**RESPOSTA EMBRIOGÊNICA E ESTABILIDADE
CROMOSSÔMICA EM CALOS DERIVADOS DE LINHAGENS E
HÍBRIDOS DE MILHO (*Zea mays* L.)**

JOSÉ RAULINDO GARDINGO

Engenheiro Agrônomo

ORIENTADORA: Profa. Dra. **MARGARIDA L.R. DE AGUIAR-PERECIN**

Tese apresentada à Escola Superior de
Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade
de São Paulo, para obtenção do título de
Doutor em Agronomia, Área de concentração:
Genética e Melhoramento de Plantas.

P I R A C I C A B A

Estado de São Paulo - Brasil

Maio – 1998

ERRATA

p.	linha	onde se lê	leia-se
vii	9	linhagens designada 1-3,	linhagens, designada 1-3,
vii	16	família 1-3 mostrou que as mesmas tem alta capacidade...	família 1-3 mostrou que as mesmas têm alta capacidade...
viii	16	Para tais avaliações inoculou-se de	Para tais avaliações inocularam-se de
xi	1	...maize callus cultures depend on	...maize callus cultures depends on
xi	3	This work is part of a program wich objectives...	This work is part of a program of wich the objectives...
xi	11	...abnormalities in chromossomes bearing...	...abnormalities in chromosomes bearing..
xi	18	well as a greater ability of regenerating fertile plants.	well as a greater ability for regenerating fertile plants.
xii	5	...(1 year) culture.	...(1 year) cultures.
xii	10	The line 132331/1 also shows a	The line 132331/1 also have a
xii	23	...at 2 and 3-4 month after culture initiation.	...at 2 and 3-4 months after culture initiation.
xiii	7	great block of terminal...	large block of terminal...
xiii	11	Observed in knobbed chromosome...	Most types of alterations involving knobbed chromosome...
xiii	15	So, the present work provided...	So, the present work permitted a...
2	18 e 19	O objetivo foi avaliar condições de cultivo para a...	O objetivo foi avaliar nas condições de cultivo empregadas a...
9	1	...o efeito aditivo é predominante	...o efeito genético aditivo quantitativo é predominante
28	13	...mudança no nível de metilação do DNA,	...mudança no padrão de metilação do DNA,
29	10 e 11	...Decico (1991), Conforme Figura 1 e Tabela 1.	...Decico (1991) (Tabela 1). Conforme a Figura 1, as linhagens podem ser separadas baseando-se nas bandas-C.
31	14 e 15	...e por Santos (1995) (Tabela 2).	...e Santos (1995) (Tabela 2).
32	1	...estabilidade cromossômica,	...instabilidade cromossômica,
32	2	bem como a frequência e tipos de alterações dos cromossomos 7 e 9.	bem como possíveis alterações dos cromossomos 7 e 9.
35	12 e 13	...distância entre o centrômero e o início da banda e o entre o centrômero e o final da banda.	...distância do centrômero à porção distal e à porção proximal da banda.
36	5	...Demétrio.	...Demétrio, do Departamento de Matemática da ESALQ/USP
42	19	...mini cromossomos (Fig. 12B, D),	...minicromossomos (Fig. 12B, D),
50	8	ocorreu 90% de indução de calos,	ocorreu ao redor de 90% de indução de calos,
66	14	... multipolar mitose.	... mitose multipolar.
67	8 e 9	3) A alta frequência de células normais indicam...	3) A frequência de células normais ao redor de 95% indicam...
67	10	3) O cromossomo 7...	4) O cromossomo 7...
68	1, 2, 3 e 4	4) A ocorrência de crossing-over desigual entre cromátides irmãs é um dos...	4) A ocorrência de atraso na separação das cromátides irmãs e ciclos de quebra-fusão-ponte parece ser a principal causa de alterações das bandas observadas na metáfase. Mas a ocorrência de permuta desigual entre cromátides irmãs seria um dos...
68	5	5) Quando o genótipo....	6) Quando o genótipo....
68	10	6) À medida que a cultura envelheceu ocorreram em alguns calos um aumento do número de células com aberrações, sendo devido...	7) À medida que a cultura envelheceu, alguns calos apresentaram um aumento da proporção de células contendo aberrações, sendo isto devido...
87	2	...Jac Duro (Agrocere).	...Jac Duro (Agrocere), segundo Aguiar-Perecin e Decico (1988) e Decico (1991).
90	15 e 16	...entre os híbridos aos 45 dias, mas ocorre para um ano após a inoculação.	...entre os híbridos aos 45 dias, porém ocorreu diferença significativa ao nível de 5% entre os híbridos um ano após a inoculação.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - Campus "Luiz de Queiroz"/USP

Gardingo, José Raulindo

Resposta embriogênica e estabilidade cromossômica em calos derivados de linhagens e híbridos de milho (*Zea mays* L.) / José Raulindo Gardingo. - - Piracicaba, 1998.

125 p. : il.

Tese (doutorado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 1998.
Bibliografia.

1. Aberração cromossômica 2. Calo embriogênico 3. Cultivo "in vitro" 4. Genótipo vegetal 5. Linhagem vegetal 6. Melhoramento genético vegetal I. Título

CDD 633.15

À Professora Maria Alves
Pelas primeiras letras e números,
OFEREÇO

À
minha esposa, Luzia
aos meus filhos, Lauricilha, Daniel e Luísa
meus pais, José e Laurice Gardingo
meus irmãos, João, Ma. José, Ma. Aparecida,
Joselito (In memória), Joelma e Nix-Sandro.
DEDICO

AGRADECIMENTOS

- A **Deus**, Supremo Criador de todas as maravilhas;
- À **Profa. Dra. Margarida L.R. de Aguiar-Perecin**, pela orientação, ajuda e pelo exemplo de dedicação;
- À **Universidade Estadual de Ponta Grossa**, pela liberação que possibilitou a realização do curso.
- Ao governo do Estado de São Paulo, pela criação e manutenção de entidades voltadas à educação e pesquisa.
- Aos **professores do Curso de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas**, por compartilharem o saber; e em especial ao **Prof. Paulo Sodero Martins** pelos conselhos.
- À **Mônica Rosa Bertão, Janay Almeida dos Santos, Maria Angélica Maciel Martinho Ferreira, Mateus Mondin**, pelo companheirismo, apoio e sugestões durante a elaboração deste trabalho;
- À **Silvia Cristina Menuzzo Molina e Carlos Alberto Veríssimo**, também pelo auxílio em atividades relacionadas com os experimentos.
- À **Profa. Dra. Clarisse Garcia Borges Demétrio** e ao colega **Rhainer Gleico Cardoso**, pelo empenho e grande colaboração nas análises estatísticas;
- Aos **funcionários** do Departamento de Genética da ESALQ/USP, **Antônio Pádua Gorga (Oberdan), Fernando Leopoldino, Valdir Próspero, Silvana M. Gregório e Carmen M.F. Piloto**, pela amizade, atenção e pelos inúmeros favores;

- Aos **colegas do Curso de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas**, pelo convívio e múltiplas atenções;
- Enfim, **a todos os amigos** que me apoiaram e contribuíram para que os dias fossem melhores.
- À **FAPESP** e **CAPES**, pelo financiamento do projeto de pesquisa e pela concessão da bolsa de estudo.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	vii
SUMMARY.....	xi
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. Aspectos gerais	3
2.2. Cultivo <i>in vitro</i> de milho.....	4
2.3. Efeito do genótipo.....	7
2.4. Efeito da idade da cultura.....	12
2.5. Instabilidade cromossômica em cultura <i>in vitro</i>	16
2.5.1. Aberrações numéricas e estruturais.....	17
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
3.1. Genótipos utilizados.....	29
3.2. Obtenção e manutenção de calos.....	29
3.3. Análise citogenética.....	31
3.4. Análise morfométrica dos cromossomos	33
3.5. Análise estatística.....	35

4. RESULTADOS	38
4.1. Aspectos morfológicos da cultura de calos	38
4.1.1. Capacidade de manutenção das culturas por longos períodos de cultivo	35 39
4.1.2. Análise estatística da resposta embriogênica dos calos....	40
4.2. Análises cromossômicas	41
4.2.1. Análise das prometáfases e metáfases coradas pela metodologia de bandamento-C.....	41
4.2.2. Análise das aberrações em calos coletados aos 2 meses de idade.....	42
4.2.3. Análise de aberrações dos calos coletados aos 3-4 meses de idade.....	44
4.2.4. Análise de aberrações dos calos coletado aos 4-7 meses de idade.....	47
4.2.5. Análises morfométricas dos cromossomos.....	48

5. DISCUSSÃO.....	50
5.1. Aspectos do cultivo <i>in vitro</i> de milho.....	50
5.2. Estabilidade dos cromossomos nos calos.....	53
5.2.1. Análise de metáfases mitóticas de calos coletados aos 2 meses de idade.....	54
5.2.2. Análise de metáfases mitóticas dos calos coletados aos 3- 4 meses de idade.....	56
5.2.3. Análise de metáfases mitóticas dos calos coletados aos 4-7 meses de idade.....	60
5.2.4. Análise morfométrica dos cromossomos	61
5.3. Mecanismos de indução de alterações cromossômicas.....	62
6. CONCLUSÕES.....	67
Anexo : Figuras.....	69
Anexo : Tabelas.....	86
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	105

**RESPOSTA EMBRIOGÊNICA E ESTABILIDADE
CROMOSSÔMICA EM CALOS DERIVADOS DE LINHAGENS E
HÍBRIDOS DE MILHO (*Zea mays* L.)**

Autor: JOSÉ RAULINDO GARDINGO

Orientador: Dra. MARGARIDA L.R. DE AGUIAR-PERECIN

RESUMO

A resposta embriogênica em culturas de calos de milho, depende principalmente do genótipo, explante, meio de cultura, duração do cultivo *in vitro* e estabilidade cromossômica. O presente trabalho faz parte de um programa cujos objetivos são o de se selecionarem genótipos altamente responsivos ao cultivo *in vitro*, apresentando baixo grau de instabilidade cromossômica em culturas de calos.

Em experimentos anteriores, foi detectada maior frequência de embriogênese somática em calos induzidos a partir de uma família de linhagens designada 1-3, derivada de uma variedade tipo flint (Fluminhan, 1992). A análise citogenética destas culturas mostrou a presença de pontes anafásicas, evidências de ocorrência de ciclos de quebra-fusão-ponte e maior incidência de aberrações em cromossomos com knobs heterocromáticos de tamanho médio e grande (Fluminhan, 1992; Aguiar-Perecin e Fluminhan, 1992; Fluminhan, Aguiar-Perecin e Santos, 1996). A análise de duas culturas derivadas de linhagens da família 1-3 mostrou que as mesmas tem alta capacidade para o cultivo *in vitro* por longos períodos (Santos, 1995; Santos e Aguiar-Perecin, 1995). Além disso, em uma das culturas observou-se menor frequência

de aberrações mitóticas e de alterações cromossômicas, bem como maior capacidade de regenerar plantas férteis.

No presente trabalho foram induzidas culturas a partir de embriões imaturos derivados de linhagens relacionadas àquelas utilizadas por Santos e Aguiar-Perecin (1995) e respectivos híbridos, com os seguintes objetivos:

- a) Avaliar a resposta embriogênica de genótipos relacionados em culturas de curta duração (45 – 60 dias) e de longa duração (1 ano)
- b) Avaliar a ocorrência de aberrações cromossômicas em culturas derivadas de linhagens e híbridos com diferenças em sua composição de knobs e estado homozigótico ou heterozigótico dos mesmos.

As linhagens empregadas designadas 132331/1, 13342/1 e 13342/5 apresentam knobs nas posições 6L₂, 6L₃, 7S, 7L e 8L₁. A linhagem 132331/1 apresenta também um knob em 9S, enquanto que a linhagem 13342/1 um knob em 3L. Para tais avaliações inoculou-se de 25 a 30 embriões imaturos (1-2 mm) por placa de Petri, cerca de 80 embriões por planta. As culturas foram mantidas a 28°C no escuro, em meio N6 contendo 1,5 mg/l de 2,4-D e 12 mM L-prolina, realizando-se os subcultivos a cada 14-20 dias. Observou-se que a capacidade para a cultura de tecidos é excelente, pois a frequência de indução de calos embriogênicos está acima de 97%, a capacidade de formação de calos embriogênicos aos 45 dias variou de 81,76% (132331/1) a 89,42% (13342/1 x 13342/5). Aos 6 meses de cultura foi realizada uma seleção dos calos embriogênicos com maior taxa de crescimento e observou-se que a capacidade de manutenção de culturas aos 12 meses variou de 1,28% (132331/1) a 5,00% (13342/5) em relação aos embriões inoculados.

Para a análise citogenética das culturas, foram utilizados respectivamente 5 e 10-15 calos por planta, aos 2 e 3-4 meses após a inoculação. Também foram analisados alguns calos no período entre 4 e 7 meses de idade da cultura. A análise de metáfases e prometáfases coradas pela metodologia de bandamento-C mostrou que nas culturas com 2 meses de idade a frequência de células normais variou de 73,7% a 97,2%. Para os calos aos 3-4 meses, observou-se que a frequência de células normais variou de 88,9% a 96,8%, sendo as linhagens aparentemente inferiores aos híbridos. Aos 4-7 meses, a proporção de células normais foi superior a 78%. De uma maneira geral, observou-se que houve predomínio de alterações estruturais, sendo que o cromossomo 7 estava envolvido em mais de 60% das alterações, alterações estas ligadas às regiões dos knobs nos dois braços. Foram constatadas várias evidências de ciclos de ponte-quebra-fusão nestas culturas. Entre os tipos de alterações do cromossomo 7 observaram-se alterações nas bandas-C (correspondentes aos knobs heterocromáticos) amplificadas, duplicadas, reduzidas, terminais (braço longo) e subterminais (braço curto), bem como anéis e translocações recíprocas. O cromossomo 9 que apresenta um grande bloco de heterocromatina terminal apresentou poucas alterações aos 3-4 e 4-7 meses, geralmente em células em que havia um cromossomo 7 alterado. Entre os tipos menos freqüentes tem-se as células tetraplóides, trissômicas, etc. Vários tipos de alterações observados em cromossomos portadores de knobs podem ser interpretados como originados a partir de atraso na separação das cromátides ao nível dos knobs seguidos de ciclos de quebra-fusão-ponte. No caso do cromossomo 7, há também a possibilidade de em alguns casos, o evento primário ser uma amplificação do knob, seguido de ocorrência de quebra cromossômica e ciclos de quebra-fusão-ponte.

Assim, pode-se concluir que o experimento realizado permitiu a escolha de genótipos que são capazes de produzir calos friáveis altamente embriogênicos com baixo grau de instabilidade cromossômica.

**EMBRYOGENIC RESPONSE AND CHROMOSOMAL
STABILITY IN CALLI DERIVED FROM MAIZE (*Zea mays* L.)
LINES AND HYBRIDS**

Author: JOSÉ RAULINDO GARDINGO

Adviser: Dra. MARGARIDA L.R. DE AGUIAR-PERECIN

SUMMARY

The embryogenic response of maize callus cultures depend on the genotype, explant, culture medium, culture age and chromosome stability. This work is part of a program which objectives are to screen genotypes highly responsive to *in vitro* culture, and showing low degree of chromosome instability in calli cultures.

In previous experiments, a high frequency of somatic embryogenesis was observed in calli derived from a family of lines designated 1-3, originated from a flint variety (Fluminhan, 1992). The cytogenetic analisys of these cultures showed the presence of anaphase bridges, evidences of the occurrence of break-fusion-bridge cycles and a higher incidence of abnormalities in chromossomes bearing medium and large-sized heterochromatic knobs (Fluminhan, 1992; Aguiar-Perecin & Fluminhan, 1992, Fluminhan, Aguiar-Perecin, Santos, 1996). The analisys of two cultures derived from lines of the family 1-3 showed that both have high ability for long-term *in vitro* cultivation (Santos, 1995; Santos & Aguiar-Perecin, 1995). Futhermore, one of the cultures showed low frequency of mitotic abnormalities and chromosome alterations, as well as a greater ability of regenerating fertile plants.

In the present work cultures from immature embryos were induced from lines related to those utilized by Santos & Aguiar-Perecin (1995) and the corresponding hybrids aiming to:

a) Evaluate the embryogenic response of related genotypes in short (45-60 days) and long-term (1 year) culture.

b) Evaluate the occurrence of chromosome abnormalities in cultures derived from lines and hybrids bearing slight differences in their knob composition and their heterozygous or homozygous state.

The lines used, designated 132331/1, 13342/1 and 13342/5 have knobs at 6L₂, 6L₃, 7S, 7L and 8L₁. The line 132331/1 also shows a knob at 9S, while line 13342/1 has a knob at 3L. For the evaluation of the embryogenic response, 25-30 immature embryos (1-2 mm) were inoculated per Petri dish, approximately 80 embryos per plant. Cultures were maintained in N6 medium supplemented with 1,5 mg/l 2,4-D and 12 mM L-proline, by subculturing every 14-20 days, at 28°C in the dark. The frequency of embryogenic calli induction was higher than 97%. The ability of calli formation at 45 days ranged from 81,76% (132331/1) to 89,42% (13342/1 x 13342/5). At 6 months after culture initiation, fast growing embryogenic calli were selected. Twelve-month-old cultures were scored and ranged from 1,28% (132331/1) to 5,00% (13342/5) of the embryos inoculated.

For cytogenetic analysis, 5 and 10-15 calli per plant were sampled, respectively at 2 and 3-4 month after culture initiation. The analysis of C-banded metaphases and prometaphases showed that in 2-month-old cultures the frequency of normal cells ranged from 73,7% to 97,2%. In 3-4-month-old calli, the frequency of normal cells ranged from 88,9% to 96,8%, and was higher in the hybrids. Structural abnormalities were the most frequent alterations observed, and chromosome 7 was involved in more than 68% of these alterations,

most of them, related to knob regions of both arms. Many evidences of break-fusion-bridge cycles were observed in these cultures. Among the aberrations of chromosome 7, C-band alterations (corresponding to knobs) such as band amplification, duplication, reduction, terminal (long arm) and subterminal (short arm) bands as well as rings and reciprocal translocations were observed. Chromosome 9 which has a great block of terminal heterochromatin at the short arm, showed few alterations at 3-4 and 4-7 months after culture initiation, generally in cells carrying an altered 7 chromosome. Among the less frequent alteration types were tetraploid, trisomic cells, etc.

Observed in knobbed chromosomes may have been originated from delayed separation of sister chromatids at knob sites followed by breakage-fusion-bridge cycles. Also, knob amplification may have been the primary event that gave origin to alteration of chromosome 7

So, the present work provided selection of genotypes with high capability to produce highly embryogenic calli (type-2) with low level of chromosome instability.

1. INTRODUÇÃO

A capacidade de regeneração de plantas a partir de calos embriogênicos depende do genótipo, das condições ambientais durante o crescimento da planta doadora, do tipo de explante, do meio de cultura e da estabilidade do genótipo. A manutenção de culturas estáveis é fundamental para a regeneração de plantas transgênicas sem efeitos indesejáveis. A regeneração de culturas derivadas de calos de milho a partir de embriões imaturos foi reportada pela primeira vez por (Green & Phillips, 1975) e, desde então tornou-se uma técnica rotineira nos laboratórios.

Durante o cultivo *in vitro* de tecidos vegetais podem ocorrer variações genômicas, envolvendo desde mutações gênicas a alterações do número e da estrutura dos cromossomos, que podem ocorrer em plantas regeneradas a partir de cultura de tecidos. Em milho, a ocorrência de tais variações em plantas regeneradas está frequentemente associada com as regiões heterocromáticas dos cromossomos, denominadas knobs, caracterizadas pela presença de seqüências repetitivas e replicação tardia durante o ciclo mitótico. Lee & Phillips (1987a), a partir da análise meiótica de plantas regeneradas, relacionaram a ocorrência de quebra cromossômica ao atraso na replicação dos knobs heterocromáticos. Também, verificaram um aumento da freqüência de regenerantes aberrantes com o aumento da idade da cultura.

Os relatos de análises citológicas de calos são raros. No laboratório de Citologia de Genética da ESALQ/USP, partindo de genótipos de milho com diferentes conteúdos de knobs, Fluminhan (1992) e Fluminhan et al. (1996a) analisando metáfases e anáfases de calos com cerca de um ano de cultivo, coradas pelas metodologias de bandamento-C e Feulgen, detectaram eventos de instabilidade mitótica. Entre os eventos, observaram atraso na separação das cromátides irmãs e evidências de ocorrência de ciclos de quebra-fusão-ponte. Trabalhando com duas culturas de longa duração (23 a 42 meses) altamente embriogênicas, Santos (1995) e Santos e Aguiar-Perecin (1995), verificaram que uma das culturas, 12F (genótipo 13342/5), era mais estável e a cultura designada 3-57 apresentava maior grau de instabilidade cromossômica.

Procurou-se analisar a resposta embriogênica de três linhagens (132331/1, 13342/1 e 13342/5) endogâmicas altamente relacionadas, e seus respectivos híbridos. As linhagens diferiam em sua composição de knobs. Foi analisada a ocorrência de aberrações cromossômicas nas culturas. O objetivo foi avaliar condições de cultivo para a seleção de genótipos capazes de produzir calos altamente embriogênicos, com baixo grau de instabilidade cromossômica.

Foram avaliadas metáfases mitóticas de células derivadas de calos coletados aos 2, 3-4 e 4-7 meses de cultivo *in vitro*, coradas pelo bandamento-C. O objetivo foi se realizar um estudo biométrico de cariótipos, procurando estabelecer uma relação entre a estabilidade cromossômica e os diferentes conteúdos de knobs cromossômicos, bem como da ocorrência de aberrações derivadas de ciclos de quebra-fusão-ponte e a possível cicatrização dos cromossomos quebrados, como complementação aos estudos desenvolvidos por Fluminhan (1992), Santos (1995), Santos e Aguiar-Perecin (1995) e Fluminhan et al. (1996).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Aspectos gerais

O milho (*Zea mays* L.) é a terceira cultura mais importantes no suprimento da necessidade crescente de alimentação humana. Apesar do seu cultivo a milênios, esta cultura apresenta muitos problemas, tais como susceptibilidade a várias doenças e qualidades nutritivas limitadas. Assim, Lörz et al. (1988) sugerem o emprego de modernas técnicas biotecnológicas, para beneficiar os programas de melhoramento genético, pois estas permitem combinar novas características mais precisamente.

Há uma série de fatores que influenciam a capacidade para o cultivo *in vitro* do milho, tais como a fonte de explante, as condições ambientais durante o desenvolvimento da planta doadora, o meio de cultura e o genótipo (Green & Phillips, 1975; Aguiar-Perecin & Fluminhan, 1985; Armstrong & Green, 1985; Rapela, 1985-1986; Morrish et al., 1987; Bhaskaran & Smith, 1990; Fluminhan, 1992; Dolgykh, 1994; Bohorova et al., 1995; revisão em Phillips et al., 1988).

A passagem de células vegetais pela fase de calos pode causar alterações no genoma da planta, o que pode resultar em variação do número ou estrutura do cromossomo e/ou mutações

gênicas (revisão em D'Amato, 1977, D'Amato, 1985, Lee & Phillips, 1988), bem como alterações a nível do DNA das mitocôndrias e cloroplastos. Essas variações observadas entre as plantas regeneradas foram denominadas de 'variação somaclonal' (Larkin & Scowcroft, 1981). Os calos em cultura podem apresentar um mosaico genético de células (Edallo et al., 1981; Brown et al., 1991), que é proveniente de mutações preexistentes no explante ou do cultivo *in vitro* (revisão em D'Amato, 1985), cuja detecção entre plantas regeneradas depende da capacidade de sobrevivência e proliferação (Armstrong et al., 1983; Benzion et al., 1986). Portanto, as análises citológicas das aberrações cromossômicas permitem identificar o padrão de variação e subseqüentemente, compreender os possíveis mecanismos que geraram algumas alterações estruturais (revisão em Bayliss, 1980), para estabelecer os métodos de controle da variação somaclonal (Armstrong & Phillips, 1988; revisão em Phillips et al., 1994).

2.2. Cultivo *in vitro* de milho

Os primeiros calos de milho foram obtidos empregando-se endosperma triplóide (La Rue, 1947) e vários tipos de explantes diplóides (Mascarenhas et al., citados por Phillips et al., 1988 e Dolgykh, 1994). Entretanto, o primeiro trabalho relatando sucesso na regeneração de plantas *in vitro* foi apresentado em 1975 por Green & Phillips, empregando embriões imaturos da linhagem americana A188 e A188 x R-njR-nj. Os embriões imaturos são considerados a melhor fonte de explante para produção de calos embriogênicos com capacidade de regeneração de plantas (revisão em Vasil, 1985). A

eficiência na regeneração dos calos formados pelos outros explantes não é alta e é instável (Duncan et al., 1985; Dolgykh, 1994, revisão em Phillips et al., 1988).

Quando se utiliza embriões imaturos o tamanho e a posição em relação ao meio de cultura são fatores muito importantes. Tem sido utilizados embriões imaturos coletados 10 a 18 dias após a polinização, os quais apresentam cerca de 1,0 a 2,0 mm de comprimento, colocando-os com o eixo embrionário em contato com meio, para inibir a germinação e permitir a proliferação do calo a partir das células da região do escutelo (Green & Phillips, 1975; Green, 1977; Armstrong & Green, 1985; Edallo et al., 1981; Lu et al., 1982; Novák et al., 1983; Tomes & Smith, 1985; Lowe et al., 1985; Rapela, 1985; Vasil, 1985; Kamo & Hodges, 1986; McCain & Hodges, 1986; Van Lammeren, 1988; Lupotto & Lusardi, 1988b; Prioli & Silva, 1989; Fluminhan, 1992; Dolgykh, 1994; Fransz & Schel, 1994; Bohorova et al., 1995).

Visando a manutenção e multiplicação dos embriões somáticos, os subcultivos devem ser realizados a cada 15-20 dias, transferindo-se as regiões com maior crescimento dos calos para um meio de cultura novo e mantendo-os no escuro, a 25°C (Lowe et al. 1985; Rapela, 1985; Kamo & Hodges, 1986; Fluminhan, 1992). Durante as transferências, a seleção de setores com características diferentes do calo original podem resultar em diferentes sublinhagens celulares ou subclones (Lowe et al., 1985; Prioli, 1987; Lupotto & Lusardi, 1988a, 1988b; Fluminhan, 1992; Santos, 1995).

Para o cultivo *in vitro* de milho, os meios mais eficientes são: o de Duncan (D), de Murashige e Skoog (MS) e N6. Fluminhan (1992), utilizando os meios N6 e MS acrescidos de 2,4-D (2 mg/l), verificou semelhança na frequência de formação de calos embriogênicos para

vários genótipos. No entanto, diversos autores observaram a ocorrência da interação genótipo x meio (Novak et al., 1983; Armstrong & Green, 1985; Kamo & Hodges, 1986; Hodges et al., 1986; Wilkinson & Thompson, 1987; Bates, 1993).

A presença de uma auxina no meio de cultura, por exemplo o 2,4-D, é necessária para induzir a formação e a manutenção de calos (Green & Phillips, 1975; Singh & Harvey, 1975; Reddy & Peterson, 1977). Embriões com mais de 9 dias de idade, na ausência do 2,4-D no meio de cultura, apresentaram indução de germinação precoce e não ocorreu a indução de calos (Van Lammeren, 1988).

A redução progressiva na concentração de 2,4-D até a sua omissão no meio de cultura, induz a iniciação de um processo de diferenciação que pode resultar na regeneração de plantas (Green & Phillips, 1975; Vasil et al., 1984; Prioli & Silva, 1987). A concentração do 2,4-D para indução de calos depende do tamanho do embrião imaturo, mas em geral está entre 0,25 e 2 mg/l, sendo a concentração mais utilizada 0,5-1,0 mg/l (Green, 1977; McCoy & Phillips, 1982; Lowe *et al.*, 1985; Lee & Phillips, 1987a, 1987b; Chernyshova citado por Dolgykh, 1994).

As condições de cultivo (consistência do meio e intervalos de subculturas) e os componentes do meio, especialmente os hormônios e demais reguladores de crescimento, podem causar perturbações no controle celular, levando a numerosas mudanças genômicas das células cultivadas *in vitro* (revisão em Peschke & Phillips, 1992; Phillips et al., 1994). O intervalo entre subcultivos pode alterar o equilíbrio intracelular dos desoxirribonucleotídeos, resultando em alterações no genoma (revisão em Lee & Phillips, 1988).

Em estudos de manutenção de calos Tipo I e II de milho, Reddy & Peterson (1987), empregando concentração de 5,0 a 20,0

mg/l de 2,4-D no meio, verificaram um aumento no número de cromossomos na presença de maior concentração da auxina.

A indução de aberrações cromossômicas por 2,4-D é controversa (revisão em D'Amato, 1985). Bayliss (1980) comenta que no caso da auxina sintética 2,4-D é o crescimento desorganizado que induz a formação de anormalidades mitóticas, e não o efeito direto desse componente sobre a mitose. O autor relata também, que a constituição cromossômica final da cultura pode ser mais dependente da capacidade competitiva entre células com genótipos diferentes do que da frequência de origem das células aberrantes. Orton (1980) afirma que as células cujo genoma se encontra alterado, podem apresentar uma desvantagem funcional e não participarem na formação da planta regenerada.

2.3. Efeito do genótipo

A partir da descoberta da aptidão para o cultivo *in vitro* da linhagem A188 (Green & Phillips, 1975) e melhorias das condições de cultivo *in vitro*, obteve-se grande avanço na área para o milho. A procura de novos genótipos evidenciou que muitos genótipos agronomicamente superiores, mesmo sob as melhores condições ambientais conhecidas, são de difícil manipulação (Armstrong et al., 1985, 1992; Fahey et al., 1986). Portanto, a escolha do genótipo para estudos de cultivos celulares tem exercido uma influência marcante sobre a probabilidade de sucesso na indução de calos embriogênicos e na capacidade de regeneração de plantas (Phillips et al., 1988; Fluminhan, 1992).

Na procura de genótipos alternativos ao A188 que apresentem uma boa resposta ao cultivo *in vitro*, foram encontrados principalmente genótipos adaptados ao clima temperado (Lu et al., 1982; Novak et al., 1983; Vasil et al., 1984; Duncan et al., 1985; Rapela, 1985-1986; Hodges et al., 1986; Fahey et al., 1986; Reddy & Peterson, 1987; Wilkinson & Thompson, 1987; Garcia et al., 1992; Bates, 1993; Dolgykh, 1994; revisão em Phillips et al., 1988).

Para as condições tropicais ou subtropicais, tem-se poucos relatos de genótipo com aptidão ao cultivo *in vitro*. Para os genótipos tropicais, Aguiar-Perecin & Fluminhan (1985) verificaram aptidão para a variedade Piranão de inverno. Prioli & Silva (1989) avaliaram 8 linhagens da raça Cateto, constatando que em todas ocorreu regeneração de plantas, enquanto que para a raça Tuxpeño apenas 21,43% (3/14) (Ast-1, Tux 100-2, Tux 100-10) regeneraram plantas.

Fluminhan & Aguiar-Perecin (1991), avaliando várias famílias de linhagens derivadas de uma variedade do tipo Flint, observaram que a família 1-3 apresentou a maior taxa de embriogênese somática e regeneração de plantas. Furini & Jewell (1994) verificaram entre quatro linhagens tropicais regeneração para a Ki3 e CML67. Bohorova et al. (1995), verificaram capacidade de regeneração de plantas férteis em 57,5% (15/26) das linhagens tropicais provenientes do “pool” Tuxpeño, Eto, Antigua e Suwan 1, resultados superiores aos encontrados por Prioli & Silva (1989). Considerando-se que ocorreu resposta de vários genótipos ao cultivo *in vitro*, é altamente desejável a seleção de novos genótipos tropicais com aptidão ao cultivo *in vitro*.

Numerosos estudos têm sido conduzidos sobre o controle genético da resposta ao cultivo *in vitro* de tecidos vegetais. Quando se estuda o estabelecimento e o crescimento de calos, e a regeneração de

plantas, têm-se encontrado que o efeito aditivo é predominante (revisão em Henry et al., 1994). Mas outros sistemas genéticos tem sido reportados isolados ou conjuntamente, tais como: efeito dominante, codominante, citoplasmático, maternal e paternal (Tabata & Motoyoshi, citados por Phillips et al., 1988; Nestický et al., 1983; Beckert & Qing, 1984; Armstrong et al., 1985; Tomes & Smith, 1985; Hodges et al., 1986; Dolgykh, 1994; Ivantsov et al., 1994; Rosati et al., 1994). A heterose para capacidade de indução de calos embriogênicos, para longevidade da cultura e capacidade de regeneração de plantas foi observada em alguns cruzamentos (Kamo & Holdges, 1986; Hodges et al., 1986).

Visando localizar regiões cromossômicas relacionadas a aptidão de embriões imaturos ao cultivo *in vitro*, Armstrong et al. (1992) empregando a técnica de RFLP, verificaram que 5 regiões cromossômicas estão envolvidas na resposta à cultura de calos friáveis e embriogênicos. Elas foram localizadas nos cromossomos 1 (2 regiões), 2, 3 e 9, sendo a região mais importante aquela marcada pela sonda c595, situado no braço longo do cromossomo 9. A aptidão para a cultura de antera está localizada nos cromossomos 1, 2 (duas regiões), 3, 6 e 8 (Wan et al., 1992). Já Beaumont et al. (1995) verificaram que a aptidão para a cultura de anteras esta localizada em regiões próximas aos mutantes viviparos (*vp*), com algumas coincidências com o trabalho anterior, isto é, nos cromossomos 1 (2 regiões), 3, 5, 7 e 8.

A obtenção de genótipos com melhor capacidade para o cultivo *in vitro* a partir de embriões imaturos de milho tem sido obtida através de seleção (Beckert & Qing, 1984; Fluminhan & Aguiar-Perecin, 1991), transferência de alelos dos genótipos aptos ao cultivo *in vitro* para linhagens agronomicamente superiores (Hodges et al.,

1986; Fahey et al., 1986; Armstrong et al., 1985,1991,1992), por seleção recorrente (Rosati et al., 1994) e por cruzamento com espécies selvagens (Prioli & Silva, 1989; Furini & Jewell, 1995). Entre os diversos genes envolvidos na resposta ao cultivo *in vitro*, Henry et al. (1994) afirmam que é mais fácil incorporar alelos para a capacidade de cultivo por curta duração ("short term").

Baseando-se na morfologia e na taxa de crescimento dos embriões de milho *in vitro* tem-se dois tipos de calos: Tipo I e Tipo II. Os diferentes tipos de calos dependem do genótipo, do estágio do explante e do meio de cultura empregado, sendo o Tipo I o mais freqüente (Rapela, 1985-1986; Lupoto, 1986; Prioli & Silva, 1989; Bohorova et al., 1995; revisão em Phillips et al., 1988). Os calos Tipo I são caracterizados como compactos, opacos, com crescimento relativamente lento, morfologicamente complexos e organizados. Já os calos do Tipo II, são caracterizados como friáveis e não diferenciados, exceto para a presença de inúmeros embriões somáticos globulares em sua superfície, e apresentam o crescimento rápido (Armstrong & Green, 1985; Tomes & Smith, 1985; Lupotto & Lusardi, 1988a, 1988b).

Os calos Tipo II podem ser obtidos a partir de cultura do Tipo I de forma espontânea (Lowe et al., 1985; Lupotto & Lusardi, 1988a, 1988b), podem ser induzidos pela adição de L-prolina ao meio de cultura N6 (Armstrong & Green, 1985; Armstrong & Phillips, 1988), ou por baixas concentrações de sacarose no meio de cultura (Vasil et al., 1984). Por outro lado, a concentração de L-prolina superior a 6 mM mostra ser negativa para a produção de calos embriogênicos do Tipo I (Claparols et al., 1993).

O estabelecimento de culturas Tipo II, por serem mantidas por longos períodos sem perderem a capacidade para a regeneração

de plantas (Armstrong & Green, 1985; Tomes & Smith, 1985; Luppoto & Lusardi, 1988b; Dolgykh, 1994), são de interesse crescente pelos pesquisadores.

Armstrong & Green (1985) verificaram que somente uma parte dos calos induzidos resultaram em calos embriogênicos e friáveis. Welter et al. (1995) observaram perda da morfologia de alguns calos Tipo II durante os três primeiros meses de cultivo *in vitro*, o que resultou no seu descarte. Jiménez et al. (1988) observaram que a longevidade dos calos pode ser identificada indiretamente pela morfologia de suas células. Os calos que só se mantêm em cultura por curto período ("short-term") não resistem a um longo período de cultivo e apresentam células isodiamétricas. Por outro lado, os calos que se mantêm por longos períodos de cultivo, são compostos por células grandes e alongadas e apresentam um crescimento maior que os calos de curta duração.

A frequência de formação de calos embriogênicos é um fator muito importante para o rendimento de plantas regeneradas. Entre os genótipos de maior capacidade de indução de calos a partir de embriões imaturos citados na literatura encontrou-se Piranão de Inverno (Aguiar-Perecin & Fluminhan, 1985), a linhagem Mo17 (Fahey et al., 1986), a linhagem A188 (Hodges et al., 1986), as linhagens MBS61 e R168 (Wilkinson & Thompson, 1987), a linhagem W64A (Luppoto & Lusardi, 1988a), e a linhagem CML67R (Bohorova et al., 1995). A capacidade de regenerar plantas foi correlacionada com a habilidade de formar calos, entretanto nem todos os calos embriogênicos regeneraram plantas (Hodges et al., 1986; Wilkinson & Thompson, 1987; Furini & Jewell, 1994; Bohorova et al., 1995; Santos, 1995).

Além da presença de alelos favoráveis à regeneração de plantas é necessária a estabilidade cromossômica dos genótipos em cultivos de curta e longa duração.

2.4. Efeito da idade da cultura

O efeito da duração do período de cultivo *in vitro* pode ser avaliado em células de calos e/ou em plantas regeneradas.

A idade da cultura não influencia na taxa de mutação, mas possibilita a manutenção e o acúmulo de células aberrantes. As mutações que são detectadas em células meióticas podem ser originadas na fase inicial da cultura (Benzion & Phillips, 1988).

Segundo Peschke & Phillips (1992), a análise rigorosa do efeito da idade da cultura é limitada pela capacidade de avaliar a taxa de crescimento (isto é, número de gerações celulares/tempo), bem como o tempo para que o mutante possa proliferar suficientemente para ser detectado na planta regenerada. Então, o efeito da idade da cultura tem sido atribuído a uma causa ou a uma combinação de causas: a) a cultura *per se* torna-se mais propensa a alterações à medida que envelhece, isto é, a taxa de mutação por geração celular aumenta; b) a taxa de mutação é aproximadamente constante no tempo, de modo que, o número de mutações aumenta durante o tempo, em virtude da seleção não eliminá-las; c) algumas alterações ocorrem no início da cultura mas não são detectadas senão mais tarde, quando um número suficiente de células mutantes tenham sido acumuladas para serem incluídas em uma amostra de calos ou em uma planta regenerada; d) alterações que ocorrem no início da

cultura são ativamente selecionadas, aumentando fortemente a proporção de células durante o tempo.

A análise meiótica de 87 plantas provenientes de embriões imaturos do genótipo A188 x W22 R-nj R-nj, obtidas de culturas aos 65 a 125 dias de idade, mostrou que a maioria das plantas regeneradas eram normais. Por outro lado ocorreu uma redução na altura destas plantas (Green, 1977; Green et al., 1977). Resultados semelhantes foram obtidos através da análise meiótica de 119 plantas regeneradas a partir de culturas aos 120 e 240 dias de idade. A maioria das plantas (95,1%) eram normais, indicando o alto grau de estabilidade genética e citogenética. No entanto, quando foram analisadas plantas regeneradas obtidas após um período de 3 anos de cultivo, estas mostraram heteromorfismo para o braço longo do cromossomo 6 (McCoy & Phillips, 1982)

Novák et al. (1983) trabalhando com culturas da linhagem CHI-31 com até 150 dias de idade, verificaram entre as plântulas regeneradas que apenas 8,9% resultaram plantas normais e 45% morreram durante a aclimação e o desenvolvimento. Já Lazányi et al. (1990) verificaram que ocorreu variação fenotípica em 22,4% (554/2470) das plantas regeneradas de culturas com 120 dias de idade

Lee & Phillips (1987a) estudaram citologicamente 78 plantas resultantes de células cultivadas *in vitro* por 3 a 4 meses, e não observaram alterações. Entretanto, 48% (91/189) das plantas regeneradas a partir da cultura aos 8 a 9 meses, apresentavam aberrações. Estas aberrações envolveram principalmente alterações na estrutura dos cromossomos (96%), sendo 42% de translocações e inversões, 35% de deficiência e 19% de pares heteromórficos. A

freqüência de alterações fenotípicas por planta aumentou de 0,5% (3 - 4 meses) para 1,3 (8 - 9 meses).

Ao analisar as alterações cromossômicas em alguns calos de diversas idades, Edallo et al. (1981) não obtiveram correlação entre a freqüência de aberrações e os subcultivos. Já McCoy & Phillips (1982) verificaram que 97% (434/449) e 95% (377/398) das células apresentavam $2n=20$, aos 4 e 8 meses, respectivamente. Mohanty et al. (1986) também verificaram uma redução da percentagem de células diplóides com o aumento da idade dos calos.

Ao se analisar calos, Fluminhan et al. (1996a) verificaram que ocorreram aberrações cromossômicas nas culturas. Aos 14 meses de idade encontraram células com um cromossomo 7 com a banda do braço longo amplificada e uma outra cultura com a banda do braço curto subterminal. Ao avaliar uma destas culturas, designada 3-57, no período entre 23 a 42 meses, Santos (1995) verificou quatro diferentes tipos de alterações do knob, bem como em uma das culturas o cromossomo 9 reduzido.

Fluminhan & Kameya (1996), avaliando dois genótipos, também observaram um aumento do número de pontes e da percentagem total de células à medida que a cultura envelhecia.

Um estudo realizado em culturas tipo I, utilizando a variedade Colorado Klein, mostrou que o número de células dos calos com aberrações, aos 17, 32 e 52 meses, foi de 30%, 92% e 100%, respectivamente. Uma análise das plantas regeneradas destes calos mostrou que ocorreram 30%, 95% e 100% de alterações fenotípicas. Já aos 60 meses de cultivo, as células dos calos apresentavam mudanças do número de cromossomos ($2n=18, 19, 20, 21, 22$ ou 23) e alterações estruturais (anéis, pares heteromórficos). Todas as plantas regeneradas foram fenotipicamente anormais e apenas 10%

apresentavam $2n=20$. As plantas regeneradas restantes apresentavam $2n=21$, das quais algumas apresentavam também alterações estruturais (Garcia et al., 1992; Molina et al., 1992; Molina & Garcia, 1994)

Beckert & Qing (1984) afirmaram que a percentagem de regeneração decresce drasticamente com o envelhecimento do calo. Entretanto, para alguns genótipos a capacidade de regeneração persiste após longo período *in vitro* (McCoy et al., 1982; Luppoto & Lusardi, 1988b; Santos, 1995). A regeneração de plantas provenientes de culturas de curta duração sem perda de produtividade é encorajador para o emprego destas na transformação genética (Phillips, 1989), sendo o controle da variação somaclonal de grande importância.

Num estudo meiótico de plantas regeneradas de calos tipo I e II em duas idades (16 e 36 semanas), Armstrong & Phillips (1988) verificaram que as alterações citológicas foram mais freqüentes para o calo tipo II e para as culturas mais velhas.

O baixo índice mitótico de células provenientes de calos (Ting et al., 1980; Phillips & Wang, 1984; Phillips et al., 1988) e a dificuldade de identificação dos cromossomos mitóticos estão entre as razões de serem poucos os trabalhos realizados a nível de células dos calos. Outra dificuldade está em determinar o período de maior freqüência de células em divisão. Assim, para se atingir um melhor índice mitótico McCoy & Phillips (1982) coletavam calos 7 dias após a transferência para um meio novo. Aguiar-Perecin et al. (1991) e Fluminhan et al. (1996a), verificaram que o melhor índice foi obtido de células meristemáticas de pró-embrióides dos calos coletados no 5º dia após a transferência.

Para suspensões celulares de milho, Wang et al. (1986) verificaram um acúmulo no índice mitótico que resultou num aumento de 3 para 19% de células metafásicas

Nuti Ronchi et al. (1992) observaram o índice mitótico para duas culturas de cenoura. A linhagem mais promissora A+ apresentou um índice contínuo superior a 7%, ao contrário da linhagem (E²A¹C6), que apresentou um pico de 6% no terceiro dia após transferência para um meio novo.

Em outros cereais, observou-se que um aumento da duração do período de cultivo *in vitro* resultou num incremento de anormalidade entre as plantas regeneradas. Isto ocorreu para a aveia (McCoy et al., 1982), e o triticales hexaplóide (Armstrong et al., 1983).

2.5. Instabilidade cromossômica em cultura *in vitro*

A perpetuação de um genótipo durante o crescimento *in vitro* depende de um processo regular de replicação e divisão celular (revisão em Sunderland, 1977).

Os primeiros estudos citológicos em cultura de tecidos de plantas foram relacionados a alterações do nível de ploidia e frequência de aneuplóides (revisão em D'Amato, 1977) e, posteriormente às alterações estruturais.

As irregularidades mitóticas são mais frequentes em cultura *in vitro* do que em organismos intactos, por duas razões: 1) as condições artificiais perturbam o sistema de regulação intracelular e, 2) o meio artificial suporta células diferentes mais efetivamente que o organismo. As células livres ou calos são menos estáveis que os tecidos ou órgãos diferenciados (revisão em Sybenga, 1992).

O acúmulo de aberrações cromossômicas pode ser um dos fatores que causam a perda da capacidade regenerativa em cultura de células vegetais (Murashige & Nakano, 1967; Reinert & Backs, 1968; Smith & Street, 1974; Santos e Aguiar-Perecin, 1995). Estas alterações são indesejáveis para células cultivadas para fins de aplicação em engenharia genética (revisão em Phillips et al., 1994).

Mudanças genéticas e citogenéticas podem ser induzidas por componentes do meio, idade da cultura, fonte de explante e pelo genótipo (revisão em D'Amato, 1977; Lee & Phillips, 1988; Phillips et al., 1988; Peschke & Phillips, 1992). Estas mudanças incluem alterações a nível de mutações gênicas, no padrão de metilação do DNA, no número de cópias de seqüências repetitivas, no DNA das organelas e no número e estrutura do cromossomos (revisão em Peschke & Phillips, 1992; Phillips et al., 1988, 1994). Os trabalhos de avaliação de alterações podem ser efetuados pela observação do fenótipo de calos ou de plantas regeneradas, bem como pela análise de suas células. É possível avaliar tais alterações, através da análises de mitoses e meioses (plantas), empregando-se técnicas como bandamento-C (Fluminhan, 1992, Fluminhan et al., 1996), RFLP (Brown et al., 1991), hibridização *in situ* (revisão em Phillips & Wang, 1984), entre outras.

2.5.1. Aberrações numéricas e estruturais.

Em células provenientes de cultivo *in vitro* e plantas regeneradas foram observadas aberrações numéricas e estruturais.

Entre as aberrações numéricas tem-se a poliploidia que pode ser resultante de endopoliploidização ou fusão nuclear, e a aneuploidia que pode ser causada por não disjunção, atraso

cromossômico e aberrações nas fibras do fuso. Entre as aberrações estruturais tem-se as duplicações, deleções inversões e translocações. Elas são conseqüências de quebras cromossômicas, com ou sem fusão de extremidades cromossômicas quebradas (revisão em Sunderland, 1977; Bayliss, 1980; D'Amato, 1985; Phillips et al., 1994).

As análises mitóticas de células cultivadas *in vitro* pode revelar a presença de poliplóides, aneuplóides, grandes deleções, ou grandes duplicações (revisão em Phillips & Wang, 1984). Apesar da possibilidade de se empregar vários tecidos para tal análise, para a cultura do milho existem poucos relatos na literatura.

A análise de células mitóticas de calos não derivados de embriões imaturos mostram geralmente predomínio de alterações numéricas.

Analizando calos derivados de mesocótilos de milho após 7 subcultivos, Balzan (1978) verificou que as linhagens SII04 e H-3 apresentaram 3,8% e 88,6% de células diplóides e 62,5 e 0% de células tetraplóides, respectivamente.

Rao et al. (1983), verificaram que o nível de ploidia de calos derivados de raízes foi de 96% de células diplóides, enquanto que para o calos derivados de endosperma foram 70% de células triplóides e para glumas predominaram células com 11-28 cromossomos. Já Mohanty et al. (1986) verificaram alterações estruturais e numéricas entre as células de calos derivadas de raízes. Entre as aberrações estruturais encontraram fragmentos, micronúcleos e adesões.

Gubar & Kunakh (1994) cultivaram seções de colmos de plântulas, verificaram através do empregando o bandamento-C, que a linhagem VIR-27 apresentou maior freqüência de células diplóides em

relação a linhagem Chk-218 (90% vs. 60%). As células aberrante em sua maioria foram haplóides, tetraplóides ou apresentaram um maior nível de ploidia.

Ting et al. (1980) analisaram células de calos provenientes de anteras aos 2 meses de idade, e observaram que 74% eram haplóides e 13% diplóides, com diferença no nível de estabilidade entre as 5 variedades chinesas empregadas.

Por outro lado, as avaliações de calos derivados de embriões imaturos geralmente registram baixa frequência de alterações do genoma, e quando essas ocorrem há um predomínio de células com alterações estruturais.

Ao analisarem calos provenientes de embriões imaturos das linhagens W64A e S65, Edallo et al. (1981) encontraram 8% e 15% de células com o cariótipo alterado, respectivamente. As células tetraplóides representavam cerca de 5% dessas alterações. Já McCoy e Phillips (1982), verificaram que menos de 5% das células dos calos provenientes de embriões imaturos não eram diplóides ($2n=20$).

Fluminhan et al. (1996a) empregando células coradas pela técnica de bandamento-C, encontraram aberrações estruturais envolvendo as regiões heterocromáticas dos cromossomos 7. Santos (1995) observou quatro tipos de cromossomos 7 alterados, bem como alterações no cromossomo 9.

Além da análise de mitose de calos pode-se analisar meiose das plantas regeneradas a partir do cultivo *in vitro*.

A análise meiótica de plantas permite análises adicionais de mudanças cariotípicas, tais como pequenas deleções e translocações que não podem ser detectadas por análises baseadas somente em células mitóticas (revisão em Phillips & Wang, 1984). A maioria das

plantas regeneradas analisadas eram diplóides (Edallo *et al.*, 1981; Green *et al.*, 1977; McCoy & Phillips, 1982).

Quando plantas regeneradas de milho foram examinadas meioticamente, quebras cromossômicas e suas conseqüências (translocações, inversões, duplicações e deleções) constituem as aberrações mais comuns detectadas (Benzion & Phillips, 1988; Lee & Phillips, 1987a; revisão em Lee & Phillips, 1988; Phillips *et al.*, 1988; Phillips, 1989). As translocações e deficiências são as duas classes que tem sido mais detectas (revisão em Benzion *et al.*, 1986).

Benzion & Phillips (1988) analisaram plantas regeneradas de três linhagens celulares que produziram translocações citologicamente idênticas entre o braço longo do cromossomo 7 e do cromossomo 8. Os autores sugerem que, tendo em vista a ocorrência da mesma aberração citológica em três linhagens celulares individuais, existem pontos específicos de quebra cromossômica ("hot spots"), que se manifestam durante o ciclo de cultura de tecidos.

Há vários estudos de avaliação de células cultivadas de outras espécies. Na cultura da cevada, Singh (1986) encontrou que a maioria das células dos calos morfogênicos eram diplóides e não ocorreram aberrações estruturais. Enquanto que, para os calos não morfogênicos, os diplóides representaram menos de 33%, sendo grande a proporção de variação no nível de ploidia e um pouco menor de aberrações estruturais.

Para a cultura do milheto, Swedlun & Vasil (1985) analisando culturas de 1 e 6 meses de idade, verificaram uma freqüência superior a 74% de células diplóides para os calos e apenas 1% (1/101) de plantas regeneradas do tipo 4n. Resultados semelhantes aos anteriores foram obtidos por Mythili *et al.* (1995),

analisando culturas com 6 e 12 semanas, exceto que todas as plantas regeneradas foram diplóides.

Para a cultura do trigo, Gill & Kimber (1977) empregaram a técnica do bandamento-C para identificar translocações de seus cromossomos entre si e com os cromossomos de outras espécies. Karp & Maddock (1984) verificaram que 29% das 192 plantas regeneradas foram aneuplóides com número de cromossomos variando de 38-45, e também alterações estruturais dos cromossomos.

Para as plantas regeneradas de aveia aos 20 meses de cultivo, McCoy et al. (1982) verificaram que a alteração mais freqüente foi a quebra de cromossomos, seguida de perda de um segmento que resultou em um par heteromórfico durante a diacinese.

Para as plantas regeneradas de centeio, Bebeli et al. (1990) encontraram que 15,8% apresentavam mudanças numéricas e estruturais dos cromossomos. As plantas regeneradas de cevada e tritcale produzem menor nível de variação somaclonal que o milho (Lörz et al., 1988).

Em aipo, Murata & Orton (1983,1984) verificaram que a freqüência de rearranjos cromossômicos em células cultivadas *in vitro* excedeu à de alterações na ploidia, sendo a causa mais importante a fusão de cromossomos.

Na cultura do algodão, Stelly et al. (1989) encontraram alta freqüência de monossômicos terciários entre 35 plantas aberrantes regeneradas de duas cultivares, aberrações estas que podem estar associadas a ciclos de quebra-fusão-ponte (que podem ocasionar perda de cromatina) e inativação de um dos centromeros deste cromossomo.

Na cultura da cebola, Joachimiack et al. (1995) trabalhando com calos provenientes de raízes, verificaram através da técnica do bandamento-C, que ocorreu alta taxa de alterações numéricas e estruturais dos cromossomos. As alterações estruturais ocorreram na região da heterocromatina telomérica, enquanto que as alterações numéricas podem ser resultantes de não disjunção cromossômica. Aos 12 meses de idade das culturas, 20% das células apresentavam alterações cariotípicas, tais como: fusões, anéis, adesões e cromossomos dicêntricos.

Grandes deficiências em regiões de heterocromatina são toleradas, enquanto que, pequenas deficiências na eucromatina são usualmente letais (Rhoades, 1978). Os mutagênicos químicos e radiações causam mais quebras dos cromossomos para as espécies com maior quantidade de heterocromatina (Natarajan & Ahnström, 1969).

Estudos de replicação do DNA, revelam que a heterocromatina normalmente tem replicação mais tardia que a eucromatina (Lima de Faria, 1969). Entre as diferentes classes de heterocromatina de milho, o knob é a classe que replica mais tardiamente (Pryor et al., 1980). Os knobs são compostos por seqüências de DNA altamente repetitivas (fragmentos de 185 pares de bases) arranjadas em tandem (Peacock et al., 1981).

Os knobs dos cromossomos de milho são heterocromatina constitutiva a qual permanece condensada durante o ciclo mitótico. Os knobs apresentam uma herança tão precisa quanto a de um gene (Rhoades, 1955), estando localizados em posições fixas dos cromossomos (Longley, 1939), em cromossomos mitóticos correspondem às bandas obtidas através da metodologia de bandamento-C (Vosa & Aguiar, 1972; Hadlaczky & Kalman, 1975;

Ward, 1980; Aguiar-Perecin, 1985; Aguiar-Perecin & Vosa, 1985). Quando os knobs são médios ou grandes alteram o comprimento dos braços dos cromossomos mitóticos (Aguiar-Perecin, 1979; Aguiar-Perecin & Vosa, 1985).

Para a cultura do milho, há poucos estudos sobre identificação dos cromossomos metafásicos mitóticos empregando o bandamento-C. Assim, baseando-se na relação de braços, no comprimento relativo e comparações deste padrão com knobs observados no paquíteno, Aguiar-Perecin (1985) identificou os cromossomos homólogos de duas raças (Zapalote Chico e Cerimonial) com conteúdos diferentes de knobs. Aguiar-Perecin & Decico (1988) identificaram os knobs dos genótipos derivados de JAC DURO (Agrocere).

A aplicação desta metodologia tem despertado o interesse de pesquisadores para a análise de plantas regeneradas e identificação de cromossomos de plantas híbridas (*Zea mays* L x *Tripsacum* sp) (Furini & Jewell, 1994; Furini & Jewell, 1995)

Estudos de indução de quebras em cromossomos de milho, realizados por Jancey & Walden (1972) demonstraram que os pontos de quebra de translocações recíprocas e inversões foram encontrados preferencialmente no centrômero e em regiões adjacentes.

O ponto de ocorrência de quebras nos cromossomos de plantas regeneradas tende a ocorrer principalmente na região organizadora do nucléolo, nos knobs, e entre os centromeros e os knobs (Lee & Phillips, 1987a; revisão em Benzion & Phillips, 1988, Lee & Phillips, 1988).

Fluminhan & Kameya (1996) verificaram que as quebras cromossômicas ocorrem freqüentemente dentro dos knobs ou em regiões adjacentes, e que os genótipos com maior número de knobs

apresentam um maior número de células com anormalidades envolvendo vários cromossomos. Assim, é possível observar a mesma frequência de células aberrantes para genótipos com diferentes composições de knobs e um maior número de células com aberrações em culturas mais velhas que podem ser devidas a rearranjos criados por translocações recíprocas.

Gill et al. (1980) trabalhando com tomate, sugeriram que a alta densidade de DNA por unidade de comprimento na heterocromatina, a organização e justaposição da cromatina no núcleo, ou mesmo propriedades físico-químicas das regiões heterocromáticas podem explicar a susceptibilidade destas regiões à quebra. Nuti Ronchi et al. (1986), trabalhando com cebola e fava, verificaram que as quebras ocorrem principalmente nas regiões heterocromáticas compostas por DNA repetitivo.

A frequência muito alta de telocêntricos entre as plantas de aveia regeneradas de cultura de tecidos, levaram McCoy et al. (1982) a estabelecerem uma hipótese sobre o envolvimento da heterocromatina pericentromérica nas quebras cromossômicas. Segundo esta hipótese se existe normalmente replicação tardia na região pericentromérica nos cromossomos de aveia, esta heterocromatina poderia ocasionalmente replicar ainda mais tarde que o usual no ambiente de cultura de tecidos. Assim, as cromátides envolvidas permaneceriam unidas neste ponto de replicação tardia, formando uma ponte na anáfase. Consequentemente, isto produziria um estresse que poderia resultar em uma quebra na região localizada entre os centrômeros do cromossomo dicêntrico. Alternativamente, este mecanismo poderia resultar em não disjunção e subsequente aneuploidia.

Essa hipótese foi comprovada por Johnson et al. (1987), ao verificarem que nos cromossomos da aveia ocorriam grandes regiões de heterocromatina próximas ao centrômero e que estas apresentavam replicação tardia. Os autores concluíram que, a replicação da heterocromatina no fim do período S induz a estas regiões maior sensibilidade a perturbações no ciclo celular, que podem ocorrer durante a cultura de tecidos, resultando em alterações tais como deficiências, duplicações, translocações e amplificação da heterocromatina.

Ao analisar meioses de milho, Rhoades & Dempsey (1982) observaram na segunda fase da meiose a ocorrência de uma ponte dicêntrica em consequência do atraso na replicação dos knobs heterocromáticos dos cromossomos A (em presença de cromossomos B). A ruptura das pontes dicêntricas resultam na perda de segmento eucromáticos ou knobs.

Ao analisar meioses de plantas de milho regeneradas a partir de calos derivados de embriões imaturos, Lee & Phillips (1987a) constataram ocorrência de quebras cromossômicas envolvendo freqüentemente braços cromossômicos contendo knobs heterocromáticos. Eles propuseram que a causa de alterações citogenéticas na cultura de tecidos de milho seria decorrente de distúrbios no ciclo celular que causariam uma replicação mais tardia dos knobs, resultando em quebras, à semelhança do observado por Rhoades & Dempsey (1982). Como as plantas regeneradas apresentavam inversões, translocações, pares heteromórficas e deficiências de segmentos internos dos cromossomos, Lee & Phillips (1987a) sugeriram que o fragmento acêntrico terminal produzido pela cultura de tecidos de milho pode fundir novamente ao cromossomo do qual se originou ou a extremidade quebrada de outro cromossomo.

Aguiar-Perecin & Fluminhan (1992) observaram que em condições de atraso da separação dos knobs as cromátides envolvidas podem quebrar originando um ciclo de quebra-fusão-ponte. Foram empregadas linhagens endogâmicas de milho com diferentes conteúdos de knobs e a técnica de bandamento-C.

Novas evidências de ocorrência de ciclo de quebra-fusão-ponte foram observados por Santos (1995) e Santos & Aguiar-Perecin (1995) em duas culturas de longa duração, onde a análise de metáfases coradas pelo bandamento-C mostrou alterações sequenciais no braço curto do cromossomo 7 e 9 envolvendo o knob, bem como a presença de um microcromossomo.

Fluminhan et al. (1996a) utilizando-se de calos de pró-embrióides de milho, ao verificarem um atraso na separação das cromátides irmãs, originado preferencialmente na região dos knobs no braço longo do cromossomo 7 (K7L) e a formação de pontes. Empregando a metodologia do bandamento-C em células mitóticas, os autores observaram que um dos cromossomos 7 apresentava knobs maiores no braço longo ou, no braço curto um knob subterminal ou dois knobs menores, resultando em cromossomos que apresentam duplicação-deficiência. Tais cromossomos contendo duplicação-deficiência, podem ser resultantes de um ciclo quebra-fusão-ponte e que a cicatrização teria ocorrido após algumas divisões das células.

Estudos iniciais sobre a ocorrência de ciclos de quebra-fusão-ponte foram realizados por McClintock em milho (1939, 1941, 1942). Tais estudos evidenciaram que a introdução de um cromossomo quebrado na célula poderia iniciar um ciclo onde o cromossomo quebrado se replicaria, as extremidades das cromátides irmãs (no sítio de quebra) se fundiriam, e uma ponte anafásica seria

formada pelo dicêntrico resultante. Esta ponte eventualmente poderia quebrar durante as sucessivas divisões, permitindo que o processo recomeçasse novamente a cada divisão celular, consequência do nome ciclo de quebra-fusão-ponte. O ciclo de quebra-fusão-ponte cessa quando o zigoto é formado (McClintock, 1942), pois não ocorre mais fusão.

Evidências indicam que os ciclos de quebra-fusão-ponte podem ser ativados em função da ocorrência de duplicações em tandem reverso podendo ser detectados pela ocorrência de cromossomos dicêntricos, em anéis ou outras formas de cromossomos instáveis (Blackburn, 1991; Lukaszewski, 1995).

Outros autores tem verificado a ocorrência de alterações em regiões heterocromáticas induzidas pela cultura de tecido. Romanava et al. (1991) através do emprego do bandamento-C, verificaram que ocorreram diferenças no tamanho dos knobs entre cromossomos homólogos de 7 linhagens e 7 dihaplóides, comprovando assim a ocorrência de tais alterações ao nível da heterocromatina. Ataeva et al. (1994) observaram que 3 das 5 plantas regeneradas de A188 apresentam diferenças no tamanho do segmento heterocromático telomérico do braço longo dos cromossomos 7 e 8.

Em triticale, as variações citológicas nas plantas regeneradas demonstram que os sítios de quebra ocorrem dentro da região do centrômero ou adjacente a ela, com subsequente perda da maioria dos produtos da quebra, principalmente para os cromossomos do trigo (Armstrong et al., 1983). A quantidade de variação somaclonal depende do genótipo, ocorrendo uma maior taxa de aberrações quando os cromossomo 6RS e 7RL apresentam heterocromatina telomérica (Bebeli et al., 1993).

Por outro lado, Lapitan et al. (1984) observaram entre as plantas regeneradas do híbrido 6x (trigo x centeio), que a maioria dos sítios de quebra ocorreram na região heterocromática dos cromossomos, resultando em translocações e deleções. Também, encontraram amplificações das bandas nos braços dos cromossomos 2RL e 7RL de cinco plantas. Para o híbrido 8x (trigo x centeio), Lapitan et al. (1988) verificaram que ocorreu amplificação de algumas bandas-C. Utilizando a sonda telomérica pSC74, que contém uma sequência de 480 pb, os autores verificaram que a amplificação ocorreu no telômero 7RS.

Outros estudos sugerem que perturbações no ciclo celular induzidas pelo cultivo *in vitro* poderiam ativar um mecanismo de mudança no nível de metilação do DNA, o que alteraria a estrutura da cromatina, levando a um atraso na replicação da heterocromatina, e conseqüentemente na ativação dos transposons (revisão em Phillips, 1989; Phillips et al., 1988; Kaeppler & Phillips, 1993).

Várias mudanças gênicas qualitativas e quantitativas em plantas regeneradas e respectivas progênes podem estar relacionadas com a metilação do DNA (Brown, 1989; revisão em Phillips et al., 1988). A transcrição do elemento Ac ocorre com a demetilação da região promotora do mesmo (Schwartz, 1989). A ativação do elemento Ac ocorre em condições naturais (Johns, 1991) e em plantas provenientes do cultivo *in vitro* (Brettel & Dennis, 1991; Peschcke et al., 1991; revisão em Peschke & Phillips, 1991, 1992; Kaeppler & Phillips, 1993). A quebra de cromossomos em milho, parece ser de ocorrência comum em cultura de tecidos, e podem induzir a manifestação de transposons.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Genótipos utilizados

O presente estudo foi conduzido no Departamento de Genética da ESALQ, empregando-se os genótipos que pertencem à família (1-3), subgrupos (1-3-2 e 1-3-3) provenientes da variedade Flint Jac-Duro (Agrocere) (Fluminhan & Aguiar-Perecin, 1991). Utilizou-se 3 linhagens endogâmicas (132331/1, 13342/1 e 13342/5), e três híbridos resultantes do cruzamento entre as linhagens. As linhagens 13342/1 e 13342/5 são isogênicas e diferem quanto à presença de knob no braço longo do cromossomo 3 (K3L). A constituição de knobs heterocromáticos cromossômicos das linhagens foi determinada por Aguiar-Perecin & Decico (1988) e Decico (1991), Conforme Figura 1 e Tabela 1

3.2. Obtenção e manutenção dos calos

As linhagens foram cultivadas em condições de campo, sendo o semeio efetuado entre novembro de 1995 e janeiro de 1996 e as polinizações realizadas entre janeiro e março de 1996. Foram

realizados cruzamentos num sistema de dialelo completo, obtendo-se no mínimo 5 espigas a partir de cruzamentos entre plantas irmãs. Também, foram obtidos acima de 4 espigas contendo embriões híbridos heterozigóticos para knobs nos cromossomos 3L e/ou 9S.

Aos 10 - 12 dias após a polinização, as espigas resultantes de tais cruzamentos foram colhidas e lavadas em água corrente. Após a esterilização superficial com solução de hipoclorito de sódio a 1% por 30 minutos, as espigas foram enxaguadas por 3 vezes em água destilada estéril, em câmara de fluxo de ar contínuo. Os embriões de aproximadamente 1,5 e 2,0 mm de comprimento foram removidos das espigas e inoculados em placas de Petri contendo meio de cultura sólido, com o escutelo voltado para cima a fim de induzir calogênese. Foram removidos cerca de 80 embriões imaturos por espiga, inoculando-se de 25 a 30 embriões por placa de Petri.

Os calos foram avaliados individualmente por ocasião de cada subcultivo, quanto à sua capacidade embriogênica. Cada planta foi acompanhada quanto à sua capacidade embriogênica, anotando-se em fichas de avaliação as seguintes características: número de calos induzidos, classificação dos calos seguindo denominações padronizadas na literatura (mucilaginoso, embriogênico, friável, tipo II), verificação de ocorrência de regiões embriogênicas com características morfológicas diferentes, observações do crescimento e viabilidade dos calos para cultivos de longa duração.

As culturas foram mantidas em placas de Petri (100 mm x 20 mm) contendo um volume de meio de aproximadamente 50 ml, no escuro a 25°C. Elas foram subcultivadas a cada 15-20 dias utilizando-se de meio recém-preparado. A cada subcultivo os setores de maior crescimento dos calos foram agrupados em placas de Petri com outros calos de crescimento semelhante, mantendo sempre sua

individualidade. Os calos com crescimento reduzido, contaminados ou oxidados foram descartados.

Aos 4-6 meses de cultivo, selecionou-se principalmente os calos friáveis e embriogênicos (Tipo II), dos maiores para os menores, tomando-se como base os melhores calos aos 90 dias de idade. Assim, selecionou-se aqueles que poderiam ser agrupados no máximo em 6 numa placa, mantendo os 10-18 melhores provenientes de cada espiga. Aos 9-10 meses, realizou-se a coleta final, exceto para os calos que ocupavam acima de 50% de uma placa de Petri. Aos 12 meses foram mantidos os calos embriogênicos e friáveis, com capacidade de crescimento que permite a repicagem em mais de uma placa

Utilizou-se o meio N6 (Chu et al., 1975), acrescido de componentes orgânicos, segundo Fluminhan (1992) e por Santos (1995)(Tabela 2).

O pH foi ajustado em 5,8 com auxílio de NaOH, adicionou-se 8g/l de agar e autoclavou-se a 120°C por 20 minutos.

3.3. Análise citogenética

Quando as culturas completaram 2 meses de idade coletou-se de alguns genótipos 5 calos. Aos 3-4 meses de idade, foram coletados 10-15 calos de cada planta. Nessa etapa, alguns calos apresentavam um tamanho que permitiu uma coleta parcial, sendo então identificados. Aos 4-6 meses efetuou-se a coleta de alguns calos com menor crescimento, calos esses eliminados pelo processo seletivo. Tal coleta foi realizada com o objetivo de verificar se estes

calos foram eliminados por problemas de estabilidade cromossômica, bem como a frequência e tipos de alterações dos cromossomo 7 e 9.

Empregou-se o método de preparação de lâminas a partir de fragmentos de calos de milho, padronizado no laboratório (Aguiar-Perecin et al., 1991; Fluminhan, 1992; Aguiar-Perecin e Fluminhan, 1992; Fluminhan et al., 1996) que consiste das etapas descritas a seguir:

Os calos ou regiões meristemáticas foram coletados cinco dias após a transferência dos mesmos para um meio recém-preparado. Os calos foram pré-tratados numa mistura 8-hidroxiquinolina 2 mM + cicloheximida 0,71 mM, por 2:30 horas e posteriormente transferidos para o fixador Carnoy (3 partes de álcool etílico: 1 parte de ácido acético glacial P.A.), onde permaneceram por uma noite, em temperatura ambiente. Após esse período as amostras foram mantidas em geladeira (0-5°C). O tratamento com cicloheximida foi para testar maior obtenção de metáfases.

A coloração através de metodologia de bandamento-C foi realizada segundo o procedimento estabelecido por Aguiar-Perecin (1985) e Aguiar-Perecin & Vosa (1985), adaptados para calos por Fluminhan Jr. (1992) e Fluminhan et al.(1996). Os materiais fixados em Carnoy foram macerados em ácido acético 45% por 10 minutos. Após a separação das áreas meristemáticas, os fragmentos foram esmagados em ácido acético 45% e as lâminas foram observadas em microscópio de contraste de fase. A seguir, as lamínulas foram removidas em ácido acético 45% e secas ao ar. As lâminas foram conservadas em álcool absoluto a 4°C até o procedimento de coloração (tempo mínimo - 12 horas).

As cubas foram retiradas da geladeira deixando atingir a temperatura ambiente, quando então as lâminas e lamínulas foram

colocadas para secar ao ar. Na seqüência elas foram incubadas em solução saturada de hidróxido de bário a 37°C por 25 minutos, lavadas em água desmineralizada, a seguir incubadas em solução salina 2 x SSC à temperatura ambiente (cloreto de sódio 0,3M + citrato de sódio 0,03M) por cinco minutos e transferidas para as cubas contendo 2 x SSC a 60°C, onde permaneceram por 60 minutos. Após estes tratamentos, as lâminas foram lavadas em água desmineralizada, imersas em uma série de álcoois: 70%, 95% e absoluto, e secas ao ar. A coloração foi feita com solução Giemsa (Gurr's R 66 Giemsa) a 1% (em solução tampão pH 6,8) por um tempo variável de 2 a 2 minutos e 30 segundos. Em seguida, as lâminas foram lavadas em água desmineralizada, secas ao ar e montadas em Bálsamo do Canadá.

Os calos foram avaliados individualmente, utilizando-se um microscópio óptico, anotando-se em fichas de avaliação as seguintes características: número de células nas fases de prometáfase e metáfase, número de cromossomos, presença de aberrações grosseiras e qualidade das células.

3.4. Análise morfométrica dos cromossomos.

Foram analisadas metáfases e prometáfases coradas pelo bandamento-C, empregando-se células normais e com ocorrência de alterações grosseiras no cariótipo.

Para a identificação dos calos empregou-se uma combinação de letras e números. As letras correspondem aos genótipos, sendo A (13342/5), B (132331/1), C (13342/1), AB (13342/5 x 132331/1), AC (13342/5 x 13342/1) e BC(132331/1 x 13342/1). O número ao lado

da letra corresponde à planta, enquanto que o número após o hífen é o número do calo. Ex: BA9-15 corresponde ao híbrido 132331/1 x 13342/5, espiga número 9 e ao calo número 15.

Somente as metáfases aparentemente intactas, com cromossomos bem espalhados e apresentando coloração bem nítida foram selecionadas e fotografadas, com o uso do fotomicroscópio Zeiss, com aumento 100 x 1,25 x 3,2. O filme empregado foi o Agfa COEXPAN A.H.U. TRI 13.

Os cromossomos das células dos calos foram comparados entre si, utilizando-se para tal os seguintes parâmetros: relação de braços (RB) e comprimento relativo dos cromossomos (CR), distância do centrômero à banda (DCB), tamanho da banda (TB).

Os valores de relação de braços (RB) e comprimento relativo (CR) foram estimados de acordo com a metodologia descrita por Aguiar-Perecin & Vosa (1985) para os cromossomos do milho, apresentada a seguir:

$$RB = \frac{\text{braço maior}}{\text{braço menor}}$$

Em cada célula metafásica foi calculada a média da relação de braços dos dois cromossomos de cada par de homólogos.

O comprimento relativo foi estimado dividindo-se o comprimento absoluto de cada cromossomo da metáfase pela média do comprimento absoluto dos homólogos do par número 10. Em seguida foi calculada para cada célula a média desses índices cromossômicos, de cada par de homólogos.

$$CR = \frac{\text{comprimento absoluto}}{\text{comprimento absoluto do cromossomo 10}} \times 100$$

O cromossomo 10 foi empregado para o cálculo desse parâmetro em virtude de não apresentar bandas na metáfase dos genótipos em estudo, e portanto, representam um ponto de referência invariável para a comparação de cromossomos.

Os cromossomos visivelmente alterados foram avaliados considerando-se também os seguintes parâmetros: comprimento do braço longo (BL), comprimento do braço curto (BC), distância entre o centrômero e a banda do braço longo (DCBL), tamanho da banda do braço longo (TBL), distância centrômero-banda do braço curto (DCBS) e tamanho da banda do braço curto (TBS), conforme o caso.

O tamanho da banda-C foi calculado pela diferença entre a medida da distância entre o centrômero e o início da banda e o entre o centrômero e o final da banda.

3.5. Análise estatística

Os dados referentes a embriogênese e cromossomos foram analisados segundo um delineamento experimental inteiramente casualizado.

A avaliação da percentagem de calos embriogênicos foi efetuada a cada subcultivo. No caso das culturas aos 12 meses de idade, realizou-se uma correção para o número de embriões inoculados subtraindo-se o número de calos utilizados para a análise citogenética. As frequências de calos embriogênicos aos 45 dias e aos

12 meses após o início da cultura foram comparadas através de uma análise de desvios ("deviance"), empregando-se um modelo binomial (logístico) com superdispersão (McCullagh & Nelder, 1995) de acordo com o programa GLIM 4. A análise e interpretação dos dados foi realizada pela Prof^a Dra. Clarisse Garcia Borges Demétrio.

Para os dados referentes às análises citológicas, realizaram-se análises de variância para o comprimento relativo e relação de braços de todos os cromossomos dos calos derivados das linhagens 132331/1, 13342/1 e 13342/5, e seus respectivos híbridos, exceto para os cromossomos que sofreram alterações. Esta análise foi realizada com o objetivo de avaliar possíveis alterações que pudessem ter ocorrido nos cromossomos e que não foram detectadas visualmente, através do bandamento-C.

No caso dos cromossomos que sofreram alterações grosseiras, a avaliação da distância do centrômero à banda, tamanho das bandas de todos os cromossomos com bandas, foi feita com o objetivo de se avaliar a ocorrência de alterações destas regiões.

Avaliou-se o tamanho da região eucromática terminal do cromossomo 7, com o objetivo de verificar se os cromossomos com alterações da banda do braço longo apresentavam o mesmo tamanho dos cromossomos normais. Assim, se apresentam o mesmo tamanho, a alteração da banda pode ser decorrente de outros processo alternativo ao atraso na replicação da região heterocromática seguido de quebras e ciclos de quebra-fusão-ponte.

Os dados referentes a avaliações cromossômicas foram submetidos ao programa SAS (Statistical Analysis System), através de sua rotina GML (General Linear Models Procedure). Empregou-se a análise de variância do Tipo I, que compara as médias dos níveis de fatores, sem fazer a ponderação das médias (IEMMA, 1993).

Nos casos onde detectaram-se diferenças pelo teste F empregaram-se os testes de Tukey e Dunnett. O teste de Tukey, que segundo SAS (1988) apesar da ocorrência apenas de uma aproximação para o número de repetições pela média harmônica, esta é compensada pelo grande rigor do teste. O teste de Dunnett foi empregado apenas nas comparações dos cromossomos 7 normais com os cromossomos 7 apresentando alterações da distância do centrômero a banda e tamanho das bandas.

4. RESULTADOS

4.1. Aspectos morfológicos das culturas

A formação dos calos se deu pela proliferação de células principalmente a partir da região do escutelo dos embriões imaturos (Fig. 2).

Aos 60 dias após a inoculação os calos que se apresentavam mais embriogênicos e friáveis foram aqueles derivados do genótipo 132331/1 (Fig. 3A), sendo mais friáveis que os calos da linhagem 13342/5 (Fig. 3B).

Aos 90 dias, foram obtidos calos embriogênicos e friáveis (Tipo II) nas linhagens (Fig. 4A, B) e nos híbridos. Aos 9-10 meses de idade, os calos que apresentavam-se altamente friáveis e altamente embriogênicos de todos os genótipos também o foram aos 12 meses (Tab. 3), sendo então considerados de longa duração.

Verificou-se a ocorrência de alterações na morfologia de dois calos que resultaram em dois subclones. Aos 9-10 meses de idade o calo C2-25 (genótipo 13342/1, planta 2, calo 25) era compacto e apresentava baixa taxa de embriogênese, tornando-se altamente embriogênico e friável aos 14 meses. Aos 16 meses de idade, surgiu um subclone a partir do calo AB8-26 (genótipo 13342/5 x 132331/1),

o qual apresentou o dobro do crescimento original, no entanto com baixa embriogênese.

Em ensaios paralelos visando obter calos de longa duração, foram avaliadas duas modificações do meio de cultura empregado: o N6-1* (1 mg/l 2,4-D; 25 mM L-prolina; 2 g/l fitagel) e o N6-2* (2 mg/l 2,4-D; 5 mM L-prolina). Os calos conduzidos em meio N6-1* foram altamente friáveis e embriogênicos tipo II, à semelhança da figura 3A. Os calos conduzidos em meio N6-2* perderam a morfologia do Tipo II rapidamente e foram muito compactos. A remoção da região oxidada dos calos foi mais difícil em relação ao meio N6 utilizado neste trabalho.

4.1.1. Capacidade de manutenção das culturas por longos períodos de cultivo

Aos 5-7 dias após a inoculação, procedeu-se a eliminação das pequenas raízes (< 2cm) de alguns calos. Aos 18-20 dias após a inoculação, durante a primeira transferência, realizou-se a contagem do número de embriões que formaram calos e a eliminação dos calos de morfologia mucilaginosa. Nesta etapa estabeleceu-se a avaliação da percentagem de indução de calos (Tab. 3).

A segunda transferência ocorreu cerca de 35 dias após a inoculação. O procedimento consistiu da eliminação dos piores calos, isto é, aqueles completamente oxidados e os do tipo mucilaginoso. Quanto aos calos embriogênicos, após a eliminação das regiões oxidadas facilmente destacáveis (que correspondem ao embrião inoculado), as regiões de maior crescimento de cada calo foram agrupadas em placas de Petri (Fig. 3 A, B).

Nas transferências subseqüentes realizou-se a eliminação dos calos menos desenvolvidos ou oxidados e dos fragmentos oxidados dos calos selecionados. Assim, transferiu-se apenas as regiões meristemáticas de maior crescimento dos calos mantendo-as agrupadas, como na figura 4.

Os calos foram classificados baseando-se na friabilidade e na área da placa de Petri necessária para a sua manutenção em quatro tipos: excelentes, bons, regulares e ruins. Assim, a cada transferência os calos foram reagrupados em placas de Petri em ordem decrescente de tamanho. Observou-se que dificilmente um calo passou de uma placa com menor desenvolvimento para outra contendo os calos maiores.

Para efetuar as análises citológicas dos calos aos 2 e 3-4 meses de idade, foram retiradas amostras representativas dos diversos tamanhos.

4.1.2. Análise estatística da resposta embriogênica dos calos

A análise da morfologia e freqüência de sobrevivência dos calos foi realizada em diferentes idades. A percentagem de calos induzidos foi superior a 97%. Aos 45 dias de cultivo a freqüência de calos tipo II variou de 81,76% a 89,42%, mas não foram observadas diferenças significativas entre os genótipos. Por outro lado, aos 12 meses observou-se que os calos derivados do cruzamento 13342/1 x 13342/5 apresentaram menor taxa de sobrevivência e pior aparência (baixa embriogênese e baixa friabilidade) (Tab. 3, 4), assim permanecendo até aos 18-24 meses. Os calos derivados do genótipo

132331/1 x 13342/1 apresentaram-se mais embriogênicos e friáveis aos 12-24 meses (Fig. 4B) em relação aos outros genótipos.

4.2. Análises cromossômicas

As análises citológicas foram baseadas em células nas fases de metáfase e prometáfase coradas pela metodologia de bandamento-C.

Quando a região meristemática dos calos fixados era de coloração opaca, em geral, apresentavam um maior rendimento de células em divisão em relação àqueles calos que eram translúcidos.

4.2.1. Análise de prometáfases e metáfases coradas pela metodologia de bandamento-C.

A avaliação das preparações citológicas numa primeira etapa foi visual, verificando-se o nível de ploidia e a presença de alterações estruturais grosseiras. Numa segunda etapa, realizou-se análises morfológicas dos cromossomos de células aparentemente normais e de células que apresentaram alterações cromossômicas, visando estabelecer uma correlação entre bandas e as aberrações cromossômicas. Para tais análises empregaram-se apenas células que apresentavam boa distribuição dos cromossomos.

Todos os genótipos apresentaram aberrações aos 2, 3-4, 4-7 meses de idade (Tab. 5, 6, 7, 8, 9).

Encontraram-se vários tipos de alterações, sendo a maioria localizadas no braço curto e/ou no longo do cromossomo 7. No braço longo foram encontradas alterações na banda como a amplificação,

redução, duplicação da banda heterocromática, quebra na região do knob resultando em banda terminal e ausência da banda (Fig. 5, 6A, 7).

Quanto as alterações no braço curto do cromossomo 7, encontrou-se banda amplificada, banda intersticial, banda duplicada, banda reduzida, e a ausência da banda (Fig. 5F-J, 6B, 8C-E). Também observou-se a presença de banda duplicada (Fig. 6B).

Uma combinação dos tipos de aberrações do cromossomo 7 descritas anteriormente foi observada. Assim, quando se encontraram dois cromossomos 7 alterados numa mesma célula denominou-se de (K7L + K7S). Por outro lado, quando uma célula apresentou alterações nos dois braços de um cromossomo 7 ela foi denominada de (K7L e K7S) (Fig. 8A, B).

Para o cromossomo 9 foram encontrados três tipos de alterações. O primeiro com uma banda duplicada, um segundo tipo com a banda intersticial e um terceiro tipo com a banda reduzida (Fig. 6C, 9).

Foram encontrados outros tipos de alterações do genoma com menor frequência: anéis (Fig. 10), trissômicos (Fig. 11A-C), nulissômicos, (Fig. 11D) tetraplóides (Fig. 12A, B), triplóides (Fig. 12C), mini cromossomos (Fig. 12B, D), translocações (Fig. 13), dicêntricos (Fig. 14A, B), isocromossomos (Fig. 14C-E).

4.2.2. Análise das aberrações em calos coletados aos 2 meses de idade

Avaliaram-se em média 13,8 células por calos, cujo rendimento de células em divisão (prófases, prometáfases e metáfases) variou de 0 a 73. Entre os calos analisados individualmente 59,7% (46/77) não apresentaram aberrações cromossômicas.

Como as análises se referiam a calos individuais, a planta B2 (genótipo 132331/1) foi analisada separadamente isto é, não esta incluída na tabela 5 por constituir-se de uma mistura de cinco calos. Foram observadas 22 células normais (88%), uma célula com translocação, uma contendo o knob do braço curto subterminal e uma com um cromossomo dicêntrico (Fig. 14A).

Considerando-se os resultados da tabela 5, foi encontrada uma taxa de aberrações menor que 10%, exceto para as plantas C5 (genótipo 13342/1) e BC6 (132331/1 x 13342/1).

O cromossomo 7 foi o mais alterado, sendo encontrado em mais de 4,4% (44/1066) das células analisadas. A frequência de alterações foi semelhante para os dois braços do cromossomo 7, entretanto, a distribuição das aberrações não foi uniforme, tendo sido observados com maior frequência a banda subterminal correspondente a K7S e duplicação da banda correspondente a K7L.

A linhagem 132331/1 e o híbrido 13342/1 x 13342/5 apresentaram frequência de alterações do braço longo do cromossomo 7 inferior à do braço curto.

Em menor frequência verificaram-se: translocações, alterações das bandas de um dos homólogos do par 7, dois cromossomos 7 alterados numa mesma célula, apenas uma célula apresentando o cromossomo 9 em anel (calo C4-4), uma célula tetraplóide, uma monossômica (Fig. 11D), os cromossomo 7 e 1 dicêntricos (Fig. 14 A, B).

Os resultados da análise de uma célula proveniente do calo C5-4 e um outro o CA3-1, em que ocorreu homozigose da banda amplificada correspondente a K7L (Fig. 5B) sugere que mecanismos idênticos tenham atuados sobre os dois cromossomos.

Foram poucos os outros tipos de aberrações que não envolveram o cromossomo 7. Assim, observou-se que apenas uma célula do calo A8-5 apresentou $2n=21$ cromossomos, sendo este correspondente a uma trissomia do cromossomo número 1. Esta célula também apresentou uma banda intersticial no braço longo do cromossomo 6, resultado provável de uma duplicação em tandem reverso (Fig. 11A). Também se observou que uma célula do calo C3-4 foi “nulissômica”, com ausência dos cromossomos 2 e 5, e a presença de um cromossomo cuja morfologia aproxima-se do cromossomo 9 (Fig. 11D).

Foram observadas translocações envolvendo um dos cromossomo 7 nos calos B4-1, A7-2 e BA9-1. Nos calos BA9-3, BA9-4 e CA2-5, observou-se o cromossomo 2 translocado com outro cromossomo sem knob.

4.2.3. Análise de aberrações dos calos coletados aos 3-4 meses de idade.

O número de células observadas por calos individualmente variou de 0 a 63. Entre os calos analisados 69% (252/365) não apresentaram aberrações cromossômicas.

Baseando-se nas tabelas 6 e 7, verificou-se que a frequência média de células normais do híbridos (95,7%) foi ligeiramente superior às linhagens (91,1%).

O calo B4-15, proveniente do genótipo 132331/1 apresentou 13 células triplóides e duas $2n=22$. Os outros calos foram provenientes do genótipo 13342/5: o calo A5-18 apresentou 16 células contendo um cromossomo 7 com o knob terminal reduzido, e

também uma célula tetraplóide contendo dois destes cromossomos. O calo A8-17 apresentou cinco células trissômicas para o cromossomo 7.

A análise conjunta das frequências de aberrações aos 2 e 3-4 meses de idade mostrou acima de 93,9% (3914/4167) de células normais (Tab. 8). Nas células com aberrações mais de 68% apresentavam alterações do cromossomo 7 (a frequência de aberrações envolvendo o braço longo foi praticamente o dobro das alterações no braço curto), sendo que as demais alterações cromossômicas representam menos de 28%.

A presença de duas ou mais aberrações iguais no mesmo calo pode significar que após ciclos de quebra-fusão-ponte ocorreu cicatrização das extremidades quebradas (Fluminhan et al., 1996).

Células contendo duas ou mais aberrações foram encontradas em todos os genótipos. Assim, para a linhagem 132331/1 (B), observou-se o calo B4-16, contendo duas células com a banda amplificada terminal correspondente a K7L; o calo B4-18 com o maior mosaicismo observado (5 células diferentes), sendo uma com a banda duplicada correspondente a K7L, uma com banda terminal correspondente a K7L, uma com banda amplificada correspondente a K7S, uma com banda reduzida correspondente a K7S e uma banda reduzida correspondente a K9S; o calo B2-6p, contendo duas células com banda reduzida correspondente a K7S e o calo B1-5, com duas células com banda reduzida correspondente a K9S.

Para o genótipo 13342/1 (C), observou-se o calo C3-11, com três células contendo banda duplicada correspondente a K7L e um provável iso-cromossomo para o cromossomo 6; o calo C3-12, com duas células contendo uma banda subterminal correspondente a K7S, uma célula sem a banda correspondente a K7S, duas células contendo aberrações nas duas bandas do cromossomo 7, e o calo C3-

18, com quatro células com banda subterminal correspondente a K7S das quais uma banda era reduzida e as demais amplificadas.

Para o genótipo 13342/5 (A) observou-se o calo A7-16, com duas células com bandas terminais reduzidas correspondente a K7L; o calo A7-22, com duas células com a banda reduzida correspondente a K7S; o calo A5-11, com três células com banda amplificada correspondente a K7S; o calo A4-6p, com duas células com banda duplicada correspondente a K7L e o calo A4-8 com duas células com banda reduzida correspondente a K7L.

Para o genótipo 132331/1 x 13342/1 (BC) observou-se o calo CB6-12, com cinco células com banda correspondente a reduzida K7S e uma com banda subterminal correspondente a K7S; o calo CB6-18, com 3 células contendo anéis para o cromossomo 7; o calo CB3-14, com duas células banda duplicada correspondente a K7L; o calo CB3-18, com duas células e banda duplicada correspondente a K7L duas com banda reduzida correspondente a K7L e o calo CB3-23 com uma célula contendo um anel e uma com banda terminal correspondente a K7L.

Para o genótipo 132331/1 x 13342/5 (BA) verificou-se o calo AB2-10, com uma célula com banda duplicada correspondente a K7S e com a banda duplicada correspondente a K9S e o calo AB2-11 com duas células com banda amplificada correspondente a K7L e duas com banda terminal correspondente a K7L.

Para o genótipo 13342/1 x 13342/5 (CA) observou-se o calo AC4-15, com três células com banda reduzida correspondente a K7L e três com banda terminal reduzida correspondente a K7L; o calo CA3-16, com duas células com as bandas correspondentes a K7L e K7S alteradas; CA2-20 com uma célula com banda duplicada correspondente a K7L, duas células com banda terminal de diferentes

tamanhos correspondentes a K7L e o calo CA1-10, com duas células com banda correspondente a K7L, uma com as bandas correspondentes a K7L e K7S alteradas.

Foram observadas outras aberrações menos freqüentes tais como: no calo A4-6p, duas prometáfases com os nucléolos grandes (Fig. 14F); no calo AB8-13, três células tetraplóide (Fig. 12B); anéis, células contendo translocações e alterações na região do knob do cromossomo 9. Outro tipo mais raro foi a adesão/sobreposição de cromossomos na região dos knobs.

Foram observados isocromossomos para o braço curto do cromossomo 6 no calo C3-11 (Fig. 14C), e para o braço longo do cromossomo 7 nos calos C3-12 e C3-18. Para o surgimento de tal aberração é necessária a quebra no centrômero e a não separação das cromátides irmãs.

Em três culturas foram observadas a presença de um cromossomo 7 com diferenças no tamanho das bandas das cromátides irmãs (calos C1-14 e AC4-16, planta 13342/5) (Fig. 15).

Vários calos não apresentaram células em divisão geralmente constituídos de células de pequeno diâmetro.

4.2.4. Análise de aberrações dos calos coletados aos 4-7 meses de idade.

Foram analisados os calos de menor crescimento provenientes de 4 genótipos: linhagens 132331/1 e 13342/5, híbridos 132331/1 13342/1 e 132331/1 x 13342/5. O número de células observadas foi baixo e a freqüência de células normais média foi de 78% (Tab. 9).

Duas plantas apresentaram menor frequência de células normais: a planta A6 da linhagem 13342/5 apresentou 50% (29/58) e a planta B1 da linhagem 132331/1 apresentou 14% (3/21), apresentando quatro células contendo um cromossomo 7 com a banda terminal reduzida e um 9 com a banda do braço curto subterminal. Nas demais plantas ocorreu uma menor frequência de aberrações.

4.2.5. Análises morfométricas dos cromossomos

Comparando-se o comprimento relativo e a relação de braços dos cromossomos das células aparentemente normais com os cromossomos visualmente normais das células que apresentavam o cromossomo 7 alterado (Tab. 10 e 12), não se encontraram diferenças significativas (Tab. 11 e 13).

Assim, quando comparam-se os valores de distância entre o centrômero e a banda (DCB) e o tamanho da banda (TB) dos cromossomos 3, 6, 8 e 9 (Tab. 14), não se verificou diferença significativa pelo teste de F (Tab. 15 e 16). Os cromossomos 9 contendo bandas alteradas não foram comparados em razão da baixa qualidade das poucas células obtidas e porque são discriminados facilmente (Fig. 6C, 9A-F).

Ao analisar cromossomos de células em que apenas o cromossomo 7 estava alterado, comparando-se cromossomos com bandas para avaliar sua integridade, nenhum cromossomo com banda estava alterado em uma célula, pode-se interpretar com maior segurança que a alteração do cromossomo 7 originou-se através de um ciclo de quebra-fusão-ponte.

Comparou-se os cromossomos 7 visualmente normais, utilizando-se os parâmetros: distância centrômero-banda do braço longo (DCBL), distância centrômero-banda do braço curto (DCBS), tamanho da banda do braço longo (TBL) e tamanho da banda do braço curto (TBS) (Tab. 17), para os quais não se verificaram diferenças significativas entre as células normais e alteradas (Tab. 18).

Quanto aos cromossomos 7 alterados, eles foram agrupados segundo o tipo de aberração e comparados aos cromossomos normais provenientes de células normais, para os parâmetros DCBL, DCBS, TBL e TBS. Só se observaram diferenças significativas para o parâmetro tamanho da banda. Assim, para a banda correspondente a K7L ocorreu diferença significativa quando estava amplificada ou reduzida, e para a banda correspondente a K7S ocorreu quando a banda estava duplicada, reduzida ou subterminal (Tab. 19, 20).

Comparando-se o tamanho da região eucromática terminal do braço longo do cromossomo 7 normal com a mesma região de cromossomos com a banda do braço longo alterada (duplicada, amplificada, reduzida) não se observou diferença significativa entre elas (Tab. 21, 22).

5. DISCUSSÃO

5.1. Aspectos do cultivo *in vitro* de milho

A formação dos calos teve início principalmente a partir do escutelo (Fig. 2). Esta característica já foi observada para os genótipos aparentados (Fluminhan, 1992), e em outros genótipos por Green & Phillips (1975), Edallo et al. (1981), Lu et al. (1982), Lowe et al. (1985), McCain & Hodges (1986), Prioli (1989), Van Lammeren (1988), Fransz & Schel (1994) e Bohorova et al. (1995).

Considerando os resultados da tabela 3, pode-se verificar que ocorreu 99% de indução de calos, sendo comparável aos melhores resultados para genótipos tropicais, descritos por Fluminhan & Aguiar-Perecin (não publicado) e Prioli e Silva (1989), e superior a melhor linhagem utilizada por Bohorova et al. (1995). Os resultados também são comparáveis a linhagem A188 e outros genótipos adaptados ao clima temperado (Hodges et al., 1986; Fahey et al., 1986; Wilkinson & Thompson, 1987; Lupotto & Lusardi, 1988a). Isto reflete a superioridade dos genótipos selecionados a partir de Jac Duro, das condições fisiológicas das plantas doadoras e das condições de cultivo *in vitro*. A variedade Jac Duro foi resultante do cruzamento de vários materiais,

entre eles a raça Cateto (U. Ribeiro, comunicação pessoal a M.L.R. Aguiar-Perecin). Prioli e Silva (1989) já havia observado superioridade da raça Cateto e das linhagens que apresentavam a raça cateto em sua formação. Por outro lado, Bohorova et al.(1995) haviam observado maior aptidão da raça Tuxpeño.

O procedimento de eliminação de calos a cada subcultivo, em virtude de uma redução no seu crescimento e na sua taxa de embriogênese, bem como por alguns tornarem-se oxidados ou mucilaginosos, foi necessária para não afetar os calos vizinhos. Por estas razões é que sempre ao se transferir os calos começou-se pelos mais friáveis e maiores. Assim, com este sistema de subcultivos, aos 45 dias após a inoculação observou-se uma perda da viabilidade média dos genótipos em torno de 10%, sem no entanto resultar em diferença significativa entre eles (Tab. 3).

O fato de alguns calos perderem o caráter embriogênico Tipo II está de acordo com os relatos de Welter et al. (1995), e para o Tipo I por Lusardi & Lupotto (1988A). Armstrong & Green (1985) haviam observado que a formação de cultura embriogênicas e friáveis (Tipo II) era inferior a 50% dos calos inicialmente induzidos.

A não ocorrência de diferença significativa entre os genótipos, indiferente à composição dos knobs dos mesmos, pode estar relacionado ao fato das linhagens empregadas serem irmãs, portanto apresentar alelos comuns para culturas de curta duração.

Aos 60 dias após a inoculação, os calos provenientes de 13342/1 foram menores e menos friáveis. O genótipo 132331/1 (Fig. 3A)

apresentou-se altamente embriogênico e altamente friável, assim, baseando-se nas sugestões de Phillips (1989) este genótipo seria interessante para trabalhos de transformação genética.

Efetuiu-se uma redução do número dos calos aos 4-7 meses de idade, baseando-se nos melhores calos aos 3 meses (Fig. 4B), ou seja, aqueles que poderiam ser agrupados no máximo em seis por placa de petri. As razões para esta seleção foram também para adequação do tempo necessário à manutenção, redução de custos e por se observar que os calos menos competitivos tendem a perder a taxa de embriogênese e a friabilidade. Esta menor capacidade de crescimento pode estar ligada a alterações do genoma. Estes calos preteridos apresentaram células normais e alteradas, sendo baixo o número de plantas com alta frequência de cromossomos aberrantes (Tab. 9).

Aos 12 meses de cultivo efetuou-se a seleção de calos tipo II com capacidade para cultivo de longa duração. Estes calos foram mantidos por mais de 18 meses, refletindo a alta qualidade dos genótipos, principalmente do 13342/5 (Tab. 3). Santos (1995) havia observado um calo derivado do genótipo 13342/5 com capacidade de cultivo de longa duração (23-42 meses) sem perder a capacidade de regeneração de plantas férteis.

Em termos de sobrevivência, os calos provenientes do cruzamento 13342/1 x 13342/5 foram inferiores aos demais híbridos, bem como foram menos friáveis. Pode-se observar tendência uma capacidade do híbrido 132331/1 x 13342/1 muito superior aos pais.

O meio N6 2* (2 mg/l 2,4-D e 5 mM L-prolina), utilizado em um ensaio paralelo, mostrou-se altamente seletivo, pois os calos foram menos friáveis e ocorreu alta frequência de oxidação, principalmente quando as transferências foram realizados em intervalos inferiores a 10 dias. Claparols et al. (1993), utilizando o meio N6 (2 mg/l 2,4-D) observaram que L-prolina em concentração superior a 6 mM foi prejudicial à produção de calos embriogênicos do Tipo I.

Fluminhan (1992) utilizando o meio MS acrescidos de 2,4-D (2 mg/l) encontrou bom crescimento de calos derivados de genótipos relacionados aos do presente trabalho. Dois destes genótipos (calo 3-57 e 12 F) foram mantidos por Santos (1995) em meio MS (1 ou 2 mg/l 2,4-D) ou transferidos para o meio N6 (1,5 mg/l 2,4-D) com 12 mM L-prolina. O autor observou que não ocorreu diferença na capacidade de sobrevivência dos genótipos, mas os calos cultivados em meio N6 eram mais embriogênicos. Também, observou superioridade do genótipo calo 12F que regenerou plantas férteis, enquanto que as plantas regeneradas do calo 3-57 dificilmente atingiam a maturidade.

5.2. Estabilidade dos cromossomos nos calos

Os trabalhos realizados com células coradas pela metodologia do bandamento-C permitem avaliar alterações grosseiras principalmente dos cromossomos com knobs. No desenvolvimento do presente projeto,

encontrou-se um pequeno número de metáfases de boa qualidade por calos para se efetuar as análises morfométricas.

O cromossomo 7 é o único a apresentar um knob heterocromatico médio terminal no braço curto (K7S) e um knob grande subterminal (K7L) no braço longo (Fig. 1 A-D, 6A). Portanto, é o cromossomo mais fácil de ser identificado.

Assim, baseando-se no número e na morfologia dos cromossomos analisou-se os calos coletados aos 2, 3-4 e 4-7 meses de idade.

5.2.1. Análise de metáfases mitóticas de calos coletados aos 2 meses de idade.

Acima de 94% das células eram normais (Tab. 5), portanto os genótipos testados foram estáveis. Estes resultados são semelhantes aos encontrados por McCoy & Phillips (1982) e Rao et al. (1983). Apesar do pequeno número de calos avaliados por planta (máximo 5), pode-se constatar a ocorrência de diversos tipos de alterações cromossômicas, sendo algumas já descritas nos genótipo aparentados por Santos (1995) e Fluminhan et al. (1996). Estas aberrações são decorrentes de diferentes mecanismos que serão discutidos no item 5.3.

A frequência de alterações envolvendo o cromossomo 7 foi superior aos demais cromossomos, sendo semelhante entre os dois braços. Se considerarmos todas os tipos de alterações em que o

cromossomo 7 está envolvido tem-se uma frequência de 81,0% (47/58) do total de aberrações observadas.

O genótipo mais estável foi o híbrido 132331/1 x 13342/5, enquanto que o menos estável foi 13342/1 x 132331/1. Considerando-se que este último foi representado apenas pela planta número 6, sugere-se que novas avaliações, sejam realizadas utilizando maior número de plantas.

Segundo Bayliss (1980), a constituição cromossômica final do calo depende mais da capacidade competitiva entre os tipos de células existentes do que da frequência da origem de cada tipo. O mosaicismo ocorreu em poucos calos, o que foi devido provavelmente ao pequeno número de células com aberrações acumuladas até os dois meses.

Entretanto, a ocorrência de ciclos de quebra-fusão-ponte pode ser sugerido pelo acúmulo de aberrações estruturais semelhantes ou complementares nos seguintes calos: B6-3 com duas células apresentando banda duplicada correspondente a K7S; A8-4 com três células apresentando banda duplicada correspondente K7L; A7-4 com uma célula com banda amplificada correspondente K7L e uma com banda terminal correspondente a K7L; BC6-2 com três tamanhos diferentes de bandas subterminais correspondente K7S.

Santos (1995) e Fluminhan et al. (1996) realizaram análise concomitante de anáfases e metáfases concluíram que ocorre atraso, seguido de ciclos de quebra fusão, dando origem a cromossomos 7 e 9 com bandas amplificadas, ausência, redução e bandas subterminais.

Assim, nos trabalhos de regeneração de plantas de Green et al. (1977) e Lee & Phillips (1987a, 1987b), onde não se encontraram aberrações entre as plantas regeneradas a partir de calos com mais de 4 meses, isto se deve provavelmente a menor capacidade de sobrevivência e/ou competição das células aberrantes em relação às normais.

5.2.2. Análise de metáfases mitóticas de calos coletados aos 3-4 meses de idade.

A frequência de células normais dos calos coletados aos 3-4 meses foi praticamente a mesma dos calos coletados aos dois meses de idade, mas a frequência de calos contendo aberrações reduziu em 10%. Para todos os genótipos ocorreu um predomínio de aberrações do cromossomo 7. A mesma tendência de ocorrência de alterações envolvendo o cromossomo 7, para o genótipo 132331/1, foi observada por Fluminhan (1992), Santos (1995) e Fluminhan et al. (1996).

Em alguns calos observaram-se um maior número de aberrações em relação aos dois meses de cultivo. Este acúmulo de alterações pode ocorrer em função das pontes na anáfase se romperem em qualquer posição, como sugerido por Lee & Phillips (1987a), e assim gerar cromossomos com diferentes formas aberrantes. O acúmulo pode ser consequência de um maior número de ciclos de divisão celular e de ciclos de quebra-fusão-ponte gerarem novos tipos de aberrações.

Santos (1995), partindo de um calo contendo um cromossomo 7 com 3 bandas (duas no braço curto) observou modificações como a perda de regiões eucromática duplicada-deficiente em função da quebras, principalmente na região dos knobs do braço curto.

A ocorrência de duas ou mais aberrações por calo foram observadas para todos os genótipos (Fig. 8A, B, E, 9D, E, 15C). Alguns destes calos com duas ou mais células aberrantes continham dois ou mais tipos de aberrações. A baixa frequência de ocorrência de tais casos pode estar relacionada à seleção de regiões de maior crescimento dos calos durante os subcultivos e, conforme proposto por Bayliss (1980) da capacidade competitiva entre as células com diferentes cariótipos.

No calo A5-18, todas as células analisadas apresentavam um cromossomo 7 com a banda terminal correspondente a K7L, que pode ser devido a ocorrência de tal aberração na fase inicial da cultura e pela sua capacidade competitiva, dominaram a cultura.

A trissomia do cromossomo 7 foi observada no calo A8-24 em uma célula e no calo A8-17 em todas as cinco células analisadas (Fig. 11C). Os mecanismos envolvidos na sua origem podem ser não disjunção, atraso na separação do cromossomo e aberrações no fuso (Sunderland, 1977; D'Amato, 1985). A combinação de mecanismos, proposta por Sunderland (1977) pode ter ocorrido, pois foram encontradas entre estas células uma contendo $2n = 20 - 1 + 1$, sendo que um cromossomo 7 apresentava amplificação da banda correspondente a K7L (Fig. 11B).

Outros tipos de aberrações observadas foram as translocações. No calo CB6-22 foram cinco células envolvendo os cromossomo 7 e 9; no calo CB4-21 com uma translocação envolvendo um cromossomo 7 e outro cromossomo não identificado; no calo AC4-18 contendo uma célula cuja translocação envolveu os cromossomos 7 e 3. As translocações foram os eventos mais importantes observadas por Benzion et al. (1986).

Os anéis envolveram principalmente os cromossomo que apresentam knobs (Fig. 10A-F). Assim, um anel formado pelo cromossomo 7 foi observado nos calos A6-19, B4-12 e CA2-18. A presença de anéis homozigotos formados pelo cromossomo 7 nos calos BA7-21 e AB2-2p (coleta parcial), sugerem um mecanismos comum para a formação de ambos. A presença de anéis que não envolveram os cromossomos contendo knobs foram AC4-19, A6-14, A5-11 e C2-12. Blackburn (1991) afirma que os anéis podem ser formados em consequência de ciclos de quebra-fusão-ponte.

A presença de um minicromossomo foi observada nos calos B2-14, C3-23; A7-14 (Fig. 12D); AB8-23 (Fig. 12B). Eles podem ser resultados de não disjunção e quebras cromossômicas, conforme sugestão de Santos (1995) para um genótipo aparentado.

A presença de nucléolos grandes em prometáfases pode estar relacionada a uma alteração do NOR (Fig. 14F). Alterações da região do NOR foram observadas em plantas regeneradas de cultivo *in vitro* por Lee & Phillips (1987) e Benzion & Phillips (1988).

Os isocromossomos para o braço curto do cromossomo 6 e para o braço longo do cromossomo 7, sugerem uma quebra no centrômero e a não separação das cromátides irmãs.

Foram observadas células tetraplóide em todos os genótipos, porém numa taxa muito inferior a observada por Edallo et al. (1981). Estas células tetraplóides podem ser formadas como um produto de endorrepliação ou fusão nuclear (Sunderland, 1977).

Sunderland (1977) sugere a combinação de alterações numéricas com aberrações estruturais. Observou-se que uma célula do calo AB8-23 é fruto desta combinação pois é tetraplóide e apresenta alterações estruturais como: cromossomo 7 com banda terminal correspondente a K7L, translocações, acrocêntrico e um mini cromossomos (Fig. 12B).

A ocorrência de cromátides irmãs de tamanhos diferentes se deu em função da diferença de tamanho das bandas-C, pois não ocorreu diferença na região do centrômero à banda, bem como aparentemente na região eucromática terminal (Fig. 15A-C).

A ocorrência de um grande número de calos em que não se encontrou células em divisão, mas um grande número de células pequenas pode estar associado a calos de curta duração, conforme Jiménez et al. (1988).

5.2.3. Análise de metáfases mitóticas de calos coletados aos 4-7 meses de idade.

Foram avaliados principalmente calos dos genótipos com participação da linhagem 132331/1 (Tab. 9). Isto ocorreu com os objetivos de relacionar a frequência de aberrações grosseiras com a menor capacidade de crescimento bem como o comportamento do knob do cromossomo 9 em calos mais velhos. Assim, para a planta B1, verificou-se células com K9S e/ou o banda subterminal correspondente a K7L. Uma célula da planta B2 também apresentou banda reduzida correspondente a K7L e K9S. Assim, pode-se sugerir eventos sequenciais (quebra do cromossomo 7 seguida pela formação do 9 subterminal) ou translocação da parte terminal do braço longo do cromossomo 7 para a região do knob do braço do cromossomo 9 (Fig. 9D). No caso de translocação, conforme proposto por Lee & Phillips (1987a) um fragmento acêntrico derivado do braço longo do cromossomo 7 se fundiu à extremidade quebrada do cromossomo 9. Nestes casos, semelhante ao observado por Santos (1995), ocorreu um aumento da frequência de cromossomos 9 alterados durante o período da cultura em relação com as coletas de calos anteriores.

No caso da planta A4, pode ter ocorrido ciclos de quebra-fusão-ponte pois ocorrem dois cromossomos complementares (banda reduzida em K7L e terminal reduzida em K7L), isto é, onde um cromossomo alterado pode originar o outro.

5.2.4. Análise morfométrica dos cromossomos

A análise de cromossomos aparentemente normais derivados de células que apresentavam um cromossomo 7 alterado (Fig. 5, 6A, B, 7, 8C-F, 9D-F), mostrou não haver diferenças significativas em comparação com os cromossomos de células normais (Tab. 10, 11, 12, 13). Os valores obtidos foram semelhantes aos encontrados por Santos (1995).

Ao se comparar a DCB (distância centrômero à banda) para todos os cromossomos com banda, classificados visualmente como normais, não se verificou a ocorrência de diferenças significativas entre os cromossomos provenientes de células normais e aberrantes. Pelo exposto conclui-se que as alterações ocorreram na região dos knobs, o que está de acordo com Santos (1995) e Fluminhan et al. (1996).

Estas observações foram possíveis de detectar por envolverem alterações de fácil reconhecimento. As análises estatísticas dão subsídio para afirmar que a maioria das aberrações são provenientes de ciclos de quebra-fusão-ponte. Os cromossomos contendo translocações (Fig. 12) não foram incluídos nesta análise.

O cromossomo 7 foi o mais alterado, o que facilitou a identificação visual de tais alterações (Fig. 5, 6A, B, 8, 10A-C). A banda correspondente a K7L pode ser um sítio frágil de quebra. Considerando que a linhagem A188 não apresenta banda no braço curto do cromossomo 7 (Phillips et al., 1988), não se espera encontrar alterações neste braço devido a quebras do knob, e portanto a frequência de células aberrantes será menor. Por outro lado, a maioria das linhagens componentes de híbridos cultivados na região do

"Corn belt" tem um knob grande em K7L (Chughtai & Steffesen, 1987) isto sugere novos trabalhos com linhagens com knobs menores ou ausentes, para se analisar o efeito deste knob em causar quebras cromossômicas.

Considerando o grande bloco de heterocromatina terminal do braço curto do cromossomo 9 (K9S) e a baixa frequência de alterações pode-se sugerir que ele é mais estável que o cromossomo 7. Assim, pode-se afirmar que não é o número de knobs mas a presença de determinados knobs, o fator mais importante para a estabilidade cromossômica.

5.3. Mecanismos de indução de alterações cromossômicas

As alterações cromossômicas observadas foram principalmente estruturais envolvendo os braços contendo os knobs (Tab. 5, 6, 7, 8, 9). O cromossomo 7 foi o que apresentou maior frequência de alterações. As alterações do cromossomo 7 ocorreram principalmente no knob do braço longo e/ou do braço curto (Fig. 5, 6A, B, 7, 8D-F). Mas foram observadas também aberrações numéricas e combinação entre as duas classes. Estes resultados corroboram com os de Lee & Phillips (1987a), Benzion & Phillips (1988) que encontraram alta frequência de cromossomos quebrados na região dos knobs.

No caso de um atraso na separação das cromátides na região do knob (Fig. 14A), ela pode levar a uma quebra dentro do knob do braço longo resultando um cromossomo normal e outro com a banda terminal correspondente a K7L. Este último, pode apresentar a banda

terminal correspondente a K7L. Este último, pode apresentar a banda terminal reduzida ou “normal”, dependendo do local desta quebra. Após a replicação, as extremidades quebradas se fundiriam dando origem a um cromossomo dicêntrico com uma banda entre os dois centrômeros. Os centrômeros dos cromossomo dicêntricos ao irem para pólos opostos formariam uma ponte que poderia quebrar instalando-se ciclos de quebra-fusão-ponte. Se a quebra ocorresse dentro do knob poderia resultar em cromossomos com uma banda amplificada no braço longo, que se estabilizariam se sofressem um processo de cicatrização. Por outro lado, se o local da quebra fosse numa região de eucromatina, poderia resultar em cromossomos com a banda amplificada correspondente a K7L (Fig. 5B) ou reduzido (Fig. 5C), dependendo do tamanho da banda entre os dois centrômeros, conforme demonstrado por Santos (1995) e Fluminhan et al. (1996).

Uma combinação do número de ciclos de quebra-fusão-ponte e do local de quebra poderia resultar em duas bandas justapostas (duplicação da banda correspondente a K7L), que seria uma pequena constrição de uma banda, devido provavelmente a presença de eucromatina entre as bandas (Fig. 5A).

O cromossomo dicêntrico poderia sofrer não disjunção, ou seja, os dois centrômero serem arrastados para o mesmo polo e então se estabilizar como tal, originando as células trissômicas encontradas.

Baseando-se nos relatos de Sasaki (1977) que observou o crossing over entre cromátides irmãs e da sugestão de Peschke & Phillips (1992) que o crossing over desigual resulta nas amplificações

gênicas, sugere-se que outra possibilidade seria o crossing-over desigual entre as cromátides irmãs dentro da região de DNA repetitivo, resultando em uma cromátide contendo uma banda reduzida e a outra contendo uma banda duplicada ou amplificada (Fig. 15). Conforme visualizado na figura 5A, observou-se diferentes tamanhos de bandas duplicadas correspondente a K7L. Esta via alternativa permite o surgimento de alterações internas do tamanho do knob e mantém a parte terminal eucromática do braço longo do cromossomo 7 intacta, seja ele portador de banda duplicada (K7L duplicado), de uma banda amplificada (K7L amplificado) ou reduzida (K7L reduzido), portanto apresentando o mesmo tamanho do segmento eucromático terminal do cromossomo 7 normal (Tab. 21, 22). Ocorreram células homozigóticas para a amplificação da banda correspondente a K7L e a região eucromática terminal apresenta tamanho semelhante ao do cromossomo normal. Portanto, a presença de um cromossomo K7L duplicado e K7L reduzido em células diferentes de um mesmo calo pode ser resultado de um crossing-over desigual a nível dos knobs. E neste último caso não haveria necessidade de atuação do mecanismo de cicatrização da região terminal do braço longo do cromossomo 7.

Para o braço curto, foram observados quatro tipos de alterações da banda terminal: reduzida, amplificada, sub-terminal e ausente (Fig. 5F-J), Como proposto por Santos (1995) e Fluminhan et al. (1996), ocorreria um atraso na separação das cromátides a nível do braço curto e que poderia resultar em uma quebra dentro do knob. Após a replicação as extremidades quebradas se fundiriam dando origem a

um dicêntrico que formaria uma ponte na anáfase, a qual ao quebrar resultaria em bandas “normais”, reduzidas, amplificadas ou ausentes, dependendo do local da quebra. Os cromossomos sem banda no braço curto, isto é, que sofreram uma deleção, foram raros, sendo estes dados consistentes com os observados por Fluminhan (1992), o que sugere que as células que apresentam tal cromossomo são menos competitivas.

Quanto à ocorrência dos cromossomos contendo knobs subterminais, eles seriam resultantes de uma quebra entre o knob e o centrômero (Fig. 5J). Para os cromossomo contendo a banda duplicada, seria necessária a existência de um cromossomo contendo um knob subterminal que após um ciclo de quebra-fusão-ponte resultasse na quebra de uma das cromátides na região entre a banda e o centrômero (Fig. 5F).

Os cromossomos quebrados na região dos knobs podem se estabilizar devido a adição de um novo telômero (Harber & Thoburn, 1984; Werner et al., 1992), o que pode ter ocorrido no knob do braço longo do cromossomo 7 quebrado, no calos A5-18.

Os cromossomos contendo alterações no braço curto e longo, podem ser provenientes de atrasos na separação das cromátides na região do knob do braço curto e do braço longo. Se as alterações ocorrerem em ciclos de divisão celular diferentes, e a primeira já estiver cicatrizada resultará num cromossomo alterado nos dois braços denominados de (K7L e K7S)(Fig. 8A, C). Se por outro lado, as quebras ocorrerem simultaneamente ou seqüencialmente, mas a primeira não estiver cicatrizada, pode resultar na formação de anéis (Fig. 10A-C). A ocorrência de ciclos de quebra-fusão-ponte, iniciando por cromossomos

em anel pode resultar também em cromossomos com alterações nos dois braços.

As translocações envolvendo um cromossomo 7 são as mais fáceis de identificação, pelo fato do mesmo ser o único a apresentar duas bandas nos genótipos analisados. As demais são mais difíceis, pois devido ao pequeno número de células obtidas por calo a qualidade impossibilita um trabalho mais preciso.

Para o cromossomo 9 foram encontrados cromossomos com os knobs duplicados, reduzidos ou subterminal (Fig. 6C, 9), e para tal pode-se utilizar o mesmo modelo proposto para K7S para explicar suas origens.

Os triplóides (Fig. 12C) são devido ao cultivo de endosperma (La Rue, 1947). Também, segundo Pera citado por D'Amato (1991), pode ser o resultado de segregação de genoma por multipolar mitose.

Como Fluminhan & Kameya (1996) observaram um maior número de pontes em genótipos com maior número de knobs, mas que resultaram no mesmo número de células aberrantes para outro genótipo com poucos knobs.

Podemos sugerir que o maior problema está em knobs específicos, sendo o K7L o mais problemático seguido do K7S.

6. CONCLUSÕES

Pode-se concluir que:

1) Os genótipos 132331/1, 13342/1 e 13342/5, e seus respectivos híbridos, apresentam resposta embriogênica comparável aos melhores descritos na literatura.

2) Os genótipos apresentam capacidade para o cultivo de curta e longa duração, possibilitando sua utilização em programas envolvendo produção de plantas transgênicas.

3) A alta frequência de células normais indicam que os genótipos foram estáveis.

3) O cromossomo 7 foi o responsável pela maioria das alterações ocorridas nos genótipos 132331/1, 13342/1, 13342/5 e respectivos híbridos, aos 2 e 3-4 meses de idade, correspondendo a mais de 68% das aberrações observadas.

4) A ocorrência de crossing-over desigual entre cromátides irmãs na região da banda do braço longo do cromossomo 7 é um dos possíveis mecanismos de indução de duplicação, amplificação e redução desta banda.

5) Quando o genótipo apresenta o cromossomo 9 com knob grande no braço curto as alterações geralmente ocorrem após serem observadas no cromossomo 7. Portanto, além do tamanho da banda sua localização influencia na frequência de aberrações em cultura de tecidos de milho.

6) À medida que a cultura envelheceu ocorreram em alguns calos um aumento do número de células com aberrações, sendo devido a estabilização do tipo inicial ou a novos ciclos quebra-fusão-ponte.

ANEXO 1: Figuras

Figura 1 - Cariótipos de células provenientes de calos das linhagens 13342/5 (A), 132331/1 (B), 13342/1 (C) e do híbrido 13342/1 x 13342/5 (D), coradas pela metodologia de bandamento-C. As bandas-C correspondem aos knobs. Barra = 10 μ m.

Figura 2 - Formação de calos apresentando embriões somáticos, aos 18 dias após a inoculação, derivados das linhagens 13342/5 (A), 132331/1 (B), 13342/1 (C); e dos híbridos 13342/1 x 13233/1 (D) e 13342/5 x 13342/1 (E).

Figura 3 - Calos altamente embriogênicos e friáveis (Tipo II) derivados da linhagem 132331/1 (A) e 13342/5 (B), aos 60 dias após a inoculação.

Figura 4 - Calos embriogênicos e friáveis derivados da linhagem 13342/5 (A) e do híbrido 132331/1 x 13342/5 (B), aos 90 dias e 24 meses após a inoculação, respectivamente.

Figura 5 - Pares de cromossomos 7, mostrando um homólogo normal e o alterado à direita (exceto * = homozigose). Banda no braço longo duplicada (A), amplificada (B), reduzida (C), terminal (D), ausente, bem como a parte eucromática terminal (E); Banda do braço curto duplicada (F), reduzida (G), inexistente (H), amplificada (I), subterminal (J). Barra = 10µm.

Figura 5

Figura 6 – Representação esquemática dos cromossomos 7 e 9 encontrados em células de calos coradas pelo bandamento-C. Banda no braço longo do cromossomo 7.(**A**), no braço curto do cromossomo 7 (**B**); e no braço curto do cromossomo 9 (**C**); Cromossomo 7 normal (7N), cromossomo 9 normal (9N). Banda duplicada (D), amplificada (A), reduzida (R), terminal (T), ausência da banda (S), Subterminal (ST).

Figura 7 - Células coradas através do bandamento-C, apresentando um cromossomo 7 normal (→) e um apresentando a banda do braço longo alterada (→), sendo duplicada (A), amplificada (B), terminal (C) e reduzida (D). Barra = 10μm.

Figura 8 - Pares de cromossomos 7 apresentando alterações em ambos os braços do mesmo homólogo (A), bandas diferentes nos dois cromossomos 7 (B). Células coradas pelo bandamento-C, apresentando o cromossomo 7 normal (→) e o homólogo alterado (↪) contendo banda no braço curto subterminal amplificada (C), amplificada (D), reduzida (E); célula contendo bandas alteradas em ambos os braços do mesmo homólogo (F). Barra = 10μm.

Figura 9 - Pares de cromossomos 9 mostrando um homólogo normal e à direita o outro apresentando a banda do braço curto duplicada (A), subterminal (B), reduzida (C); Células coradas pela metodologia de bandamento-C, apresentando banda terminal no cromossomo 7(→) e o cromossomo 9 subterminal (→) (A), bandas duplicadas nos cromossomo 7(→) e 9 (→) (C, D). Barra = 10µm.

Figura 10 - Células coradas pela metodologia de bandamento-C. As setas indicam cromossomos em anéis, sendo um cromossomo 7 (A, B), ambos os cromossomos 7 (C), um cromossomo 9 (D), um cromossomo 3 (E), um cromossomo sem banda (F). Barra = 10μm.

Figura 11 - Células coradas pela metodologia do bandamento-C, apresentando $2n = 21$ cromossomos sendo trissomia para o cromossomo 1 ($\rightarrow$) e o cromossomo 6 com uma banda intersticial ($\rightarrow$)(A), $2n = 20 + 1 - 1$ com trissomia do cromossomo 7 ($\rightarrow$) sendo um cromossomo com amplificação de K7L ($\rightarrow$) (B), $2n = 21$ cromossomos com trissomia para o cromossomo 7 ($\rightarrow$) (C), $2n - 1 - 1 + 1$, faltando os cromossomo 2 e 5 e apresentando um cromossomo atípico ($\rightarrow$) (D). Barra = $10\mu\text{m}$.

Figura 12 - Células coradas através do bandamento-C, apresentando uma célula tetraplóide (A), célula tetraplóide contendo um minicromossomo ($\rightarrow$), cromossomo 7 translocado ($\rightarrow$), cromossomo 7 knob do braço longo terminal ($\rightarrow$) e um cromossomo com braço reduzido ($\rightarrow$) (B), célula triplóide (C), célula contendo um minicromossomo ($\rightarrow$) (D). Barra = 10 μ m.

Figura 13 - Células coradas através da metodologia do bandamento-C apresentando translocações ($\rightarrow$) 7^3 e 3^7 (A, B, C) e 7^1 e 1^7 (D, E, F). Barra = $10\mu\text{m}$.

Figura 14 - Células coradas pela metodologia do bandamento-C. Os diferentes tipos de setas indicam um cromossomo 7 dicêntrico (A), um cromossomo 1 dicêntrico (B), um isocromossomo 6 (C), um isocromossomo 7 (D, E), alterações no nucléolo (F). Barra = 10 μ m.

Figura 15 - Células metafásicas coradas pela metodologia do bandamento-C apresentando diferença no tamanho das bandas entre cromátides irmãs ($\rightarrow$) no braço longo do cromossomo 7 dos genótipos 13342/1 (A), 13342/5 (B), e também um cromossomo 7 com a banda do braço longo terminal ($\rightarrow$) no genótipo 13342/5 x 13342/1 (C). Barra = 10 μ m.

ANEXO 2: Tabelas

Tabela 1. Composição de knobs (K) nos braços longos (L) e curtos (S) das linhagens derivadas de Jac Duro (*Agrocere*s).

Genótipo	K3L	K6L ₂	K6L ₃	K7S	K7L	K8L ₁	K9S
132331/1	00	++	++	++	++	++	++
13342/1	++	++	++	++	++	++	00
13342/5	00	++	++	++	++	++	00

0 = ausência de knobs

+ = presença de knobs

Os knobs 6L₂ e 6L₃ formam uma só banda nos cromossomos metafásicos.

Tabela 2. Composição do meio de cultura N6 empregado para o cultivo *in vitro* de calos de milho.

Componente	mg/l	Componente	mg/l
(NH ₄) ₂ SO ₄	463,0	Inositol	99,0
KNO ₃	2.830,0	Cisteína	39,4
CaCl ₂ .2H ₂ O	166,0	Tiamina-HCl	0,5
MgSO ₄ .7H ₂ O	185,0	Piridoxina	1,0
KH ₂ PO ₄	400,0	Ácido Nicotínico	1,0
FeEDTA	38,3	Pantotenato de Cálcio	1,0
H ₃ BO ₃	1,6	L-prolina	1.381,56
MnSO ₄ .4H ₂ O	4,4	Hidrol. de Caseína	20,00
ZnSO ₄ .7H ₂ O	1,5	Glicina	2,00
KI	0,8	2,4-D	1,50
Sacarose	20.000,0		

Tabela 3. Número total de plantas (PL), percentagem de calos induzidos (CI), percentagem de sobrevivência dos calos embriogênicos aos 45 dias (CE), aos 12 meses de idade (LT).

Genótipo	PL	CI%*	CE%**	LT%***
Linhagens				
132331	5	99,37 (474/477)	81,76 (390/477)	1,28 (5/392)
133421	5	100,00 (472/472)	89,19 (421/472)	1,33 (5/377)
133425	8	98,11 (520/530)	88,30 (468/530)	5,00 (20/400)
Híbridos				
132331 x 133421	4	99,75 (399/400)	88,25 (353/400)	2,09 (7/335)
132331 x 133425	6	97,63 (412/422)	87,91 (371/422)	2,84 (9/317)
133421 x 133425	4	100,00 (416/416)	89,42 (372/416)	1,47 (5/341)

* Entre parênteses, número de calos induzidos/número total de embriões inoculados

** Entre parênteses, número de calos embriogênicos/número total de embriões inoculados

***Entre parênteses, número de calos altamente embriogênicos e friáveis/número total de embriões corrigido (inoculados – coletados para análise citogenética).

Tabela 4. Quadro geral da análise de “deviance”, empregando um modelo com superdispersão, para sobrevivência aos 45 dias e 1 ano após a inoculação.

	G.L.	45 dias	1 ano
Linhagens vs. híbridos	1	0,4331	0,48
Entre linhagens	2	0,1354	1,50
Entre híbridos	2	2,676	13,46*
(Tratamentos)	(5)	3,244	15,44*
Resíduo	26	25,368	28,52
Total	31	28,612	43,96

O modelo esta bem ajustado aos dados

- não existe diferença significativa entre a média das linhagens e a média de híbridos
- não existe diferença significativa entre linhagens
- não existe diferença significativa entre os híbridos aos 45 dias, mas ocorre para um ano após a inoculação.

Tabela 5. Frequência de aberrações observadas em células de culturas de calos coradas pelo bandamento-C, aos dois meses de idade

Planta/ Calos		Total		%		Número de células												Observações					
						Normais		Aberrantes*															
								Banda do braço longo do cromossomo 7 (K7L)				Banda do braço curto do cromossomo 7 (K7S)				Banda do braço curto do cromossomo 9			Outros tipos				
								D	A	R	T	D	A	R	ST	K7L	K7S				D	R	ST
Genótipo	B6/3	23	92,0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	a Calo b4-1 um cromossomo 7 com o 4 ou 5
	B5/3	13	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	b Calo C5-4 uma célula aberração homozigota
	B4/3	30	96,8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	c Calo C4-4 cromossomo 9
Total	3/12	66		0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	d Calo C3-3 com uma célula 2n-1-1+1' faltando os cromossomo 2 e 5 mas com um cromossomo extra semelhante ao 9, e a outra com pequena deficiência na região terminal do cromossomo 3
%			95,7	0	0	0	0	0	0	2,90	0	0	0	0	0	0	0	1,45	0	0	0	0	e Calo A8-3 com três células semelhantes
133421	C6/3	12	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	f Calo A8-5 uma célula 2n + 1 para o cromossomo 1 e knob braço longo do cromossomo 6 intersticial, o calo A8-3 com uma célula sem K7L
	C5/2	12	75,0	0	2 ^b	0	1	0	0	0	0	1	0	0	-	-	-	0	0	0	0	0	g Calo A7-5 duas células semelhantes
	C4/4	45	95,7	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	-	-	-	0	1 ^c	0	0	0	h Calo A7-2 com duas células translocação 7 vs. 1 (7 ⁱ e 17)
	C3/5	139	96,5	2	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	-	-	-	0	0	0	0	0	i Calo BC6-2 com as três células diferentes
	C2/4	15	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-	0	0	0	0	0	j Calo BA9-1 um cromossomo 7, BA9-3 cromossomos 3 vs. 2 e BA9-4, cromossomos 1 vs. 2.
Total	5/18	223		2	2	0	1	0	0	1	0	2	0	0	-	-	-	0	1	0	2	0,85	k Calo CA3-1 uma célula homozigota
%			95,3	0,85	0,85	0	0,43	0	0	0,43	0,85	0	0	0	-	-	-	0	0,43	0	0	0,85	l Calo CA3-4 cromossomo 1 dicêntrico
133425	A8/5	75	92,6	3 ^e	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	-	-	-	0	0	0	0	2 ^f	m Calo CA2-4 cromossomo 2 vs. outro sem knob
	A7/5	141	91,6	0	1	0	3	1	2	0	0	4 ^g	0	0	-	-	-	0	0	0	0	0	n Calo CA2-4 cromossomo 2 vs. outro sem knob
	A6/3	12	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-	0	0	0	0	0	
	A5/5	21	91,3	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	-	-	-	0	0	0	0	0	
Total	4/18	249		3	1	1	3	1	2	1	5	0	0	0	-	-	-	2	0	0	2	0,74	
%			92,2	1,11	0,37	0,37	1,11	0,37	0,74	0,37	1,85	0	0	0	-	-	-	0,74	0	0	0,74	0	
132331	x																						
133421	BC6/4	14		0	1	1	0	0	0	0	0	3 ⁱ	0	0	-	-	-	0	0	0	0	0	
	1/4		73,7	0	5,26	5,26	0	0	0	0	0	15,8	0	0	-	-	-	0	0	0	0	0	
132331	BA9/5	25	89,3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
x	AB8/5	101	95,3	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
133425	BA7/5	23	95,8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Total	3/15	149		0	0	0	0	0	0	0	1	0	2	1	0	0	0	3	0	1	0	0	
%			94,3	0	0	0	0	0	0	0,63	0	1,27	0,63	0	0	0	0	1,90	0	0,63	0	0	
133421	AC4/4	182	98,9	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-	0	0	0	0	0	
x	CA3/5	46	95,8	1	1 ^k	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-	0	0	0	0	1 ^m	
133425	CA2/4	79	94,0	2	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	-	-	-	1 ⁿ	0	0	0	0	
Total	3/13	307		3	1	0	1	0	1	0	1	1	0	0	-	-	-	1	0	0	1	0	
%			97,2	0,95	0,32	0	0,32	0,32	0	0,32	0,32	0	0	0	-	-	-	0,32	0	0	0,32	0	
Geral	19/98	1008		8	5	2	5	4	2	4	11	2	1	1	-	-	-	7	1	1	5	0	
%			94,2	0,79	0,50	0,20	0,50	0,40	0,20	0,40	1,09	0,20	0,10	-	-	-	0,69	0,10	0,10	0,50	0		

* Banda duplicada (D), ampliçada (A), reduzida (R), terminal (T), subterminal (ST); Translocação (TR), Tetraplóide (TT), Anel (AN), Demais tipos (DT).

K7L e K7S corresponde a duas bandas alteradas de um dos homólogos do cromossomo 7, K7S + K7S dois cromossomos 7 alterados na mesma célula.

** Número da espiga / número de calos analisados.

Tabela 6. Frequência de aberrações observadas em células de culturas de calos coradas pelo bandamento-C, aos 3-4 meses de idade.

** Planta / Genótipo		Número de células																Observações			
		Normais																			
		Aberrantes																			
		Banda do braço longo do cromossomo 7 (K7L)*				Banda do braço curto do cromossomo 7 (K7S)*				Banda do braço longo do cromossomo 9				Outros tipos							
Calos	Total	%	D	A	R	T	D	A	R	ST	K7S	K7S	K7S	R	ST	D	TR	An	TT	DT	
132331	B6/14	73	93,6	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2 ^a
	B5/15	78	97,5	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	B4/15	224	87,5	5	0	0	4 ^b	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1 ^c	2	15 ^d
	B2/11	80	92,0	1	1	0	0	0	0	2	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1 ^e
	B1/6	22	81,5	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	1	0	0	0	0
Total	5/61	477	-	9	3	0	4	0	2	3	0	0	1	4	2	1	0	1	3	18	0
%			90,2	1,7	0,57	0	0,76	0	0,38	0,57	0	0	0,19	0,76	0,38	0,19	0	0,19	0,57	3,02	0
133421	C6/11	39	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-	0	0	0	0
	C4/14	61	93,8	2	0	0	0	0	0	0	1	0	0	-	-	-	-	0	0	0	0
	C3/15	208	92,0	5 ^g	0	0	0	0	0	0	5 ^g	0	2 ^g	-	-	-	-	0	0	0	4 ⁱ
	C2/14	156	97,5	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	-	-	-	-	0	1	1	0
	C1/10	101	94,4	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-	0	0	0	1 ^j
Total	5/64	573	-	10	2	0	0	0	0	0	7	2	0	-	-	-	-	1	1	1	5
%			94,6	1,7	0,34	0	0	0	0	0	1,17	0,34	0	-	-	-	-	0,17	0,17	0,17	0,84
133425	A8/14	69	88,5	0	0	0	0	0	0	0	1	2	0	-	-	-	-	0	0	0	6 ^k
	A7/14	118	92,2	0	1	0	3	0	1	2	1	1	0	-	-	-	-	0	0	0	1 ^l
	A6/15	103	94,5	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-	0	2 ^m	1	0
	A5/12	103	80,5	1	0	0	17 ⁿ	0	3 ^o	0	0	0	0	-	-	-	-	0	1	1 ⁿ	0
	A4/13	88	89,8	2	2	2 ^p	0	0	0	0	1	0	1	-	-	-	-	0	0	0	2 ^q
Total	5/68	481	-	5	4	2	20	0	4	2	3	3	1	-	-	-	-	0	3	2	9
%			88,9	0,92	0,74	0,37	3,71	0	0,74	0,37	0,55	0,55	0,19	-	-	-	-	0	0,55	0,37	1,66
TOTAL	15/	152	-	24	9	2	8	0	6	5	9	5	2	4	2	1	1	1	5	6	30
%	193	-	91,1	1,4	0,54	0,13	0,48	0	0,36	0,30	0,54	0,36	0,13	0,76	0,38	0,19	0,60	0,30	0,36	1,80	0

* Banda duplicada (D), amplificada (A), reduzida (R), subterminal (ST); Translocação (TR), Tetraplóide (TT), Anel (AN), Demais tipos (DT).

K7L e K7S corresponde a duas bandas alteradas de um dos homólogos do cromossomo 7, K7S +K7S

** Número da espiga / número de calos analisados.

dois cromossomos 7 alterados na mesma célula

Tabela 7. Frequência de aberrações observadas em células de culturas de calos coradas pelo bandamento-C, aos 3-4 meses de idade.

Genótipo	Planta/ Calos	Número de células																Observações		
		Normais				Aberrantes														
		Banda do braço longo do cromossomo 7 (K7L)*				Banda do braço curto do cromossomo 7 (K7S)*				Banda do braço curto do cromossomo 9				Outros tipos						
		D	A	R	T	D	A	R	ST	R	ST	D	TR	An	TT	DT				
		Total	%																	
132331	CB6/15	408	94,4	0	0	1	2	7 ^a	2	1	0	0	0	0	5 ^b	0	0	^a Calo CB6-13 com 5 células.		
vs.	CB4/14	96	97,0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	1 ^d	0	0	^b Calo CB6-22 cromossomos 7 vs. 9.		
133421	CB3/15	300	95,8	4 ^e	1	2 ^e	1 ^f	0	1	1	0	0	0	0	0	2 ^g	1	^c Calo CB6-16 com 3 células com um cromossomo 7, CB6-21 com um cromossomo 8 e CB6-23 com um cromossomo 9		
	BC1/9	41	95,3	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0			
Total	4/53	845	-	4	1	3	4	0	1	8	4	3	0	0	6	7	1			
%	-	-	95,3	0,45	0,11	0,34	0,45	0	0,11	0,90	0,45	0,34	0	0	0,68	0,79	0,11	^d Calo CB4-21 envolvendo um cromossomo 7		
132331	BA9/15	162	98,2	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	^e Calo CB3-14 e CB3-18 com duas células duplicadas cada e o calo CB3-18 também com duas reduzidas		
vs.	AB8/14	242	97,2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4 ⁱ	^f Calo CB3-23 mesma célula		
133425	AB7/15	99	99,0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	^g Calo CB6-15 faltando um K7S		
	BA3/8	65	94,2	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	^h Calo AB8-13 com 3 células, e AB8-23 com um minicromos.		
	AB2/11	74	92,5	1 ^k	2 ^m	0	2 ^m	0	0	0	0	0	0	0	0	1 ^j	0	ⁱ Calo AB8-24 sem K7S num cromossomo		
Total	5/63	642	-	2	3	1	2	0	1	0	0	0	1	1	0	2	6	^j Calos BA7-21 e AB2-2p com homozigose do cromossomo 7		
%	-	-	96,8	0,30	0,45	0,45	0,30	0	0,15	0	0	0	0,15	0	0,15	0	0,90	^k Calo AB2-10 mesma célula		
133421	AC4/15	404	96,0	1	0	3 ⁿ	4 ⁿ	0	0	1	2	1	0	-	1 ^o	1	2	^m Calo AB2-11		
vs.	CA3/14	83	96,5	1	0	0	0	0	0	0	0	2	0	-	0	0	0	ⁿ Calo AC4-15 com 3 reduzidas e 3 terminais banda reduzida		
133425	CA2/13	137	95,8	2 ^q	0	0	2 ^q	0	0	0	1	0	0	-	0	1 ^r	0	^o Calo AC4-18 envolvendo os cromossomos 7 e 3		
	CA1/14	278	93,6	5	6 ^s	0	0	0	3	2 ^s	2	0	1	-	0	0	0	^p Calo AC4-16 com cromátides bandas tamanhos diferentes		
Total	4/56	902	-	9	6	3	6	0	3	3	5	3	1	-	1	2	2	^q Calo CA2-20 com uma célula duplicada e duas terminais		
%	-	-	95,2	0,95	0,63	0,32	0,63	0	0,32	0,32	0,53	0,32	0,11	-	0,11	0,21	0,11	^r Calo CA2-18 um cromossomo 7		
TOTAL	13/172	2389	15	9	7	12	0	5	3	9	6	2	1	0	7	11	9	^s Calo CA1-13 contendo quatro células A e duas R.		
%	-	-	95,7	0,60	0,36	0,28	0,48	0	0,20	0,12	0,36	0,24	0,08	0,60	0	0,60	0,28	0,4	0,36	0,12

* Banda duplicada (D), amplificada (A), reduzida (R), terminal (T), subterminal (ST); Translocação (TR), Tetraplóide (TT), Anel (AN), Demais tipos (DT).

K7L e K7S corresponde a duas bandas alteradas de um dos homólogos do cromossomo 7, K7S + K7S dois cromossomos 7 alterados na mesma célula.

** Número da espiga / número de calos analisados.

Tabela 8. Percentagem de células normais (N), com alterações no braço longo do cromossomo 7 (7L), no braço curto do cromossomo (7S), na banda do braço longo e/ou curto (7SL), e outros tipos de alterações, dos calos aos 2 e 3-4 meses de idade.

Genótipo	Percentagem de células				
	Normais	Banda do cromossomo 7			Outros
	N*	7L**	7S***	7SL****	O*****
132331/1	90,95 (543/597)	2,68 (16/597)	1,17 (7/597)	1,17 (1/597)	5,02 (30/597)
133342/1	95,22 (796/836)	2,03 (17/836)	1,20 (10/836)	0,24 (2/836)	1,32 (11/836)
13342/5	90,23 (730/809)	4,82 (39/809)	2,22 (18/809)	0,49 (4/809)	2,22 (18/809)
132331/1 x 13342/1	94,71 (859/907)	1,54 (14/907)	1,76 (16/907)	0,33 (3/907)	1,65 (15/907)
132331/1 x 13342/5	96,46 (791/820)	0,98 (8/820)	0,24 (2/820)	0,49 (4/820)	1,58 (13/820)
13342/1 x 13342/5	95,65 (1290/1.264)	2,29 (29/1.264)	1,11 (14/1.264)	0,32 (4/1.264)	0,63 (8/1.264)
Geral	94,17 (4.929/5.223)	2,35 (123/5.223)	1,28 (67/5.223)	0,34 (18/5.223)	1,81 (95/5.223)

* Entre parênteses, o número de células normais/número de células totais analisadas.

** Entre parênteses, número de células com a banda correspondente a K7L alteradas/número de células totais analisadas.

*** Entre parênteses, o número de células com a banda correspondente a K7S alteradas/número de células totais analisadas.

**** Entre parênteses, o número de células contendo duas alterações nas bandas heterocromáticas do cromossomo 7/número de células totais analisadas.

***** Entre parênteses, o número de células com alterações não situadas nas bandas do cromossomo 7/número de células totais analisadas.

Tabela 9. Frequência de aberrações observadas em células de culturas de calos coradas pelo bandamento-C, aos 4-7 meses de idade.

		Número de células															Idade dos calos (meses)	Observações		
		Normais					Aberrantes*													
Genótipo	Planta / calos	Banda do braço longo do cromossomo 7 (K7L)					Banda do braço curto do cromossomo 7 (K7S)					Banda do braço curto do cromossomo 9 (K9S)							Outros tipos	
		D	A	R	T	D	A	R	ST	D	R	ST	TR	Anel	DT					
132331	B6/21	23	88,5	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	6	a Planta B4, onde a célula contém também um knob 8 reduzido	
	B5/19	11	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5		
	B5/3	30	96,8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4		
	B4/6	12	85,7	0	0	1	0	0	1 ^a	0	0	0	0	0	0	0	0	6	b Planta B2, mesma célula um cromossomo 7 e 9 alterados	
	B2/13	29	87,9	0	0	1 ^b	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	7		
	B1/20	3	14,2	0	0	1	0	0	1	1	6 ^c	0	0	0	0	0	0	6	c Planta B1, as quatro células contendo os dois tipos de aberrações	
Total	5/82	108	-	0	0	3	0	0	2	2	7	0	0	0	12	1	0	1		
%	-	-	79,4	0	0	2,21	0	0	1,47	1,47	5,15	0	0	0	8,82	0,74	0	0,74		
133425	A4/8	29	-	0	0	9	16	0	0	0	1	0	0	0	-	1 ^d	0	0	d Planta A4, envolvendo o cromossomo 7	
%	1/8	-	50,0	0	0	15,0	26,7	0	0	0	1,67	0	0	-	1,67	0	0	0		
132331	CB6/22	34	94,4	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	
vs.	CB6/3	45	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	
133421	CB4/27	8	80,0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	6	
	CB3/20	9	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	
	CB3/27	14	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	
	BC1/20	16	84,2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1 ^e	0	0	6	
Total	4/99	126	-	0	0	2	0	0	0	0	2	0	0	0	0	1	0	0	0	
%	-	-	94,7	0	0	1,50	0	0	0	0	1,50	0	0	0	0	0,75	0	0	0	
132331	BA9/10	7	77,8	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	5	
vs.	BA7/18	8	61,5	0	0	2	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	5	
133425	AB3/13	17	70,8	2	0	1	0	0	0	0	2	1	1	0	0	0	0	0	6	
	AB2/2	7	77,8	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	
	AB2/3	17	77,3	1	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	
	BA1/3	7	77,8	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	
Total	5/59	63	-	3	3	4	3	0	0	2	3	1	1	1	1	0	0	0	4	
%	-	-	74,1	3,53	3,53	4,71	3,53	0	0	2,35	3,53	1,18	1,18	1,18	1,18	0	0	0	0	
TOTAL	15/258	326	3	3	15	19	0	2	4	13	1	1	1	1	1	12	1	3	1	
%	-	-	78,7	0,72	0,72	3,62	4,59	0	0,48	0,97	3,14	0,24	0,24	0,24	0,24	2,90	0,24	0,72	0	0,24

* Banda duplicada (D), amplificada (A), reduzida (R), terminal (T), subterminal (ST); Translocação (TR), Tetraplóide (TT), Anel (AN), Demais tipos (DT).

K7L e K7S corresponde a duas bandas alteradas de um dos homólogos do cromossomo 7, K7S +K7S dois cromossomos 7 alterados na mesma célula.

** Número da espiga / número de calos analisados.

Tabela 10. Médias dos valores do comprimento relativo (CR) de cromossomos normais provenientes de células normais e aberrantes (com um cromossomo 7 alterado), obtidos a partir de calos de 3 linhagens e respectivos híbridos.

Tipo de célula	Cromossomos					
	1	2	3	3K	4	5
Normal	184,65 a (37)	156,61 a (35)	148,78 a (30)	169,75 a (14)	145,20 a (38)	134,65 a (38)
Aberrante	185,77 a (30)	156,51 (31)	149,08 a (30)	166,12 a (13)	146,80 a (32)	135,78 a (34)
DMS	6,06	5,35	5,30	8,35	4,98	4,88

Continua...

Tabela 10. (Continuação).

Tipo de células	Cromossomos				
	6	7	8	9	9K
Normal	130,05 a (39)	168,53 a (39)	132,87 a (39)	109,11 a (31)	137,73 a (13)
Aberrante	129,81 a (32)	166,34 a (28)	134,70 a (35)	109,89 a (32)	136,88 a (12)
DMS	4,47	6,16	4,21	2,94	7,05

* Entre parênteses o número de células empregadas

Médias seguidas da mesma letra não são significativamente diferentes pelo teste de Tukey a nível de 5%.

DMS = Diferença mínima significativa

Tabela 11. Quadro geral da análise de variância do comprimento relativo dos cromossomos das células normais e aberrantes (com um cromossomo 7 alterado).

Cromossomos												
1			2			3			3K			5
FV	GL	QM	GL	QM	GL	GL	QM	GL	QM	GL	QM	QM
TRAT.	1	20,71	1	0,16	1	1,35	1	89,05	1	44,44	1	23,10
RES.	65	152,32	64	117,72	58	105,30	25	110,82	68	108,25	70	107,25

Continua...

Tabela 11. (Continuação).

Cromossomos												
6			7			8			9			9K
FV	GL	QM	GL	QM	GL	GL	QM	GL	QM	GL	QM	QM
TRAT.	1	1,00	1	77,91	1	61,65	1	9,52	1	4,57		
RES.	69	88,32	65	155,00	72	82,23	61	33,99	23	72,52		

*, ** significativo a 5% e 1% respectivamente, pelo teste F

Tabela 12. Médias dos valores da relação de braços (RB) de cromossomos normais provenientes de células normais e aberrantes (um cromossomo 7 alterado), obtidos a partir de calos de 3 linhagens e respectivos híbridos.

Tipo de Célula	Cromossomos					
	1	2	3	3K	4	5
Normal	1,196 a (37)	1,262 a (35)	1,650 a (30)	1,819 a (14)	1,356 a (38)	1,062 a (38)
Aberrante	1,210 a (30)	1,279 a (31)	1,644 a (30)	1,879 a (13)	1,327 a (32)	1,054 a (34)
DMS	0,037	0,0281	0,046	0,082	0,039	0,011

Continua...

Tabela 12. (Continuação).

Tipo de Célula	Cromossomos					
	6	7	8	9	9K	10
Normal	1,653 a (39)	1,726 39	2,563 a (39)	1,551 a (31)	0,927 a (13)	1,701 a (39)
Aberrante	1,687 a (32)	1,705 28	2,599 a (35)	1,585 a (32)	0,922 a (12)	1,710 a (36)
DMS	0,045	0,062	0,090	0,049	0,058	0,045

. Médias seguidas da mesma letra não são significativamente diferentes pelo teste de Tukey a nível de 5%.

DMS = Diferença mínima significativa

Tabela 13. Quadro geral da análise de variância da relação de braço dos cromossomos derivados das células normais e aberrantes (com um cromossomo 7 alterado).

Cromossomos													
1		2		3		3K		4		5			
FV	GL	QM	GL	QM	GL	QM	GL	QM	GL	QM	GL	QM	
TRAT.	1	0,0031	1	0,0046	1	0,0006	1	0,0245	1	0,0143	1	0,0012	
RES.	65	0,0057	64	0,0033	58	0,0078	25	0,0108	68	0,0067	70	0,0006	

Continua...

Tabela 13. (Continuação).

		Cromossomos											
		6		7		8		9		9K		10	
FV		GL	QM	GL	QM	GL	QM	GL	QM	GL	QM	GL	QM
TRAT.		1	0,0201	1	0,0073	1	0,0245	1	0,0191	1	0,0002	1	0,0017
RES.		69	0,0090	65	0,0158	72	0,0379	61	0,0095	23	0,0049	73	0,0096

*, ** significativo a 5% e 1% respectivamente, pelo teste F

Tabela 14. Médias dos valores da distância do centrômero à banda (DCB) e tamanho da banda (TB) dos cromossomos 3, 6, 8 e 9, obtidos a partir de células normais e aberrantes (cromossomo 7 alterado), derivadas de calos de 3 linhagens e respectivos híbridos.

Tipo de célula	Cromossomos*							
	3		6		8		9	
	DCB	TB	DCB	TB	DCB	TB	DCB	TB
Normal	57,55 a (15)	20,03 a (15)	54,54 a (35)	17,59 a (35)	60,76 a (38)	21,97 a (38)	36,44 a (14)	35,63 a (14)
Aberrante	58,98 a (13)	21,06 a (13)	55,60 a (26)	17,59 a (25)	61,08 a (32)	21,56 a (34)	33,87 a (11)	35,64 a (12)
DMS	4,32	1,88	2,07	0,97	1,90	1,27	2,68	2,76

* Médias seguidas da mesma letra não são significativamente diferentes pelo teste de Tukey a nível de 5%.

Entre parênteses, o número de metáfase utilizadas

DMS = Diferença mínima significativa

Tabela 15. Quadro geral da análise de variância da distância do centrômero à banda (DCB), dos cromossomos 3, 6, 8 e 9.

FV	Cromossomos							
	3		6		8		9	
	GL	QM	GL	QM	GL	QM	GL	QM
TRAT.	1	14,20	1	16,78	1	1,73	1	40,47
RESÍDUO	26	30,70	59	15,92	68	15,77	23	10,32

*, ** significativo a 5% e 1% respectivamente, pelo teste F.

Tabela 16. Quadro geral da análise de variância do tamanho da banda (TB), dos cromossomos 3, 6, 8 e 9.

FV	Cromossomos							
	3		6		8		9	
	GL	QM	GL	QM	GL	QM	GL	QM
TRAT.	1	7,38	1	0,00003	1	3,01	1	0,00037
RESÍDUO	26	5,82	58	3,53	70	7,29	24	11,54

*, ** significativo a 5% e 1% respectivamente, pelo teste F.

Tabela 17. Média geral dos valores da distância centrômero-banda (DCB), tamanho da banda (TB) dos cromossomos 7 normais provenientes de células normais vs. aberrantes (cromossomo 7 alterado).

Tipo de Células	Braço longo		Braço curto	
	DCB	TB	DCB	TB
Normal	57,69 a (40)	34,85 a (39)	36,70 a (39)	24,55 a (39)
Aberrantes	58,00 a (34)	35,09 a (31)	37,12 a (39)	23,89 a (35)
DMS	2,04	1,67	1,66	1,01

* Entre parênteses, número de células utilizadas.

Médias seguidas da mesma letra não são significativamente diferentes pelo teste de Tukey a nível de 5%.

DMS = Diferença mínima significativa.

Tabela 18. Quadro geral da análise de variância para distância centrômero-banda (DCB) e tamanho da banda (TB), dos cromossomos 7 normais derivados de células normais e aberrantes (com um cromossomo 7 alterado).

FV	Braço longo				Braço curto			
	DCBL		TBL		DCBS		TBS	
	GL	QM	GL	QM	GL	QM	GL	QM
TRAT.	1	1,79	1	1,02	1	5,74	1	7,98
RES.	72	19,33	68	12,08	72	12,74	72	4,76

*, ** significativo a 5% e 1% respectivamente, pelo teste F.

Tabela 19. Médias dos valores da distância centrômero-banda do braço longo (DCBL), tamanho da banda do braço longo (TBL), distância do centrômero-banda do braço curto (DCBS), tamanho da banda do braço curto (TBS) dos cromossomos 7 normais vs. cromossomos alterados.

Tipo de cromossomo 7	DCBL	TBL	DCBS	TBS
Normal	57,81 (42)	34,91 (41)	36,77 (41)	24,55 (41)
Banda do braço longo duplicada	57,44 (6)	38,03 (6)	37,25 (6)	23,61 (6)
Banda do braço longo amplificada	58,61 (5)	48,92* (6)	34,48 (5)	24,23 (5)
Banda do braço longo reduzida	59,67 (3)	22,11* (3)	36,53 (3)	23,35 (3)
Banda do braço longo terminal	58,99 (4)	26,40 (4)	39,65 (4)	24,02 (4)
Banda do braço curto duplicada	52,69 (2)	35,33 (2)	34,62 (1)	15,86* (2)
Banda do braço curto reduzida	61,47 (2)	38,56 (4)	38,04 (4)	11,76* (4)
Banda do braço curto subterminal	56,43 (9)	34,50 (9)	36,78 (9)	29,36* (9)

& Entre parênteses, número de células empregadas.

* Médias diferem significativamente do cromossomo normal a nível de 5% pelo teste de Dunnett.

DMS = Diferença mínima significativa

Tabela 20. Quadro da análise da variância da distância centrômero-banda do braço longo (DCBL), tamanho da banda do braço longo (TBL), distância do centrômero-banda do braço curto (DCBS), tamanho da banda do braço curto (TBS) dos cromossomos 7 normais vs. cromossomos alterados.

FV	DCBL		TBL		DCBS		TBS	
	GL	QM	GL	QM	GL	QM	GL	QM
TRAT.	7	16,60	7	292,58**	7	7,35	7	147,12**
RES.	64	18,81	67	35,77	65	11,86	66	12,45

** significativo a 1% pelo teste F.

Tabela 21. Médias dos valores dos segmentos eucromáticos terminais (TSET) do cromossomo 7 normal vs. anormal (banda correspondente a K7L duplicada, amplificada e reduzida) derivadas de calos de três linhagens (132331/1, 13342/1, 13342/5) e respectivos híbridos.

Cromossomos	Número de Células	TSET
Normal	39	14,188
Anormal	10	15,875
DMS	-	3,025

DMS = Diferença mínima significativa

Tabela 22. Quadro de análise de variância do tamanho do segmento eucromático terminal do cromossomo 7 normal vs. anormal (banda correspondente a K7L duplicada, amplificada e reduzida) derivadas de calos de três linhagens (132331/1, 13342/1, 13342/5) e respectivos híbridos.

FV	GL	QM
Tratamento	1	22,660
Resíduo	47	17,997

*, ** significativo a 5% e 1% respectivamente, pelo teste F.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIAR-PERECIN, M.L.R. de. Estudo dos cromossomos somáticos de milho (*Zea mays* L.) e de suas regiões heterocromáticas. Piracicaba, 1979. 138p. Tese (Livre-Docência) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- AGUIAR-PERECIN, M.L.R. de. C-banding in maize. I. Band patterns. **Caryologia**, v.38, p.23-30, Jan./Mar. 1985.
- AGUIAR-PERECIN, M.L.R. de; DECICO, J.U. Preliminary results on the segregation of knobs (C-bands) in inbred lines derived from a flint variety. **Maize Genetics Cooperation Newsletter**, v.62, p.100, 1988.
- AGUIAR-PERECIN, M.L.R. de; FLUMINHAN JÚNIOR, A. Embriogênese somática a partir de calos de diversos tipos de explantes de milho. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA PARA O PROGRESSO DA CIÊNCIA, 37., Belo Horizonte, 1985. **Resumos. Ciência e Cultura**. Suplemento, v.37, n.7, 1985. p.719.
- AGUIAR-PERECIN, M.L.R. de; FLUMINHAN JÚNIOR, A. Mitotic instability in callus cultures of inbred lines adapted to tropical regions. **Maize Genetics Cooperation Newsletter**, v.66, p.87-88, 1992.

- AGUIAR-PERECIN, M.L.R. de; VOSA, C.G. C-banding in maize. II. Identification of somatic chromosomes. **Heredity**, v.54, n.1, p.37-42, Feb. 1985.
- AGUIAR-PERECIN, M.L.R. de; FLUMINHAN JÚNIOR, A.; NITTO, C.N. Um método para análise da estabilidade mitótica em calos de milho. In: ANNUAL MEETING OF THE BRAZILIAN GENETICS SOCIETY, 37., Caxambu, 1991. **Program and abstracts. Revista Brasileira de Genética**. Supplement, v.14, Sep., 1991. p.73.
- ARMSTRONG, C.L.; GREEN, C.E. Establishment and maintenance of friable, embryogenic maize callus and the involvement of L-proline. **Planta**, v.164, n.2, p.207-214, 1985.
- ARMSTRONG, C.L.; PHILLIPS, R.L. Genetic and cytogenetic variation in plants regenerated from organogenic and friable, embriogenic tissue cultures of maize. **Crop Science**, v.28, n.2, p.363-369, 1988.
- ARMSTRONG, C.L.; GREEN, C.E.; PHILLIPS, R.L. Development and availability of germplasm with high Type II culture formation response. **Maize Genetics Cooperation Newsletter**, v.65, p.92-93, 1991.
- ARMSTRONG, C.L.; GREEN, C.E.; PHILLIPS, R.L.; STUCKER, R.E. Genetic control of plant regeneration from maize tissue culture. **Maize Genetics Cooperation Newsletter**, v.59, p.92-93, 1985.
- ARMSTRONG, K.C.; NAKAMURA, C.; KELLER, W.A. Karyotype instability in tissue regenerants of Triticale (x *Triticosecale* Wittmack) cv. 'Welsh' from 6-month-old callus cultures. **Zeitschrift für Pflanzenzüchtung**, v. 91, n.3, p.233-245, 1983.

- ARMSTRONG, C.L.; ROMERO-SEVERSON, J.; HODGES, T.K. Improved tissue culture response of an elite maize inbred through backcross breeding, and identification of chromosomal regions important for regeneration by RFLP analysis. **Theoretical and Applied Genetics**, v.84, p.755-762, 1992.
- ATAEVA,D.M.; DUBROVINA, T.B.; DOLGYKH, Y.I.; SHAMINA, Z.B. Variation in heterochromatic regions of the chromosomes in the first seed generation of maize regenerants. **Tsitologiya-I-Genetica**, v.28, n.1, p.15-20, 1994. /**Resumo em CAB Abstracts on CD-ROM**, 1996/
- BALZAN, R. Karyotype instability in tissue cultures derived from the mesocotyl of *Zea mays* seedlings. **Caryologia**, v.21, p.75-87, 1978.
- BATES, K.J. Callus induction from various genotypes. **Maize Genetics Cooperation Newsletter**, v.69, p.75-76, 1993.
- BAYLISS, M.W. Chromosomal variation in plant tissues in culture. **International Review of Cytology Suppl.**, New York, 11A, cap. 5, p.113-144, 1980.
- BEAUMONT, V.H.; ROCHEFORD, T.R.; WIDHOLM, J.M. Mapping the anther culture response genes in maize (*Zea mays* L.). **Genome**, v.38, n.5, p.968-975, 1995.
- BEBELI, P.J.; KARP, A.; KALTSIKES, P.J. Somaclonal variation from cultured immature embryos of sister lines of rye differing in heterochromatic content.. **Genome**, v.33, n.2, p.177-183, 1990.

- BECKERT, M.; QING, C.M. Results of a diallel trial and a breeding experiment for in vitro aptitude in maize. **Theoretical and Applied Genetics**, v.68, p.247-251, 1984.
- BENZION, G.; PHILLIPS, R.L. Cytogenetic stability of maize tissue cultures: a cell line pedigree analysis. **Genome**, v.30, n.3, p.318-325, June 1988.
- BENZION, G.; PHILLIPS, R.L.; RINES, H.W. Case histories of genetic variability *in vitro*: oats and maize. In: VASIL, I.K. (Ed.) **Cell culture and somatic cell genetics of plants**: New York: Academic Press, 1986. v.3, cap. 22, p.435-448.
- BHASKARAN, S.; SMITH, R.H. Regeneration in cereal tissue culture: A review. **Crop Science**, v.30, n.5, p.1328-1337, Nov./Dec. 1990.
- BLACKBURN, E.H. Structure and function of telomeres. **Nature**, v.350, n.6319, p.569-573, Apr. 1991.
- BOHOROVA, N.E.; LUNA, B.; BRITO, R.M.; HUERTA, L.D.; HOISINGTON, D.A. Regeneration potential of tropical, subtropical, midaltitude, and highland maize inbreds. **Maydica**, v.40, n.3, p.275-281, 1995.
- BRETTELL, R.I.S.; DENNIS, E.S. Reactivation of a silent Ac following tissue culture is associated with heritable alterations in its methylation pattern. **Molecular General Genetics**, v.229, n.3, p.365-372, 1991.
- BROWN, P.T.H. DNA methylation in plants and its role in tissue culture. **Genome**, v.31, n.2, p.717-729, 1989.

- BROWN, P.T.H.; GÖBEL, E.; LÖRZ, H. RFLP analysis of *Zea mays* callus cultures and their regenerated plants. **Theoretical and Applied Genetics**, v.81, n.2, p.227-232, 1991.
- CHANG, Y.F. Plant regeneration in vitro from leaf tissues derived from cultured immature embryos of *Zea mays* L. **Plant Cell Reports**, v.2, p.183-185, 1983.
- CHU, C.C.; WANG, C.C.; SUN, C.S.; HSU, K.C.; YIN, C.Y.; CHU, C.Y.; B.I., F.Y. Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. **Scientia Sinica**, v.16, p.659-688, 1975.
- CHUGHTAI, S.R.; STEFFENSEN, D.M. Heterochromatic knob composition of commercial inbred lines of maize. **Maydica**, v.33, n.3, p.171-187, 1987.
- CLAPAROLS, M.A.; SANTOS, M.A.; TORNÉ, J.M. Influence of some exogenous amino acids on the production of maize embryogenic callus and on endogenous amino acid content. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.34, n.1, p.1-11, 1993.
- D'AMATO, F. 1. Cytogenetics of differentiation in tissue cultures. In: REINERT, J.; BAJAJ, Y.P.S. (Ed.) **Plant cell, tissue, and organ culture**. Berlin: Springer-Verlag, 1977. p.343-357.
- D'AMATO, F. Cytogenetics of plant cell and tissue cultures and their regenerates. **CRC Critical Review Plant Science**, v.3, p.73-112, 1985.
- D'AMATO, F. Nuclear changes in cultured plant cells. **Caryologia**, v.44, n.3/4, p.217-224, 1991.

- DECICO, J.U. Análise da segregação de knobs em progênies F₂ e de retrocruzamento derivadas de uma variedade de milho. Piracicaba, 1991, 134p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- DENNIS, E.S.; BRETTEL, R.I.S.; PEACOCK, W.J. A tissue culture induced *Adh1* null mutant of maize results from a single base change. **Molecular General Genetics**, v.210, n.1, p.181-183, 1987.
- DOLGYKH, Y.I. Establishment of callus cultures and regeneration of maize plants. In: BAJAJ, Y.P.S. (Ed.) (**Biotechnology in agriculture and forestry, 25**) **Maize**. Berlin: Springer-Verlag, 1994, p.24-36.
- DUCAN, D.R.; WILLIAMS, M.E.; ZEHR, B.E.; WIDHOLM, J.M. The production of callus capable of plant regeneration from immature embryos of numerous *Zea mays* genotypes. **Planta**, v.165, p.322-332, 1985.
- EDALLO, S.; ZUCCHINALI, C; PERENZIN, M.; SALAMINI, F. Chromosomal variation and frequency of spontaneous mutation associated with *in vitro* culture and plant regeneration in maize. **Maydica**, v.26, n.1, p.39-56, 1981.
- FAHEY, J.M.; REED, J.N.; READDY, T.L.; PACE, G.M. Somatic embryogenesis from three commercially important inbreds of *Zea mays*. **Plant Cell Reports**, v.5, n.1, p.35-38, 1986.
- FLUMINHAN JÚNIOR, A. Cultivo *in vitro* de milho (*Zea mays*) e análise de sua instabilidade mitótica. Piracicaba, 1992. 213p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.

- FLUMINHAN JÚNIOR, A.; AGUIAR PERECIN, M.L.R. de. Análise da estabilidade mitótica de calos de linhagens de milho com diferentes composições de knobs cromossômicos. In: ANNUAL MEETING OF THE BRAZILIAN GENETICS SOCIETY, 37. Caxambu, 1991. **Program and abstracts. Revista Brasileira de Genética**, Suplemento, v.14, set. 1991. p.74.
- FLUMINHAN JÚNIOR, A.; AGUIAR-PERECIN, M.L.R. de. Avaliação da formação de calos embriogênicos em 22 linhagens de milho homozigóticas para diferentes composições de knobs cromossômicos. **Ciência e Cultura**, v. 43, p.760-761, 1991. Suplemento.
- FLUMINHAN JÚNIOR, A.; KAMEYA, T. Behaviour of chromosomes in anaphase cells in embryogenic callus cultures of maize (*Zea mays* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, v.92, p.982-990, 1996.
- FLUMINHAN JÚNIOR, A.; AGUIAR-PERECIN, M.L.R. de.; SANTOS, J.A. dos. Evidence for heterochromatin involvement in chromosome breakage in maize callus culture. **Annals of Botany**, v.78, p.73-81, 1996a.
- FRANSZ, P.F.; SCHEL, J.H.N. Ultrastructural studies on callus development and somatic embryogenesis in *Zea mays* L.. In: BAJAJ, Y.P.S., (Ed.) (**Biotechnology in Agriculture and Forestry, 25) Maize**. Berlin: Springer-Verlag, 1994. p.50-65.
- FURINI, A.; JEWELL, D.C. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature and mature embryos of tropical and subtropical *Zea mays* L. genotypes. **Maydica**, v.39, n.5, p.155-164, 1994.

- FURINI, A.; JEWELL, D.C. Somatic embryogenesis and plant regeneration of maize/*Tripsacum* hybrids. **Maydica**, v.40, n.2, p.205-210, 1995.
- GARCIA, M.D; MOLINA, M del C.; CASO, O.H. La regeneración de plantas de maíz (*Zea mays* l. ssp *mays*) a partir de del cultivo de tejidos y su aplicación en el mejoramiento genético. **Revista de la Facultad de Agronomía, La Plata**, v.68, p.15-25, 1992.
- GILL, B.S.; KIMBER, G. Recognition of translocations and alien chromosome transfers in wheat by Giemsa C-banding technique. **Crop Science**, v.17,n.2, p.264-266, 1977.
- GILL, B.S.; BURNHAM, C.R.; STRINGAM, G.R.; STOUT, J.T.; WEINHEIMER, W.W. Cytogenetic analysis of chromosomal translocations in the tomato: preferential breakage in heterochromatin. **Canadian Journal of Genetics and Cytology**, v.22, n.3, p.333-341, 1980.
- GREEN, C.E. Prospects for crop improvement in the field of cell culture. **Hort Science**, v.12, n.2, p.131-134, 1977.
- GREEN, C.E.; PHILLIPS, R.L. Plant regeneration from tissue cultures of maize. **Crop Science**, v.15, p.417-421, 1975.
- GREEN, C.E.; PHILLIPS, R.L.; WANG, A.S. Cytological analysis of plants regenerated from maize tissue cultures. **Maize Genetics Cooperation Newsletter**, v.51, p.53-54, 1977.
- GUBAR, E.K.; KUNAKH, V.A. C-banding in *Zea mays*. In: BAJAJ, Y.P.S. (Ed.) (**Biotechnology in agriculture and forestry, 25**) **Maize**. Berlin: Springer-Verlag, 1994. p.366-81.

- HADLACZKY, G.Y.; KALMAN, L. Discrimination of homologous chromosomes of maize with Giemsa staining. **Heredity**, v.35, n.2, p.371-374, Dec. 1975.
- HARBER, J.E.; THORBURN, P.C. Healing of broken linear dicentric chromosome in yeast. **Genetics**, v.106, p.207-226, Feb. 1984.
- HENRY, Y.; VAIN, P.; DE BUYSER, J. Genetic of *in vitro* plant tissue culture responses and regeneration capacities. **Euphytica**, v.79, n.1/2, p.45-58, 1994.
- HODGES, T.K.; KAMO, K.K.; IMBRIE, C.; BECWAR, M.R. Genotype specificity of somatic embryogenesis and regeneration in maize. **Bio-Technology**, v.4, p.219-223, 1986.
- IEMMA, A.S. Análisis de varianza com datos desbalanceados. Simposio de estadística, diseño de experimentos. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencia, Departamento de Matemáticas y estadística, 1993.
- IVANTSOV, A.I.; AKHMETOV, R.R.; VAKHITOV, V.A.; IBRAGIMOV, R.I. Interaction of callus of pure lines and hybrids of maize in co-culture. In: BAJAJ, Y.P.S. (Ed.) (**Biotechnology in agriculture and forestry, 25) Maize**. Berlin: Springer-Verlag, 1994. p.119-24.
- JANCEY, R.C.; WALDEN, D.B. Analysis of pattern in distribution of breakage points in the chromosomes of *Zea mays* L. and *D. melanogaster* Meigen. **Canadian Journal of Cytology**, v.14, p.429-442, 1972.
- JIMÉNEZ, E.S. de; VARGAS, M.; AGUILAR, R.; JIMÉNES, E. Age-dependent responsiveness to cell differentiation stimulus in maize

callus culture. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.26, n.6, p.723-732, 1988.

JOACHIMIACK, A.; ILNICKI, T.; KOWALSKA, A.; PRZYWARA, L. Chromosome alterations in tissue culture cells of **Allium fistulosum**. **Genetica**, v.96, p.191-198, 1995.

JOHNS, M.A. Naturally occurring active Ac transposable element in the maize CO159 inbred line. **Maydica**, v.36, n.3, p.189-195, 1991.

JOHNSON, S.S.; PHILLIPS, R.L.; RINES, H.W. Possible role of heterochromatin in chromosome breakage induced by tissue culture in oats (*Avena sativa* L.). **Genome**, v.29, n.3, p.439-446, June 1987.

KAEPPLER, S.M.; PHILLIPS, R.L. Tissue culture-induced DNA methylation variation in maize. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.**, v.90, p.8773-8776, Oct. 1993.

KAMO, K.K.; HODGES, T.K. Establishment and characterization of long-term embryogenic maize callus and cell suspension cultures. **Plant Science**, v.45, n.2, p.111-117, 1986.

KARP, A.; MADDOCK, S.E. Chromosome variation in wheat plant regenerated from culture immature embryos. **Theoretical and Applied Genetics**, v.67, p.249-255, 1984

LA RUE, C.D. Growth and regeneration of the endosperm of maize in culture. **American Journal of Botany**, v.34, n.10, p.585-586, Dec. 1947.

LAPITAN, N.L.V.; SEARS, R.G.; GILL, B.S. Amplification of repeated DNA sequences in wheat x rye hybrids regenerated from tissue

culture. **Theoretical and Applied Genetics**, v.75, n.3, p.381-388, 1988.

LAPITAN, N.L.V.; SEARS, R.G.; GILL, B.S. Translocations and other karyotypic structural changes in wheat x rye hybrids regenerated from tissue culture. **Theoretical and Applied Genetics**, v.68, n.6, p.547-554, 1984.

LARKIN, P.J.; SCOWCROFT, W.R. Somaclonal variation - A novel source of variability from cell cultures for plant improvement. **Theoretical and Applied Genetics**, v.60, n.4, p.197-214, 1981.

LEE, M.; PHILLIPS, R.L. Genomic rearrangements in maize induced by tissue culture. **Genome**, v.29, n.1, p.122-128, Feb. 1987a.

LEE, M.; PHILLIPS, R.L. Genetic variants in progeny of regenerated maize plants. **Genome**, v.29, n.4, p.834-838, 1987b.

LEE, M.; PHILLIPS, R.L. The chromosomal basis of somaclonal variation. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.39, p.413-437, 1988.

LIMA-DE-FARIA, A. DNA replication and gene amplification in heterochromatin. In: LIMA-DE-FARIA, A. (Ed.) **Handbook of molecular cytology**. Amsterdam: North Holland, 1969. cap.13, p.277-325.

LIMA-DE-FARIA, A.; JAWORSKA, H. Late DNA synthesis in heterochromatin. **Nature**, v.217, p.138-142, 1968.

LONGLEY, A.E. Knob positions on corn chromosomes. **Journal of Agricultural Research**, v.57, n.7, p.475-490, Oct. 1939.

- LÖRZ, H.; GÖBEL, E.; BROWN, P. Advances in tissue culture and progress towards genetic transformation of cereals. **Plant Breeding**, v.100. n.1, p.1-25, 1988.
- LOWE, K.; TAYLOR, D.B.; RYAN, P. PATERSON, K.E. Plant regeneration via organogenesis and embryogenesis in the maize inbred line B73. **Plant Science**, v.41, n.2, p.125-132, 1985.
- LU, C.; VASIL, I.K.; OZIAS-AKINS, P. Somatic embryogenesis in *Zea mays* L. **Theoretical and Applied Genetics**, v.62, n.2, p.109-112, 1982.
- LUKASZEWSKI, A.J. Chromatid and chromosome type breakage-fusion-bridges cycles in wheat. (*Triticum aestivum* L.). **Genetics**, v.140, n.3, p.1069-1085, 1995.
- LUPOTTO, E. In vitro culture of isolated somatic embryos of maize (*Zea mays* L.). **Maydica**, v.31, n.2, p.193-201, 1986.
- LUPOTTO, E.; LUSARDI, M.C. An example of genotype flexibility in tissue culture: switch from type 1 to type 2 embryogenic cultures in the inbred B79. **Maize Genetics Cooperation Newsletter**, v. 62, p.31-32, 1988a.
- LUPOTTO, E.; LUSARDI, M.C. Secondary somatic embryogenesis from regenerating plantlets of the inbred line B79 of maize (*Zea mays* L.). Switch from type 1 to type 2 callus and effect on regenerative potential. **Maydica**, v.33, p.163-177, 1988b.
- McCAIN, J.W.; HODGES, T.K. Anatomy of somatic embryos from maize embryo cultures. **Botanical Gazette**, v.147, n.4, p.453-460, 1986.

- McCLINTOCK, B. The fusion of broken ends of sister half-chromatids following chromatid breakage at meiotic anaphases. **Research Bulletin of Missouri Agricultural Experimental Station**, v.290, p.1-48, 1938.
- McCLINTOCK, B. The behavior in successive nuclear divisions of a chromosome broken at meiosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.25, p.405-416, 1939.
- McCLINTOCK, B. The stability of broken ends of chromosomes in *Zea mays*. **Genetics**, v.26, p.234-282, 1941.
- McCLINTOCK, B. The fusion of broken ends of chromosomes following nuclear fusion. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.28, p.458-463, 1942.
- McCOY, T.J.; PHILLIPS, R.L. Chromosome stability in maize (*Zea mays*) tissue cultures and sectoring in some regenerated plants. **Canadian Journal of Genetics and Cytology**, v.24, n.5, p.559-565, 1982.
- McCOY, T.J.; PHILLIPS, R.L.; RINES, H.W. Cytogenetic analysis of plants regenerated from oat (*Avena sativa*) tissue cultures; high frequency of partial chromosome loss. **Canadian Journal of Genetics and Cytology**, v.24, n.1, p.37-50, 1982.
- McCULLAGH, P.; NELDER, J.A. Generalized linear models. London: Chapman & Hall, 1995, 511p. (Monographs on statistic and applied probability, 37).
- MOHANTY, B.D.; PAUL, N.K.; GHOSH, P.D. Chromosomal behaviour in callus culture of *Zea mays* L. **Cytologia**, v.51, n.1, p.37-41, 1986.

- MOLINA, M.C.; GARCIA, M.D. Cytogenetic abnormalities in callus and plants derived from one maize embryo after 60 months in culture. **Maize Genetics Cooperation Newsletter**, v.68, p.54-55, 1994.
- MOLINA, M.C.; GARCIA, M.D.; CASO, O. Phenotypic and chromosomic aberrations in plants regenerated from callus. **Maize Genetics Cooperation Newsletter**, v.66, p.63-64, 1992.
- MORRISH, F.; VASIL, V.; VASIL, I.K. Developmental morphogenesis and genetic manipulation in tissue and cell cultures of the gramineae. **Advances in Genetics**, v.24, p.431-499, 1987.
- MOZAFFARI, F.D.S.; GAHAN, P.B. Chromosome aberrations and ageing root meristems. **Annals of Botany**, v.42, n.181, p.1161-1170, 1978.
- MURASHIGE, T.; NAKANO, R. Chromosome complement as a determinant of the morphogenic potential of tobacco cells. **American Journal of Botany**, v.54, n.8, p.963-970, Sep. 1967.
- MURATA, M.; ORTON, T.J. Chromosomal structural changes in cultured celery cells. **In vitro**, v.19, p.83-89, 1983.
- MURATA, M.; ORTON, T.J. Chromosome fusions in cultured cells of celery. **Canadian Journal of Genetics and Cytology**, v.26, p.395-400, 1984.
- MYTHILI, P.K.; RAO, M.V.S.; MANGA, V. Cytology of explants, calli and regenerants in five inbred lines of pearl millet, *Pennisetum glaucum* (L.) R. Br. **Cytologia**, v.60, n.1, p.23-29, 1995.
- NATARAJAN, A.T.; AHNSTRÖM, G. Heterochromatin and chromosome aberrations. **Cromosoma**, v.28, n.1, p.48-61, 1969.

- NESTICKÝ, M.; NOVÁK, F.J.; PIOVARCI, A. DOLEZELOVÁ. Genetic analysis of callus growth of maize (*Zea mays* L.). **Zeitschrift für Pflanzenzüchtung**, v.91, 322-328, 1983.
- NOVÁK, F.J.; DOLEZELOVÁ, M.; NESTICKY, M.; PIOVARCI, A. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Zea mays* L. **Maydica**, v.28, n.4, p.381-390, 1983.
- NUTI RONCHI, V. Mitosis and meiosis in cultured plant cells and their relationship to variant cell types arising in culture. **International Review of Cytology**, v.158, p.65-140, 1995.
- NUTI RONCHI, V.; BONATTI, S., DURANTE, M.; TURCHI, G. Preferential localization of chemically induced breaks in heterochromatic regions of *Vicia faba* and *Allium cepa* chromosomes-II. 4-Epoxyethyl-1,2-epoxy-cyclohexane interacts specifically with highly repetitive sequences of DNA in *Allium cepa*. **Environmental and Experimental Botany**, v.26, n.2, p.127-135, 1986.
- NUTI RONCHI, V.; GIORGETTI, L.; TONELLI, M.; MARTINI, G. Ploidy reduction and genome segregation in cultured carrot cell lines. I. Prophase chromosome reduction. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.30, p.107-114, 1992.
- PEACOCK, W.J.; DENNIS, T.S.; RHOADES, M.M.; PRYOR, A.J. Highly repeated DNA sequences limited to knobs heterochromatin in maize. **Proceedings of the National Academy Sciences of the U.S.A.**, v.78, n.7, p.4490-4494, July 1981.
- PESCHKE, V.M.; PHILLIPS, R.L. Activation of the maize transposable element *Suppressor-mutator* (*Spm*) in tissue culture. **Theoretical and Applied Genetics**, v.81, n.1, p.90-97, 1991.

- PESCHKE, V.M.; PHILLIPS, R.L. Genetic implications of somaclonal variation in plants. **Advances in Genetics**, v.30, p.41-75, 1992.
- PESCHKE, V.M.; PHILLIPS, R.L.; GENGENBACH, B.G. Genetic and molecular analysis of tissue-culture-derived Ac elements. **Theoretical and Applied Genetics**, v.82, n.2, p.121-129, 1991.
- PHILLIPS, R.L. Somaclonal and gametoclonal variation. **Genome**, v.31, n.2, p.1119-1120, 1989.
- PHILLIPS, R.L.; WANG, A.S. Chromosome analysis. In: VASIL, I.K. (Ed.) **Cell culture and somatic cell genetics of plant**. New York: Academic Press, 1984. cap. 78, p.712-727.
- PHILLIPS, R.L.; KAEPLER, S.M.; OLHOFT, P. Genetic instability of plant tissue cultures: Breakdown of normal controls. **Proceedings of the National Academy Sciences of the U.S.A.**, v.91, n.12, p.522-526, June, 1994.
- PHILLIPS, R.L.; SOMERS, D.A.; HIBBERD, K.A. Cell/tissue culture and *in vitro* manipulation. In: SPRAGUE, G.F.; DUDLEY, J.W. (Ed.) **Corn and corn improvement**. 3.ed. Madison: ASA/CSSA/SSSA, 1988. p.345-387. (Agronomy Monographs, 18).
- PRIOLI, L.M. Cultura de tecidos e células, controle genético da embriogênese somática e variação somaclonal em milho (*Zea mays* L.). Campinas, 1987. 232p. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.
- PRIOLI, L.M.; SILVA, W.J. Somatic embryogenesis and plant regeneration capacity in tropical maize inbreds. **Revista Brasileira de Genética**, v.12, n.3, p.553-566, jul./set., 1989.

- PRYOR, A; FAULKNER, K.; RHOADES, M.M.; PEACOCK, W.J.
Asynchronous replication of heterochromatin in maize.
Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.,
v.77, n.1, p.6705-6709, Nov. 1980.
- RAO, K.V.; PRASANNA, P.S.; REDDY, G.M. Chromosomal studies in
callus cultures. **Maize Genetics Cooperation Newsletter**, v.57,
p.53, 1983.
- RAPELA, M.A. Maize organogenesis and somatic embryogenesis: stage
of the donor tissue. **Maize Genetics Cooperation Newsletter**, v.59,
p.59, 1985.
- RAPELA, M.A. Mejoramiento del maiz: un sistema experimental modelo
para cultivo de tejidos in vitro. **Revista de la Facultad de
Agronomia**, v.61/62, n.1/2, p.123-130, 1985/1986.
- REDDY, A.R.; PETERSON, P.A. Callus initiation from waxy endosperm
of various genotypes of maize. **Maydica**, v.22, n.3, p.125-130, 1977.
- REDDY, A.R.; PETERSON, P.A. Effect of age and genetic background on
the in vitro maize endosperm callus initiation. **Maydica**, v.32, n.2,
p.151-161, 1987.
- REINERT, J.; BACKS, D. Control of totipotency in plant cells growing *in vitro*. **Nature**, v.220, p.1340-1341, Dec. 1968.
- RHOADES, M.M. The cytogenetics of maize. In: SPRAGE, S.E. (Ed.)
Corn and corn improvement. New York: Academic Press, 1955.
p.123-219.

- RHOADES, M.M. Genetic effects of heterochromatin in maize. In: WALDEN, D.B. (Ed.) **Maize breeding and genetics**. New York: Wiley, 1978. cap. 40, p.641-671.
- RHOADES, M.M.; DEMPSEY, E. The induction of mutable systems in plants with the high-loss mechanism. **Maize Genetics Cooperation Newsletter**, v.56, p.21-26, 1982.
- ROMANAVA, A.B.; ATAIEVA, D.M.; SHCHERBACK, V.S.; CHUMAK, M.V. Development of heterochromatin polymorphism in inbred lines. **Maize Genetics Cooperation Newsletter**, v.65, p.89-90, 1991.
- ROSATI, C.; LANDI, P.; TUBEROSA, R. Recurrent selection for regeneration capacity from immature embryo-derived calli maize. **Crop Science**, v.34, n.2, p.343-347, 1994.
- SANTOS, J.A. dos. Estudo da instabilidade cromossômica em culturas de longa duração de calos de milho (*Zea mays* L.). Piracicaba, 1995, 172p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.
- SANTOS, J.A. dos.; AGUIAR-PERECIN, M.L.R. de. Chromosome instability in long-term maize callus cultures. **Chromosome Research**, Supplement 1, v.3, p.60, 1995.
- SASAKI, M.S. Sister chromatid exchange and chromatid interchanges as possible manifestation of different DNA repair processes. **Nature**, v.269, p.623-625, Oct. 1977.
- SAS Institute. The GLM procedure. In: SAS/STAT user's guide. Cary, N.C. 1988.

- SCHWARTZ, D. Gene-controlled cytosine demethylation in the promoter region of the Ac transposable element in maize. **Proceedings of the National Academy Sciences of the U.S.A.**, v.86, n.8, p.2789-2793, Apr. 1989.
- SINGH, R.J. Chromosomal variation in immature embryo derived calluses of barley (*Hordeum vulgare* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, v.72, n.5, p.710-716, 1986.
- SINGH, B.D.; HARVEY, B.L. Does 2,4-D induce mitotic irregularities in plant tissue cultures? **Experientia**, v.31, n.7, p.785-787, 1975.
- SMITH, S.M.; STREET, H.E. The decline of embryogenic potential as callus and suspension cultures of carrot (*Daucus carota* L.) are serially subcultured. **Annals Botany**, v.38, n.155, p.223-241, 1974.
- STELLY, D.M.; ALTMAN, D.W.; KOHEL, R.J.; RANGAN, T.S.; COMMISKEY, E. Cytogenetic abnormalities of cotton somaclones from callus cultures. **Genome**, v.32, p.762-770, 1989.
- SUNDERLAND, N. Nuclear cytology. In: STREET, H.E. (Ed.) **Plant cell and tissue culture**. Berkeley: University of California Press, 1977. v.2, cap. 7, p.177-206.
- SWEDLUNG, B.; VASIL, I.K. Cytogenetic characterization of embryogenic callus and regenerated plants of *Pennisetum americanum* (L.) K. Schum. **Theoretical Applied Genetics**, v.69, n.5/6, p.575-581, 1985.
- SYBENGA, J. **Cytogenetics in plant breeding**. Berlin: Springer-Verlag, 1992, cap.3, p.23-63: The mechanisms of genetic transmission.

- TING, Y.C; CHEN, W.C.; HWANG, C.S. Cytological stability of maize anther calli. **Maize Genetics Cooperation Newsletter**, v.54, p.19-20, 1980.
- TOMES, D.T.; SMITH, O.S. The effect of parental genotype on initiation of embryogenic callus from elite maize (*Zea mays* L.) germplasm. **Theoretical and Applied Genetics**, v.70, n.5, p.505-509, 1985.
- VAN LAMMEREN, A.A.M. Observations on the structural development of immature maize embryos (*Zea mays* L.) during *in vitro* culture in the presence or absence of 2,4-D. **Acta Botanica Neerlandica**, v.37, n.1, p.49-61, Mar. 1988.
- VASIL, I.K. Somatic embryogenesis and its consequences in the Gramineae. In: HENKE, R.R.; HUGHES, K.W.; CONSTANTIN, M.P.; HOLLAENDER, K.W. (Ed.) **Tissue cultures in forestry and agriculture**. New York: Plenum, 1985. p.31-47.
- VASIL, V.; VASIL, I.K.; LU, C. Somatic embryogenesis in long-term callus cultures of *Zea mays* L. (Gramineae). **American Journal of Botany**, v.71, n.1, p.158-161, Jan. 1984.
- VOSA, C.G.; AGUIAR, M.L.R. de. New chromosome techniques for knob detection in mitotic chromosomes in maize and teosinte. **Maize Genetics Cooperation Newsletter**, v.46, p.165-167, 1972.
- WAN, Y.; ROCHEFORD, T.R.; WIDHOLM, J.M. RFLP analysis to identify putative chromosomal regions involved in the anther culture response and callus formation of maize. **Theoretical and Applied Genetics**, v.85, n.2-3, p.360-365, 1992.

- WANG, A.S.; PHILLIPS, R.L.; MI, C.C. Cell cycles parameters and accumulation of metaphase cells in maize suspension cultures. **Plant Science**, v.46, p.53-61, 1986.
- WARD, E.J. Banding patterns in maize mitotic chromosomes. **Canadian Journal of Cytology**, v.22, n.1, p.61-67, 1980.
- WELTER, M.E; CLAYTON, D.S.; MILLER, M.A.; PETOLINO, J.F. Morphotypes of friable embryogenic maize callus. **Plant Cell Reports**, v.14, n.11, p.725-729, 1995.
- WERNER, J.E.; KOTA, R.S.; GILL, B.S.; ENDO, T.R. Distribution of telomeric repeats and their role in the healing of broken chromosome ends in wheat. **Genome**, v.35, n.5, p.844-884, 1992.
- WILKINSON, T.C.; THOMPSON, S.A. Genotype, medium, and genotype x medium effects on the establishment of regenerable maize callus. **Maydica**, v.32, n.2, p.89-105, 1987.