já se notava uma protuberância resultante da atividade meristemática das células adjacentes ao floema primário, sendo este, portanto, o sítio de formação dos calos. Após 8

dias da inoculação, a protuberância desenvolveu-se em uma estrutura semelhante a um nódulo. Segundo os autores a medida que o calo crescia, as células centrais tornavam-se vacuolizadas e maiores, enquanto aquelas da região periférica proliferavam continuamente, gerando desse modo um padrão de crescimento centrífugo. As células recém-formadas possuíam paredes finas, citoplasma denso e núcleo grande proporcionalmente ao tamanho da célula. Em relação ao explante obtido do 1º ao 9º internós os autores observaram que após 5 a 8 dias de cultivo, este já apresentava um calo na sua periferia, e tal calo se originava dos feixes vasculares (considerados atípicos quanto à estrutura) ou, mais especificamente, a partir da proliferação das células do floema. Aos 40 dias de cultivo constataram a formação de massas de calos de tamanhos diferentes no mesmo explante, devido ao fato dos feixes vasculares estarem situados a distâncias diferentes da periferia, resultando em variações na data de indução dos calos e, consequentemente, no seu crescimento. Os feixes vasculares do 8º e 9º internós do explante em questão foram considerados normais em estrutura, mas os autores não encontraram proliferação de calos a partir deles.

BONNEL et alii (1983) estudando a evolução anatômica dos tecidos de folhas jovens de cana-de-açúcar, variedade Col007 cultivadas *in vitro*, observaram que a proliferação das células da epiderme, fibras subepidérmicas, células da bainha do feixe e do tecido vascular deram origem, respectivamente, ao tecido epidérmico, zona cambial periférica, pa-

rênquima e tecidos vasculares dos calos. Deste modo, os autores concluíram pela existência de uma especificidade organogênica de cada tecido foliar, ou seja, ficou evidenciada a importância da diversidade dos tecidos na origem da formação dos calos.

Nos primeiros trabalhos onde se relatou a ocorrência da regeneração em calos de cana-de-açúcar, a origem dos regenerantes não foi investigada (HEINZ & MEE, 1969). Contudo, em 1974, LIU & CHEN citaram que a diferenciação seria influenciada pelo genótipo do doador, meio de cultura e número de subculturas. Ainda aqui, as origens dos regenerantes eram obscuras, o que levou os autores a realizarem um estudo histológico da organogênese em calos de cana-de-açúcar desenvolvidos em dois meios de cultura. Para indução e crescimento dos calos os autores utilizaram o meio MS acrescido de 3 ppm de 2,4-D ($13,6 \mu\text{M}$) e, para a diferenciação dos brotos, o mesmo meio, sem 2,4-D, mas acrescido de cînetina (1 mg/l ou $4,7 \mu\text{M}$); NAA (1 mg/l ou $5,4 \mu\text{M}$) e hidrolizado de caseína (400 mg/l), meio este chamado de indutor de órgãos. Após a inoculação neste último meio de cultura, as coletas foram efetuadas a cada 3-4 dias, desde o dia 0 até o 26º dia. Os autores registraram o aparecimento de meristemóides já a partir do 8º dia após a transferência para o meio de cultura indutor de órgãos. Os meristemóides apresentavam-se formados por células pequenas, arranjadas concentricamente, de aparência isodiamétrica, sem vacúolos e com núcleos densamente corados. Tais meristemóides, segundo os autores seriam virtualmente

pró-embriões. Os meristemóides mais tarde desenvolviam-se em várias estruturas de brotos, sendo que a parte aérea dos mesmos mostrou-se semelhante à parte aérea de embriões zigóticos, ou seja, compunha-se de estruturas semelhantes à plúmula e coleoptilo, embora às vezes com sobreposições e arranjos irregulares. Por outro lado, histologicamente, os autores não encontraram as demais partes componentes de um embrião típico de semente de gramínea, ou seja, o eixo embriônário, radícula e coleorriza. Os autores observaram, ainda, dois padrões de diferenciação nos calos: em um apareciam primeiro os brotos e, somente mais tarde, as raízes e, no outro, somente formavam-se raízes com completa perda de totipotência. A respeito da origem do embrióide na massa do calo, os autores consideraram-na unicelular, embora sem apresentar evidências mais concretas.

Deve ser observado que LIU & CHEN (1974) e tam bém LIU et alii (1980) utilizaram os termos meristemóide e embrióide como sinônimos, embora mais recentemente se observe a tendência para se reservar o termo meristemóide, para os casos onde a regeneração ocorre via organogênese e o termo embrióide para os casos de embriogênese somática (HO & VASIL, 1983a).

O trabalho de NADAR & HEINZ (1977) relata a regeneração em cana-de-açúcar como sendo através de organogênese, ou seja, inicialmente seria formado o broto e, depois, seria induzido o enraizamento, embora o trabalho não tivesse sido acompanhado por avaliações histológicas.

Porém, em outro trabalho do mesmo grupo (NADAR et alii, 1978), foi feito estudo histológico em calos de cana-de-açúcar, variedade H50-7209, desenvolvidos em meio de cultura contendo 3,0 mg de 2,4-D/l (13,6 μ M) e em meio sem auxina. Foram constatadas estruturas embriogênicas organizadas nos calos desenvolvidos em presença de 2,4-D, mas a diferenciação das plantas ocorreu somente na ausência da auxina. Os autores consideraram que a origem das plantas de cana-de-açúcar teria sido a partir de células individuais.

AHLOOWALIA & MARETZKI (1983) e HO & VASIL (1983b) demonstraram em seus trabalhos de forma clara que a via predominante de regeneração em cana-de-açúcar é a embriogênese somática. Os primeiros autores fizeram esta constatação em culturas de calos e os últimos em suspensões celulares embriogênicas.

HO & VASIL (1983a) procuraram explicar esta aparente discordância entre os autores quanto a via de regeneração em cana-de-açúcar sugerindo que, nos estudos anteriores a regeneração provavelmente teria sido via embriogênese somática, embora esta não tivesse sido reconhecida pelas seguintes razões:

1. ausência de estudos morfológicos e de desenvolvimento detalhados;

2. os embriões somáticos formados *in vitro* eram frequentemente atípicos e diferentes dos embriões zigóticos ou ainda, não foram reconhecidos ou foram mal interpretados;

3. a germinação precoce dos embriões pode ter ocorrido antes que eles pudessem ser morfologicamente identificados como embriões;

4. em muitos dos embriões o meristema radicular ou era pouco desenvolvido ou ausente;

5. as citocininas eram frequentemente adicionadas ao meio para induzir a regeneração de brotos. Isto resultou na formação de múltiplos brotos meristemáticos nos embriões assim como em sua germinação precoce;

6. muitas gemas axilares desenvolveram-se após a germinação dos embriões causando a impressão de que a regeneração das plantas ocorria pela organização de brotos.

GUIDERDONI & DEMARLY (1988) descreveram a origem de dois tipos de calos a partir de diferentes regiões do explante, ou seja, calos nodulares e compactos provenientes de áreas imaturas de folhas jovens e os calos mais friáveis e de crescimento rápido originados de áreas mais diferenciadas da folha. Os calos originaram-se a partir de folhas jovens de plântulas que, por sua vez, haviam sido regeneradas *in vitro*. Os calos nodulares apresentaram alta taxa de regeneração de plantas via embriogênese somática, enquanto que os calos friáveis raramente produziram plantas. Entretanto, os autores ressaltaram que a embriogênese somática foi a principal via de regeneração de plantas sem, contudo, descartar a ocorrência da organogênese, principalmente no caso da variedade Co6415. Outro ponto importante discutido pelos au-

tores foi o referente à organização do calo ou, em outras palavras, os dois tipos de calos foram considerados altamente organizados e não poderiam ser descritos como um agregado uniforme de células indiferenciadas.

Por outro lado, estudos mais recentes vêm indicando que tanto a embriogênese somática como a organogênese ocorrem conjuntamente, por exemplo, em calos de cevada (WEIGEL & HUGHES, 1985); milho (LOWE et alii, 1985). Assim, existiria a possibilidade, segundo CHEN et alii (1988) de que em cana-de-açúcar ambos os processos pudessem ocorrer simultaneamente. De fato, CHEN et alii (1988) constataram que em calos compactos mantidos na luz, a organogênese foi a principal via de regeneração, assim como quando as culturas eram mais velhas. Já em calos mantidos no escuro e com menos de um ano, ocorria a embriogênese somática e/ou a organogênese.

2.3.2. Variabilidade genética em cultura de tecidos de cana-de-açúcar

Quando se faz a micropropagação, o principal objetivo é conservar a integridade genética da planta doadora na progênie obtida. Inversamente, a seleção de variantes genéticos somáticos enfatiza a instabilidade cromossômica inerente à cultura de calos, por exemplo. O suposto caos genético gerado quando os tecidos são removidos da planta doadora e colocados em condições ambientais artificiais é o ponto

de onde se procura tirar proveito para se obterem os chamados "variantes somaclonais" ou "subclones" ou ainda "variantes somáticos" de acordo com os diversos autores.

No caso específico da cana-de-açúcar, é maior o interesse na utilização da cultura de tecidos pelo fato de acreditar-se que esta espécie apresente o fenômeno do mosaicismismo cromossômico de uma maneira mais ou menos generalizada. A cultura de tecidos surge, então, neste contexto como uma ferramenta providencial para expor e aproveitar as supostas mutações quiméricas naturalmente existentes nas variedades comerciais de cana (MARETZKI, 1987), devendo-se somar a isto a possibilidade do uso imediato de qualquer variação positiva através da propagação vegetativa da espécie.

HEINZ & MEE (1971) avaliaram duas populações de plantas derivadas da cultura de calos de tecidos dos clones H37-1933 (estável do ponto de vista cromossômico) e H50-7209 (mosaico cromossômico, $2n = 108 - 128$) quanto a diferenças morfológicas, número cromossômico e quatro sistemas enzimáticos. Quanto às alterações morfológicas, a maior frequência relativa de diferenças foi obtida no comprimento da aurícula e na presença ou ausência de grupos de pelos, sendo que na população derivada de H50-7209 ocorreu a mais alta porcentagem de variantes morfológicas - 34,8% contra 12,0% verificados na população de H37-1933. Por outro lado, as variações morfológicas não se correlacionaram diretamente com diferenças nos sistemas enzimáticos. Com relação a perox

xidase, amilase e transaminase 80,9% dos regenerantes de H50-7209 apresentou variação, enquanto que os de H37-1933 apresentaram 31% de variação. Entre 37 plantas da população H50-7209, todas exceto uma, tiveram variação no número cromossômico de célula para célula, na faixa completa de 94-120. Uma planta excepcional teve variação na faixa de 17-118. Entre oito plantas do clone H37-1933 (106-107 cromossomos), todas tiveram 106 cromossomos, embora em 1969 os autores houvessem descrito um variante anão obtido daquele clone cujo número de cromossomos variou de 117-124. Nesta planta, os padrões enzimáticos para esterase variaram em relação à planta doadora em quatro bandas. Assim, as maiores variações em todos os aspectos analisados foram observadas na população derivada do clone H50-7209 (mosaico).

LIU & CHEN (1976) estudando 417 plantas originadas da cultura de calos de oito variedades doadoras encontraram que aquelas diferiam de suas doadoras na frequência de alterações morfológicas assim: F146 (1,8%); NCo310 (2,4%); F161 (4,8%); F164 (6,7%); F162 (7,4%); 56-2080 (15,8%); F170 (27,6%) e F156 (34,0%). A característica que apresentou maior frequência de variações foi o comprimento de aurícula (8,6%), vindo a seguir a forma de "dewlap" (6,5%), seguido do grupo de pelos (6,2%) e da altura das folhas do topo (1,9%). O conteúdo de sacarose das plantas derivadas de calo foi aumentado em relação às doadoras de 2 a 12%. O número cromossômico ($2n$) variou de 86 a 126 nas plantas derivadas da variedade

de F156 ($2n = 114$), enquanto que nas derivadas de F164 ($2n = 108$) este número variou de 88 a 108. As plantas derivadas de F146 tiveram o número de cromossomos ao redor de 110, que é o número de variedade doadora e foi considerada a variedade mais estável do ponto de vista genético. Apesar disto, os autores não encontraram correlação aparente entre modificações morfológicas e mudanças no número cromossômico.

Os mesmos autores, em trabalho de 1978, obtiveram dados que indicaram que o somaclone 70-6132 teve maior produção de cana (32%), de açúcar (34%) e número de colmos que seu doador F164, sendo que as diferenças de produção de cana e açúcar foram significativas ao nível de 5%.

KRISHNAMURTHI (1977) obteve diferenças altamente significativas quanto ao teor de sacarose para os somaclones derivados das variedades Badila; LF60-3879; NCo310; Pindar; Spartan e Yasawa e significativas para LF63-274, enquanto que para Ragnar, LF66-9601 e Trojan as médias para sacarose foram iguais entre somaclones e os doadores.

Em outro trabalho KRISHNAMURTHI & TLASKAL (1974) relatam que, entre 38 subclones obtidos da variedade Pindar, foram isolados dois com variação nos números cromossômicos e outros quatro mostraram-se altamente resistentes à doença de Fiji, sendo a variedade Pindar suscetível à moléstia.

Taxas de aproveitamento de subclones melhorados quanto a quatro caracteres, ou seja, resistência à doença

de Fiji e a "downy mildew" (*Sclerospora sacchari* Miyake), teor de açúcar e produção, variando de 11 a 100% foram citadas por PRASAD et alii (1983), envolvendo 10 variedades doadoras.

Também LARKIN & SCOWCROFT (1981) testaram 260 somaclones derivados de uma variedade suscetível a *Helminthosporium sacchari*, Q101, quanto à sua reação à moléstia. Os autores encontraram que 8,9% dos somaclones comportaram-se como altamente resistentes, e, mais importante que isto, o nível de resistência foi mantido nas gerações seguintes de propagação vegetativa. Por outro lado, morfológicamente estes clones não se distinguiram da variedade doadora.

Contudo, a grande variabilidade fenotípica entre clones de cana derivados da cultura de tecidos nem sempre é tão estável. LOURENS & MARTIN (1987) conduziram estudos em dois anos para avaliar a variabilidade originada *in vitro*, tendo utilizado como doadoras as variedades CP65-357 e CP72-356. O processo da cultura de tecidos tanto pela formação e manutenção de calos por seis semanas, como pela indução direta do desenvolvimento da planta a partir do meristema apical, resultou em aumento na variabilidade morfológica para os dois cultivares, mas de modo mais acentuado para CP65-357. Esta variabilidade porém, reverteu no segundo ano do experimento de onde se supôs que esta variação não estivesse sob controle genético.

Outro estudo acerca da variação de caracteres

qualitativos quando se utiliza a cultura de tecidos para propagação em cana, é o de IRVINE (1984). Tecidos foliares de cinco clones de cana portadores de marcadores morfológicos foram inoculados em meio contendo 2,4-D para indução de calos e, posteriormente, transferidos para meio de regeneração de plantas. As plantas diferenciadas de dois clones, com marcadores no colmo, mostraram alta taxa de remissão do caráter, mas o mesmo reapareceu na progênie vegetativa destas plantas, tendo sido, portanto, a remissão transitória.

As plantas regeneradas dos calos de outros dois clones com marcadores foliares apresentaram baixa taxa de remissão do marcador e a progênie vegetativa foi estável. Um clone de folhas variegadas regenerou plantas em sua maioria com folhas verdes normais, algumas albinas e algumas variegadas, sugerindo que a diferenciação de plantas se inicie a partir de mais de uma célula. O autor concluiu que mudanças fenotípicas permanentes podem ocorrer devido à cultura de tecidos, mas os resultados indicaram que tais mudanças não são frequentes e podem ser confundidas com alterações temporárias ou com quimeras ocorridas durante a diferenciação. A discrepância entre a baixa taxa de remissão de caracteres qualitativos descrita neste trabalho e as altas taxas de variantes relatadas na literatura para caracteres quantitativos pode ter várias explicações, sendo uma delas o próprio número de genes que controlam um e outro tipo de caráter.

Em termos de melhoramento, o trabalho de LIU (1987) apresenta um expressivo número de variantes obtidos por cultura de tecidos, tendo sido descritos oito somaclones selecionados em nove anos. Estes somaclones foram selecionados entre centenas de plantas derivadas de cultura de tecidos (TC) de variedades elites de Formosa, tendo sido melhorados quanto às mais diversas características; tais como: maiores produções de cana e sacarose, eliminação da doença esclerótica, aumento de resistência ao agente causador do carvão (*Ustilago scitaminea*), ausência de florescimento e tolerância a solo salino. O trabalho não relata, contudo, se tais somaclones têm sido adotados pelos agricultores e seu grau de repercussão na agroindústria canavieira daquele país.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. VARIEDADES DOADORAS DE TECIDOS SOMÁTICOS

Foram utilizadas cinco variedades comerciais de cana-de-açúcar como fonte de tecidos somáticos para a cultura de tecidos, relacionadas na Tabela 2, juntamente com seus respectivos progenitores.

Tabela 2. Identificação das variedades doadoras de tecidos somáticos utilizadas na cultura de tecidos.

Variedade	Progenitores
POJ2878	POJ2364 x EK28
Co419	POJ2878 x Co290
NA56-79	Co419 (autofecundação)
IAC68-12	Co419 x IAC52-179
IAC68-144	CB40-69 x ?

3.1.1. Análise do número de cromossomos das variedades doadoras

Para a caracterização citológica das variedades doadoras foram utilizados toletes de uma gema obtidos de colmos amostrados de plantios situados em Campinas, Araras e Piracicaba, assim como de plantas mantidas em vasos. Os toletes foram colocados em condições ideais de brotação de gemas e raízes, ou seja, em recipiente contendo *Sphagnum* mantido em banho maria a $30 \pm 3^{\circ}\text{C}$, nas instalações do Setor de Citologia do Departamento de Genética da ESALQ/USP.

As raízes foram coletadas após atingirem 1 a 3 cm de comprimento sendo, a seguir, submetidas ao pré-tratamento com agentes inibidores do fuso (colchicina, 8-hidroxi-quinolina, 1-bromonaftaleno, para-diclorobenzeno) ou de síntese proteica (cicloheximida) isolados ou combinados, em presença ou ausência de dimetilsulfóxido (DMSO). A discriminação dos pré-tratamentos testados para cada variedade consta das Tabelas 4, 5, 6, 7 e 8, da Seção de Resultados e Discussão. O objetivo destes testes foi determinar o melhor tratamento para a obtenção de preparações contendo bom número de metáfases com cromossomos bem dispersos e com grau de contração adequado para sua análise. Tais objetivos são alcançados pelo emprego de agentes com a propriedade de alterar a viscosidade do citoplasma determinando a destruição das fibras do fuso mitótico ou ainda pelo concurso de um inibidor de síntese protei

ca que interrompe processos vitais na célula. Para que os objetivos descritos sejam alcançados torna-se necessário ainda que, os agentes sejam utilizados em concentrações e períodos de tempo adequados, de onde se justificam os vários testes realizados.

Após o pré-tratamento, as raízes foram fixadas em Carnoy (álcool-acético 3:1), seguidas de duas trocas de álcool 70°GL e mantidas a temperatura de $10 \pm 2^{\circ}\text{C}$ até o preparo das lâminas.

Para o preparo das lâminas, as raízes foram inicialmente hidrolizadas em HCl 1N a 60°C , por 13 minutos, sendo a seguir, coradas com o reativo de Schiff, durante 45 minutos.

Após a lavagem do corante, as raízes foram submetidas à hidrólise enzimática visando torná-las mais propícias ao esmagamento e produzindo assim, preparações com células intactas. A hidrólise enzimática inicialmente foi feita com pectinase 2,5% durante 30-50 minutos a 35°C , passando a ser feita, posteriormente, com a mistura de pectinase 2,5% e celulase 1%, durante 5 minutos, também a 35°C .

Em seguida, as raízes foram esmagadas, empregando-se sobrecoloração com carmim acético 1%, e observadas ao microscópio. As lâminas consideradas satisfatórias tiveram suas lamínulas removidas em solução de ácido acético 45% e, após secagem ao ar, lâminas e lamínulas foram montadas em bálsamo do Canadá.

As divisões, tanto metáfases como pró-metáfases, foram marcadas e desenhadas com o auxílio de câmara clara, contando-se a seguir o número de cromossomos e avaliando-se sua qualidade considerando-se os seguintes aspectos: nitidez e dispersão dos cromossomos e o fato de a célula estar ou não intacta. A cada um destes aspectos atribuiu-se pontos, segundo critério subjetivo de classificação. Assim, para a atribuição de pontos quanto à morfologia dos cromossomos esta foi classificada em boa (3 pontos), média (2 pontos) e ruim (1 ponto), considerando-se principalmente os aspectos de nitidez do centrômero e cromátides. O estado de dispersão dos cromossomos também foi classificado em bom (3 pontos), médio (2 pontos) e ruim (1 ponto), segundo o grau de sobreposição entre eles e consequentemente dificuldade de interpretação da figura. Considerando-se que a célula pode estar intacta ou não, atribuiu-se 2 e 0 pontos respectivamente, tendo-se incluído as dúvidas na segunda situação. Cada metáfase obteve então, um total de pontos resultante do somatório dos pontos atribuídos nos três quesitos descritos, sendo portanto, a contagem de cromossomos de uma célula tanto mais confiável quanto maior o número de pontos por ela alcançados. Assim por exemplo, uma metáfase com cromossomos nítidos, bem dispersos e também intacta receberia um total de 8 pontos eliminando-se, portanto, imprecisões de técnica.

Foram utilizadas para a avaliação de cada pré tratamento testado pelo menos quatro raízes. Para cada varie

dade os toletes foram amostrados e preparados como descrito, no mínimo, em três épocas diferentes.

Para a determinação do número de cromossomos de cada variedade e avaliação da ocorrência ou não de mosaicismo cromossômico, construiu-se um histograma contendo todos os números cromossômicos e respectivas frequências, obtidos em metáfases que receberam, no mínimo, 3 pontos, englobando-se todos os pré-tratamentos testados. Assumiu-se como o número somático da variedade aquele referente a classe onde se estabeleceu a moda nítida. Levou-se em consideração ainda, a classe onde ocorreu maior frequência de metáfases com maiores números de pontos atribuídos, para a avaliação da ocorrência ou não de mosaicismo cromossômico. Foram computados também, os números total e médio de metáfases obtidas com cada pré-tratamento e a média de pontos atribuídos.

As fotomicrografias foram feitas em fotomicroscópio Zeiss utilizando-se a objetiva de imersão 100x, fator da projetiva 3,2x e do optovar 1,25 ou 1,6x. Utilizou-se o filme Image Capture da Kodak e os filtros verdes 56 e 58 da Kodak.

3.1.2. Avaliação preliminar do número de nucléolos em variedades de cana-de-açúcar

Considerando-se que o cariótipo de cana-de-açúcar apresenta pares de cromossomos satelitados, conforme ob-

servações feitas nesta dissertação (Fig. 10 da Seção de Resultados e Discussão) e também da literatura (JAGATHESAN & RATNAMBAL, 1967 e 1969), decidiu-se efetuar estudo preliminar visando determinar o número de pares de cromossomos portadores da Região Organizadora do Nucléolo (NOR). Tais pares de cromossomos se constituiriam em marcadores citológicos de grande valor na avaliação de eventuais variações no cariótipo causadas pela cultura de tecidos. As metodologias de bandamento NOR visam basicamente marcar as regiões organizadoras do nucléolo de cromossomos em metáfase, mas também permitem que os nucléolos dos núcleos interfásicos sejam identificados. Desse modo, foram testados para as variedades NA56-79, IAC68-12 e IAC68-144 os métodos descritos por FERNANDEZ-GOMEZ (1969) (método A) e/ou HOWELL & BLACK (1980) (método B), dando-se a seguir os passos principais de cada um deles.

Método A

- 1 - Fixar as raízes na mistura 1:1 de formol a 10% e hidroquinona a 1%, durante 1-2h à temperatura ambiente;
- 2 - Lavar as raízes em água destilada por 3 vezes;
- 3 - Transferir para solução aquosa a 2% de AgNO_3 , mantendo-as à 70°C e no escuro, por 10-15 horas;
- 4 - Lavar as raízes em água destilada por 3 vezes;
- 5 - Transferir as raízes para a mesma mistura

usada na fixação (passo 1), mantendo - as
à temperatura ambiente por 1-2 horas;

- 6 - Esmagar as raízes em 2 ou 3 gotas de ácido acético a 50%;
- 7 - Transformar as lâminas provisórias em permanentes segundo a maneira usual.

Método B

Solução A - solução aquosa a 2% de gelatina
acrescida de 1 ml de ácido fórmico puro;

Solução B - solução aquosa de nitrato de prata a 50%;

Adicionar 2 gotas da solução A e 4 gotas da
solução B sobre a lâmina já contendo as
preparações cromossômicas. Cobrir com
lamínula e colocar por 2 min em placa à
70°C. Remover com água deionizada.

A efetividade dos métodos A e B na marcação
de bandas NOR foi avaliada nas metáfases presentes nas lâminas preparadas através de cada método. Determinou-se paralelamente, o número de nucléolos presentes em núcleos interfásicos íntegros de pelo menos 300 células para cada método.

As fotomicrografias foram feitas em fotomicroscópio Wild, utilizando-se a objetiva de 40x e o filme Panatomic X da Kodak.

3.2. SUBCLONES DE CULTURA DE TECIDOS

Os subclones selecionados para as análises realizadas na presente dissertação foram obtidos na Seção de Genética do Instituto Agrônomo de Campinas, durante o período de 1983 a 1988 e, em sua maioria resultaram de metodologia proposta por SONDAHL & CARLUCCI (1983).

As fontes de explantes utilizadas foram:

a) **Folhas jovens** que protegem o meristema apical, compondo o capitel de plantas adultas, tendo sido utilizadas somente as folhas mais internas conforme indicado pela seta na Figura 1a;

b) Porções do colmo de plantas adultas contendo uma única gema foram colocadas para "brotar" em vermiculita úmida. De cada brotação com 10-15 cm de altura, foi extraído o meristema apical juntamente com a região localizada logo abaixo deste, composta por internós, extremamente curtos, dotados das respectivas gemas. Tal explante foi denominado **submeristema** e encontra-se indicado pela seta na Figura 1b.

Para a indução dos calos utilizou-se de meios de cultura gelificados por agar (6,0 g/l) tendo por base a solução salina de MURASHIGE & SKOOG (1962), suplementada com vitaminas (tiamina 30 μ M; piridoxina 10 μ M e ácido nicotínico (15 μ M); mio-inositol 550 μ M; cisteína 500 μ M e sacarose (30 g/l). Utilizou-se de duas concentrações de 2,4-D, a saber: 400 ou

Figura 1. Explantes utilizados para a indução de calos em cana-de-açúcar. (a) folhas jovens que protegem o meristema apical de plantas adultas, compondo o capitel, selecionando-se as folhas mais internas, conforme indicado pela seta; (b) vista de cima de frasco de cultura contendo o explante submeristema que se compõem do meristema apical (primórdios foliares) e da região imediatamente inferior (se-ta).

200 μM , referido como meio I e 13,6 μM denominado meio II, com e sem carvão ativado (2,5 g/l), respectivamente.

A fase de calo ocorreu sob condições de ausência de luz e à temperatura de 25-27°C. As subculturas foram realizadas a cada 20-30 dias. Para a indução de regeneração de plantas a partir dos calos de meio I e II, utilizou-se o mesmo meio de cultura descrito anteriormente, somente que, em lugar do 2,4-D foi adicionado 6-benzilaminopurina (6-BA) na concentração de 10 μM e hidrolizado de caseína, 400 mg/l.

A regeneração de plantas ocorreu sob condições de 16 horas de luz e à temperatura de 27-30°C. As plantas regeneradas foram aclimatadas inicialmente em vermiculita, passando a seguir para recipientes com solo e depois para o campo, onde após serem protocoladas por um número de campo, foram conduzidas individualmente.

3.2.1. Análise do número de cromossomos de subclones derivados de cultura de tecidos

Na Tabela 3, desta Seção, estão relacionados os subclones nos quais se efetuaram as determinações dos números de cromossomos, incluindo-se também, a variedade doadora que lhes deu origem, tipo de explante e meio de cultura utilizados na fase de calos, número de meses nesta fase e ainda a geração de propagação vegetativa onde se procedeu à coleta de raízes para o preparo das lâminas. Para a seleção dos subclo-

Tabela 3. Subclones de cana-de-açúcar, provenientes da regeneração de calos incubados em meio de cultura com 2,4-D (1), analisados citologicamente.

Subclone nº	Variedade doadora	Fonte de explante	Período de incubação do calo (meses)	Geração de propagação vegetativa(2)
94	NA56-79	Submeristema	2	2
250	NA56-79	Folhas jovens	4	2
315	NA56-79	Submeristema	10	2
600	NA56-79	Submeristema	3	1
1325	NA56-79	Submeristema	4	1
1518	NA56-79	Submeristema	4	1
2050(3)	NA56-79	Folhas jovens	4	0
1062	IAC68-12	Submeristema	4	0*
1351	IAC68-12	Submeristema	3	1
1647	IAC68-12	Folhas jovens	4	1
1214	IAC68-144	Submeristema	1	0*
2060	Co419	Folhas jovens	2	0
2061	Co419	Folhas jovens	4	0
2071(3)	POJ2878	Folhas jovens	2	0

(1) Meio I = meio de MURASHIGE & SKOOG (1962) com 400 ou 200 μ M de 2,4-D.

(2) 0 = Planta em fase de aclimação em vermiculita.

0* = Planta individual com 3 a 4 anos de campo, após a regeneração do calo.

1 = Planta proveniente da primeira propagação vegetativa (a partir de toletes), após a regeneração do calo.

2 = Planta proveniente da segunda propagação vegetativa (a partir de toletes), após a regeneração do calo.

(3) Meio II = meio de MS com 13,6 μ M de 2,4-D.

nes a serem submetidos às contagens de cromossomos, além dos critérios de idade do calo, fonte de explantes, levou-se em consideração características de campo manifestadas por alguns materiais, ainda que em observações preliminares. Tal situação ocorreu por exemplo, com o subclone 600, em que se observou acentuada suscetibilidade ao carvão da cana (*Ustilago scitaminea*), tanto em testes artificiais como em condições naturais de campo, o que determinou a análise de seu número de cromossomos.

A respeito da geração de propagação vegetativa dos subclones na qual se procedeu à coleta de raízes, é necessário citar que, aquela variou entre os materiais, porque os mesmos foram sendo aclimatados e conduzidos ao campo gradativamente, isto é, de acordo com a sequência de liberação das plantas no laboratório de cultura de tecidos, gerando então, a referida diferenciação. Assim, para a caracterização citológica dos subclones que já haviam sido propagados vegetativamente por uma ou duas vezes ou mesmo nenhuma vez, mas, após 3 ou 4 anos de campo (designados na Tabela 3 por 1, 2 e 0*, respectivamente), as amostragens de colmos, em número de uma a quatro, foram efetuadas em áreas plantadas em Campinas ou Araras. O material preparado na forma de toletes de uma gema, foi conduzido como descrito em 3.1.1, e submetido aos pré-tratamentos indicados nas Tabelas 9 a 14 e 19 a 22, da Seção de Resultados e Discussão, tendo os mesmos sido avaliados em pelo menos quatro raízes.

Por outro lado, para a avaliação daqueles materiais ainda em fase de adaptação em vermiculita (geração 0), as coletas de raízes foram efetuadas diretamente nas plantas originadas da cultura de tecidos, espaçando-as de um período de 15-30 dias para nova emissão de raízes. Aqui, a avaliação dos pré-tratamentos foi feita com número variável de raízes, assim como o número de amostragens realizadas, face a menor disponibilidade de raízes. Os vários pré-tratamentos testados para cada material estão descritos nas Tabelas 15 a 18 da Seção de Resultados e Discussão.

Considerando-se que, a análise dos subclones ocorreu após a análise de suas respectivas variedades doadoras, quando então já se dispunha de certo conhecimento acerca dos pré-tratamentos e suas respostas, isto possibilitou um direcionamento na escolha dos pré-tratamentos a serem testados nos subclones, de modo a se obter maior eficiência.

O preparo das lâminas, avaliação das metáfases, tabulação e interpretação dos resultados seguiu o descrito em 3.1.1, assim como as condições em que foram obtidas as fotomicrografias.

3.3. ESTUDO HISTOLÓGICO DOS CALOS

Foram feitos cortes histológicos de calos desenvolvidos a partir dos dois tipos de explantes utilizados

neste trabalho ou seja, de folhas jovens e submeristemas, am bos descritos anteriormente. A indução dos calos aqui amos trados, ocorreu no meio II, tendo sido utilizada como varieda de doadora somente a NA56-79. A amostragem dos calos a par tir de folhas jovens foi feita após 1, 3, 6, 9 e 12 meses em pre sença de 2,4-D e daqueles provenientes de submeristemas, após 1, 2,5, 4 e 5 meses de cultivo.

Foi amostrado ainda, material proveniente de folhas jovens que, após ter permanecido por 3 meses em pre sença de 2,4-D, foi transferido para o meio de regeneração (6-BA), tendo aí permanecido por 2,5 meses. Neste material, já eram distintos nódulos verdes,

O material para o estudo histológico foi fixa do em FAA 50%, veja SASS (1951). A técnica empregada para desidratação e inclusão do material em parafina, corte e dis tensão das fitas em lâminas foi a usual em trabalhos de his tologia, veja em SASS (1951). A espessura dos cortes variou de 10 a 15 μ m. Seguiram-se a remoção da parafina dos cortes pelo xilol, hidratação e coloração dupla dos mesmos pelo mét odo de Feulgen, adaptado para o caso de lâminas, e "fast-green" ou, em alguns casos, pela safranina e "fast-green" ou ainda, orceina lacto-acética 1% e "fast-green" e, finalmente, monta gem em Bálsamo do Canadá.

Os desenhos de regiões aproximadamente media nas de cada amostra, foram executados ao microscópio óptico, com emprego de câmara clara e projeção de escala micrométri ca, paralelamente.

Foram feitas fotomicrografias das preparações histológicas em fotomicroscópio Zeiss, utilizando-se as objetivas 2,5 e 10x, fator da projetiva 3,2x e do optovar 1,25x. Utilizou-se o filme Fujicolor e o filtro 1,0 da Kodak. Foram feitas ainda, fotomicrografias utilizando-se o filme Panatomic X da Kodak, em fotomicroscópio Wild, objetivas 4, 10 e 25x.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. ANÁLISE DO NÚMERO DE CROMOSSOMOS DAS VARIEDADES DOADORAS

Os principais resultados referentes aos testes efetuados com agentes inibidores do fuso e de síntese proteica, isolados ou conjugados, para a obtenção de metáfases com cromossomos de boa dispersão, nitidez e contidos em células intactas, nas variedades doadoras de tecidos somáticos, encontram-se nas Tabelas 4 a 8 e Figuras 2, 4, 6, 8 e 10. Nas tabelas estão discriminados os pré-tratamentos testados incluindo-se a duração e a temperatura em que ocorreram, assim como os parâmetros utilizados na avaliação de sua eficiência. Estes foram: número total de raízes observadas, total de metáfases analisadas, médias de metáfases em raízes individuais e média dos pontos conferidos.

A distribuição dos números de cromossomos encontrados para cada variedade doadora e seus respectivos subclones, assim como a distribuição dos pontos atribuídos é apresentada nas Figuras 3, 5, 7, 9 e 11.

- Variedade NA56-79

Entre os pré-tratamentos testados para esta variedade, verifica-se na Tabela 4 que as combinações entre o inibidor de síntese proteica, cicloheximida e o inibidor de fuso, 8-hidroxiquinolina, nas proporções de 1,5:1 ou 1:1 partes das soluções estoques 140 e 600 ppm, durante 5 ou 4 horas, respectivamente, permitiram conciliar a obtenção de metáfases em número e qualidade regulares, uma vez que a média dos pontos conferidos para cada pré-tratamento citado foi de 4,3 e 4,8. Deve ser salientado ainda que, somente os pré-tratamentos combinados produziram os resultados desejados, o mesmo não se verificando com os agentes de pré-tratamento utilizados isoladamente. A Figura 2 apresenta uma metáfase onde se utilizou como pré-tratamento a combinação da cicloheximida e 8-hidroxiquinolina, 1:1 partes dos estoques 140 e 500 ppm, respectivamente, durante 4 horas. No que se refere aos parâmetros básicos de avaliação da qualidade da metáfase proporcionados pelo pré-tratamento, a dispersão e a morfologia dos cromossomos foram considerados intermediários (2 pontos), tendo em vista algumas sobreposições e não total nitidez dos centrômeros e cromátides. Por outro lado, a célula permaneceu intacta, conforme observações em microscópio de contraste de fase, conferindo-se portanto, 2 pontos ao quesito da integridade celular. Assim, a contagem de 114 cromossomos ocorrida em uma célula a qual se conferiu um total de 6 pontos, pode ser considerada bastante segura.

Tabela 4. Avaliação dos pré-tratamentos testados em pontas de raízes de cana-de-açúcar, variedade NA56-79.

Pré-tratamentos	Duração (h)	Tempe- ratura (°C)	Nº de raízes observadas	Nº de metáfases observadas	Média de metáfases/ raiz	Média dos pontos con feridos
A) Isolados						
1-bromonaftaleno 1 go/10 ml	2	T.A.	11	01	0,09	3,0
1-bromonaftaleno 1 go/10 ml	3	T.A.	6	-	-	-
1-bromonaftaleno 2 go/4 ml	2	T.A.	8	-	-	-
B) Combinados						
Ciclo. ¹ + 8-hidroxi. ² (1:1)	4	T.A.	32	08	0,25	4,8
Ciclo. + 8-hidroxi. (1:1)	4,5	T.A.	12	02	0,17	4,0
Ciclo. + 8-hidroxi. (1:1)	5	T.A.	11	01	0,09	5,0
Ciclo. + 8-hidroxi. (1,5:1)	4,5	T.A.	6	-	-	-
Ciclo. + 8-hidroxi. (1,5:1)	5	T.A.	45	20	0,44	4,3
Ciclo. + 8-hidroxi. (1,5:1)	5,5	T.A.	11	-	-	-
Cicloheximida 70ppm + 1-bromo. ³ +IMS ⁴	3	T.A.	28	-	-	-

¹ Solução estoque 140 ppm de cicloheximida.

² Solução estoque 600 ppm de 8-hidroxiquinolina.

³ e ⁴ Uma gota de 1-bromonaftaleno ou dimetilsulfóxido.

Considerando-se os resultados das contagens de cromossomos, obtidos com todos os pré-tratamentos utilizados, num total de 32 células analisadas para a variedade em questão (Figura 3), observou-se a ocorrência de moda nítida na classe referente a 114 cromossomos, ou seja, 59,4% das metáfases analisadas apresentaram aquele número. Merece ser destacado ainda que, do total de metáfases ocorridas na classe modal (19), 31,6% receberam 6 pontos, tratando-se portanto, de metáfases similares a apresentada na Figura 2. Os desvios ocorridos em relação a moda foram pequenos acrescentando-se o fato de serem sempre representados por metáfases de menor qualidade, conforme pode ser evidenciado pelos pontos a elas conferidos, o que as torna mais sujeitas a erros de interpretação.

Figura 2. Metáfase mitótica em ponta de raiz da variedade de cana-de-açúcar NA56-79, onde se determinou 114 cromossomos e se atribuiu 6 pontos. O pré-tratamento utilizado foi a combinação do inibidor de síntese proteica, cicloheximida e do inibidor de fuso, 8-hidroxiquinolina, 1:1 partes dos estoques 140 e 600 ppm, respectivamente, durante 4 horas.

Figura 3. Distribuições dos números de cromossomos somáticos determinados em raízes da variedade NA56-79 e sete subclones.

* Total de células analisadas.

Pelo exposto, conclui-se que a variedade NA 56-79 não apresenta mosaicismismo cromossômico em suas células somáticas o que concordou perfeitamente com os resultados obtidos por KUNIEDA et alii (1984), onde os autores também encontraram estabilidade no número somático de 114 cromossomos. Entretanto, ambos os resultados diferiram dos obtidos por FERNANDEZ et alii (1978) que encontraram uma variação na faixa de 90-122 cromossomos, de onde concluíram pela ocorrência de mosaicismismo cromossômico para a referida variedade. Uma provável hipótese para justificar tão grande amplitude de variação encontrada pelos autores seria de que os mesmos não teriam tomado precauções especiais com respeito às divisões analisadas o que é imprescindível, como salientado por TLASKAL & HUTCHINSON (1973), quando se pretende demonstrar a instabilidade cromossômica em cana-de-açúcar.

- Variedade POJ2878

A análise dos pré-tratamentos testados para esta variedade (Tabela 5) indicou que só se obtiveram os resultados desejados quando se utilizaram pré-tratamentos combinando o inibidor de síntese proteica, cicloheximida e um inibidor de fuso, seja o 1-bromonaftaleno ou a 8-hidroxiquinolina, durante 4 e 5 horas, respectivamente. Por outro lado, o efeito benéfico do inibidor de fuso 1-bromonaftaleno sobre a qualidade das metáfases, especialmente no que se refere ao aspecto da morfologia dos cromossomos, pode ser eviden

ciado pela maior média de pontos atribuídos aos pré-tratamentos em que participa. A Figura 4 ilustra o aspecto de uma metáfase resultante do pré-tratamento composto pela cicloheximida (70 ppm) acrescida de 1-bromonaftaleno e DMSO, estes na proporção de 1 gota em 4 ml do primeiro, por 4 horas, a qual se atribuiu 6 pontos, destacando-se ainda, o fato de a célula estar perfeitamente intacta.

Os pré-tratamentos em que os agentes foram empregados isoladamente, novamente não foram eficientes em acumular metáfases de boa qualidade.

Tabela 5. Avaliação dos pré-tratamentos testados em pontas de raízes de cana-de-açúcar, variedade POJ2878.

Pré-tratamentos	Duração (h)	Temperatura (°C)	Nº de raízes observadas	Nº de metáfases observadas	Média de metáfases/ raiz	Média dos pontos com feridos
A) Isolados						
1-bromonaftaleno 1 go/4 ml	1,5	T.A.	12	-	-	-
Colchicina 0,1%	3	T.A.	6	-	-	-
B) Combinados						
Ciclo. ¹ + 8-hidroxi. ² (1:1) + DMSO ³	5	T.A.	9	7	0,77	3,7
Ciclo. + 8-hidroxi. (1:1)	5	T.A.	20	11	0,55	3,8
Cicloheximida 70ppm + 1-bromo. ⁴ +DMSO	5	T.A.	17	01	0,06	6,0
Cicloheximida 70ppm + 1-bromo. +DMSO	4	T.A.	5	16	3,20	4,9
Colchicina 0,1% + DMSO	4	T.A.	9	-	-	-

¹ Solução estoque 140 ppm de cicloheximida.

² Solução estoque 600 ppm de 8-hidroxiquinolina.

³ e ⁴ Uma gota de dimetilsulfóxido ou 1-bromonaftaleno.

Figura 4. Metáfase mitótica em ponta de raiz da variedade POJ2878, onde se determinou 118 cromossomos e se atribuiu 6 pontos. O pré-tratamento utilizado foi a combinação de cicloheximida (70 ppm) + 1-bromonaftaleno + DMSO, durante 4 horas.

Pela observação conjunta dos resultados de todas as contagens efetuadas e contidas na Figura 5, verificou-se que 51,4% das contagens ocorreram na classe de 118 cromossomos e 31,4% na classe de 117 cromossomos. Esta observação levou inicialmente a suposição de que a variedade em questão apresentava alguma variação quanto ao número de cromossomos somáticos, concordando com citações de literatura de 117 - 121 relatada por PRICE (1963); 117-124 por BARRETO & SIMON (1982) e 84-119 por FERNANDEZ et alii (1978). Entretanto, quando se analisa o aspecto referente a qualidade das metáfases contendo 118 e 117 cromossomos, observa-se que a diferença entre estas duas classes está em que, do total de 18 metáfases ocorridas na classe modal, 33,3% delas receberam 6 pontos, o mesmo não se dando na classe de 117 cromossomos. Deste modo, foi necessário considerar não somente o aspecto do número de metáfases ocorridas na classe modal para se concluir pela não ocorrência de mosaicismo cromossômico nesta variedade, mas também, o aspecto referente a qualidade daquelas metáfases foi decisivo para tal conclusão.

- Variedade Co419

Observando-se os resultados obtidos com os pré-tratamentos testados para esta variedade e agrupados na Tabela 6, verificou-se bons resultados, em termos de médias de metáfases por raiz analisada, com o emprego das misturas

Figura 5. Distribuições dos números de cromossomos somáticos determinados em raízes da variedade POJ2878 e um subclone.

* Total de células analisadas.

de cicloheximida e colchicina (na proporção de 1:1 partes dos estoques 140 ppm e 0,1%, respectivamente) durante 5 horas e também com cicloheximida (70 ppm) acrescida de 1-bromonaftaleno e DMSO, durante 3 horas. Contudo, quando se observa a qualidade das metáfases sob o efeito de tais pré-tratamentos fica evidente a maior eficiência do segundo, refletindo - se na média dos pontos a ele atribuídos 6,0, contra os 3,2 do primeiro. A Figura 6 demonstra claramente os resultados daquele pré-tratamento em função da qualidade da metáfase obtida, a qual se atribuiu 8 pontos.

A avaliação da ocorrência ou não de mosaicismos cromossômico foi feita através da Figura 7 onde foram computados todos os resultados das contagens realizadas. Sua

análise mostra que 50,8% do total das contagens realizadas (59) ocorreram na classe referente a 113 cromossomos, constituindo uma moda bem nítida. Além disso, a 30,0% das metáfases desta classe foram atribuídos de 6 a 8 pontos indicando com bastante segurança a não ocorrência de mosaicismo cromossômico para a variedade em questão. O número de cromossomos indicado por DUTT & RAO (1956), 118, diferiu do resultado aqui obtido, embora com estabilidade nos dois casos.

Tabela 6. Avaliação dos pré-tratamentos testados em pontas de raízes de cana-de-açúcar, variedade Co419.

Pré-tratamentos	Duração (h)	Tempe- ratura (°C)	Nº de raízes observadas	Nº de metáfases observadas	Média de metáfases / raiz	Média dos pontos con- feridos
A) Isolados						
Colchicina 0,1%	4	T.A.	11	-	-	-
Colchicina 0,1%	5	T.A.	04	01	0,25	3,0
8-hidroxiquinolina 0,03%	3	T.A.	04	-	-	-
1-Bromonaftaleno 1 go/10 ml	1	T.A.	04	-	-	-
1-Bromonaftaleno 1 go/10 ml	2	T.A.	06	-	-	-
B) Combinados						
Ciclo. ¹ + Colch. ² (1:1) + bromo. ³	5	15	06	-	-	-
8-Hidroxi. 0,03% + DMSO ⁴	3	T.A.	05	-	-	-
Colch. + 8-Hidroxi. ⁵ (1:1)	5	T.A.	19	01	0,05	5,0
Ciclo. + Colch. (1:1)	5	T.A.	12	16	1,33	3,2
Ciclo. + Colch. (1:1)	5	15	09	-	-	-
Ciclo. + 8-Hidroxi. (1:1)	5	T.A.	31	12	0,39	3,6
Ciclo. + 8-Hidroxi. (1:1)	5	15	07	-	-	-
Ciclo. 70ppm + 1-Bromo + DMSO	3	T.A.	13	23	1,77	6,0
Ciclo. 70ppm + 1-Bromo + DMSO	4	T.A.	12	04	0,33	3,8
Ciclo. + 8-Hidroxi. + Colch.(1,5:1:1,5)	5	T.A.	08	01	0,13	5,0
Ciclo. + Colch.(1:1) + 1-Bromo+DMSO	5	T.A.	08	01	0,13	3,0

¹ Solução estoque 140 ppm de cicloheximida.

² Solução estoque 0,1% de colchicina.

³ e ⁴ Uma gota de 1-bromonaftaleno ou dimetilsulfóxido.

⁵ Solução estoque 600 ppm de 8-hidroxiquinolina.

Figura 6. Metáfase mitótica em ponta de raiz da variedade Co419, onde se determinou 113 cromossomos e se atribuiu 8 pontos. O pré-tratamento utilizado foi a combinação de cicloheximida (70 ppm) + 1-bromonaftaleno + DMSO, durante 3 horas.

Figura 7. Distribuições dos números de cromossomos somáticos determinados em raízes da variedade Co419 e dois subclones.

* Total de células analisadas.

- Variedade IAC68-12

Os resultados dos pré-tratamentos testados para esta variedade, apresentados na Tabela 7, indicaram a eficiência da combinação do inibidor de síntese proteica, cicloheximida e do inibidor de fuso 8-hidroxiquinolina (na proporção de 1:1 partes dos estoques 140 e 600 ppm, respectivamente, durante 5 horas), em termos de média de metáfases/raiz, embora a média dos pontos atribuídos nas 21 metáfases avaliadas tenha sido 4,0. A Figura 8 ilustra os efeitos deste pré-tratamento sobre uma metáfase da referida variedade a qual se atribuiu um total de 5 pontos. Esta variedade apresentou como característica de seu cariótipo um microcromossomo, indicado pela seta na Figura 8.

Tabela 7. Avaliação dos pré-tratamentos testados em pontas de raízes de cana-de-açúcar, variedade IAC68-12.

Pré-tratamentos	Duração (h)	Tempe- ratura (°C)	Nº de raízes observadas	Nº de metáfases observadas	Média de metáfases/ raiz	Média dos pontos con feridos
A) Isolados						
1-Bromonaftaleno 1 go/4 ml	2,5	15	15	02	0,13	4,0
1-Bromonaftaleno 1 go/4 ml	2,5	T.A.	14	02	0,14	3,5
1-Bromonaftaleno 1 go/4 ml	3	T.A.	06	-	-	-
1-Bromonaftaleno 2 go/4 ml	2	15	09	-	-	-
1-Bromonaftaleno 2 go/4 ml	1,5	T.A.	06	-	-	-
1-Bromonaftaleno 3 go/4 ml	1	T.A.	04	-	-	-
B) Combinados						
Ciclo. ¹ + 8-hidroxi. ² (1:1)	3	10	09	-	-	-
Ciclo. + 8-hidroxi. (1:1)	4,5	T.A.	14	-	-	-
Ciclo. + 8-hidroxi. (1:1)	5	T.A.	14	21	1,50	4,0
Ciclo. + 8-hidroxi. (1,5:1)	5	T.A.	12	01	0,08	3,0
Ciclo. + 8-hidroxi. (1:1)+1-Bromo. ³	4	T.A.	07	01	0,14	6,0

¹ Solução estoque 140 ppm de cicloheximida.

² Solução estoque 600 ppm de 8-hidroxiquinolina.

³ Uma gota de 1-bromonaftaleno.

Figura 8. Metáfase mitótica em ponta de raiz da variedade IAC68-12, onde se determinou 112 cromossomos e se atribuiu 5 pontos. O pré-tratamento utilizado foi a combinação de cicloheximida e 8-hidroxiquinolina, 1:1 partes dos estoques 140 e 600 ppm, respectivamente, durante 5 horas. Seta indica microcromossomo característico do cariótipo da variedade.

Figura 9. Distribuições dos números de cromossomos somáticos determinados em raízes da variedade IAC68-12 e três subclones.

* Total de células analisadas.

A Figura 9 contem os resultados das contagens dos números de cromossomos de 27 metáfases, sendo que 17 delas (representando 63%) apresentaram 112 cromossomos. Destas, 41,2% obtiveram 5 e 6 pontos, constatando-se assim, que a maior frequência de metáfases de melhor qualidade esteve con centrada em uma nítida classe modal, indicando a não ocorrên cia de mosaicismo cromossômico nesta variedade.

- Variedade IAC68-144

Observando-se os pré-tratamentos testados para a variedade em questão verifica-se na Tabela 8 que ocorreu resposta razoável quanto a média de pontos atribuídos e a média de metáfases obtidas por raiz, para a combinação de cicloheximida e 8-hidroxiquinolina, na proporção de 1:1 partes dos estoques 140 e 600 ppm, respectivamente, durante 5 horas, em uma amostragem grande de raízes (40).

A Figura 10 mostra uma metáfase proveniente do pré-tratamento descrito e a qual foram atribuídos 6 pontos, observando-se também pelo menos dois pares de cromossomos satelitados, indicados pela seta.

Por outro lado, verificou-se também que o pré tratamento durante 2,5 horas com a combinação de cicloheximi da 70 ppm, 1-bromonaftaleno e DMSO conduziu a um aumento na média de metáfases/raiz e também ao aumento da média de pontos (5,8), refletindo portanto, a melhor qualidade das prepa rações obtidas, como é característico de combinações onde se

inclui o 1-bromonaftaleno. Contudo, deve ser levado em conta que, tais observações ocorreram em uma amostragem de 5 raízes, o que poderia representar um efeito de acaso.

Tabela 8. Avaliação dos pré-tratamentos testados em pontas de raízes de cana-de-açúcar, variedade IAC68-144.

Pré-tratamentos	Duração (h)	Tempe- ratura (°C)	Nº de raízes observadas	Nº de metáfases observadas	Média de metáfases/ raiz	Média dos pontos com feridos
A) Isolados						
1-Bromonaftaleno 1 go/4 ml	1,5	T.A.	09	-	-	-
1-Bromonaftaleno 1 go/4 ml	2	T.A.	06	-	-	-
1-Bromonaftaleno 1 go/4 ml	3	T.A.	04	-	-	-
1-Bromonaftaleno 1 go/4 ml	5	15	05	-	-	-
Paradiclorobenzeno (sol.saturada)	5	17	08	-	-	-
B) Combinados						
Ciclo. ¹ + 8-hidroxi. ² (1:1)	4,5	T.A.	48	-	-	-
Ciclo. + 8-hidroxi. (1:1)	5	T.A.	40	13	0,33	4,0
Ciclo. + 8-hidroxi. (1:1)	4	T.A.	27	08	0,29	3,3
Ciclo. + 8-hidroxi. (1,5:1)	4	T.A.	04	03	0,75	3,6
Ciclo. + 8-hidroxi.(1:1)+1-bromo. ³	3	T.A.	05	02	0,40	4,5
Ciclo. + 8-hidroxi. (1:1) + 1-bromo.	4	T.A.	35	-	-	-
Ciclo. + 8-hidroxi. (1:1)+1-bromo+DMSO ⁴	3	T.A.	29	06	0,21	3,2
Cicloheximida 70ppm + 1-bromo+DMSO	2	T.A.	12	01	0,08	3,0
Cicloheximida 70ppm + 1-bromo+DMSO	2,5	T.A.	05	04	0,80	5,8
Cicloheximida 70ppm + 1-bromo+DMSO	5	T.A.	36	03	0,08	4,3
Cicloheximida 70ppm + 1-bromo+DMSO	4	T.A.	18	-	-	-

¹ Solução estoque 140 ppm de cicloheximida

² Solução estoque 600 ppm de 8-hidroxiquinolina.

³ e ⁴ Uma gota de 1-bromonaftaleno ou dimetilsulfóxido.

O histograma da Figura 11, construído com os dados de todas as contagens efetuadas para a variedade em questão, indica que 57,5% das 40 metáfases analisadas apresentaram 115 cromossomos. A maior frequência de metáfases de melhor qualidade também esteve concentrada nesta classe, tendo ocorrido 34,8% de metáfases com 5 a 7 pontos atribuídos,

Figura 10. Metáfase mitótica em ponta de raiz da variedade IAC68-144, onde se determinou 115 cromossomos e se atribuiu 6 pontos. O pré-tratamento utilizado foi a combinação de cicloheximida e 8-hidroxiquinolina, 1:1 partes dos estoques 140 e 600 ppm, respectivamente, durante 5 horas. Setas indicam dois pares de cromossomos satelitados.

o que por sua vez permite concluir pela não ocorrência de mosaicismo cromossômico para a variedade.

Figura 11. Distribuições dos números de cromossomos somáticos determinados em raízes da variedade IAC68-144 e um subclone.

* Total de células analisadas.

De um modo geral, os resultados somente foram positivos quando os agentes de pré-tratamento foram utilizados combinadamente tendo por componente obrigatório o inibidor de síntese proteica, cicloheximida, associado, na maioria dos casos, ao inibidor de fuso, 8-hidroxiquinolina, conforme proposto por TLASKAL & HUTCHINSON (1974) e TLASKAL (1980). Segundo este último trabalho a superioridade dos pré-tratamentos combinados pode ser explicada postulando-se a seguinte sequência de eventos:

1 - Penetração rápida da cicloheximida nas cé

lulas meristemáticas, inibindo a maioria dos processos vitais de mitose e prevenindo que as células em metáfase prossigam no ciclo mitótico.

2 - A cicloheximida age tanto em cromossomos profásicos como metafásicos, conduzindo-os a uma supercontração.

3 - Posteriormente, a 8-hidroxiquinolina penetra nas células já afetadas pela cicloheximida e nas células em metáfase inibe o fuso mitótico, permitindo a dispersão dos cromossomos durante o "squash".

4 - A 8-hidroxiquinolina contrai somente cromossomos metafásicos, mantendo detalhes da morfologia dos cromossomos.

Neste trabalho, de um modo geral, tal pré-tratamento conduziu a um acúmulo de metáfases, com médias intermediárias de pontos conferidos. Uma segunda combinação de pré-tratamento eficiente para certas variedades estudadas nessa dissertação, foi a que incluiu a cicloheximida 70 ppm acrescida de 1-bromonaftaleno e DMSO, estando sua eficiência mais relacionada à qualidade das metáfases principalmente no aspecto da morfologia conferida aos cromossomos. Além da ação dos agentes de pré-tratamento sobre a dispersão e nitidez dos cromossomos foi fundamental para a obtenção de metáfases intactas, a ação da hidrólise enzimática proporcionada pela combinação da pectinase e celulase.

Deste modo, observando-se as distribuições ob

tidas para cada variedade estudada, em que sempre houve uma classe onde a moda se estabeleceu, aliada aos critérios de avaliação da qualidade das metáfases, concluiu-se pela não ocorrência do mosaicismo cromossômico nas mesmas. Esta constatação, contrariando o conceito mais ou menos generalizado de que a cana-de-açúcar seria portadora do mosaicismo cromossômico, pode ser discutida com base no fato de que para sua comprovação há necessidade de precauções especiais quanto às principais fontes de erros nas contagens de cromossomos de cana, caracteristicamente pequenos e em grande número, conforme citadas anteriormente (TLASKAL & HUTCHINSON, 1973).

Ainda a respeito das variações nas contagens de números cromossômicos relatadas na literatura para cana-de-açúcar, BONNEL (1980) concluiu que as mesmas parecem ser excessivas. O autor sugeriu inclusive, que estas poderiam ser resultantes de artefatos de técnica, uma vez que as classicamente utilizadas em citogenética vegetal estariam mal adaptadas para cana-de-açúcar, tornando impossível diferenciar as variações reais das variações determinadas pela utilização de metodologia de contagem insuficientemente dominada. Para contornar estes problemas o autor sugere um refinamento de metodologia baseado na utilização de protoplastos conforme proposto por MOURAS et alii (1978).

Entretanto, os resultados obtidos com a metodologia proposta no presente estudo proporcionaram determina

ções bastante confiáveis de números cromossômicos, demonstrando não ser imprescindível a utilização da metodologia de protoplastos em citogenética vegetal.

4.1.1. Avaliação preliminar do número de nucléolos em variedades de cana-de-açúcar

Observações realizadas no cariótipo de algumas das variedades utilizadas nesta dissertação, indicaram a ocorrência de pelo menos dois pares de cromossomos satelitados como por exemplo é indicado na Figura 10 (setas) para a variedade IAC68-144. A partir daí decidiu-se efetuar estudo preliminar para determinar o número de pares de cromossomos portadores de Região Organizadora do Nucléolo (NOR), através de metodologias de bandamento NOR, os quais viriam a se constituir em marcadores citológicos de valor, principalmente na avaliação de variações causadas pela cultura de tecidos.

Constatou-se que somente o método proposto por HOWELL & BLACK (1980), referido como método B, produziu marcações em metáfases da variedade NA56-79, conforme a Figura 12, muito embora se observe que a qualidade da metáfase quanto a dispersão e nitidez dos cromossomos não tenha sido boa. Uma das causas para a má qualidade das metáfases foi a ausência da hidrólise ácida, não prevista no método, mas que é fundamental para que se obtenha a separação das células em prepa-

rações de raízes de cana-de-açúcar, caracteristicamente fibrosas. Assim, haveria necessidade de se contornar tal ausência de modo a se obterem metáfases intactas com cromossomos bem dispersos e nítidos, passíveis de serem marcados de maneira distinta.

Figura 12. Metáfase mitótica da variedade NA56-79 onde se observa cromossomos apresentando marcações de ban das NOR (setas), obtidas pelo método B.

Deste modo, foram efetuadas somente observações preliminares do número de nucléolos em núcleos interfásicos das variedades NA56-79, IAC68-12 e IAC68-144, segundo o método B e, para efeito de comparação a variedade IAC68-12 foi avaliada também pelo método A.

A Figura 13 apresenta a distribuição dos números de nucléolos encontrados na avaliação daquelas variedades, cuja amplitude de variação foi de 1 a 9 nucléolos por célula em interfase. Tal número máximo de nucléolos encontrado estaria dentro do limite esperado para cana-de-açúcar, caso a hipótese da correlação entre a ploidia e o número máximo de nucléolos por célula em interfase, proposta por DE MOL (1928), se verificasse. Contudo, sabe-se que o número de nucléolos isoladamente nem sempre é indicador seguro do nível de ploidia da espécie, uma vez que está sujeito a variações citando-se entre elas as fusões nucleolares. Além disso, a variedade IAC68-12, testada pelos dois métodos indicou algumas diferenças quanto aos números encontrados que aparentaram ser devidas a metodologia de coloração. Assim, com o método A as maiores frequências de contagens ocorreram nas classes de 3, 4 e 5 nucléolos por célula, enquanto que com o método B as maiores frequências ocorreram nas classes de 2 e 3 nucléolos por célula. Tais fatos talvez possam ser justificados pelas condições de visualização fornecidas pelos próprios métodos. A metodologia de FERNANDEZ-GOMEZ et alii (1969) proporciona uma coloração contrastante entre os nucléolos e o núcleo, confor

me pode ser observado na Figura 14a, permitindo a visualização mesmo dos nucléolos menores, de modo muito seguro, diminuindo as oportunidades de erros de contagem. Ainda é característico nesta metodologia os nucléolos permanecerem mais individualizados reduzindo a incidência dos números menores de nucléolos por célula. Já a metodologia de HOWELL & BLACK (1980), talvez por ser mais rápida, não proporcione a necessária discriminação entre os nucléolos de tamanhos menores que ocorrem juntos, conforme a Figura 14b mostra, conduzindo a um aumento na frequência de números menores de nucléolos por célula.

Figura 13. Distribuição dos números de nucléolos determinados em núcleos interfásicos das variedades IAC-68-144, NA56-79 e IAC68-12.

1 - método B; 2 - método A

Figura 14. Núcleos interfásicos de células da variedade IAC-68-12, mostrando nucléolos. (a) coloração pelo método de FERNANDEZ-GOMEZ et alii (1969); (b) coloração pelo método de HOWELL & BLACK (1980).

4.2. ANÁLISE DO NÚMERO DE CROMOSSOMOS DE SUBCLONES DERIVADOS DE CULTURA DE TECIDOS

Os resultados dos testes de pré-tratamentos realizados com os subclones originados da variedade NA56-79 encontram-se nas Tabelas 9 a 15. Considerando-se que as variedades doadoras foram estudadas antes de seus subclones, foram testados nestes materiais primeiramente aqueles pré-tratamentos que proporcionaram os melhores resultados com a respectiva variedade doadora. Assim foi que, neste caso observou-se certa coincidência entre as combinações de agentes de pré-tratamento mais eficientes para a variedade doadora e para seus subclones. Os subclones 94 e 600 (Tabelas 9 e 12) apresentaram os melhores resultados quanto a média de metáfases/raiz com a combinação da cicloheximida e 8-hidroxiquinolina nas proporções de 1,5:1 partes dos estoques 140 e 600 ppm, respectivamente, durante 5 horas, tendo obtido média intermediária de pontos atribuídos. Para os subclones 250, 315, 1518 e 2050 (Tabelas 10, 11, 14 e 15) a proporção mais adequada dos mesmos agentes foi a de 1:1, durante 4 ou 5 horas, com exceção do subclone 2050 em que a duração do pré-tratamento foi de 2,5 horas. A redução no tempo de pré-tratamento neste caso, pode ser justificada porque foi utilizada para coleta de raízes a própria planta regenerada, ainda em fase de adaptação ao ambiente, possuindo sistema radicular de constituição menos fibrosa comparativamente ao das

Tabela 9. Avaliação dos pré-tratamentos testados em pontas de raízes de cana-de-açúcar, subclone 94 (NA56-79).

Pré-tratamentos	Duração (h)	Temperatura (°C)	Nº de raízes observadas	Nº de metáfases observadas	Média de metáfases/raiz	Média dos pontos com feridos
Ciclo. ¹ + 8-hidroxi. ² (1:1)	5	T.A.	30	08	0,27	4,0
Ciclo. + 8-hidroxi. (1,5:1)	5	T.A.	06	04	0,67	4,5
Cicloheximida 70ppm + 1-bromo ³ +DMSO ⁴	5	T.A.	06	02	0,33	4,0

Tabela 10. Avaliação dos pré-tratamentos testados em pontas de raízes de cana-de-açúcar, subclone 250 (NA56-79).

Pré-tratamentos	Duração (h)	Temperatura (°C)	Nº de raízes observadas	Nº de metáfases observadas	Média de metáfases/raiz	Média dos pontos com feridos
A) Isolados						
Paradiclorobenzeno (sol.saturada)	2	10	05	-	-	-
Paradiclorobenzeno (diluição 1:1)	3	T.A.	07	02	0,29	4,5
B) Combinados						
Ciclo. ¹ + 8-hidroxi. ² (1:1)	5	T.A.	12	11	0,92	4,0
Ciclo. + 8-hidroxi. (1,5:1)	5	T.A.	09	-	-	-
Cicloheximida 70ppm + 1-bromo ³ +DMSO ⁴	3,5	T.A.	13	-	-	-
Ciclo. + pDB ⁵ (1:1) + 1-bromo	4,5	10	09	-	-	-

Tabela 11. Avaliação dos pré-tratamentos testados em pontas de raízes de cana-de-açúcar, subclone 315 (NA56-79).

Pré-tratamentos	Duração (h)	Temperatura (°C)	Nº de raízes observadas	Nº de metáfases observadas	Média de metáfases/raiz	Média dos pontos com feridos
Ciclo. ¹ + 8-hidroxi. ² (1:1)	5	10	04	-	-	-
Ciclo. + 8-hidroxi. (1:1)	5	T.A.	14	12	0,86	4,5
Cicloheximida 70ppm + 1-bromo ³ +DMSO ⁴	4	T.A.	10	01	0,10	4,0

¹ Solução estoque 140 ppm de cicloheximida.

² Solução estoque 600 ppm de 8-hidroxiquinolina.

³ e ⁴ Uma gota de 1-bromonaftaleno ou dimetilsulfóxido.

⁵ Solução estoque saturada de paradichlorobenzeno.

plantas produzidas de toletes, facilitando provavelmente, a penetração e ação dos agentes de pré-tratamento em menor tempo. O único subclone que se diferenciou quanto aos agentes de pré-tratamento foi o 1325 (Tabela 13) em que a combinação mais eficiente foi a que envolveu a cicloheximida (35 ppm) acrescida de 1-bromonaftaleno e DMSO, durante 3 horas.

Tabela 12. Avaliação dos pré-tratamentos testados em pontas de raízes de cana-de-açúcar, subclone 600 (NA56-79).

Pré-tratamentos	Duração (h)	Temperatura (°C)	Nº de raízes observadas	Nº de metáfases observadas	Média de metáfases/raiz	Média dos pontos com feridos
A) Isolados						
Cicloheximida 70ppm	3	T.A.	10	06	0,60	3,8
1-bromonaftaleno 1 go/10 ml	2	T.A.	15	01	0,07	4,0
1-bromonaftaleno 1 go/10 ml	3	T.A.	10	-	-	-
1-bromonaftaleno 3 go/4 ml	1	T.A.	05	-	-	-
1-bromonaftaleno 1 go/4 ml	3	10	04	-	-	-
1-bromonaftaleno 1 go/4 ml	2	T.A.	37	-	-	-
1-bromonaftaleno 1 go/4 ml	2,5	T.A.	11	-	-	-
Paradiclorobenzeno (sol.saturada)	1	12	05	-	-	-
Paradiclorobenzeno (sol.saturada)	2	12	06	-	-	-
Paradiclorobenzeno (sol.saturada)	1,5	11	07	-	-	-
Paradiclorobenzeno (sol.saturada)	3	15	04	-	-	-
Paradiclorobenzeno (sol.saturada)	4	15	07	-	-	-
B) Combinados						
Ciclo. ¹ + 8-hidroxi. ² (1:1)	3	T.A.	25	02	0,08	5,0
Ciclo. + 8-hidroxi. (1:1)	3,5	T.A.	33	-	-	-
Ciclo. + 8-hidroxi. (1:1)	4	T.A.	27	03	0,11	4,0
Ciclo. + 8-hidroxi. (1:1)	5	T.A.	38	18	0,47	4,2
Ciclo. + 8-hidroxi. (1,5:1)	5	T.A.	26	21	0,81	4,7
Ciclo. + 8.hidroxi. (1:1)+1-bromo. ⁵	3	T.A.	07	-	-	-
Ciclo. + 8-hidroxi. (1:1)+1-bromo.	5	T.A.	16	-	-	-
Ciclo. + 8-hidroxi. (1:1)+DMSO ⁴	5	T.A.	11	03	0,27	5,0
Cicloheximida 70ppm + 1-bromo	3	T.A.	04	-	-	-
Cicloheximida 70ppm + 1-bromo+DMSO	3	T.A.	49	04	0,08	4,0
Cicloheximida 70ppm + 1-bromo+DMSO	5	T.A.	11	-	-	-
8-hidroxiquinolina 0,03% + 1-bromo	3	T.A.	05	-	-	-
8-hidroxiquinolina 0,03% + 1-bromo+DMSO	2,5	T.A.	08	-	-	-

¹ Solução estoque 140 ppm de cicloheximida

² Solução estoque 600 ppm de 8-hidroxiquinolina.

³ e ⁴ Uma gota de 1-bromonaftaleno ou dimetilsulfóxido.

Tabela 13. Avaliação dos pré-tratamentos testados em pontas de raízes de cana-de-açúcar, subclone 1325 (NA56-79).

Pré-tratamentos	Duração (h)	Tempe- ratura (°C)	Nº de raízes observadas	Nº de metáfases observadas	Média de metáfases / raiz	Média dos pontos con feridos
Ciclo. ¹ + 8-hidroxi. ² (1:1)	3	T.A.	19	01	0,05	6,0
Ciclo. + 8-hidroxi. (1:1)	3,5	T.A.	21	-	-	-
Ciclo. + 8-hidroxi. (1:1)	4	T.A.	76	08	0,11	4,4
Cicloheximida 35ppm + 1-bromo ³ +DMSO ⁴	3	T.A.	05	03	0,60	4,0
Cicloheximida 70ppm + 1-bromo +DMSO	3	T.A.	63	-	-	-

Tabela 14. Avaliação dos pré-tratamentos testados em pontas de raízes de cana-de-açúcar, subclone 1518 (NA56-79).

Pré-tratamentos	Duração (h)	Tempe- ratura (°C)	Nº de raízes observadas	Nº de metáfases observadas	Média de metáfases/ raiz	Média dos pontos con feridos
A) Isolados						
Paradichlorobenzene (sol.saturada)	5	15	04	-	-	-
B) Combinados						
Ciclo. ¹ + 8-hidroxi. ² (1:1)	4	T.A.	77	06	0,08	6,3
Cicloheximida 35ppm + 1-bromo ³ + DMSO ⁴	3	T.A.	08	-	-	-
Cicloheximida 70ppm + 1-bromo + DMSO	3	T.A.	32	01	0,03	4,0

Tabela 15. Avaliação do pré-tratamento testado em pontas de raízes de cana-de-açúcar, subclone 2050 (NA56-79).

Pré-tratamento	Duração (h)	Tempe- ratura (°C)	Nº de raízes observadas	Nº de metáfases observadas	Média de metáfases/ raiz	Média dos pontos con feridos
Ciclo. ¹ + 8-hidroxi. ² (1:1)	2,5	T.A.	19	04	0,21	5,0

¹ Solução estoque 140 ppm de cicloheximida.

² Solução estoque 600 ppm de 8-hidroxiquinolina.

³ e ⁴ Uma gota de 1-bromonaftaleno ou dimetilsulfóxido.

Quanto aos resultados das contagens de números de cromossomos somáticos dos subclones obtidos da variedade NA56-79, contidos na Figura 3, observa-se que na classe correspondente a 114 cromossomos ocorreu a maior frequência de contagens em todos os sete subclones analisados. Também pode ser verificado que, no caso dos subclones 94, 250, 315, 1325, 1518 e 2050, a maioria das metáfases as quais se atribuiu maior número de pontos e portanto com melhor qualidade, ocorreram na classe em que a moda se estabeleceu, de onde se conclui que os referidos subclones não variaram em relação a doadora. Pode ser observado ainda que, o número total de metáfases avaliadas nestes subclones foi menor que o total avaliado para a variedade doadora, demonstrando tal fato a possibilidade de se obter conclusões mesmo com número baixo de observações, desde que se aprimore a qualidade das metáfases, como mostrado pelo subclone 2050 onde somente quatro metáfases foram suficientes para demonstrar a não ocorrência de variação no aspecto do número de cromossomos.

Por outro lado, o subclone 600 se constituiu numa exceção uma vez que além de uma classe onde ocorreu a maior frequência de metáfases (32,8%) observou-se também frequências relativamente altas de metáfases nas classes de 115 e 116 cromossomos (20,7%), além da presença de 16,7% de metáfases a que foram atribuídos 6 pontos na classe de 115 cromossomos e em 10,0% das metáfases da classe de 117 cromossomos, o que garante razoável confiabilidade para estas conta-

gens. Em outras palavras, tais contagens podem não se tratar apenas de desvios gerados por imperfeições da técnica. Estes fatos considerados em conjunto levam a suposição de que o referido subclone possa ser portador de certa instabilidade cromossômica de pequena amplitude. As Figuras 15, 16a e 16b ilustram metáfases onde se contaram 114 (5 pontos), 115 (6 pontos) e 117 (4 pontos) cromossomos, respectivamente. Outro ponto a ser ressaltado é o referente a presença de um cromossomo de aspecto atípico e de um microcromossomo na Figura 16b (setas), sugerindo uma provável quebra cromossômica envolvida no aumento do número de cromossomos, a qual poderia talvez se relacionar com a grande suscetibilidade ao carvão da cana, verificada neste subclone.

Figura 15. Metáfase mitótica em ponta de raiz do subclone 600, a qual se atribuiu 5 pontos, mostrando o mesmo número de cromossomos que a doadora, NA56-79, $2n=114$. O pré-tratamento utilizado foi a combinação de cicloheximida e 8-hidroxiquinolina, 1:1 partes dos estoques 140 e 600 ppm, respectivamente, durante 5 horas.

Figura 16. Metáfases mitóticas em pontas de raízes do subclone 600, mostrando pequena instabilidade quanto ao número de cromossomos, em relação a variedade doadora, NA56-79. O pré-tratamento utilizado foi a combinação da cicloheximida e 8-hidroxiquinolina, 1:1 partes dos estoques 140 e 600 ppm, respectivamente, durante 3 e 4 h. (a) Figura onde se determinou $2n=115$ e a qual se atribuiu 6 pontos; (b) Figura onde se determinou $2n=117$ e a qual se atribuiu 4 pontos. Setas indicam cromossomo atípico e microcromossomos.

Os resultados dos testes de pré-tratamentos realizados para a obtenção de metáfases nítidas do subclone 2071, originado da variedade POJ2878, encontram-se na Tabela 16. Por ela se verifica que somente se obtiveram metáfases nítidas quando se utilizou a combinação da cicloheximida (140 ppm) e 8-hidroxiquinolina (600 ppm) na proporção de 1:1 partes durante 2 horas, o que correspondeu a um dos pré-tratamentos mais eficientes para a variedade POJ2878, apenas que nesta, sua duração foi de 5 horas. As razões para a redução do período de pré-tratamento podem ser, provavelmente, as mesmas sugeridas para o caso do subclone 2050.

A distribuição dos números cromossômicos obtida para o subclone 2071 é dada na Figura 5 onde se observa maior frequência de metáfases com 118 cromossomos, do mesmo modo que na variedade doadora POJ2878, acrescentando-se a isto o fato de que nesta classe ocorreu a maior frequência de metáfases a que se atribuiu 7 pontos.

Tabela 16. Avaliação dos pré-tratamentos testados em pontas de raízes de cana-de-açúcar, subclone 2071 (POJ-2878).

Pré-tratamentos	Duração (h)	Tempe- ratura (°C)	Nº de raízes observadas	Nº de metáfases observadas	Média de metáfases/ raiz	Média dos pontos con feridos
Ciclo. ¹ + 8-hidroxi. ² (1:1)	2	T.A.	30	09	0,30	4,8
Cicloheximida 70ppm + 1-bromo ³ +DMSO ⁴	2	T.A.	07	-	-	-

¹ Solução estoque 140 ppm de cicloheximida.

² Solução estoque 600 ppm de 8-hidroxiquinolina.

³ e ⁴ Uma gota de 1-bromonaftaleno ou dimetilsulfóxido.

Os resultados dos testes de pré-tratamentos efetuados com dois subclones originários da variedade Co419 encontram-se nas Tabelas 17 e 18. Para o subclone 2060 (Tabela 17) o pré-tratamento que melhores resultados apresentou em termos de média de metáfases/raiz, foi a combinação da cicloheximida (70 ppm) acrescida de 1-bromonaftaleno e DMSO, por 2,5 horas, enquanto para o subclone 2061 testou-se somente o pré-tratamento padrão ou seja cicloheximida (140 ppm) e 8-hidroxiquinolina (600 ppm) na proporção de 1:1 partes, durante 3 horas. Desde modo, somente o subclone 2060 coincidiu com sua variedade doadora quanto ao pré-tratamento mais eficiente, apenas que com menor tempo de exposição ao mesmo, talvez pelas mesmas razões sugeridas para o subclone 2050.

Tabela 17. Avaliação dos pré-tratamentos testados em pontas de raízes de cana-de-açúcar, subclone 2060 (Co419).

Pré-tratamentos	Duração (h)	Tempe- ratura (°C)	Nº de raízes observadas	Nº de metáfases observadas	Média de metáfases/ raiz	Média dos pontos con- feridos
A) Isolados						
Paradiclorobenzeno (sol.saturada)	3	15	04	-	-	-
B) Combinados						
Ciclo. ¹ + 8-hidroxi. ² (1:1)	2	T.A.	10	05	0,30	5,0
Ciclo. + 8-hidroxi. (1:1)	2,5	T.A.	08	05	0,38	3,7
Cicloheximida 70ppm + 1-bromo ³ +DMSO ⁴	2	T.A.	23	06	0,26	4,5
Cicloheximida 70ppm + 1-bromo + DMSO	2,5	T.A.	06	05	0,50	3,7

¹ Solução estoque 140 ppm de cicloheximida.

² Solução estoque 600 ppm de 8-hidroxiquinolina.

³ e ⁴ Uma gota de 1-bromonaftaleno ou dimetilsulfóxido.

Tabela 18. Avaliação do pré-tratamento testado em pontas de raízes de cana-de-açúcar, subclone 2061 (Co419).

Pré-tratamento	Duração (h)	Tempe- ratura (°C)	Nº de raízes observadas	Nº de metáfases observadas	Média de metáfases/ raiz	Média dos pontos con- feridos
Ciclo. ¹ + 8-hidroxi. ² (1:1)	3	T.A.	29	05	0,17	4,0

¹ Solução estoque 140 ppm de cicloheximida.

² Solução estoque 600 ppm 8-hidroxiquinolina.

Quanto aos resultados das contagens dos números de cromossomos a Figura 7 revela que, tanto para o subclone 2060 como 2061 a maior frequência de contagens ocorreu na classe de 113 cromossomos. Além disso, pode ser observado que foi nesta classe onde se verificou a maior frequência de metáfases a que se atribuiu maior número de pontos.

Os resultados referentes aos testes de pré-tratamentos efetuados com três subclones da variedade IAC68-12 encontram-se nas Tabelas 19 a 21. Nelas se observa que os pré-tratamentos mais eficientes no sentido de produzir maiores médias de metáfases/raiz foram diferenciados entre os subclones. Assim, para o subclone 1351 o pré-tratamento mais satisfatório foi o resultante da combinação da cicloheximida 35 ppm com 1-bromonaftaleno e DMSO, durante 2,5 horas do qual se pode observar o efeito através da Figura 17, onde se observa o bom grau de contração dos cromossomos, a pequena sobreposição dos mesmos, a integridade celular e onde se atribuiu 7 pontos.

Tabela 19. Avaliação dos pré-tratamentos testados em pontas de raízes de cana-de-açúcar, subclone 1062 (IAC-68-12).

Pré-tratamentos	Duração (h)	Tempe- ratura (°C)	Nº de raízes observadas	Nº de metáfases observadas	Média de metáfases/ raiz	Média dos pontos con feridos
Ciclo. ¹ + 8-hidroxi. ² (1:1)	5	T.A.	67	02	0,03	4,0
Ciclo. + 8-hidroxi. (1,5:1)	5	T.A.	10	10	1,00	4,0
Ciclo. + 8-hidroxi.(1:1)+DMSO ³	5,5	T.A.	10	-	-	-
Ciclo. + 8-hidroxi.(1:1)+1-bromo ⁴ +DMSO	3	T.A.	17	-	-	-
1-bromo+DMSO (1 go/10 ml)	3	T.A.	17	-	-	-

Tabela 20. Avaliação dos pré-tratamentos testados em pontas de raízes de cana-de-açúcar, subclone 1351. (IAC68-12)

Pré-tratamentos	Duração (h)	Tempe- ratura (°C)	Nº de raízes observadas	Nº de metáfases observadas	Média de metáfases/ raiz	Média dos pontos con feridos
A) Isolados						
Paradiclorobenzeno (sol.saturada)	3	15	17	-	-	-
B) Combinados						
Ciclo. ¹ + 8-hidroxi. ² (1:1)	3	T.A.	05	-	-	-
Ciclo. + 8-hidroxi. (1:1)	4	T.A.	63	-	-	-
Ciclo. + 8-hidroxi. (1:1)	5	T.A.	44	01	0,02	6,0
Ciclo. + 8-hidroxi. + 1-bromo ³	3	T.A.	17	-	-	-
Ciclo. + 8-hidroxi. + 1-bromo	4	T.A.	21	-	-	-
Cicloheximida 35ppm + 1-bromo+DMSO ⁴	2,5	T.A.	23	06	0,26	4,8
Cicloheximida 35ppm + 1-bromo+DMSO	3	T.A.	13	-	-	-
Cicloheximida 70ppm + 1-bromo+DMSO	3	T.A.	21	-	-	-

¹ Solução estoque 140 ppm de cicloheximida.

² Solução estoque 600 ppm de 8-hidroxiquinolina.

³ e ⁴ Uma gota de 1-bromonaftaleno ou dimetilsulfóxido.

Tabela 21. Avaliação dos pré-tratamentos testados em pontas de raízes de cana-de-açúcar, subclone 1647. (IAC68-12).

Pré-tratamentos	Duração (h)	Temperatura (°C)	Nº de raízes observadas	Nº de metáfases observadas	Média de metáfases/raiz	Média dos pontos com feridos
A) Isolados						
1-bromonaftaleno (1 go/4 ml)	1,5	T.A.	20	-	-	-
1-bromonaftaleno (1 go/4 ml)	2	T.A.	23	01	0,04	6,0
1-bromonaftaleno (2 go/4 ml)	2	T.A.	33	08	0,24	4,9
B) Combinados						
Ciclo. ¹ + 8-hidroxi. ² (1,5:1)	4	T.A.	10	-	-	-
Ciclo. + 8-hidroxi. (1:1)	5	T.A.	32	04	0,13	4,3
Ciclo. + 8-hidroxi. (1:1)+1-bromo ³	4	T.A.	08	-	-	-
Cicloheximida 70ppm + 1-bromo.	4,5	T.A.	04	-	-	-
Cicloheximida 70ppm + 1-bromo+DMSO ⁴	4	T.A.	14	-	-	-
Cicloheximida 70ppm + 1-bromo+DMSO	4,5	T.A.	13	-	-	-

¹ Solução estoque 140 ppm de cicloheximida.

² Solução estoque 600 ppm de 8-hidroxiquinolina.

³ e ⁴ Uma gota de 1-bromonaftaleno ou dimetilsulfóxido.

O subclone 1062 apresentou melhor resposta ao pré-tratamento composto pela cicloheximida (140 ppm) adicionado de 8-hidroxiquinolina (600 ppm) na proporção de 1,5 : 1 partes, durante 5 horas. Por outro lado, o subclone 1647 constituiu-se em uma exceção, uma vez que foram obtidos os melhores resultados com o uso de 1-bromonaftaleno na proporção de 2 gotas em 4 ml de água, durante 2 horas, como mostra a Figura 18. Este portanto, foi o único caso onde se obteve resultados positivos com um inibidor de fuso, utilizado isoladamente.

O fato de o pré-tratamento mais eficiente para a variedade doadora IAC68-12 não ter assim se comportado para os três subclones parece indicar que o estado fisiológico destes materiais deve ter sido diferenciado e provavelmente de uma maneira não controlada nas condições do presente estudo.

Figura 17. Metáfase mitótica em ponta de raiz do subclone 1351, onde se determinou 112 cromossomos, conservando portanto, o mesmo número que a doadora IAC68-12, e se atribuiu 7 pontos. O pré-tratamento utilizado foi a combinação de cicloheximida (35 ppm) + 1-bromonaftaleno + DMSO, durante 2,5 horas. A seta indica microcromossomo característico.

Figura 18. Metáfase mitótica em ponta de raiz do subclone 1647, onde se determinou 112 cromossomos conservando portanto, o mesmo número que a doadora IAC68-12 e se atribuiu 6 pontos. O agente de pré-tratamento utilizado foi o 1-bromonaftaleno (2 gotas/4 ml de água, durante 2 horas). A seta indica microcromossomo característico.

A análise das Tabelas 19 a 21 mostra ainda que a taxa de obtenção de metáfases foi das menores nestes três materiais ou, em outras palavras, foi necessário preparar grande número de raízes para a obtenção de pequeno número de metáfases. Isto pode ter resultado do menor índice mitótico próprio do material ou outra condição fisiológica inadequada.

Verificou-se pelos histogramas de contagem de cromossomos (Figura 9) que, as maiores frequências de contagens e também as melhores, ocorreram sempre na classe de 112 cromossomos, evidenciando tendência para estabilidade quanto ao número de cromossomos nos subclones derivados da variedade IAC68-12. Nas Figuras 17 e 18 pode ser observado ainda, a presença do microcromossomo (setas) característico da variedade doadora, fornecendo mais uma evidência de não ter havido variação entre os subclones, pelo menos no aspecto do número de cromossomos.

Quanto ao subclone 1214, derivado da variedade IAC68-144, os resultados referentes a avaliação dos pré-tratamentos constam da Tabela 22. Nela se observa que, o pré-tratamento mais efetivo foi a combinação da cicloheximida (70 ppm) acrescido de 1-bromonaftaleno e DMSO por 3 horas, coincidindo portanto, com um dos melhores pré-tratamentos verificados para a variedade doadora IAC68-144. A Figura 11 mostra claramente que, na classe de 115 cromossomos, ocorreu não só a maior frequência de metáfases (60%) como também a maior frequência de metáfases de boa qualidade ou se-

ja, a 66,6% delas se atribuiu 6 ou 7 pontos, evidenciando tam
bém aqui uma tendência para a manutenção do mesmo número de
cromossomos verificado na doadora.

Tabela 22. Avaliação dos pré-tratamentos testados em pontas
de raízes de cana-de-açúcar, subclone 1214.
(IAC68-144)

Pré-tratamentos	Duração (h)	Tempe- ratura (°C)	Nº de raízes observadas	Nº de metáfases observadas	Média de metáfases/ raiz	Média dos pontos con feridos
Ciclo. ¹ + 8-hidroxi. ² (1:1)	2	T.A.	04	-	-	-
Ciclo. + 8-hidroxi.(1:1)	3,5	T.A.	04	01	0,25	4,0
Ciclo. + 8-hidroxi.(1:1)	4	T.A.	22	-	-	-
Cicloheximida 70ppm + 1-bromo ³ +IMSO ⁴	2,5	-T.A.	04	03	0,75	6,0
Cicloheximida 70ppm + 1-bromo +IMSO	3	T.A.	06	06	1,00	5,5

¹ Solução estoque 140 ppm de cicloheximida.

² Solução estoque 600 ppm de 8-hidroxiquinolina.

³ e ⁴ Uma gota de 1-bromonaftaleno ou dimetilsulfóxido.

A análise citológica de subclones originados da cultura de tecidos de diferentes genótipos indicou que, de um modo geral, a taxa de variação verificada quanto ao número de cromossomos foi relativamente baixa. Na realidade o que se observou foi uma tendência acentuada para a conservação do mesmo número de cromossomos encontrado para as variedades doadoras. Estas por sua vez também foram consideradas estáveis cromossomicamente, ou seja, não portadoras de mosaicismo cromossômico, sendo que os desvios em relação a moda foram devidos a erros de interpretação causados por pro

blemas relacionados a qualidade das preparações, de onde se justifica o emprego da escala de pontos.

Considerando-se a variedade NA56-79 onde se analisou o maior número de subclones, provenientes dos dois tipos de explantes utilizados neste trabalho e também após períodos variáveis de manutenção em fase de calo (Tabela 3 da Seção de Material e Métodos), observou-se que somente o subclone 600 talvez possa ser considerado portador de pequena instabilidade quanto ao parâmetro avaliado.

Os resultados da análise citológica dos subclones regenerados da cultura de tecidos somáticos aqui relatados diferiram dos resultados, por exemplo, de KRISHNAMURTHI & TLASKAL (1974) onde os autores analisando 17 subclones derivados da variedade Pindar encontraram distribuições bastante diferenciadas em relação a variedade doadora, com números cromossômicos menores e maiores em relação a média (105).

Muitos trabalhos da literatura indicam o 2,4-D como um dos componentes do meio de cultura passível de induzir variações nos números de cromossomos tanto em suspensões celulares (SUNDERLAND, 1977) como em plantas regeneradas após cultivo em meio sólido (DEAMBROGIO & DALE, 1980). De outro lado também são encontrados trabalhos onde foram contatadas correlações inversas entre alterações numéricas em culturas de tecidos e a presença de 2,4-D no meio de cultura. KALLACK & YARVEKYLIG (1971) descreveram um relacionamento inverso entre a concentração de 2,4-D e o grau de poliploidização em culturas de células de ervilha. De acordo com os

autores o 2,4-D em baixa concentração (0,25 mg/l ou 1,1 μ M) teria aumentado a frequência de mitoses poliplóides e diminuído a de mitoses diplóides com o envelhecimento das subculturas, mas quando aplicado na concentração de 20 mg/l (90,5 μ M) favoreceria a entrada em divisão das células diplóides.

Deste modo a ação do 2,4-D na indução de alterações numéricas em células *in vitro* é bastante controversa, embora deva ser ressaltado que muitos outros efeitos além do 2,4-D possam ter se somado para produzir os resultados citados.

Os resultados aqui obtidos permitem supor que o 2,4-D contido nos meios de cultura onde foram mantidos os calos por períodos variáveis (máximo 10 meses), mesmo em altas doses, 400 e 200 μ M, das quais se originou a maioria dos subclones analisados, induziu baixa taxa de variação quanto ao número de cromossomos, não se descartando porém, a possibilidade de ocorrência de mutações gênicas entre os subclones. Deve ser citado ainda que, a maioria das plantas regeneradas avaliadas no presente estudo se originou de meios de cultura acrescidos de carvão ativado, o que pode ter contribuído para a remoção da auxina do meio de cultura conforme sugerido por FRIDBORG & ERIKSON (1975) e FRIDBORG et alii (1978), diminuindo deste modo os efeitos do 2,4-D na indução de variações.

4.3. ESTUDO HISTOLÓGICO DOS CALOS

O estudo histológico dos calos foi realizado com o objetivo de fornecer subsídios para análises citogenéticas posteriores, a nível dos próprios calos. Em outras palavras, para que o conhecimento da localização e evolução dos diversos tipos celulares que compõem os calos de cana-de-açúcar, possibilite maior eficiência na amostragem de regiões contendo mitoses, tanto para o caso de calos provenientes de meios de cultura contendo 2,4-D como para os calos em fase de regeneração (6-BA). Neste último caso constituiu-se também em uma tentativa de identificação do modo pelo qual se dava aquele processo, nas condições do presente trabalho.

Assim, os resultados aqui apresentados e discutidos originaram-se de observações efetuadas em várias amostragens de calos em presença de 2,4-D e em uma amostragem para a fase de regeneração, quando já se evidenciava a presença de nódulos verdes nos calos.

4.3.1. Calos mantidos em presença de 2,4-D

Na Figura 19 estão ilustrados os tipos celulares observados nas amostragens dos calos originados dos dois tipos de explantes de cana-de-açúcar cultivados em meio de cultura contendo 2,4-D, os quais arbitrariamente, foram numerados de 1 a 6, semelhantemente ao que foi feito em fumo

Figura 19. Tipos celulares observados em calos de cana-de-açúcar cultivados em meio de cultura contendo 2,4-D ($13,6 \mu\text{M}$).

- (a) Tipo 1, células com aspecto meristemático, alta relação núcleo-citoplasmática e alto índice mitótico.
- (b) Tipo 2, células com aspecto parenquimático e relação núcleo-citoplasmática menor que no tipo 1.
- (c) Tipo 3, células com aspecto parenquimático mas de tamanho maior que as do tipo 2, de arranjo compacto, estando na interface com as células do tipo 4 arranjadas em estratos, indicados pela seta.
- (d) Tipo 4, células de tamanho conspícuo, com os menores valores da relação núcleo-citoplasmática, arranjadas frouxamente.
- (e) Tipo 5, elementos traqueais do explante com seta indicando a proliferação celular a partir deles.
- (f) Tipo 6, elementos traqueais diferenciados no calo, indicados pela seta.
- (g) Área de oxidação do calo, indicada pela seta.

por FLOH (1983). Para esquematização dos cortes histológicos dos calos foram criadas legendas correspondentes aos mencionados tipos, encontrando-se tais esquemas nas Figuras 20 a 22, 24 e 25, desta Seção.

Após 1 mês de cultura (Figura 20), quase toda a massa dos calos compunha-se por células de aspecto meristemático, caracterizadas pela alta relação núcleo-citoplasmática e também pela presença de muitas divisões mitóticas. Tais células foram denominadas tipo 1 e são apresentadas com detalhes nas Figuras 19a e 23a1. Observou-se ainda que a proliferação celular que resultou na formação do calo, ocorreu ao nível dos feixes vasculares do explante, conforme pode ser visto na Figura 19e, confirmando estudos feitos por LIU et alii (1982) e por GUIDERDONI (1986), para explantes foliares de cana-de-açúcar. LIU et alii (1982) propuseram que, a nível do feixe vascular as células que entram em divisão seriam semelhantes àsquelas do meristema cambial baseando-se para tanto, no trabalho de ARTSCHWAGER (1925) onde o autor já demonstrava que, em bainhas foliares de cana-de-açúcar os feixes vasculares apresentavam células cambiais entre o xilema e o floema primários. Esta observação foi confirmada também por MORELAND & FLINT (1942). Pelo exposto, é provável que, a proliferação celular na região dos feixes vasculares, verificada no presente estudo, seja resultante da divisão das células cambiais, pois a fonte de explantes utilizada, folhas jovens, trata-se na realidade, de um conjunto de limbos

Figura 20. Esquema do corte histológico do explante folhas jovens, após 1 mês em meio de cultura contendo 2,4-D (meio II).

Legenda válida para as figuras 20 a 22, 24 e 25.

Tipo 1

Tipo 2

Tipo 3

Tipo 4

Tipo 5

Tipo 6

Regiões de oxidação do calo

Contorno do calo

Contorno do explante

e bainhas foliares superpostas. A região inoculada no meio de cultura, que corresponde à porção mais próxima do meristema apical, na qual ocorreu o crescimento dos calos, é de fato, composta por bainhas foliares.

Após 3 e 6 meses de cultura, os cortes histológicos dos calos ainda revelaram sua origem associada aos feixes vasculares do explante, conforme pode ser observado nas Figuras 21a e 21b, respectivamente. Nestas duas fases observou-se a ausência do tipo celular predominante no primeiro mês, ou seja, das células do tipo 1. Em substituição a este tipo, observou-se nas regiões de proliferação celular, próximas aos feixes vasculares do explante e portanto, internamente na massa do calo, células caracterizadas por uma relação núcleo-citoplasmática menor que no tipo 1 e com menor número de mitoses. Tais células de aspecto parenquimático, ocupando menos da metade da massa do calo, foram denominadas de tipo 2 (Figuras 19b e 23a₂). Na amostra de 6 meses observou-se ainda, a presença de grupos de elementos traqueais diferenciados no calo, denominados de tipo 6 (Figura 19f, seta). Em ambas as amostras, observou-se também que, ao redor das células do tipo 2, ocupando a parte externa da massa do calo, ocorreu um outro tipo celular, denominado tipo 4 (Figura 19d), caracterizado por células de tamanho conspícuo, arranjas frouxamente, com núcleos pequenos, nem sempre evidenciados devido ao tamanho das células e ao posicionamento parietal dos mesmos e também onde não se observou a

a

b

Figura 21. Esquemas dos cortes histológicos do explante folhas jovens, após 3 meses (a) e 6 meses (b) em meio de cultura contendo 2,4-D (meio II).

presença de divisões celulares. Estas células correspondem ao padrão IV, descrito por FLOH (1983) em *Nicotiana tabacum* e denominadas hiperhídricas por PETERS (1980). Segundo FLOH (1983) e FLOH & HANDRO (1985), as células do padrão IV ocorreram com maior frequência em calos de fumo incubados no escuro, conferindo-lhes aspecto friável. No presente estudo, a indução e manutenção dos calos também ocorreu na ausência de luz. Segundo aqueles autores, o fator luz é muito importante para o controle do crescimento e organização estrutural do calo. Sua influência poderia ser vista como resultante de sua atuação sobre processos que afetam o balanço hormonal endógeno, como por exemplo a fotoxidação do IAA, aumento na atividade de peroxidase com consequente redução do IAA e aumento na síntese de citocininas (FLOH & HANDRO, 1985).

Aos 9 meses de cultura (Figura 22a), as observações realizadas nos cortes dos calos indicaram a presença de um tipo celular com tamanho intermediário entre os tipos 2 e 4, denominado tipo 3. Neste tipo (Figura 19c) o arranjo das células não é frouxo sendo que, na interface com as células do tipo 4 apresentam-se arranjadas em estratos. Assim como no tipo 4, apresentam núcleos pequenos nem sempre evidenciados, devido ao tamanho relativamente grande das células e também não se observam divisões celulares. Nesta fase observou-se que o calo era composto por maiores proporções dos tipos 3 e 4 mas apresentou, em posições mais periféricas, pequenas proporções dos tipos 1 e 2.

a

b

Figura 22. Esquemas dos cortes histológicos do explante folhas jovens, após 9 meses (a) e 12 meses (b) em meio de cultura contendo 2,4-D (meio II).

Os calos, aos 12 meses de cultura (Figura 22b), apresentaram-se constituídos principalmente pelas células do tipo 4; apenas nas regiões periféricas apareceram pequenos agrupamentos de células dos tipos 2 e 3.

O aumento progressivo na proporção de células hiperhídricas (tipo 4) na composição dos calos, de acordo com a idade destes, pareceu estar associado a queda na totipotência verificada nas condições deste estudo. As observações realizadas nos diferentes meses de cultura em 2,4-D revelaram que, nos primeiros meses, os tipos celulares que predominam nos calos compreendem células com aspecto meristemático (tipo 1) e parenquimático (tipo 2), ou seja, células potencialmente capazes de entrar em divisão. Com o passar do tempo, a proporção destas células na constituição dos calos decresce à medida que aumenta a proporção de células dos tipos 3 e, principalmente, do tipo 4, ou seja, células que aparentemente, não apresentam potencial de rediferenciação. BHOJWANI & RAZDAN (1983) apresentam três hipóteses para justificar a perda do potencial morfogenético em culturas prolongadas. Na hipótese genética, as alterações nucleares seriam as responsáveis pelo fenômeno; na hipótese fisiológica, a perda da totipotência é justificada por alterações no balanço hormonal interno das células e dos tecidos ou pela sensibilidade das células a substâncias de crescimento exógenas; a hipótese da competição, formulada por SMITH & STREET (1974) para culturas prolongadas de cenoura, combina as duas hipóteses anteriores. Estes últimos autores verificaram que as culturas de calos com alto potencial embriogênico eram tipicamente opacas, com superfície nodular sendo que, as células dos nódulos, eram pequenas, com citoplasma denso e ricas em amido. As culturas com pouco ou ne-

nhum potencial embriogênico eram tipicamente translúcidas, brilhantes e úmidas, contendo numerosas células vacuolizadas e de grande tamanho. Nestas culturas, a relação peso úmido por peso seco foi superior àquela das culturas embriogênicas. A descrição apresentada por SMITH & STREET (1974) para as células presentes nas culturas sem potencial morfogenético, assemelha-se àquela apresentada no presente estudo para as células do tipo 4, denominadas por PETERS (1980), hiperhídricas. De acordo com a hipótese da competição, a perda da totipotência seria resultante da ação inibitória decorrente da predominância do tipo celular não embriogênico o qual, por sua vez, teria sido favorecido de forma seletiva, pelas condições do meio de cultura. Os resultados obtidos no presente trabalho parecem confirmar esta hipótese. É interessante observar que a sequência de eventos que culminam com a perda da totipotência em culturas de calos prolongadas têm muitos aspectos comuns mesmo para espécies distintas como a cana-de-açúcar e a cenoura (SMITH & STREET, 1974).

A outra fonte de explantes utilizada neste trabalho foi a região submeristemática. É necessário considerar que esta região consiste do meristema apical e de vários primórdios de nós e respectivas gemas situados abaixo deste. Tais primórdios de nós são muito próximos uns dos outros havendo, portanto pouco tecido internodal. Cortes longitudinais permitem observar uma grande proporção de feixes vasculares que constituem o sistema vascular dos primórdios foliares de cada nó (ARTSCHWAGER, 1925).

Os esquemas dos cortes histológicos realizados em amostras com 1, 2,5, 4 e 5 meses de cultura encontram-se nas Figuras 24 e 25.

Nos calos obtidos após 1 mês de cultura (Figura 24a), as células do tipo 1 constituíram a região de proliferação celular que esteve associada às regiões do sistema vascular, já desorganizado, do explante. Ao redor das células do tipo 1 observou-se a presença das células do tipo 2 e, mais externamente, das células do tipo 4, além de áreas de oxidação na região de contacto do calo com o meio de cultura (Figura 19g).

Após 2,5 meses de cultura (Figura 24b), cortes transversais do domo apical, mostraram claramente a associação entre os feixes vasculares dos primórdios foliares e a região de multiplicação celular do calo, composta por células do tipo 1, mostrada com detalhe na Figura 26. Esta última região ocorreu no interior da massa do calo, na qual predominaram as células do tipo 4.

Os cortes histológicos dos calos com 4 (Figura 25a) e 5 meses de cultura (Figura 25b) não apresentaram células do tipo 1, porém ocorreram células dos tipos 2, 3 e 4 em proporções variáveis, sendo que houve predominância do último tipo, sugerindo o início da perda de potencial morfogênico dos calos. Observou-se ainda, nestas duas épocas amostradas, a presença de grupos de elementos traqueais (Figura 19f) em regiões distintas na massa dos calos.

Figura 24. Esquemas dos cortes histológicos do explante submeristemático, após 1 mês (a) e 2,5 meses (b) em meio de cultura contendo 2,4-D (meio II).

a

b

Figura 25. Esquemas dos cortes histológicos do explante submeristemático, após 4 meses (a) e 5 meses (b) em meio de cultura contendo 2,4-D (meio II).

Figura 26. Secção de um calo formado a partir do explante submeristemático, após 2,5 meses em meio de cultura contendo 2,4-D.

- (a) Proliferação celular, que resultou na formação do calo, originando-se ao nível dos feixes vasculares dos primórdios foliares (seta);
- (b) Detalhe de uma das proliferações citadas em (a).

De um modo geral, os principais aspectos verificados para esta fonte de explantes mostraram similaridades com aqueles observados para o explante folhas jovens.

Em termos de amostragem dos calos para análise citogenética no próprio calo, as observações anteriores sugeriram que, de um modo geral, no intervalo aproximado de 1 a 6 meses, as coletas deveriam ser realizadas mais internamente na massa do calo, de forma a garantir maior número de divisões, pois nestes locais foram observadas as maiores proporções de células dos tipos 1 ou 2, ou seja com aspecto meristemático e parenquimático, respectivamente. Após este periodo houve uma inversão neste padrão, observando-se um aumento progressivo na proporção das células dos tipos 3 e 4 localizadas internamente na massa do calo e sem a presença de divisões celulares. Nas regiões externas do calo observouse a ocorrência de células com aspecto meristemático e/ou parenquimático, indicando que as amostragens deveriam ser periféricas na massa do calo.

4.3.2. Calos em meio de regeneração (6-BA)

Os materiais utilizados para as análises histológicas da fase de regeneração foram obtidos de calos desenvolvidos em meio II (13,6 μ M de 2,4-D). Após a transferência destes calos para o meio de regeneração (10 μ M de 6-BA), observa-se normalmente uma proliferação celular originando

um calo friável sobre aquele já existente, ou seja, formado no meio II. Este último sofre um processo gradual de oxidação ao mesmo tempo em que ocorre a proliferação celular de coloração creme que, posteriormente, dará origem aos eixos vegetativos.

Numa das porções analisadas observou-se a presença de áreas constituídas de células de aspecto meristemático arranjadas de forma organizada (Figura 27a e a₁) semelhantemente ao que foi registrado por HO & VASIL (1983a), na Figura 26, como embrióides.

Em outras porções, os calos apresentavam células, de arranjo compacto, com núcleos nem sempre evidenciados nos cortes devido ao tamanho conspícuo das células e quase sempre em posição parietal. Em determinadas regiões do mesmo calo foram observadas células menores que as citadas anteriormente, contendo grãos de amido, identificados através de luz polarizada (Figura 28, setas). Na Figura 30c (seta) verifica-se que estas circundavam células de aspecto meristemático. Na literatura onde se descrevem aspectos histológicos da morfogênese *in vitro* a presença do amido tem sido sempre citada como uma evidência do início daquele processo, tanto via organogênese (THORPE, 1980) como embriogênese somática (KOHLENBACH, 1978 e BHOJWANI & RAZDAN, 1983). Nestes calos verificou-se ainda, a presença de células de aspecto meristemático e formato retangular, organizadas em estratos, associadas aos elementos traqueais (Figura 29, setas e 31, setas).

Figura 27. Secção de um calo formado em meio de regeneração (10 μM 6-BA) apresentando a região periférica organizada.

(a) aspecto geral da região.

(a₁) detalhe de (a).

Figura 28. Secção de um calo formado em um meio de regeneração ($10 \mu\text{M}$ 6-BA) mostrando uma área contendo células com citoplasma rico em grânulos de amido.
(a) aspecto geral da área (seta);
(a₁) detalhe de (a). As setas indicam grânulos de amido.

Figura 29. Secção de um calo formado em meio de regeneração (10 μM 6-BA). Nota-se, em aumentos progressivos (a, a₁ e a₂) a presença de células organizadas em estratos (setas).

Figura 30. Secções de calos formados em meio de regeneração ($10 \mu\text{M}$ 6-BA) observando-se em (a) e (b) a presença de determinadas regiões na massa do calo onde parece haver um princípio de organização (setas).
(c) detalhe de células de aspecto meristemático circundadas por células contendo grânulos de amido (seta).

Figura 31. Secção de um calo formado em meio de regeneração (10 μ M 6-BA), observando-se em aumentos progressivos (a, a_1 e a_2) a presença de uma região composta por células arranjadas em estratos (setas). Em (a_3), a seta indica elementos traqueais associados à esta região.

Pelo exposto, os calos obtidos a partir do meio de regeneração apresentavam potencial morfogenético. Este foi evidenciado pela presença de células, contendo grânulos de amido, associadas às células de aspecto meristemático e, pela ocorrência de estruturas com maior grau de organização (Figura 27). Porém, as análises realizadas, neste estudo, não permitiram definir se a morfogênese se processava via organogênese ou embriogênese somática. A análise efetuada não permitiu ainda, uma definição quanto às regiões de coleta para fins de análise citológica na fase de calo em regeneração. Isto porque foram observadas células de aspecto meristemático em locais distintos na massa do calo, ou seja, tais células ocorreram tanto periféricamente, como mostra a Figura 27, como em posições mais internas, conforme ilustra a Figura 30c. Talvez, através de uma amostragem mais ampla durante a fase de regeneração, fosse possível determinar o padrão de evolução das células de aspecto meristemático, elucidando tais dúvidas. Tal amostragem certamente contribuiria também, para a definição da via de regeneração predominante, nas condições de cultura citadas.

Outro ponto importante ainda, seria a adaptação de metodologia de fixação específica para calos em regeneração, que conduzisse a um rápido endurecimento dos mesmos, de modo a garantir a manutenção de sua integridade, uma vez que nesta fase em particular, o calo torna-se muito friável e portanto suscetível a quebras durante sua desidratação

e inclusão em parafina, conforme se verificou nas condições do presente trabalho.

5. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos no presente estudo pode-se estabelecer as seguintes conclusões:

1. Os dados de contagens do número de cromossomos somáticos referentes às cinco variedades comerciais de cana-de-açúcar, doadoras de tecidos, mostraram sempre haver determinado número cromossômico onde se verificou não só a maior frequência de metáfases mas também a presença daquelas com boa dispersão e nitidez dos cromossomos, o que permitiu concluir pela estabilidade cromossômica daqueles genótipos. Ao mesmo tempo foi observado ser fundamental um refinamento na metodologia de contagem, através de pré-tratamentos específicos e seleção nas metáfases analisadas, para se evitar constatações indevidas de mosaicismo cromossômico.

2. Treze dos subclones de cultura de tecidos analisados quanto ao número de cromossomos somáticos foram considerados estáveis cromossomicamente e não diferiram da variedade que lhes deu origem, segundo os critérios de ava-

liação estabelecidos. A única exceção foi o subclone 600, originário da variedade NA56-79, que aparentou ser portador de certa instabilidade quanto ao parâmetro avaliado.

3. Os pré-tratamentos com agentes inibidores do fuso e de síntese proteica somente se mostraram eficientes quando utilizados conjugadamente, tendo por componente obrigatório o inibidor de síntese proteica, cicloheximida. Entre os inibidores de fuso produziram bons resultados a 8-hidroxiquinolina e o 1-bromonaftaleno. A hidrólise enzimática realizada com pectinase + celulase foi essencial para a obtenção de células intactas, garantindo deste modo, a presença do complemento cromossômico integral.

4. As avaliações preliminares dos números de nucléolos em núcleos interfásicos, de algumas variedades de cana-de-açúcar, indicaram haver de 1 a 9 nucléolos por célula.

5. A proliferação celular que resultou na formação dos calos em presença de 2,4-D ocorreu ao nível dos feixes vasculares dos dois tipos de explantes analisados, compondo-se inicialmente de células de aspecto meristemático (tipo 1). Considerando-se que foi observado um padrão centrífugo na proliferação das células do tipo 1 e/ou 2 em calos entre 1 a 6 meses de cultura, sugere-se que as amostragens para análises citológicas de calos com esta idade, deveriam ser mais internamente na massa do calo, de modo a se obter maior índice de divisões.

6. O aumento na proporção de células dos tipos 3 e 4 na composição dos calos com mais de 6 meses de cultura, ocupando posição interna e também, a presença de pequenas regiões contendo células do tipo 1 e/ou 2 em posição mais externa do calo, indicou que as coletas para fins de análise citológica deveriam ser feitas mais externamente no calo. Além disso, o aumento progressivo na proporção de células dos tipos 3 e 4, pareceu indicar condição crescente de perda do potencial morfogenético dos calos.

7. As análises dos calos em meio de regeneração indicaram a presença de potencial morfogenético, embora não tenha sido possível definir se a morfogênese se processava via organogênese ou embriogênese somática. Não foi possível ainda, uma definição quanto às regiões ideais de coleta para tais calos, sugerindo-se amostragens mais amplas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIRRE Jr., J.M. Creação de novas variedades de canna no Estado de São Paulo. Campinas, Instituto Agrônomo, 1936. 64p. (Boletim Técnico 34).
- AHLOOWALIA, B.S. & MARETZKI, A. Plant regeneration via somatic embryogenesis in sugarcane. Plant Cell Reports, New York, 2: 21-5, 1983.
- ALVAREZ, R.; BASTOS, C.R.; POMMER, C.V.; BRINHOLI, O.; DALBEN, A.E.; GODOY Jr., G.; BOVI, V.; CIONE, J. Melhoramento da cana-de-açúcar; III. Experimentos regionais com clones obtidos em 1968. In: CONGRESSO NACIONAL DA STAB, 2., Rio de Janeiro, 1981. Anais. p.198-215.
- ARTSCHWAGER, E. Anatomy of the vegetative organs of sugarcane. Journal of Agricultural Research, Washington, 30: 197-221, 1925.
- BARRETO, A. & SIMON, J.P. Identificación de progenies y progenitores por el análisis del número cromosómico en *Saccharum*. Turrialba, Turrialba, 32: 169-80, 1982.
- BAYLISS, M.W. Origin of chromosome number variation in cultured plant cells. Nature, London, 246: 529-30, 1973.

- BAYLISS, M.W. The duration of the cell cycle of *Daucus carota* **in vivo** and **in vitro**. Experimental Cell Research, New York, 92: 31-8, 1975.
- BAYLISS, M.W. Chromosomal variation in plant tissues in culture. International Review of Citology, New York, 11A: 113-44, 1980.
- BAYLISS, M.W. Regulation of the cell division cycle in cultured plant cells. In: BRYANT, J.A. & FRANCIS, D., ed. The cell division cycle in plants. Cambridge, Cambridge University Press, 1985. p.157-77.
- BHAT, S.R. & GILL, S.S. The implications of 2n egg gametes in nobilization and breeding of sugarcane. Euphytica, Wageningen, 34: 377-84, 1985.
- BHOJWANI, S.S. & RAZDAN, M.K. Plant tissue culture; theory and practice. Amsterdam, Elsevier, 1983. 502p.
- BONNEL, E. Évolution anatomique et variabilité cytogénétique des implants foliaires de canne à sucre cultivés **in vitro**. Orsay, 1980. 96p. (Docteur - Université de Paris XI - Centre D'Orsay).
- BONNEL, E.; DEMARLY, Y.; ESSAD, S. Évolution anatomique des tissus foliaires de canne à sucre (*Saccharum* sp) cultivés **in vitro**. Canadian Journal of Botany, Ottawa, 61: 830-6, 1983.
- BREMER, G. Problems in breeding and cytology of sugarcane. Euphytica, Wageningen, 10: 59-78, 1961a.

- BREMER, G. Problems in breeding and cytology of sugarcane; II. The sugarcane breeding from a cytological view-point. Euphytica, Wageningen, 10: 121-33, 1961b.
- BREMER, G. Problems in breeding and cytology of sugarcane; III. The cytological crossing research of sugarcane. Euphytica, Wageningen, 10: 229-43, 1961c.
- BREMER, G. Problems in breeding and cytology of sugarcane; IV. The origin of the increase of chromosome number in species hybrids of *Saccharum*. Euphytica, Wageningen, 10: 325-42, 1961d.
- BREMER, G. Problems in breeding and cytology of sugarcane; V. Chromosome increase in *Saccharum* hybrids in relation to interspecific and intergeneric hybrids in other genera. Euphytica, Wageningen, 11: 65-80, 1962.
- BREMER, G. Problems in breeding and cytology of sugarcane; VI. Additional contemplations on fertilization and parthenogenesis. Euphytica, Wageningen, 12: 178-88, 1963.
- BREMER, G. The origin of the north indian sugarcane. Genetica, S-Gravenhage, 37: 345-63, 1966.
- CARUSO, J.L. The auxin conjugates. HortScience, St. Joseph, 22: 1201-4, 1987.
- CHEN, W.H.; DAVEY, M.R.; POWER, J.B.; COCKING, E.C. Control and maintenance of plant regeneration in sugarcane callus cultures. Journal of Experimental Botany, Oxford, 39: 251-61, 1988.

- CONSTANTIN, M. Chromosome instability in cell and tissue cultures and regenerated plants. Environmental and Experimental Botany, Oxford, 21: 359-68, 1981.
- CROCOMO, O.J.; GONÇALVES, A.N.; CABRAL, J.B. Clonagem e melhoramento de plantas *in vitro*. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS, 1., Brasília, 1985. Anais. Brasília, EMBRAPA, 1986. p.39-43.
- CROCOMO, O.J.; SHARP, W.R.; CARVALHO, M.T.V. Controle da morfogênese e desenvolvimento de plantas em cultura de tecido de cana-de-açúcar. Resultados experimentais. In: CONGRESSO NACIONAL DA STAB, 1., 1979. Anais. p.241-243.
- D'AMATO, F. Chromosome number variation in cultured cells and regenerated plants. In: THORPE, T.A., ed. Frontiers of plant tissue culture. Calgary, The International Association for Plant Tissue Culture, 1978. p.287-95.
- DANIELS, J.; SMITH, P.; PATON, N.; WILLIAMS, C.A. The origin of the genus *Saccharum*. Sugarcane Breeder's Newsletter, Queensland, 36: 24-39, 1975.
- DEAMBROGIO, E. & DALE, P.J. Effect of 2,4-D on the frequency of regenerated plants in barley and on genetic variability between them. Cereal Research Communications, Szeged, 8: 417-23, 1980.
- DE MOL, W.E. Nucleolar number and size in diploid, triploid and aneuploid *Hyacinths*. La Cellule, Louvain, 38: 7-64, 1928.
- DUTT, N.L. & RAO, J.T. Coimbatore canes in cultivation. New Delhi, The Indian Central Sugarcane Committee, 1956. 136p.

- DUTT, N.L. & RAO, K.S.S. Observations on the cytology of sugarcane. Indian Journal of Agricultural Science, Delhi, 3: 37-56, 1933.
- EARLE, E.D. & GRACEN, V.E. Somaclonal variation in progeny of plants from corn tissue cultures. In: ANNUAL MEETING OF ILLINOIS CORN BREEDERS SCHOOL, 21., Illinois, 1985. p.139-52.
- EVANS, D.A.; CROCOMO, O.J.; CARVALHO, M.T.V. Protoplast isolation and subsequent callus regeneration in sugarcane. Zeitschrift für Pflanzenphysiologie, Jena, 98: 355 - 58, 1980.
- EVANS, D.A. & GAMBORG, O.L. Chromosome stability of cell suspension cultures of *Nicotiana* spp. Plant Cell Reports, New York, 1: 104-7, 1982.
- EVANS, D.A. & SHARP, W.R. Single gene mutations in tomato plants regenerated from tissue culture. Science, Lancaster, 221: 949-51, 1983.
- EVANS, D.A. & SHARP, W.R. Somaclonal and gametoclonal variation. In: EVANS, D.A.; SHARP, W.R.; AMMIRATO, P.V., ed. Handbook of plant cell culture. New York, Macmillan, 1986. p.97-132.
- FANKHAUSER, G. The effect of changes in chromosome numbers on amphibian development. Quarterly Review of Biology, Baltimore, 20: 20-78, 1945.
- FERNANDEZ-GOMEZ, E.; STOCKERT, J.C.; LOPEZ-SAEZ, J.F.; GIMENEZ-MARTIN, G. Staining plant cell nucleoli with AgNO₃, after formalin-hydroquinone fixation. Stain Technology, Geneva, 44: 48-9, 1969.

- FLOH, E.I.S. Cultura de tecidos de medula caular de plantas de *Nicotiana tabacum* L. cv. Wisconsin 38 de diferentes níveis de plodia: aspectos fisiológicos, bioquímicos, genéticos e citohistológicos. São Paulo, 1983. 183p. (Doutorado - Universidade de São Paulo).
- FLOH, E.I.S. & HANDRO, W. Variation of histological patterns in tobacco callus during successive subcultures. Canadian Journal of Botany, Ottawa, 63: 1794-800, 1985.
- FERNANDEZ, A.M.F.; HINOJO, M.E.C.; CANELADA, M.E.L. Citogenética de la caña de azúcar; 1. Recuentos cromosómicos de variedades cultivadas en el noroeste argentino. Lilloa, Tucumán, 35: 23-30, 1978.
- FRIDBORG, G. & ERIKSSON, T. Effects of activated charcoal on growth and morphogenesis in cell cultures. Physiologia Plantarum, København, 34: 306-8, 1975.
- FRIDBORG, G.; PEDERSEN, M.; LANDSTROM, L.E.; ERIKSSON, T. The effect of activated charcoal on tissue cultures: adsorption of metabolites inhibiting morphogenesis. Physiologia Plantarum, København, 43: 104-6, 1978.
- GAUTHERET, R.J. Histogenesis in plant tissue cultures. Journal of National Cancer Institute, Washington, 19: 555-73, 1957.
- GUIDERDONI, E. L'embryogenèse somatique des explants foliaires de canna à sucre (*Saccharum* sp) cultivés *in vitro*, I. Initiation des cultures. L'Agronomie Tropicale, Paris, 41: 50-9, 1986.

- GUIDERDONI, E. & DEMARLY, Y. Histology of somatic embryogenesis in cultured leaf segments of sugarcane plantlets. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, Dordrecht, 14: 71-88, 1988.
- GUNN, R.E. & SHEPARD, J.F. Regeneration of plants from mesophyll derived protoplasts of British potato (*Solanum tuberosum* L.) cultivars. Plant Science Letters, Amsterdam, 22: 97-101, 1981.
- GRASSL, C.P. The origin of the sugar producing cultivars of *Saccharum*. Sugarcane Breeders' Newsletter, Queensland, 39: 8-24, 1977.
- HARTLEY, W. Studies on the origin, evolution and distribution of the Gramineae; 1. The tribe Andropogoneae. Australian Journal of Botany, Melbourne, 6: 116-28, 1958.
- HEINZ, D.J. & MEE, G.W.P. Plant differentiation from callus tissue of *Saccharum* species. Crop Science, Madison, 9: 346-8, 1969.
- HEINZ, D.J. & MEE, G.W.P. Morphologic, cytogenetic, and enzymatic variation in *Saccharum* species hybrid clones derived from callus tissue. American Journal of Botany, New York, 58: 257-62, 1971.
- HEINZ, D.J.; MEE, G.W.P.; NICKELL, L.G. Chromosome numbers of some *Saccharum* species hybrids and their cell suspension cultures. American Journal of Botany, New York, 56: 450-6, 1969.

- HINOJO, M.E.C.; CANELADA, M.E.L.; FERNANDEZ, A.M.F. Citogenética de caña de azúcar; II. Recuentos cromosómicos de variedades cultivadas en el Noroeste Argentino. Lilloa, Tucumán, 36: 233-6, 1985.
- HO, W.J. & VASIL, I.K. Somatic embryogenesis in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.); I. The morphology and physiology of callus formation and the ontogeny of somatic embryos. Protoplasma, Leipzig, 118: 169-80, 1983a.
- HO, W.J. & VASIL, I.K. Somatic embryogenesis in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.): growth and plant regeneration from embryogenic cell suspension cultures. Annals of Botany, Oxford, 51: 719-26, 1983b.
- HOWELL, W.M. & BLACK, D.A. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer; a 1 step method. Experientia, Basel, 36: 1014-5, 1980.
- IRVINE, J.E. The frequency of marker changes in sugarcane plants regenerated from callus culture. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, Dordrecht, 3: 201-9, 1984.
- IRVINE, J.E.; FITCH, M.; MOORE, P.H. The induction of callus in sugarcane tissue cultures by selected chemicals. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, Dordrecht, 2: 141 - 9, 1983.
- ✕ JAGATHESAN, D. Cytogenetics of sugarcane. In: CONGRESS OF THE INTERNATIONAL SOCIETY OF SUGARCANE TECHNOLOGISTS, 14., Louisiana, 1971. Proceedings. Baton Rouge, Franklin Press, 1972. p.303-16.

XJAGATHESAN, D. & RATNAMBAL, M.J. Karyotype analysis in *Saccharum officinarum*. The Nucleus, Calcutta, 10: 159-67, 1967.

XJAGATHESAN, D. & RATNAMBAL, M.J. Karyotype analysis in *Saccharum robustum*. The Nucleus, Calcutta, 12: 23-30, 1969.

KALLACK, H. & YARVEKYL, L. On the cytogenetic effects of 2,4-D on pea callus in culture. Acta Biologica Academiae Scientiarum Hungaricae, Budapest, 22: 67-73, 1971.

HOHLENBACH, H.W. Comparative somatic embryogenesis. In: THORPE, T.A., ed. Frontiers of plant tissue culture. Calgary, The International Association for Plant Tissue Culture, 1978. p.59-66.

KRISHNAMURTHI, M. Notes on disease resistance of tissue culture subclones and fusion of sugarcane protoplasts. Sugarcane Breeders' Newsletter, Queensland, 35: 24-6, 1974.

KRISHNAMURTHI, M. Sugarcane improvement through tissue culture. In: CONGRESS OF THE INTERNATIONAL SOCIETY OF SUGARCANE TECHNOLOGISTS, 16., São Paulo, 1977. Proceedings. São Paulo, Impres, 1978. p.23-8.

KRISHNAMURTHI, M. & TLASKAL, J. Fiji disease resistant *Saccharum officinarum* var. Pindar sub-clones from tissue cultures. In: CONGRESS OF THE INTERNATIONAL SOCIETY OF SUGARCANE TECHNOLOGISTS, 15., Durban, 1974. Proceedings. Durban, Hayne & Gibson, 1974. p.130-7.

- KUNIEDA, M.; AGUIAR-PERECIN, M.L.R.; BASSINELO, A.I. Caracterização do número de cromossomos de duas variedades de cana-de-açúcar cultivadas no Brasil. In: COLÓQUIO SOBRE CITOGENÉTICA E EVOLUÇÃO DE PLANTAS, 1., Piracicaba, 1984. Programa e Resumos. Piracicaba, ESALQ/USP, 1984. p.46.
- LARKIN, P.J. & SCOWCROFT, W.R. Somaclonal variation - a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. Theoretical and Applied Genetics, Berlin, 60: 197-214, 1981.
- LAT, J.B. & LANTIN, M.M. Agronomic performance of sugarcane clones derived from callus tissue. Philippine Journal of Crop Science, Manila, 1: 117-23, 1976.
- LEE, T.S.G. Micropropagação de cana-de-açúcar através de cultura de meristema apical. Saccharum, São Paulo, 35: 36-9, 1984.
- LEE, T.S.G. Multiplication of sugarcane by apex culture. Turrialba, Turrialba, 36: 231-6, 1986.
- LEE, M. & PHILLIPS, R.L. The chromosomal basis of somaclonal variation. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, Stanford, 39: 413-37, 1988.
- LIAO, S.H. & HAMILTON, R.H. Intracellular localization of growth hormones in plants. Science, Lancaster, 151: 822-4, 1966.
- LINGA-MORALES, C. & BARBA, R.C. Effect of various auxins and gibberellic acid on sugarcane callus formation and their subsequent influence on differentiation and on chromosome number of sugarcane plantlets *in vitro*. In: CONGRESS OF THE INTERNATIONAL SOCIETY OF SUGARCANE TECHNOLOGISTS, 17., Manila, 1980. Proceedings. Manila, Print-Inn, 1980. p.1256-66.

- LIU, M.C. A new method for sugarcane breeding: tissue culture technique. Taiwan Sugar, Taipei, 18: 8-10, 1971.
- LIU, M.C. Sugarcane. In: SHARP, W.R.; EVANS, D.A.; AMMIRATO, P.V.; YAMADA, Y., ed. Handbook of plant cell culture. New York, MacMillan, 1984. p.572-602.
- LIU, M.C. Sugarcane improvement through somaclonal variation. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF PLANT TISSUE CULTURE TROPICAL SPECIES, 1., Bogotá, 1987. Abstracts. Bogotá, Universidade Nacional de Colombia, 1987. p.3-4.
- LIU, M.C. & CHEN, W.H. Histological studies on the origin and process of plantlet differentiation in sugarcane callus. In: CONGRESS OF THE INTERNATIONAL SOCIETY OF SUGARCANE TECHNOLOGISTS, 15., Durban, 1974. Proceedings. Durban, Hayne & Gibson, 1974. p.118-28.
- LIU, M.C. & CHEN, W.H. Tissue and cell culture as aids to sugarcane breeding; I. Creation of genetic variation through callus culture. Euphytica, Wageningen, 25: 393-403, 1976.
- LIU, M.C. & CHEN, W.H. Tissue and cell culture as aids to sugarcane breeding; II. Performance and yield potential of callus derived lines. Euphytica, Wageningen, 27: 273-82, 1978.
- LIU, Y.T.; CHEN, S.S.; LEE, S.; LEE, H.C. Detection of isoenzymes in sugarcane leaves by disc electrophoresis. In: CONGRESS OF THE INTERNATIONAL SOCIETY OF SUGARCANE TECHNOLOGISTS, 15., Durban, 1974. Proceedings, Durban, Hayne Gibson, 1974. p.1048-57.

- LIU, M.C.; CHEN, W.H.; SHIH, S.C. Sites of sugarcane callus formation in young leaf and stem tip explants. In: CONGRESS OF THE INTERNATIONAL SOCIETY OF SUGARCANE TECHNOLOGISTS, 17., Manila, 1980. Proceedings, Manila, Print Inn, 1980. p.458-69.
- LIU, M.C.; CHEN, W.H.; SHIH, S.C. Histogenesis of sugarcane callus originating from young leaf and stem tip explants. Canadian Journal of Botany, Ottawa, 60: 2889-95, 1982.
- LIU, M.C. & SHIH, C.S. Chromosomal variations in suspension cells of sugarcane. Taiwan Sugar, Taipei, 99: 115-22, 1983.
- LORZ, H. & SCOWCROFT, W.R. Variability among plants and their progeny regenerated from protoplasts of Su/su heterozygotes of *Nicotiana tabacum*. Theoretical and Applied Genetics, Berlin, 66: 67-75, 1983.
- LOURENS, A.G. & MARTIN, F.A. Evaluation of *in vitro* propagated sugarcane hybrids for somaclonal variation. Crop Science, Madison, 27: 793-6, 1987.
- LOWE, K.; TAYLOR, D.B.; RYAN, P.; PATERSON, K.E. Plant regeneration via organogenesis and embryogenesis in the maize inbred line B78. Plant Science, Urbana, 41: 125-32, 1985.
- LYRENE, P.M. Tissue culture and mutations in sugarcane. Sugarcane Breeders' Newsletter, Queensland, 38: 61-2, 1976.
- MARETZKI, A. Tissue culture: its prospects and problems. In: HEINZ, D.J., ed. Sugarcane improvement through breeding. Amsterdam, Elsevier, 1987. p.343-84.

- McCLINTOCK, B. The significance of responses of the genome to challenge. Science, Lancaster, 226: 792-801, 1984.
- MEINS Jr., F. Heritable variation in plant cell culture. Annual Review of Plant Physiology, Stanford, 34: 327-46, 1983.
- MENDIBURU, A.O. & PELOQUIN, S.J. The significance of 2n gametes in potato breeding. Theoretical and Applied Genetics, Berlin, 49: 53-61, 1977.
- MOHANDAS, T. & GRANT, W.F. Cytogenetic effects of 2,4-D and amitrole in relation to nuclear volume and DNA content in some higher plants. Canadian Journal of Genetics and Cytology, Ottawa, 14: 773-83, 1972.
- MORELAND, F. & FLINT, L.H. The development of vascular connections in the leaf-sheath of sugarcane. American Journal of Botany, New York, 29: 360-2, 1942.
- MORRISH, F.; VASIL, V.; VASIL, I.K. Developmental morphogenesis and genetic manipulation in tissue and cell cultures of the Gramineae. Advances in Genetics, New York, 24: 431-99, 1987.
- MOURAS, A.; SALETTES, G.; LUTZ, A. Sur l'utilisation des protoplastes en cytologie: amelioration d'une methode recente en vue de l'identification des chromosomes mitotiques des genres *Nicotiana* et *Prunus*. Caryologia, Pisa, 31: 117-27, 1978.
- MUKHERJEE, S.K. Origin and distribution of *Saccharum*. Botanical Gazette, Chicago, 119: 55-61, 1957.

- MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum, Kobenhavn, 473-9, 1962.
- NADAR, H.M. & HEINZ, D.J. Root and shoot development from sugarcane callus tissue. Crop Science, Madison, 17: 814-6, 1977.
- NADAR, H.M.; SOEPRAPTOPO, S.; HEINZ, D.J.; LADD, S.L. Fine structure of sugarcane (*Saccharum* sp) callus and the role of auxin in embryogenesis. Crop Science, Madison, 18: 210-6, 1978.
- NAGL, W.; POHL, J.; RADLER, A. The DNA endoreduplication cycles. In: BRYANT, J.A. & FRANCIS, D., ed. The cell division cycle in plants. Cambridge, Cambridge University Press, 1985. p.217-32.
- NARAYANASWAMI, S. Megasporogenesis and the origin of triploids in *Saccharum*. Indian Journal of Agricultural Science, Delhi, 10: 534-51, 1940.
- NICKELL, L.G. Tissue and cell cultures of sugarcane: another research tool. Hawaiian Planter's Record, Honolulu, 57: 223-9, 1964.
- NICKELL, L.G. Tissue and cell culture for sugarcane research. In: CONGRESS OF THE INTERNATIONAL SOCIETY OF SUGARCANE TECHNOLOGISTS, 12., Puerto Rico, 1965. Proceedings. Amsterdam, Elsevier, 1967. p.887-92.
- NISHIYAMA, I. Basic numbers in the polyploidy of *Saccharum*. Journal of Heredity, Washington, 47: 91-9, 1956.

- NUNES Jr., D. Variedades de cana-de-açúcar. In: PARANHOS, S. B. Cana-de-açúcar cultivo e utilização. Campinas, Fundação Cargill, 1987. v.1, p.187-259.
- NUTI RONCHI, V.; MARTINI, G.; BUIATTI, M. Genotype -- hormone interaction in the induction of chromosome aberrations. effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and kinetin on tissue cultures from *Nicotiana* spp. Mutation Research, Amsterdam, 36: 67-72, 1976.
- OGIHARA, Y. Tissue culture of *Haworthia*; IV. Genetic characterization of plants regenerated from callus. Theoretical and Applied Genetics, Berlin, 60: 353-63, 1981.
- ORTON, T.J. Somaclonal variation: theoretical and practical considerations. In: GUSTAFSON, J.P., ed. Gene manipulation in plant improvement. New York, Plenum Press, 1984. p.427-68.
- PANJE, R.R. & BABU, C.N. Studies in *Saccharum spontaneum* distribution and geographical association of chromosome numbers. Cytologia, Tokyo, 25: 152-72, 1960.
- PETERS, J.A. Autotrofia para citocininas em cultura de tecidos de plantas haplóides de *Nicotiana tabacum* L. cv. W-38. São Paulo, 1980. 119p. (Doutorado - Universidade de São Paulo).
- PRASAD, S.C.; KRISHNAMURTHI, M.; HASSALL, D.C. Success rates of subcloning by tissue culture in selected hybrids varieties of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). In: CONGRESS OF THE INTERNATIONAL SOCIETY OF SUGARCANE TECHNOLOGISTS, 18., Habana, 1983. Proceedings. Habana, José Martí Publishing House, 1983. p.622-31.

- PRICE, S. Cytological studies in *Saccharum* and allied genera; VII. Maternal chromosome transmission by *S. officinarum* in intra and interspecific crosses. Botanical Gazette, Chicago, 122: 298-305, 1961.
- PRICE, S. A modified leaf-squash technique for counting chromosomes in somatic cells of *Saccharum* and related grasses. In: CONGRESS OF THE INTERNATIONAL SOCIETY OF SUGARCANE TECHNOLOGISTS, 11., Mauritius, 1962. Proceedings. Amsterdam, Elsevier, 1963. p.583-5.
- PRICE, S. Cytogenetics of modern sugarcane. Economic Botany, New York, 17: 97-106, 1963.
- PROGNÓSTICO AGRÍCOLA 88/89, São Paulo, 1: 33-7, 1988.
- RAGHAVAN, T.S. The sugarcane of India. Some cytogenetic considerations. Journal of Heredity, Washington, 42: 199-206, 1951.
- RAGHAVAN, T.S. Cytogenetics in relation to sugarcane breeding. Cytologia, Tokyo, 19: 133-43, 1954.
- ROACH, B.T. Cytological studies in *Saccharum*. Chromosome transmission in interspecific and intergeneric crosses. In: CONGRESS OF THE INTERNATIONAL SOCIETY OF SUGARCANE TECHNOLOGISTS, 13., Taiwan, 1968. Proceedings. Amsterdam, Elsevier, 1969. p.901-20.
- ROACH, B.T. & DANIELS, J. A review of the origin and improvement of sugarcane. In: COPERSUCAR INTERNACIONAL SUGARCANE BREEDING WORKSHOP, Piracicaba, 1987. São Paulo, 1987. p.1-31.

- SASS, J.E. Botanical microtechnique. Iowa, The Iowa State College Press, 1951. 228p.
- SAUVAIRE, D. & GALSZY, R. Une methode de planification experimentale appliquee aux cultures de tissus vegetaux. Exemple de la canne à sucre (*Saccharum* sp). Canadian Journal of Botany, Ottawa, 58: 264-9, 1980.
- SHARMA, A.K. & SHARMA, A. Chromosome techniques. 3.ed. London, Butterworths, 1980. 693p.
- SHEPARD, J.F. Protoplasts as sources of disease resistance in plants. Annual Review of Phytopathology, Palo Alto, 19: 145-55, 1981.
- SHEPARD, J.F.; BIDNEY, D.; SHAHIN, E. Potato protoplasts in crop improvement. Science, Lancaster, 208: 17-24, 1980.
- SIMMONDS, N.W. Sugarcanes. In: SIMMONDS, N.W., ed. Evolution of crop plants. London, Longman, 1979. p.104-8.
- SINGH, B.D. Chemical composition of medium in relation to cytogenetic behaviour of *Haplopappus gracilis* callus cultures. The Nucleus, Calcutta, 19: 74-9, 1976.
- SINGH, B.D. & HARVEY, B.L. Does 2,4-D induce mitotic irregularities in plant tissue cultures? Experientia, Basel, 31: 785-7, 1975a.
- SINGH, B.D. & HARVEY, B.L. Effects of different 2,4-D concentrations on the cytogenetic behaviour of plant cells cultured in vitro. Biologia Plantarum, Praha, 17: 167 - 74, 1975b.

- SINGH, B.D.; HARVEY, B.L.; KAO, K.N.; MILLER, R.A. Selection pressure in cell populations of *Vicia hajastana* cultured in vitro. Canadian Journal of Genetics and Cytology, Ottawa, 14: 65-70, 1972.
- SISODIA, N.S. A root squash technique for counting somatic chromosomes in sugarcane. Stain Technology, Geneva, 43: 129-33, 1968.
- SKIRVIN, R.M. & JANICK, J. Tissue culture-induced variations in scented *Pelargonium* spp. Journal of the American Society for Horticultural Science, Geneva, 101: 281-90, 1976.
- SMITH, S.M. & STREET, H.E. The decline of embryogenic potential as callus and suspension culture of carrot (*Daucus carota* L.) are serially subcultured. Annals of Botany, Oxford, 38: 223-41, 1974.
- SONDAHL, M.R.I. & CARLUCCI, M.V. Variabilidade somaclonal em cultura de tecidos de cana-de-açúcar. In: SBPC, 35., Belém, 1983. Resumos. Belém, 1983. p.689. (Ciência e Cultura, São Paulo, 35: 689, 1983).
- SREENIVASAN, T.V.; AHLOOWALIA, B.S.; HEINZ, D.J. Cytogenetics. In: HEINZ, D.J., ed. Sugarcane improvement through breeding. Amsterdam, Elsevier, 1987. cap. 5, p.211-53.
- STEVENSON, G.C. Genetics and breeding of sugarcane. London, Longmans, 1965. 284p.
- SUNDERLAND, N. Nuclear cytology. In: STREET, H.E., ed. Plant tissue and cell culture, Oxford, Blackwell Scientific Publishers, 1977. p.177-205.

- THORPE, T.A. Organogenesis *in vitro*: structural, physiological, and biochemical aspects. International Review of Cytology, New York, 11A: 71-111, 1980.
- TLASKAL, J. Cycloheximide and 8-hidroxyquinoline pretreatment for study of plant chromosomes. Stain Technology, Geneva, 54: 313-9, 1980.
- TLASKAL, J.; HUTCHINSON, P.B.; ROACH, B.T. Variation in chromosome numbers within tissues of sugarcane clones. Sugarcane Breeders' Newsletter, Queensland, 25: 20-4, 1970.
- TLASKAL, J. & HUTCHINSON, P.B. The detection of mitotic instability in sugarcane. Sugarcane Breeders' Newsletter, Queensland, 31: 11-6, 1973.
- TLASKAL, J. & HUTCHINSON, P.B. An objective method for counting chromosomes in sugarcane root meristems. In: CONGRESS OF THE INTERNATIONAL SOCIETY OF SUGARCANE TECHNOLOGISTS, 15., Durban, 1974. Proceedings. Durban, Hayne & Gibson, 1974. p.168-78.
- TLASKAL, J. & HUTCHINSON, P.B.; ROACH, B.T.; DANIELS, J. Karyotyping in sugarcane. Sugarcane Breeders' Newsletter, Queensland, 28: 17-20, 1971.
- TORREY, J.G. Differential mitotic response of diploid and polyploid nuclei to auxin and kinetin treatment. Science, Lancaster, 128: 1148, 1958.
- ZEHR, B.E.; WILLIAMS, M.E.; DUNCAN, D.R.; WIDHOLM, J.M. Somaclonal variation in the progeny of plants regenerated from callus cultures of seven inbred lines of maizes. Canadian Journal of Botany, Ottawa, 65: 491-9, 1987.

- ZWAR, J.A. & BROWN, R. Distribution of labelled plant growth regulators within cells. Nature, London, 220: 500-1, 1968.
- VASIL, V.; VASIL, I.K.; ZUBERER, D.A.; HUBBEL, D.A. The biology of *Azospirillum*-sugarcane association; I. Establishment of the association. Zeitschrift für Pflanzenphysiologie, Jena, 95: 141-7, 1979.
- WALBOT, V. & CULLIS, C.A. Rapid genomic change in higher plants. Annual Review of Plant Physiology, Stanford, 36: 367-96, 1985.
- WAREING, P.F. & PHILLIPS, I.D.J. Growth and differentiation plants. 3.ed. Oxford, Pergamon Press, 1981. 343p.
- WEIGEL Jr., R.C. & HUGHES, K.W. Long term regeneration by somatic embryogenesis in barley (*Hordeum vulgare* L.) tissue cultures derived from apical meristem explants. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, Dordrecht, 5: 151-62, 1985.
- WILSON, G.B. Cytological effects of some antibiotics. Journal of Heredity, Washington, 41: 227-31, 1950.