**ANÁLISE DA TRANSMISSÃO E COMPORTAMENTO MEIÓTICO DE
CROMOSSOMOS ALTERADOS EM PLANTAS DE MILHO REGENERADAS
IN VITRO E SELEÇÃO DE GENÓTIPOS PARA CULTURAS DE CALOS
COM ALTA CAPACIDADE DE REGENERAÇÃO**

JANAY ALMEIDA DOS SANTOS-SEREJO

Engenheira Agrônoma

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

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

PIRACICABA

Estado de São Paulo - Brasil

Junho - 1999

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

Santos-Serejo, Janay Almeida dos

Análise da transmissão e comportamento meiótico de cromossomos alterados em plantas de milho regeneradas *in vitro* e seleção de genótipos para culturas de calos com alta capacidade de regeneração / Janay Almeida dos Santos-Serejo. - - Piracicaba, 1999.

131 p. : il.

Tese (doutorado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 1999.
Bibliografia.

1. Aberração cromossômica 2. Bandamento cromossômico 3. Calo embriogênico 4. Cromossomo vegetal 5. Cultura de calo 6. Instabilidade cromossômica 7. Milho 8. Planta transgênia 9. Regeneração "in vitro" I. Título

CDD 633.15

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte - O Autor"

ERRATA

Pág.	Linha	Onde se lê	Leia-se
vi	15	... de plantas de linhagens e respectivos híbridos, cujos genótipos são relacionados com os materiais acima mencionados.	... de plantas a partir de linhagens e respectivos híbridos, cujos genótipos pertencem a mesma família dos materiais acima mencionados.
ix	9	... whit high...	... with high ...
7	16	Sugerindo que ...	Isto sugere que ...
12	18	... alguns genomas podem ser...	... alguns genótipos podem ser...
16	5	... cromossomo satélite ...	... cromossomo satelitado ...
19	20	... 97,2% 94%.	97,2%.
21	28	... relacionada alterações no DNA...	... relacionada a alterações no DNA...
25	21	... encontrado um cromossomo 7 com amplificação na banda-C do braço longo ...	...encontrada uma amplificação na banda-C do braço longo do cromossomo 7
30	7	... sementes R ₁ .	... sementes R ₁ . As plantas R ₂ foram obtidas a partir da autofecundação de plantas R ₁ .
33	10	... encubadas em solução salina...	... incubadas em solução salina...
41	Última	... correspondentes.	... correspondentes a diversas metáfases analisadas.
48	5	...ocorrência de dois univalentes...	...ocorrência de nove bivalentes e dois univalentes...
48	12	(Figura 5)	(Figura 6)
48	14	(Figura 6)	(Figura 5)
51	1	... Microsporócitos na fase de diacinese ...	... Microsporócitos na fase de anáfase I ...
55	3	...considerando-se simultaneamente as segregações...	Apresentando simultaneamente as composições ...
55	última	(Figuras 10a-d, 10g, 10j, 11c-e, 12b)	(Figuras 9a-d, 9g, 9j, 10c-e, 11b)
59	18	... metáfases realizada ...	... metáfases mitóticas de células de culturas de calos realizada ...
61	2	... segmento eucromático distal ...	... segmento eucromático distal, expresso em percentagem, em ...
70	5 e 21	DP-DF	DF-DP
90	26	... 48 fora sacrificadas ...	48 foram utilizadas ...
91	última	... plantas utilizadas ...	... plantas controle utilizadas ...
101	18	... poderia de se parear ...	... poderia se parear ...
102	2	...extremidade final do braço longo...	... região distal do braço longo ...
111	24	... calos de curta, ...	... calos de curta duração ...

A DEUS

Meu louvor,

Meu agradecimento,

Minha prece...

"Ensina-me a contar os dias,
para que eu alcance a sabedoria"

A meus pais e irmãos

OFEREÇO

Ao meu esposo Marcos

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Ao **Departamento de Genética, ESALQ/USP**, pela oportunidade concedida.

À **Profa. Dra. Margarida Lopes Rodrigues de Aguiar-Perecin**, pela preciosa orientação, dedicação e pelas lições de vida.

Aos **Professores do Curso de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas**, pelos ensinamentos e atenção.

Aos colegas e amigos inesquecíveis **Maria Angélica M.M. Ferreira, Mônica Rosa Bertão, José Raulindo Gardingo, Mateus Mondin** pelo convívio, paciência e alegria.

Aos **funcionários do Laboratório de Citologia** do Departamento de Genética da ESALQ/USP, **Silvia Cristina Menuzzo Molina e Carlos Alberto Veríssimo**, pela amizade e colaboração no desenvolvimento deste trabalho.

Aos **funcionários do Departamento de Genética** da ESALQ/USP, em especial, **Carmem M.F. Piloto, Vandeléia de Oliveira, Antonio Pádua Gorga (Berdan), Fernando Leopoldino, Valdir Próspero, Silvana Gregório, Elisabeth da Silva e Silvana**, pelo convívio de amizade e pelos inúmeros favores.

Aos **colegas do Curso de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas**, pelo companheirismo.

Ao **CNPq**, pela concessão da bolsa de estudo.

À **FAPESP**, pelo apoio ao projeto de pesquisa relacionado com a tese.

ÍNDICE

	Página
RESUMO.....	i
SUMMARY.....	iii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	5
2.1. Embriogênese somática e regeneração de plantas de milho.....	5
2.2. Instabilidade cromossômica em cultura de tecidos.....	8
2.3. Transformação genética em milho.....	26
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	29
3.1. Plantas regeneradas de culturas de calos com 12, 28 e 29 meses.....	29
3.1.1. Análise citogenética de somaclones.....	30
3.1.1.1. Análise mitótica.....	30
3.1.2.2. Análise meiótica	33
3.2. Genótipos para regeneração de plantas após curto período de cultivo in vitro (2-3 meses).....	35
3.2.1. Obtenção das culturas.....	37
3.2.1. Avaliação da resposta embriogênica.....	37
3.2.3. Regeneração de plantas.....	37
3.2.4. Avaliação da estabilidade cromossômica em plantas Ro....	38
4. RESULTADOS.....	39
4.1. Cultura 12-F.....	39
4.1.1. Análise mitótica de plantas R ₁ derivadas da cultura 12-F	39
4.1.1.1. Análise mitótica de plantas R ₁	39

	Página
4.1. 2. Análise meiótica de plantas R1 derivadas da cultura 12-F.	48
4.2. Cultura 3-57.....	70
4.2.1. Análise da transmissão do cromossomo alterados em plantas R1 e R2 derivadas da cultura 3-57.....	70
4.2.2. Análise do comportamento meiótico de plantas R1 derivadas da cultura 3-57 e de plantas controle.....	73
4.3. Genótipos avaliados para regeneração de plantas após curto período de cultivo <i>in vitro</i>	85
4.3.1. Resposta embriogênica e regeneração de plantas.....	85
4.3.2. Análise citogenética de plantas Ro.....	93
5. DISCUSSÃO.....	96
5.1. Plantas regeneradas a partir de duas culturas de longa duração (12-29 meses).....	96
5.1.1. Cultura 12-F.....	96
5.1.2. Cultura 3-57.....	105
5.2. Resposta embriogênica e regeneração de plantas a partir de culturas de curta duração (2-3 meses).....	109
6. CONCLUSÕES.....	112
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	114

**ANÁLISE DA TRANSMISSÃO E COMPORTAMENTO MEIÓTICO DE
CROMOSSOMOS ALTERADOS EM PLANTAS DE MILHO REGENERADAS
IN VITRO E SELEÇÃO DE GENÓTIPOS PARA CULTURAS DE CALOS
COM ALTA CAPACIDADE DE REGENERAÇÃO**

Autor: JANAY ALMEIDA DOS SANTOS-SEREJO

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

RESUMO

O presente trabalho faz parte de um programa de pesquisa cujo objetivo é o de selecionar linhagens de milho com alta capacidade de regenerar plantas férteis e com estabilidade cromossômica. Foram feitas duas abordagens: a) análise citogenética de plantas regeneradas a partir de culturas de calos altamente embriogênicos com 12 a 29 meses de idade, cujo grau de instabilidade cromossômica tinha sido investigado anteriormente; b) avaliação da resposta ao cultivo *in vitro* e capacidade de regeneração de plantas de linhagens e respectivos híbridos, cujos genótipos são relacionados com os materiais acima mencionados.

Em uma investigação anterior, a análise citogenética de duas culturas de calos, designadas 12-F e 3-57, havia mostrado uma predominância de alterações no cromossomo 7, detectadas por bandamento-C de metáfases mitóticas. Em um subclone (1-MS2) da cultura 12-F, foi observada a presença de uma amplificação do knob heterocromático do braço longo do cromossomo 7 (K7L), bem como em outro somaclone (2-N6) o cariótipo apresentou-se normal. Em todos os subclones da cultura 3-57 foi observada uma alteração do braço curto do cromossomo 7, que envolvia o knob terminal (K7S) e que havia sido interpretada como constituída de duplicação de segmentos desse braço e

deficiência do knob K7S (DF-DP). Todas as alterações foram interpretadas como decorrentes de ciclos de quebra-fusão-ponte, cujas evidências foram constatadas através da análise de anáfases mitóticas, coradas pelo bandamento-C, onde se observaram pontes decorrentes de atraso na separação das cromátides ao nível dos knobs e pontes típicas com e sem banda.

No presente trabalho, a análise de metáfases de pontas de raiz, através de bandamento-C, mostrou a presença do cromossomo 7 com amplificação de K7L, em plantas R₁ derivadas do subclone 1-MS2 da cultura 12-F, bem como desvios da segregação mendeliana esperada. A constatação da presença de plantas homozigóticas para esta amplificação sugere, no entanto, que deve ser feita uma reavaliação de que esta aberração tenha surgido a partir de ciclos de quebra-fusão-ponte, o que implicaria em deficiência parcial do knob, bem como deficiência total do segmento eucromático distal, do braço maior do cromossomo 7. A análise do paquíteno destas plantas mostrou que o comprimento deste segmento distal não diferia entre plantas homozigóticas para presença e ausência da amplificação, o que sugere que esta alteração poderia ter tido outra origem, por exemplo, troca desigual entre cromátides irmãs. A análise da diacinese mostrou a presença de univalentes, e na anáfase I foram observados cromossomos retardatários, pontes interpretadas como eventos de "misdivision" e outros tipos de pontes sem fragmento. As plantas R₁ derivadas do subclone 2-N6 da cultura 12-F apresentaram-se sem alterações detectadas pelo bandamento-C em cromossomos mitóticos e através de análise meiótica, porém sua frequência de univalentes na diacinese, bem como a do subclone 1-MS2, foram maiores do que a das plantas controle.

O cromossomo 7 com DF-DP no braço curto, observado na cultura 3-57, foi transmitido para 45,8 % das plantas R₁ analisadas,

sendo que homozigotos para esta aberração não foram observados. A análise meiótica de plantas heterozigóticas para DF-DP mostrou a ocorrência de adesão entre knobs no paquíteno e presença de par heteromórfico na diacinese. Os dados dão evidências adicionais de que este cromossomo teria se originado a partir de ciclo de quebra-fusão-ponte, e se estabilizou em decorrência de cicatrização telomérica.

A avaliação da resposta ao cultivo *in vitro* e capacidade de regeneração de plantas, a partir de linhagens relacionadas com os genótipos das culturas de longa duração estudadas, envolveu três linhagens (13342/2, 13342/5 e 132331/1) e respectivos híbridos, sendo as linhagens derivadas de uma variedade de milho tropical, tipo flint, pertencentes a uma família detectada anteriormente como capaz de produzir calos altamente embriogênicos, tipo II. As culturas foram obtidas a partir de embriões imaturos, inoculados em meio N6 suplementado com 1,5 mg/l de 2,4-D e 12 mM de prolina. A frequência de calos embriogênicos 45 dias após o início da cultura (83-99%) foi semelhante aos melhores genótipos descritos na literatura, refletindo a alta qualidade dos genótipos testados para o estabelecimento de culturas com resposta embriogênica após curto período de cultivo. Em média, 2-8 plantas regeneradas por calo foram obtidas a partir de culturas com 2-3 meses de idade, destacando-se os híbridos 13342/2 x 13342/5 e 132331/1 x 13342/5. Não foram detectadas alterações no cariótipo em metáfases de pontas de raiz de uma amostra de plantas R₀, coradas através da metodologia de bandamento-C. A análise meiótica mostrou baixa frequência de univalentes na diacinese, e de univalentes retardatários na anáfase I, comparável à de plantas controle utilizadas no primeiro experimento. Os resultados mostram que estes genótipos são promissores para a regeneração de plantas férteis e apresentando estabilidade cromossômica, que poderão ser utilizadas em programas envolvendo transformação de plantas.

**ANALYSIS OF THE TRANSMISSION AND MEIOTIC BEHAVIOR OF
ABERRANT CHROMOSOMES IN REGENERATED MAIZE PLANTS
AND SELECTION OF GENOTYPES TO TISSUE CULTURE WITH HIGH
REGENERATION CAPACITY**

Author: JANAY ALMEIDA DOS SANTOS-SEREJO

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

SUMMARY

This study is part of a research program aiming the selection of maize lines showing high capacity of plant regeneration, whit high chromosome stability. Two approaches were focused: a) cytogenetic analysis of regenerated plants from two higly embryogenic callus cultures 12-29-month-old, whose mitotic instability had been previously investigated. b) evaluation of tissue culture response and plant regeneration from lines and hybrids related to materials mentioned above.

In a previous investigation, the cytogenetic analysis of two cultures, designated 12-F and 3-57, had shown a predominance of aberrations involving chromosome 7, detected in C-banded mitotic metaphases. In a subclone from culture 12-F (1-MS2) an amplification of the band corresponding to K7L was observed., and the 2-N6 subclone showed normal karyotype. In all subclones of culture 3-57, it was observed na alteration in the short arm of chromosome 7 (K7S), and that was interpreted as a duplication of segments of the short arm and also a deficiency of the distal region of K7S (DF-DP). These aberrations were interpreted as resulting from breakage-fusion-bridge cycle (BFB), whose

evidences were detected by the analysis of C-banded mitotic anaphases,, showing bridges resulting from delayed chromatid separation and typical bridges, with or without C-bands.

In the present study, the analysis of mitotic C-banded mitotic metaphases showed the presence of the chromosome 7 with amplification of K7L in R₁ plants derived from 1-MS2 subclone of culture 12-F, and deviation of the mendelian segregation expected. The presence of plants homozygous for this amplification suggests, however, the interpretation that this aberration was originated from a BFB cycle should be reviewed, for this event would result in a partial deficiency of the knob, and total deficiency of the distal euchromatin of long arm of chromosome 7. Analysis of pachynema showed that the length of the distal segment did not differ among plants homozygous to presence or absence of this amplification, suggesting that the aberration could have a different origin, for example, unequal sister chromatid exchange. Analysis of diakinesis showed the presence of univalents, and at anaphase I laggard univalents, bridges interpreted as misdivision events and other types of bridges without fragment were observed. R₁ plants derived from subclone 2-N6 of the culture 12-F did not show aberrations in C-banded metaphases and in meiotic cells, however, its frequency of univalents at diakinesis, as well as that from subclone 1-MS2, was higher than in control plants.

The chromosome 7 with DF-DP in the short arm, observed in culture 3-57, was transmitted to 45.8% of the R₁ plants analysed, but homozygotes for this aberration were not observed. The meiotic analysis of plants heterozygous for deficiency duplication showed the occurrence of knob adherence in pachynema and the presence of a heteromorphic pair at diakinesis. These results provide additional evidence that this

chromosome would have originated from of BFB cycles and has become stable by chromosome healing.

The evaluation of the embryogenic response and capacity to regenerate plants from maize lines related to the genotypes of the long-term tissue cultures studied, involved three lines (13342/2, 13342/5 e 132331/1) and their respective hybrids. These lines were derived from a maize flint variety of tropical origin belonging to a family previously detected as able to produce type II embryogenic cultures. The cultures were obtained from immature embryos inoculated on N6 medium supplemented with 1.5 mg/L 2,4-D and 12 mM L-proline. The frequency of embryogenic 45 day-old calli (83-99%) was similar to those of the best genotypes described in the literature, reflecting the high quality of the genotypes investigated to establish short-term tissue cultures. The average number of regenerated plants from 2-3 month-old cultures ranged from 2 to 8.15 per callus. The hybrids 13342/5 x 13342/2 and 132331 x 13342/5 showed the better performance. The regenerated plants were fertile. Chromosome aberrations were not detected in C-banded metaphases from root tip of a sample of R_0 plants. Meiotic analysis showed low frequency of univalents at diakinesis and of laggard univalents at anaphase I, similar to the control plants used in the first experiment. The results show that these genotypes are promising to the regeneration of fertile plant with chromosome stability, that could be used in programs involving plant transformation.

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos tem crescido o interesse na utilização de culturas embriogênicas de milho visando a produção de plantas geneticamente transformadas. Entretanto, a obtenção de plantas transgênicas depende, entre outros fatores, da integração do gene exógeno na célula alvo e da eficiência com que as plantas são regeneradas a partir destas células. Atualmente, um dos materiais mais amplamente utilizados para transformação em milho é a cultura de calos derivados de embriões imaturos (revisão em Armstrong, 1999).

Várias linhagens e híbridos adaptados a regiões de clima temperado têm sido testados, mas eficiência na regeneração de plantas a partir de embriões somáticos tem sido obtida de poucos genótipos, destacando-se a linhagem A188, que apresenta pouco valor agrônômico mas é muito superior a outras linhagens de milho em sua capacidade para regenerar plantas a partir de calos embriogênicos (Green & Phillips, 1975; Lee & Phillips, 1987; Armstrong et al., 1992). Alguns genótipos adaptados a regiões tropicais e subtropicais com capacidade para produção de calos embriogênicos tem sido relatados (Prioli & Silva, 1989; Furini & Jewell, 1994; Bohorova et al., 1995; Fluminhan & Aguiar-Perecin, 1998).

Numerosos estudos têm mostrado a ocorrência de variação genética e citogenética em plantas regeneradas a partir de culturas de tecidos de milho (revisão em Lee & Phillips, 1988; Phillips et al., 1990; Peschke & Phillips, 1992). Análises meióticas de plantas de milho regeneradas mostraram a ocorrência de quebras cromossômicas, a

maioria envolvendo braços cromossômicos contendo knobs heterocromáticos. Foi proposta a hipótese de que as regiões heterocromáticas que normalmente têm replicação tardia devem replicar ainda mais tarde em condições de cultivo *in vitro*, levando à formação de pontes na anáfase, devido ao atraso na separação de cromátides irmãs ao nível de knobs (Lee & Phillips, 1987).

Como parte de um programa de seleção de genótipos para o cultivo *in vitro* desenvolvido no Departamento de Genética, foram investigadas várias linhagens relacionadas que apresentavam diferentes conteúdos de knobs heterocromáticos, pertencentes a quatro famílias derivadas de uma variedade de milho tipo flint de origem tropical (Fluminhan, 1992; Fluminhan & Aguiar-Perecin, 1998). Foi observado que as linhagens pertencentes à família 1-3 apresentaram alta capacidade de produção de calos tipo II, friáveis e altamente embriogênicos. A análise citológica dos calos mostrou a presença de pontes na anáfase resultantes de atraso na separação de cromátides ao nível dos knobs, confirmando assim a hipótese proposta por Lee & Phillips (1987). O emprego de bandamento-C revelou também a presença de pontes típicas com e sem bandas-C (correspondentes aos knobs). Este fato e a presença de certas aberrações grosseiras observadas em metáfases mitóticas, sugeriram a ocorrência de ciclos de quebra-fusão-ponte após o evento primário (Fluminhan, 1992; Fluminhan et al., 1996). A análise da frequência de pontes mostrou que nem sempre há correlação entre frequência de knobs e frequência de pontes, e que esta é dependente do genótipo. A análise de metáfases coradas através da metodologia de bandamento-C apresentou novas evidências da ocorrência de ciclos de quebra-fusão-ponte (Fluminhan et al., 1996; Fluminhan & Aguiar-Perecin, 1998).

Com base nestes estudos, foram investigadas duas culturas de calos embriogênicos de milho com 2-3 anos de idade, selecionadas pelo

seu vigor (Santos, 1995; Santos & Aguiar-Perecin, 1995). Alguns critérios foram adotados para a escolha destes materiais para os estudos realizados. Uma das culturas (designada 12-F) tinha regenerado plantas férteis, e a outra cultura (3-57) apresentava uma aberração cromossômica que evidenciava indícios de cicatrização da extremidade quebrada de um cromossomo, após ciclo de quebra-fusão-ponte. A análise dos calos, através de metáfases coradas pelo bandamento-C, mostrou que a cultura 12-F apresentava amplificação no knob do braço longo em 54% das células analisadas do subclone 1-MS2, enquanto que o cariótipo do subclone 2-N6 permaneceu aparentemente normal. Na cultura 3-57 foram observadas aberrações envolvendo os knobs do braço curto dos cromossomos 7 e 9, bem como a presença de um microcromossomo, interpretadas como deficiências e duplicações resultantes de ciclos de quebra-fusão-ponte. A análise de anáfases mostrou que a medida que aumentou a idade da cultura as aberrações que ocorreram nas várias subculturas acumularam-se, mas aparentemente não ocorreu um aumento na frequência de pontes anafásicas, o que sugere a ocorrência de estabilização de cromossomos com extremidades quebradas provavelmente pela ocorrência de cicatrização telomérica.

Em continuidade ao programa de seleção de genótipos para o cultivo *in vitro* desenvolvido no Departamento de Genética, Gardingo (1998) analisou a resposta embriogênica e a instabilidade cromossômica em culturas obtidas a partir de embriões imaturos derivados de linhagens pertencentes a família 1-3, e respectivos híbridos. Foi observada alta frequência de embriogênese somática aos 45 dias de cultivo (81,76 a 89,42%), destacando-se o híbrido 13342/1 x 13342/5. A capacidade de manutenção de culturas aos 12 meses variou de 1,28% (linhagem 132331/1) a 5% (linhagem 13342/5) em relação aos embriões inoculados. A análise de metáfases e prometáfases, coradas pelo

bandamento-C, mostrou que a maioria das células analisadas das culturas com 2 meses e 3- 4 meses eram normais. Foi observada uma baixa frequência de alterações cromossômicas estruturais, envolvendo principalmente os knobs do cromossomo 7. Portanto, os genótipos analisados são capazes de produzir calos friáveis altamente embriogênicos com baixo grau de instabilidade cromossômica.

O presente estudo foi desenvolvido com os seguintes objetivos:

1. Analisar a transmissão de cromossomos alterados, observados previamente através da análise de calos, o seu comportamento meiótico, bem como a ocorrência de outras aberrações cromossômicas não detectadas através da análise de metáfases mitóticas coradas pelo bandamento-C, em plantas regeneradas a partir de duas culturas de longa duração (12 a 29 meses).
2. Investigar a eficiência de um novo protocolo para regeneração de plantas a partir do cultivo de embriões imaturos derivados de linhagens e híbridos de milho pertencentes à família 1-3, detectada anteriormente como altamente responsiva (Fluminhan & Aguiar-Perecin, 1998), e cujo grau de estabilidade cromossômica vem sendo investigado (Fluminhan, 1992; Santos, 1995; Santos & Aguiar-Perecin, 1995; Fluminhan et al. 1996; Fluminhan & Aguiar-Perecin, 1998; Gardingo, 1998). Visa-se também a investigação da estabilidade cromossômica de plantas regeneradas 2-3 meses após o início da cultura.

A presente investigação tem implicação para a Biotecnologia, no sentido de se selecionarem linhagens de milho para o cultivo *in vitro*, e tem importância também para estudos da estrutura dos cromossomos de milho e sua resposta ao estresse.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Embriogênese somática e regeneração de plantas de milho

O primeiro relato sobre regeneração de plantas de milho a partir de culturas de tecidos foi feito por Green & Phillips (1975). O tipo de explante utilizado foi o embrião imaturo, derivado da linhagem A188. A disposição do embrião com o eixo embrionário em contato com o meio de cultura retarda a germinação do embrião e induz a proliferação de células do escutelo permitindo a formação do calo (Green & Phillips, 1975; Green, 1978; Lu et al., 1982; Vasil et al., 1984, 1985; Vanlammeren, 1988).

Em milho, os calos embriogênicos estão agrupados em duas classes distintas baseadas em sua morfologia: tipo I e tipo II. Os diferentes tipos de calos dependem do genótipo, do estágio do explante e do meio de cultura empregado (Phillips et al., 1988).

Calos tipo I são caracterizados como compactos, opacos, com crescimento relativamente lento, morfologicamente complexos e organizados (Armstrong & Green, 1985). Embora calos tipo I possam ser mantidos em cultura por um longo período de tempo em outras espécies, em milho são difíceis de serem mantidos após algumas subculturas devido ao alto grau de organização dentro da massa do calo e à formação de estruturas que provavelmente representam o escutelo de um embrião germinado precocemente (Lu et al., 1982; Vasil & Vasil, 1986).

Por outro lado, calos tipo II são caracterizados como friáveis e com numerosos embriões somáticos globulares em sua superfície (Armstrong & Green, 1985). Apresentam crescimento rápido e mantém sua capacidade embriogênica em culturas de longa duração (Green, 1982; Tomes & Smith, 1985; Vasil & Vasil, 1986). Estudos histológicos de calos tipo II tem verificado que a regeneração de plantas ocorre via embriogênese somática (Lowe et al., 1985). Calos tipo II de milho têm apresentado respostas favoráveis no estabelecimento de suspensões celulares (Green et al., 1983; Kamo & Hodges, 1986; Vasil & Vasil, 1986) e na regeneração de plantas férteis a partir do cultivo de calos induzidos de protoplastos derivados de suspensões celulares embriogênicas (Shillito et al., 1989; Prioli & Sondahl, 1989; Mórocz et al., 1990).

Desde o primeiro relato em 1975, por Green e Phillips, várias linhagens e híbridos adaptados a regiões de clima temperado tem sido testados, mas eficiência na regeneração de plantas a partir de embriões somáticos tem sido obtida de relativamente poucos genótipos, destacando-se a linhagem A188, que apresenta pouco valor agrônomo mas é muito superior a outras linhagens de milho em sua capacidade para regenerar plantas a partir de calos embriogênicos (Green et al., 1977; Springer, 1979; McCoy & Phillips, 1982; Lu et al., 1982; Vasil & Vasil, 1986; Armstrong & Green, 1985; Lee e Phillips, 1987; Armstrong et al., 1992).

Alguns genótipos adaptados a regiões tropicais e subtropicais com capacidade para produção de calos embriogênicos tem sido relatados (Prioli & Silva, 1989; Fluminhan & Aguiar-Perecin, 1992; Furini & Jewell, 1994; Bohorova et al., 1995; Fluminhan & Aguiar-Perecin, 1998).

Prioli & Silva (1989) investigaram a embriogênese somática e a capacidade para regeneração de plantas em 34 linhagens de milho de origem tropical, das raças Cateto e Tuxpeño. As linhagens derivadas da

raça Cateto apresentaram alta frequência de formação de calos embriogênicos tipo I, bem como capacidade para regeneração de plantas, muito superiores às obtidas na raça Tuxpeño. Alguns genótipos formaram calos tipo II (Cat 100-6, Cat 100-8 e TuxMo-1). Os autores sugerem que os genes que controlam a resposta para regeneração de plantas em milho tropical estão presentes em alta frequência na raça Cateto.

Entre os genótipos testados por Fluminhan & Aguiar-Perecin (1998), destacou-se a família 1-3, derivada de uma variedade de milho tipo flint de origem tropical (Jac-Duro, Sementes Agrocere, Brasil), que apresentou alta capacidade de produção de calos tipo II (friável e altamente embriogênico). Em um estudo posterior, utilizando uma linhagem pertencente a esta família (Santos, 1995), foi verificado que culturas de longa duração, obtidas a partir de embriões imaturos, regeneravam plantas férteis e com estabilidade cromossômica. Sugerindo que estes genótipos são promissores para obtenção de culturas embriogênicas que podem ser mantidas por longos períodos, sem perder sua capacidade de regenerar plantas férteis e com alta estabilidade cromossômica.

Recentemente, Gardingo (1998) analisou a frequência de embriogênese somática e a estabilidade cromossômica em algumas linhagens pertencentes à família 1-3, e respectivos híbridos. Foi observada alta frequência de calos embriogênicos tipo II (acima de 80%), 45 dias após o início da cultura. A análise citológica dos calos derivados de embriões imaturos, através de metáfases coradas pela metodologia de bandamento-C, mostrou baixa frequência de instabilidade cromossômica. Entretanto, a capacidade para regeneração de plantas não foi investigada.

Numerosos estudos têm sido conduzidos sobre o controle genético da resposta ao cultivo *in vitro* de tecidos vegetais. Foi observado

que um número relativamente pequeno de genes está envolvido na determinação desta característica e que a herdabilidade é alta (revisão em Peschke & Phillips, 1992; Henry et al., 1994).

Wan et al.. (1992) identificaram seis regiões cromossômicas envolvidas na resposta à cultura de anteras e regeneração de plantas de milho, através de análises de RFLP. Estas regiões estavam localizadas no braço curto do cromossomo 1, no braço longo dos cromossomos 2 (uma próxima ao centrômero e outra próxima à extremidade), 3, 6 e 8. Entretanto, os dados das análises de RFLP indicaram que outras regiões podem também estar relacionadas com a capacidade para regeneração.

Armstrong et al. (1992) identificaram, pela análise de RFLP, cinco regiões cromossômicas envolvidas no estabelecimento de culturas de calos friáveis e embriogênicos derivados de embriões imaturos. Estas regiões estão localizadas nos cromossomos 1, 2, 3 e 9. Os autores obtiveram sucesso na transferência desses genes de uma linhagem com alta resposta à indução de culturas friáveis e embriogênicas (A188) para uma linhagem de baixa resposta (B73), através de retrocruzamento.

No processo de seleção de genótipos para o cultivo *in vitro*, com capacidade para produção de calos altamente embriogênicos e para regeneração de plantas, é muito importante considerar o aspecto da estabilidade cromossômica.

2.2. Instabilidade cromossômica em cultura de tecidos

A ocorrência de variação genética e citogenética durante o cultivo *in vitro* tem sido bem documentada (revisão em Bayliss, 1980; Lee & Phillips, 1988; Phillips et al., 1990, 1994; Ronchi, 1995).

Análises citológicas têm provido informações importantes sobre os tipos e frequência de aberrações de cromossomos específicos e

regiões do cromossomo afetadas pelos rearranjos. Estes estudos têm sido usados para identificar o padrão de variação e investigar os mecanismos que geram algumas alterações estruturais.

O uso de reguladores de crescimento, o genótipo e a idade da cultura tem sido citados como os principais fatores que contribuem para a ocorrência de variação somaclonal (revisão em Bayliss, 1980; Peschke & Phillips, 1992).

Green et al. (1977) analisaram 87 plantas regeneradas a partir de culturas derivadas de embriões imaturos do genótipo A188 x W22 R-nj R-nj. As plantas regeneradas foram obtidas de culturas com 65 a 125 dias de idade. Das 43 plantas examinadas, apenas duas apresentaram anormalidades citológicas: uma sendo tetraplóide em um setor da inflorescência masculina e outra apresentou um setor com monossomia do cromossomo 5. Oitenta e cinco plantas foram examinadas quanto à fertilidade do pólen e 83 apresentaram mais de 97% de fertilidade do pólen, e das duas restantes uma apresentou 60% e outra 92%. Os autores concluíram, portanto, que a maioria das plantas regeneradas dos calos de milho 65-125 dias após o início da cultura eram normais.

Semelhantemente, McCoy & Phillips (1982) analisaram 124 plantas regeneradas do cruzamento A188 x W22 R-nj R-nj e seu recíproco, obtidas a partir de embrião imaturo, após 120 e 240 dias de cultivo *in vitro*. Somente cinco destas plantas apresentaram anormalidades cromossômicas e 50% de aborto do pólen. Destas, três exibiram quimerismo na inflorescência masculina com relação ao aborto do pólen (50%), sendo que duas destas três plantas apresentaram-se meioticamente normais, enquanto que a terceira tinha um setor monossômico. A quarta planta perdeu uma grande parte do braço curto do cromossomo 10. A quinta planta anormal tinha 50% de pólen pequeno.

Edallo et al. (1981) não observaram aumento na frequência de mutações com o tempo de cultura. Estes autores examinaram culturas de células dos genótipos W64A e S65, e verificaram que nessas culturas o aumento da idade da cultura não levou ao aumento na ploidia ou eliminação de cromossomos, mas ao decréscimo na percentagem de células aberrantes. Entre 110 plantas regeneradas, somente duas apresentaram número de cromossomos diferente de $2n=20$ em células de ponta de raiz. Aparentemente as células não diplóides não participaram na regeneração de plantas. Apesar de não ter sido realizada análise meiótica das plantas regeneradas ou sua progênie, a alta esterilidade observada foi atribuída a anormalidades intracromossômicas, como pequenas deficiências ou duplicações, e não a alterações na ploidia.

Em contraste aos resultados acima, tem sido observado um aparente efeito da idade da cultura sobre a frequência de alterações. Muitos investigadores tem notado um aumento na variabilidade de todos os tipos de aberrações com o aumento da idade da cultura.

Análises meióticas de plantas de milho regeneradas a partir de embriões imaturos, mostraram que após 3-4 meses em cultura, nenhuma anormalidade cromossômica foi observada em plantas regeneradas de calos induzidos a partir de embriões imaturos de famílias F_2 de isolinhas da linhagem Oh43 segregando para genes de macho-esterilidade. Após 8-9 meses, metade das plantas regeneradas apresentaram-se com alterações cromossômicas estruturais, como translocações, deficiências e inversão paracentromérica, indicada pela presença de uma ponte e um fragmento na anáfase I. Grande parte destas aberrações foram classificadas como pares heteromórficos (Lee & Phillips, 1987).

Armstrong & Phillips (1988) compararam a frequência de variação genética e citogenética em plantas regeneradas de culturas de

tecidos de milho tipo I e tipo II. Os genótipos usados foram a linhagem A188, a linhagem A188-BC6 apresentando marcadores genéticos, e progênies de plantas regeneradas de culturas de calos embriogênicos e friáveis, derivados de embriões imaturos de um F₂ do cruzamento A188 x B73. Após 16 semanas em cultura, 33,3 e 20,8% das plantas regeneradas de culturas tipo II e tipo I, respectivamente, apresentaram pelo menos uma anormalidade (permuta entre cromossomos homólogos, trissomia, setores tetraplóides e irregularidades meióticas). Estes valores aumentaram para 37,2 (tipo II) e 24,2% (tipo I) após 36 semanas em cultura.

Através da análise de pedigree de linhagens celulares, iniciadas de embriões imaturos de linhagens e combinações híbridas de milho, Benzion & Phillips (1988) verificaram que, de modo geral, houve uma tendência de aumentar a frequência de plantas anormais com o aumento da idade da cultura. Entretanto, a frequência de cada aberração individual em cada cultura variou com o aumento da idade da cultura. Estes autores concluíram que o aumento na frequência de plantas anormais à medida que aumenta o tempo de cultura não implica necessariamente em um aumento na taxa de mutação devido ao ambiente de cultura, ou à ocorrência de novas de aberrações enquanto a cultura é mantida, mas pode ser parcialmente explicada pela proliferação e acúmulo de células com aberrações que ocorreram no início da cultura.

Molina et al. (1992) e Molina & Garcia (1994) estudaram a ocorrência de aberrações cromossômicas e fenotípicas em plantas de milho regeneradas de calos após 17, 32, 50 e 60 meses de subcultura. Os calos foram obtidos a partir de um embrião imaturo da cultivar Colorado Klein. Análises meióticas de plantas regeneradas revelaram que 30%, 95%, 100% e 100% delas, respectivamente, eram citogeneticamente anormais. Análises citológicas das culturas com 60

meses de idade revelaram grande variabilidade no número de cromossomos ($2n=18$ a 23), além de aberrações cromossômicas estruturais. Algumas células apresentaram de 2 a 4 cromossomos com satélite, pares heteromórficos e cromossomos circulares. Todas as plantas foram fenotipicamente anormais e completamente estéreis. Entretanto, a análise de microsporócitos das plantas regeneradas demonstrou que 90% das plantas apresentavam $2n=21$ e apenas 10% das plantas possuíam $2n=20$. Os tipos de alterações observadas nestas plantas foram deficiências, duplicações, elevado número de univalentes, um ou mais cromossomos extra, inversões, cromossomos com duas regiões organizadoras do nucléolo e translocações. Estes autores concluíram que, para o genótipo testado, a frequência de alterações cromossômicas aumenta com a idade da cultura.

Embora os aspectos do estabelecimento e manutenção da cultura de calos possam influenciar a frequência em que alterações ocorrem, diferenças na extensão da variação podem ocorrer quando diferentes genótipos são regenerados sob semelhantes condições de cultura. Isto sugere que alguns genomas podem ser mais propícios a variação que outros.

Segundo Peschke & Phillips (1992), dentro de uma espécie o genótipo pode ser um importante determinante da variação cromossômica. Diferenças entre variedades foram relatadas por diversos autores. Em grande parte destes estudos as análises citológicas foram realizadas em microsporócitos das plantas regeneradas.

McCoy et al. (1982) compararam a estabilidade citológica em plantas regeneradas de duas cultivares de aveia, Lodi e Tippecanoe. Os tipos de alterações cromossômicas mais frequentes foram quebras e perdas de segmentos cromossômicos levando à formação de pares heteromórficos. Em plantas regeneradas após 4 meses, 12% das plantas Tippecanoe tinham um ou mais variantes comparados a 49% de Lodi;

estas frequências aumentaram em 8 meses para 40 e 89%, respectivamente. Neste caso foi observado tanto o efeito da idade da cultura quanto do genótipo. Apesar de ocorrer um aumento na frequência de variantes com o aumento do tempo de cultura para os dois genótipos testados, a cultivar Tippecanoe apresentou-se com menor frequência de variantes em relação à cultivar Lodi.

Em milho, diversos genótipos têm sido empregados na avaliação da frequência de variação cromossômica entre plantas regeneradas (Green et al., 1977; Edallo et al., 1981; McCoy & Phillips, 1982; Lee & Phillips, 1987, 1988; Benzion & Phillips, 1988).

Variações no número e estrutura dos cromossomos tem sido atribuídas à anormalidades no fuso e quebras cromossômicas. A frequência de cada aberração cromossômica resulta da intervenção de mecanismos que alteram fisicamente o complemento cromossômico de células individuais e a taxa relativa de proliferação de linhagens celulares alteradas. Os eventos celulares que produzem alterações no número e estrutura dos cromossomos podem ser determinados como alterações na sequência normal da replicação do DNA, e nos próprios mecanismos da mitose (revisão em Bayliss, 1980; Lee & Phillips, 1988; Phillips et al., 1990, 1994; Ronchi, 1995).

Existem evidências de que a heterocromatina está envolvida na ocorrência de quebras cromossômicas. Como a quantidade e distribuição de heterocromatina varia entre linhagens de milho, um efeito do genótipo poderia ser esperado com base nestas diferenças (Phillips et al., 1988).

A análise meiótica de plantas regeneradas tem revelado que a ocorrência de quebras cromossômicas e suas conseqüências (translocações, inversões, deleções e duplicações) constituem as aberrações mais comumente detectadas (Lee & Phillips, 1988).

Entretanto, a posição da quebra parece não ser ao acaso, mas frequentemente ocorre entre regiões heterocromáticas e o centrômero.

Por exemplo, McCoy et al. (1982) observaram, em aveia, uma alta frequência de quebras cromossômicas próximo ao centrômero. Murata & Orton (1983, 1984) notaram em aipo uma alta frequência de fusões cromossômicas, que levaram à formação de cromossomos contendo translocações e constrições múltiplas em cultura de tecidos e plantas regeneradas. A origem destes eventos poderia ser atribuída à quebra na heterocromatina telomérica, ou próximo a ela, encontrada em todos os cromossomos de aipo.

Em cebola, Joachimiak et al. (1995) observaram a ocorrência de quebras na região da heterocromatina telomérica, resultando em fusões, anéis, adesões e cromossomos dicêntricos.

Em tritcale, a análise meiótica de plantas regeneradas mostrou que 12 dos 13 pontos de quebra envolvidas em translocações e deleções estavam na heterocromatina (Lapitan et al., 1984). Foi observado também que entre 51 plantas da cultivar 'Welsh' regeneradas de culturas com seis meses de idade, 29 continham cromossomos telo ou acrocêntricos (Armstrong et al., 1983). Novamente, os sítios de quebra produzindo cromossomos aberrantes parecem estar localizados dentro da heterocromatina ou adjacente a ela.

Lee & Phillips (1987), identificaram alterações estruturais em plantas de milho regeneradas (tais como: translocações, pares heteromórficos em heterozigotos para uma deficiência, presença de pontes na anáfase I indicando a ocorrência de inversão paracentromérica) e notaram uma alta frequência de cromossomos quebrados entre o centrômero e os knobs heterocromáticos, ou a região organizadora do nucléolo.

Benzion & Phillips (1988) analisaram plantas regeneradas de três linhagens celulares de milho que produziram translocações

citologicamente idênticas entre o braço longo do cromossomo 7 e do cromossomo 8. Estas culturas foram derivadas de híbridos onde A188 era um dos parentais. As aberrações cromossômicas originaram-se aparentemente durante o ciclo de cultivo *in vitro*, haja visto que plantas normais e anormais foram regeneradas destas culturas. Além disso, sementes controle destes cruzamentos (isto é, sementes da mesma espiga em que os embriões foram cultivados) não apresentaram nenhuma aberração genética ou citogenética. A ocorrência da mesma aberração citológica em três linhagens celulares individuais, sugere que existem "hot spots", ou seja, pontos específicos de quebra cromossômica, que se manifestam durante o ciclo de cultura de tecidos.

Conforme demonstrado por Pryor et al. (1980), diferentes classes de heterocromatina de milho apresentam tempos distintos de replicação, sendo que o knob replica mais tardiamente que as outras classes de heterocromatina.

O knob dos cromossomos de milho consiste de heterocromatina constitutiva que 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). A composição de knobs pode ser determinada pela análise de paquíteno (McClintock, 1929, 1959; Neuffer et al., 1997). A posição da heterocromatina pode também ser detectada pela técnica de bandamento-C em cromossomos mitóticos (Hadlaczky & Kalman, 1975; Aguiar-Perecin, 1985; Aguiar-Perecin & Vosa, 1985; Tito et al., 1991). Quando os knobs são médios ou grandes alteram o comprimento dos braços cromossomos mitóticos (Aguiar-Perecin, 1979; Aguiar-Perecin & Vosa, 1985). Os knobs são compostos de sequências de cerca de 180 pares de base, altamente repetitivas, arranjadas em tandem (Peacock et al., 1981), com certo nível de polimorfismo (Dennis & Peacock, 1984). Viotti et al. (1985) especularam que podem existir na

eucromatina outros sítios de knobs com baixa concentração de sequências de 180 pb.

Sacristan (1971) analisou cultura de calos de *Crepis capillaris* e observou a ocorrência de quebras em regiões de síntese tardia de DNA (regiões de heterocromatina), e que o cromossomo satélite estava envolvido em 82% dos rearranjos. O autor sugeriu que a replicação tardia do DNA pode ser um mecanismo envolvido na indução de rearranjos cromossômicos em cultura de tecidos.

Gill et al. (1980) sugeriram que a alta densidade de DNA por unidade de comprimento na heterocromatina, a organização e justaposição da cromatina no núcleo, ou mesmo propriedades físicoquímicas das regiões heterocromáticas e centroméricas podem explicar a susceptibilidade destas regiões à quebra.

Segundo Johnson et al. (1987), a cultura de tecidos pode afetar uma ou mais dessas propriedades da heterocromatina afetando assim o seu tempo de replicação. Portanto, devido a características singulares da heterocromatina, alterações no ambiente celular induzidas por diferentes caminhos podem conduzir a um mesmo resultado final: quebra em regiões heterocromáticas.

A frequência muito alta de telocêntricos entre as plantas de aveia regeneradas de cultura de tecidos, levou McCoy et al. (1982) a estabelecerem uma hipótese sobre o envolvimento da heterocromatina pericentromérica. Esta baseou-se na observação de que a heterocromatina comumente tem replicação tardia (Lima-de-Faria, 1969) e que várias espécies tem regiões de heterocromatina ao redor de seus centrômeros. A hipótese é que se existe normalmente replicação tardia na região pericentromérica nos cromossomos de aveia, esta heterocromatina poderia ocasionalmente replicar mesmo mais tarde que o usual no ambiente de cultura de tecidos. As cromátides envolvidas permaneceriam unidas neste ponto de replicação tardia, formando uma

ponte na anáfase. Isto produziria um estresse que poderia resultar em quebra (provavelmente localizada entre o centrômero e a região de replicação tardia). Alternativamente, este mecanismo poderia resultar em não disjunção e subsequente aneuploidia.

A análise de paquíteno de plantas de aveia, que não eram derivadas de cultura de tecidos, mostrou que todos os cromossomos tinham grandes regiões de heterocromatina ao redor do centrômero (Johnson et al., 1987). A caracterização detalhada de uma planta regenerada com um cromossomo satelitado mostrou que a quebra cromossômica tinha ocorrido na região da heterocromatina pericentromérica, resultando num par heteromórfico. Além disso, o padrão de incorporação de timidina-³H em cromossomos de células de ponta de raiz, analisada através de autorradiografia, indicou que havia replicação tardia de DNA em regiões heterocromáticas de cromossomos de aveia. Baseados nestas observações, Johnson e colaboradores (1987) concluíram que a replicação da heterocromatina no fim do período S permite que estas regiões sejam mais sensíveis a perturbações no ciclo celular que podem ocorrer durante a cultura de tecidos.

Lee & Phillips (1987) e Phillips et al. (1988) observaram, através de análises meióticas de plantas de milho regeneradas a partir de calos derivados de embriões imaturos, a ocorrência de quebras cromossômicas envolvendo frequentemente braços cromossômicos contendo knobs heterocromáticos e propuseram que a causa de alterações citogenéticas na cultura de tecidos de milho seria decorrente de distúrbios causados pela replicação tardia do knob heterocromático. Segundo os autores, perturbações afetando o período de síntese de DNA nos locais de replicação tardia na região dos knobs, poderia resultar na não separação das cromátides-irmãs, posterior formação de ponte na anáfase e quebra das cromátides envolvidas. Vários rearranjos são possíveis dependendo da posição da quebra, do número de

cromossomos envolvidos e do nível de ploidia da célula (Phillips et al., 1990).

Com base nestes estudos, Fluminhan, 1992; Fluminhan et al. (1996) e Fluminhan & Aguiar-Perecin (1998) investigaram o envolvimento dos knobs na formação de pontes anafásicas em calos, obtidos a partir de embriões imaturos, em linhagens endogâmicas de milho derivadas de uma variedade de milho tropical com diferentes conteúdos de knobs heterocromáticos. Foram observadas pontes na anáfase resultantes de atraso na separação de cromátides, pontes típicas e fragmentos. A análise de anáfases mitóticas, coradas pela metodologia de bandamento-C, mostrou que as cromátides atrasadas eram mantidas juntas nos sítios de knobs, confirmando assim a hipótese proposta por Lee & Phillips (1987). As pontes típicas seriam formadas por cromátides dicêntricas resultantes de ciclos de quebra-fusão-ponte dos tipos descritos por McClintock (1941, 1942), iniciados pelos braços cromossômicos quebrados originados pelo atraso na separação das cromátides. A análise da frequência de pontes mostrou que nem sempre há correlação entre frequência de knobs e frequência de pontes, e que esta é dependente do genótipo. A análise de metáfases coradas através da metodologia de bandamento-C apresentou novas evidências da ocorrência de ciclos de quebra-fusão-ponte.

Santos (1995), analisou duas culturas de longa duração (24-42 meses) altamente embriogênicas, designadas 12-F e 3-57, derivadas de linhagens com diferentes conteúdos de knobs, utilizadas em trabalho anterior (Fluminhan, 1992; Fluminhan et al., 1996). A análise periódica da cultura 3-57 mostrou a ocorrência de pontes anafásicas resultantes de atraso na separação das cromátides e pontes típicas. Houve uma tendência de diminuição da frequência de pontes com o aumento da idade da cultura. A análise de metáfases coradas pelo bandamento-C, mostrou a ocorrência de diferentes tipos de alterações no braço curto

dos cromossomos 7 e 9, inclusive a presença de um microcromossomo, interpretados como deficiências e duplicações decorrentes de ciclos de quebra-fusão-ponte. Determinados tipos de cromossomos alterados foram mantidos na cultura sem que ocorressem novas alterações, sugerindo a ocorrência de cicatrização da extremidade quebrada. Por outro lado, a cultura 12-F apresentou menor frequência de pontes, e os cromossomos mostraram-se aparentemente normais na maioria da metáfases analisadas. Ambas culturas eram altamente embriogênicas, porém, apenas a cultura 12-F produziu plantas normais a partir de culturas com 28 e 29 meses de idade.

Garding (1998) avaliou a resposta ao cultivo *in vitro* e a estabilidade cromossômica de linhagens e híbridos, com diferentes conteúdos de knobs, relacionados aos genótipos utilizados por (Fluminhan, 1992; Santos (1995) e Fluminhan & Aguiar-Perecin (1998). Foi observada uma alta frequência de indução de calos embriogênicos (acima de 97%), e a capacidade de formação de calos embriogênicos aos 45 dias variou de 81,76%, na linhagem 132331/1, a 89,42% no híbrido 13342/1 x 13342/5. A análise de metáfases e prometáfases, coradas pelo bandamento-C, mostrou que nas culturas com 2 meses de idade a frequência de células normais variou de 73,7% a 97,2% 94%. Para os calos com 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. De maneira geral, foram observadas alterações cromossômicas estruturais, decorrentes de quebras cromossômicas, envolvendo principalmente os knobs do cromossomo 7 (K7S e K7L). Algumas alterações eram notadamente complementares a outras, sugerindo a ocorrência de ciclos de quebra-fusão-ponte, iniciados por atrasos na separação das cromátides na região do knob. Alterações cromossômicas numéricas, como tetraploidia e trissomia, foram observadas em menor frequência.

Os primeiros estudos sobre a ocorrência de ciclos de quebra-fusão-ponte foram realizados por McClintock (1939, 1941, 1942). Foi observado que a introdução de um cromossomo quebrado na célula poderia iniciar um ciclo onde o cromossomo quebrado se replicaria, as extremidade das cromátides irmãs (no sítio de quebra) se fundiriam, e uma ponte anafásica seria formada pelo dicêntrico resultante. Esta ponte eventualmente poderia quebrar, permitindo que o processo começasse novamente, consequência do nome ciclo de quebra-fusão-ponte. As pontes envolvidas em um ciclo tendiam a se quebrar no mesmo lugar em sucessivas divisões, indicando que as fusões das cromátides irmãs após as quebras poderia ser frágil ou incompleta.

Miles (1971) observou que certos cromossomos derivados de pontes dicêntricas frequentemente sofriam quebras no sítio original de quebra durante o desenvolvimento do endosperma. Especificamente, quebras em regiões heterocromáticas algumas vezes mostraram uma completa ausência de perdas genéticas associadas com ciclo de quebra-fusão-ponte.

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).

O ciclo de quebra-fusão-ponte pode ter efeitos diversos no genoma do milho. Evidências tem sugerido que transposons latentes podem ser ativados em células que sofreram ciclos de quebra-fusão-ponte (McClintock, 1941, 1951, 1984; Doerschug, 1973; Rhoades & Dempsey, 1982, 1983).

Weil & Wessler (1993) observaram que cromossomos podem se quebrar nos sítios contendo elementos Ds, as cromátides se fundir formando um cromossomo dicêntrico, e iniciar um ciclo de quebra-

fusão-ponte. Além disso, estes autores caracterizaram dois alelos Ds em milho que frequentemente provocam a quebra do braço curto do cromossomo 9.

Recentemente, Ananiev et al. (1998) estudaram a estrutura e composição do knob do cromossomo 9 do milho, utilizando uma linhagem de adição de cromossomo de aveia-milho que apresentava somente o cromossomo 9 do milho (Riera-Lizarazu et al., 1996). A variedade Seneca 60 foi utilizada como parental na obtenção da linhagem de adição, a qual possui um knob grande no braço curto do cromossomo 9 (Laurie & Bennett, 1985). Os autores encontraram membros de pelo menos três famílias de retrotransposons identificados no genoma de milho (Grande, Zeon 1 e PREM2) interdispersos no DNA do knob.

Com base nesta informação pode-se supor a ocorrência de inserção de elementos transponíveis no knob de outros cromossomos do milho, os quais poderiam ser ativados durante o cultivo *in vitro*.

Lee & Phillips (1987) propuseram um modelo no qual a replicação incompleta do knob pode levar à formação de pontes cromossômicas, resultando em quebra cromossômica, que por sua vez pode gerar a ativação de transposons e rearranjos cromossômicos, duplicações e deleções.

Segundo Phillips (1989) desvios na replicação tardia da heterocromatina podem ser resultantes de perturbações no ciclo celular induzidas pelo cultivo *in vitro*. Estas alterações no ciclo celular por sua vez podem alterar a metilação normal do DNA, levando a hipo ou hipermetilação. Além disso, em alguns sistemas vegetais a ativação de transposons também pode estar relacionada alterações no DNA, incluindo alterações no padrão de metilação (Peschke et al., 1991). Mais de 90% das sequências repetidas mais de 1000 vezes no genoma do milho são metiladas. Talvez alterações na quantidade e padrão de

metilação possa afetar o tempo de replicação destas sequências (Phillips et al., 1990, 1994, Kaepler & Phillips 1993ab).

Brown (1989) observou alterações significativas na metilação do DNA em plantas de milho regeneradas. Mesmo entre plantas que se originaram de um mesmo calo não foi observada uma uniformidade no padrão de metilação. Além disso, o autor observou que a cultura de tecidos induziu alterações na metilação de certos setores do DNA ou em determinados genes.

Muitas proteínas influenciam a segregação de cromossomos durante a divisão celular em eucariotos. A maioria dessas proteínas afetam a síntese de DNA (Hartwell & Smith, 1985), a condensação e segregação de cromossomos (Peterson, 1994) ou a resolução de cromossomos interligados na mitose (Uemura et al, 1987; Holm et al, 1989). A ausência de algumas destas proteínas pode levar a não disjunção ou quebra, uma vez que o cromossomo replicados ainda estarão fisicamente ligados (Watt & Hickson, 1994).

Segundo Pesckhe & Phillips (1992), outros eventos podem estar relacionados com a ocorrência de alterações cromossômicas. Um deles seria o aumento na frequência de trocas entre cromátides irmãs. Se a troca for precisa não ocorre instabilidade genômica, porém podem ocorrer erros no processo. Regiões de DNA repetitivo são candidatas para a ocorrência de troca desigual entre cromátides irmãs, resultando em alteração no número de cópias. Dolezel e Novak (1986) notaram que a frequência de trocas entre cromátides irmãs no calo foi significativamente mais alta que em pontas de raiz. Dolezel et al. (1987) observaram que a frequência destes eventos aumentava em baixa concentração de ácido diclorofenoxiacético (2,4-D). A maioria dos eventos ocorreram nas junções entre o as regiões de replicação tardia (heterocromatina) e a eucromatina (Dimitrov, 1987). As zonas de transição entre heterocromatina e eucromatina devem ter propriedades

especiais e o acesso de proteínas de reparo pode ser difícil, permitindo a troca entre cromátides fora do padrão normal, levando à ocorrência troca desigual entre cromátides. Pesckhe e Phillips (1992) sugeriram que talvez a hipótese do atraso na replicação mais tardia da heterocromatina explique o aumento na frequência de trocas entre cromátides irmãs durante o cultivo *in vitro*.

Diversos mecanismos podem estar envolvidos na origem de alterações cromossômicas estruturais *in vitro*. Entretanto, a manutenção de cromossomos alterados depende da estabilização das extremidades quebradas.

McClintock (1939, 1942) demonstrou que ocasionalmente, durante o ciclo de quebra-fusão-ponte os cromossomos que apresentavam as extremidades quebradas tornavam-se estáveis ou "cicatrizavam". Após a fertilização, o ciclo de quebra-fusão-ponte continuava no tecido do endosperma, enquanto que no tecido zigótico as extremidades quebradas cicatrizavam, cessando o ciclo. O cromossomo cicatrizado era propagado no subsequente desenvolvimento da planta. Estas observações sugeriram que um processo que cicatrizava as extremidades quebradas estava presente no tecido zigótico mas ausente no endosperma. O processo de cicatrização foi assumido como adição de um novo telômero (McClintock, 1984), embora isto não tenha sido caracterizado molecularmente.

Nos últimos 15 anos têm sido relatada na literatura uma série de estudos que ampliaram a compreensão sobre a estrutura molecular e função dos telômeros, bem como sobre o processo de cicatrização a nível molecular (revisão em Zakian, 1989; Blackburn, 1991; Greider, 1990, 1991; Richards et al., 1993; Greider et al., 1993; Beissmann & Mason, 1992 e 1994).

Richards & Ausubel (1988) clonaram sequências teloméricas de *Arabidopsis thaliana*, determinaram que a sequência do

oligonucleotídeo telomérico era TTTAGGG e observaram que estas sequências hibridavam com os telômeros de milho.

Os eventos de cicatrização parecem ocorrer por dois caminhos: a recombinação entre homólogos e a síntese de um novo telômero. Harber & Thorburn (1984) e Harber et al. (1984) observaram, através da análise de cromossomos quebrados após a formação de pontes na anáfase, que em levedura uma pequena proporção de derivados estáveis adquiriram novas sequências teloméricas diretamente na extremidade quebrada, enquanto outros derivados tornaram-se estáveis via recombinação ou rearranjo com outros cromossomos.

Cicatrização via adição de novas sequências teloméricas foi observada na cicatrização de cromossomos em *Schizoccharomyces pombe*, *Plasmodium* e humanos. Nestes dois últimos, os cromossomos cicatrizados foram caracterizados a nível de sequência de DNA. Foi observada uma transição abrupta da sequência codificadora de um gene conhecido para sequências teloméricas, sugerindo que os telômeros foram adicionados nas extremidades quebradas (revisão em Blackburn, 1991).

A telomerase é capaz de promover a cicatrização do cromossomo pela adição de sequências teloméricas em DNA não telomérico (revisão em Greider et al, 1993). Fajkus et al. (1998) relataram a ocorrência de aumento da atividade da telomerase em culturas de calos de tabaco.

Werner et al. (1992) estudaram a distribuição de sequências teloméricas em trigo e sua função na cicatrização de cromossomos que sofreram deleção. Através de hibridação *in situ* com sondas sintéticas de sequências teloméricas de *Arabidopsis thaliana*, foi observado que todos os cromossomos, inclusive aqueles com deleções, apresentaram sítio de hibridação em ambas extremidades. Estes resultados sugerem a

ocorrência de mecanismos de cicatrização envolvendo a adição de sequências teloméricas nas extremidades quebradas dos cromossomos.

Resultados semelhantes foram obtidos por Wang et al. (1992) em *Hordeum vulgare*. Estes autores analisaram, através de hibridação *in situ* com sequências teloméricas de *A. thaliana*, a ocorrência de cicatrização em cromossomos de linhagens aneuplóides contendo cromossomos quebrados em diferentes partes. Os resultados mostraram a presença de sequências teloméricas nas extremidades quebradas, indicando a ocorrência de cicatrização, o que explica a estabilidade desses cromossomos alterados através de muitas gerações.

Evidências da ocorrência de cicatrização *in vitro*, após ciclo de quebra-fusão-ponte, foram obtidas através da análise de duas culturas embriogênicas de longa duração (24-42 meses), designadas 12-F e 3-57 (Santos & Aguiar-Perecin, 1995; Santos, 1995). Conforme citado anteriormente, a análise de metáfases coradas pelo bandamento-C mostrou aberrações envolvendo os knobs do braço curto dos cromossomos 7 e 9, na cultura 3-57, interpretadas como deficiência-duplicações resultantes de ciclos de quebra-fusão-ponte. Várias destas alterações (inclusive um micro-cromossomo que se derivou do cromossomo 9) permaneceram estáveis na cultura. Na cultura 12-F foi encontrado um cromossomo 7 com amplificação na banda-C do braço longo, também interpretado com decorrente de ciclos de quebra-fusão-ponte, que se manteve na cultura. Além disso, a análise de anáfases mostrou uma tendência à diminuição da frequência de pontes anafásicas com o aumento da idade da cultura. Estas observações sugerem que ciclos de quebra-fusão-ponte não se acumulam indefinidamente nas culturas, e que os cromossomos com extremidades quebradas cicatrizam, isto é, adquirem um novo telômero *in vitro*. As interpretações dadas para a origem das aberrações observadas nestas culturas foram investigadas no presente estudo.

Apesar de eventos de quebras cromossômicas e cicatrização das extremidades quebradas terem sido documentados, o processo de estabilização dos cromossomos quebrados em milho ainda necessita de maiores estudos.

2.3. Transformação genética em milho

Os métodos tradicionais de melhoramento de plantas tem produzido cultivares melhoradas, mas estão limitados a caracteres que são avaliados em espécies e variedades compatíveis sexualmente. O desenvolvimento da engenharia genética aumentou significativamente a quantidade de genes disponíveis para o uso no melhoramento genético de muitas espécies.

Embora mundialmente a utilização de plantas transgênicas na alimentação seja discutida, nos Estados Unidos aproximadamente 20% da área plantada com milho está ocupada por híbridos de milhos transgênicos (Armstrong, 1999).

Nos últimos anos, a tecnologia de transformação genética tem sido adotada e implementada por grupos acadêmicos para responder questões biológicas fundamentais.

Utilizando suspensões celulares embriogênicas derivadas de calos tipo II de linhagens A188 e B73, Rhodes et al. (1988a) foram os primeiros a relatar a regeneração de plantas de milho a partir de protoplastos. Plantas de milho transformadas foram obtidas a partir do sistema de eletroporação como meio de transferência do DNA (Rhodes et al., 1988b). Entretanto, as plantas produzidas foram estéreis.

O maior avanço na obtenção de plantas transgênicas de milho férteis ocorreu com o desenvolvimento do sistema de transferência de

DNA utilizando bombardeio de microprojétils em células intactas de plantas (Klein et al., 1987, 1988, 1989).

Os primeiros relatos de produção de plantas de milho transgênicas férteis ocorreram no início desta década (Gordon-Kamm et al., 1990; Fromm et al., 1990; Walters et al., 1992). Desde então genes, cuja exploração através de métodos de melhoramento tradicionais é inviável, tem sido introduzidos e mostram conferir proteção contra importantes pragas e doenças, bem como resistência a herbicidas (Armstrong et al., 1995; Koziel et al., 1993; Murry et al., 1993; Wan et al., 1995).

Koziel et al. (1993) relataram pela primeira vez, comprovadamente, a produção de plantas elite de milho transgênicas expressando um caráter de importância agrônômica. A infestação com a broca europeia do milho pode levar a uma perda de 3 a 7% da produção/broca/planta. Foi observada a expressão de gene *cryIA(b)*, derivado de *Bacillus thuringiensis*, que confere resistência a insetos. *B. thuringiensis* produz proteínas chamadas δ -endotoxinas, que são altamente tóxicas a insetos lepidópteros, dípteros e coleópteros. O gene foi introduzido em embriões imaturos pré cultivados de uma linhagem elite de milho através de bombardeio de microprojéteis, e foi expressado sob o controle do promotor CaMV 35S ou uma combinação de dois promotores tecido-específicos derivados de milho. Os híbridos resultantes do cruzamento entre plantas elite transgênicas e linhagens comerciais foram avaliados para resistência à broca europeia do milho sob condições de campo. As plantas transgênicas obtidas expressaram excelente resistência a repetidas infestações com grandes quantidades da broca europeia do milho.

Murry et al. (1993) relataram o primeiro exemplo de proteção contra vírus mediante a proteína da capa em plantas de milho transformadas. O MDMV ('maize dwarf mosaic virus') é a doença mais difundida e importante do milho, causando 2,4% de perda de

produção/10% de infecção. O gene que codifica a proteína da capa (cp) do MDMV linhagem B foi introduzido, através de bombardeio de microprojéteis ou eletroporação, em suspensões celulares derivadas de calos tipo II, obtidos a partir de embriões imaturos. As células transformadas foram selecionadas em meio contendo canamicina, e plantas foram regeneradas. As células das linhagens transformadas expressaram o gene cp, e uma linhagem sintetizou aproximadamente 100-200 µg de MDMV-cp por peso fresco de grão. As plantas regeneradas dessas linhagens foram inoculadas com concentrações ajustadas para produzir sintomas em plantas controle 6 dias após a inoculação. Em testes realizados em casa de vegetação, foi verificado que a presença de MDMV-cp conferiu resistência à inoculações com MDMV-A ou MDMV-b e à inoculação com a mistura de MDMV e MCMV ('maize chlorotic mottle virus').

Estes resultados são animadores e demonstram que, através do desenvolvimento de sistemas adequados para transferência de genes em milho, os programas de melhoramento podem ser altamente beneficiados pela obtenção de plantas transgênicas comerciais apresentando as características agronômicas desejadas.

Atualmente entre os materiais mais utilizados em experimentos de transformação de plantas de milho encontra-se a cultura de calos embriogênicos derivados de embrião imaturo (Armstrong, 1999). Portanto, tem sido crescente o interesse na obtenção de genótipos a partir dos quais se possa estabelecer culturas tipo II, que possam ser mantidas por longos períodos, sem perderem a sua capacidade para regeneração de plantas férteis.

Através do desenvolvimento de sistemas adequados para transferência de genes em milho, os programas de melhoramento podem ser altamente beneficiados pela obtenção de plantas transgênicas comerciais apresentando as características agronômicas desejadas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Plantas regeneradas a partir de duas culturas de calos com 12, 28 e 29 meses.

As culturas das quais foram derivados os regenerantes, foram iniciadas de embriões imaturos derivados de uma linhagem endogâmica (13342/5 - cultura 12-F) e de um F2 do cruzamento entre duas linhagens relacionadas (1315/1x13213/1 - cultura 3-57), cuja composição de knobs heterocromáticos, apresentada na Tabela 1, foi determinada por Aguiar-Perecin & Decico (1988) e Decico (1991). Estes genótipos são derivados de uma variedade de milho tipo flint de origem tropical (Jac-Duro, Sementes Agrocere).

Os embriões imaturos foram inoculados em meio MS (Murashige & Skoog, 1962) com 2 mg/l de 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético). Posteriormente, as culturas foram subdivididas em subclones, sendo mantidas em meio MS suplementado com 2,0 mg/l de 2,4-D (MS2), meio MS suplementado com 1,0 mg/l de 2,4-D (MS1) e em meio N6 (Chu et al, 1975) com 1,5 mg/l de 2,4-D e 12 mM de prolina.

A avaliação prévia de calos, através da análise de metáfases coradas pelo bandamento-C, mostrou que na cultura 12-F o subclone 1-MS2 apresentava um dos cromossomos do par 7 com uma amplificação no knob do braço longo (K7L) em 54% das células analisadas, e o subclone 2-N6 apresentava-se com cariótipo aparentemente normal. Na

cultura 3-57 tinha sido observado um dos cromossomos do par 7 com deficiência-duplicação (DF-DP) no braço curto envolvendo o knob (Santos & Aguiar-Perecin, 1995; Santos, 1995; Fluminhan et al., 1996).

O protocolo de regeneração seguiu a metodologia padronizada no laboratório e descrita por Fluminhan (1992), com algumas modificações (Santos, 1995). As plantas R₀ obtidas foram preferencialmente autofecundadas para obtenção de sementes R₁.

As progênes R₁ avaliadas no presente estudo foram obtidas a partir de plantas regeneradas 12 meses (cultura 3-57) e 28 e 29 meses (cultura 12-F, subclones 1-MS2 e 2-N6, respectivamente) após o início da cultura (Tabela 2) (Santos, 1995).

3.1.1. Análise citogenética de somaclones

3.1.1.1. Análise mitótica

O objetivo desta análise foi avaliar a transmissão de cromossomos alterados nas culturas para plantas regeneradas, e identificar previamente as plantas que apresentam os cromossomos com alterações que foram observadas através da análise da cultura.

As sementes derivadas de plantas R₁ obtidas a partir da cultura 12-F (subclones 1-MS2 e 2-N6), e plantas R₁ e R₂ derivadas da cultura 3-57 (subclone MS2), foram germinadas em *Sphagnum*, procedendo-se a coleta de raízes, pré-tratamento com 8-hidroxiquinolina (300ppm) ou com a combinação 8-hidroxiquinolina (300ppm) + cicloheximida (6,25ppm), por 2 horas e 30 min, e fixação em álcool:ácido acético (3:1).

Tabela 1. Composição de knobs dos genótipos utilizados para obtenção das culturas 12-F e 3-57.

Genótipo	Cultura	Knob*						
		K3L	K6L ₂	K6L ₃	K7S	K7L	8L ₁	K9S
13342/5	12-F	+0	++	++	++	++	++	00
1315/1x13213/1	3-57	00	++	++	++	++	++	++

* ++ homozigótico para presença

00 homozigótico para ausência

+0 heterozigótico

Tabela 2. Plantas R₁ e R₂ derivadas de regenerantes derivadas das culturas 3-57 e 12-F, avaliadas no presente estudo.

Genótipo	Cultura		Subclone	Somaclone				
(1315x 13213/1)1	3-57	R ₁	MS2 (12 meses)*	H9				
				H17				
				H21				
		R ₂		H9-4				
				H9-5				
				H9-7				
				H17-6				
				H17-7				
				H17-12				
				13342/5	12-F	R ₁	1-MS2 (28 meses)	A1
A7								
A8								
A26								
A29								
A38								
A44								
A52								
A56								
A64								
A66								
A77								
A78								
A86								
2-N6 (29 meses)	Q2							
	Q23							
	Q42							
	Q54							
	Q79							
	<hr/>							
	Controle							
	CCT 3-57							
	(1315x 13213/1)1-89/90-2							
	(1315x 13213/1)1-89/90-3							
	132331/93-1/94-4							
	CCT 12-F							
	13342/89-5/91-1 (XII)/93-1							
	13342/89-5/91(2x1)/92(G1xF7)/94-1							
13342/89-5/91(2x1)/92(G1xF7)/94-2								

* () idade da cultura quando foram regeneradas plantas (R₀)

As raízes fixadas foram maceradas em ácido acético a 45% e as lâminas observadas em microscópio de contraste de fase. Em seguida as lamínulas foram removidas em ácido acético a 45% e secas ao ar. As lâminas e lamínulas foram conservadas em álcool absoluto a 4°C até o procedimento de coloração.

A coloração através da metodologia de bandamento-C foi realizada segundo o procedimento estabelecido por Aguiar-Perecin (1985) e Aguiar-Perecin & Vosa (1985). Após secagem ao ar, as lâminas foram incubadas em solução saturada de hidróxido de bário a 37 °C, por 25 minutos, lavadas em água deionizada, encubadas em solução salina 2x SSC (cloreto de sódio 0,03M + citrato de sódio 0,03M), à temperatura ambiente, por cinco minutos e em seguida transferidas para cubas contendo 2xSSC a 60 °C, onde permaneceram por 60 minutos. Após esses tratamentos as lâminas foram lavadas em água deionizada, imersas em uma série de álcoois: 70%, 95% e absoluto, e secas ao ar. A coloração foi feita com solução Giemsa a 1% em tampão pH 6,8, por um tempo variável de 2-3 minutos. Finalmente as lâminas foram lavadas em água deionizada, secas ao ar e montadas em Bálsamo do Canadá.

Foram avaliadas 10 sementes por espiga dos genótipos indicados na Tabela 2. As plantas foram transplantadas para sacos plásticos em estufa climatizada para obtenção de espigas resultantes de cruzamentos direcionados, visando multiplicação do material. Uma amostra das plantas obtidas foi sacrificada, pois foram coletadas anteras para análise do comportamento meiótico.

3.1.1.2. Análise meiótica

Uma vez analisado o cariótipo das plantas (R₁ e R₂) foram selecionadas para análise meiótica:

a) Plantas que apresentaram todos os cromossomos aparentemente normais, para investigação da ocorrência de outras aberrações que possivelmente não foram detectadas através da análise de metáfases coradas pelo bandamento-C e análise do comportamento meiótico.

b) Plantas cuja análise mitótica indicou a presença de cromossomos alterados que foram previamente observados na cultura, em estado homozigótico e heterozigótico.

Foram analisados microsporócitos corados com carmin propiônico a 1%, nas fases de diacinese e anáfase I para investigar a presença e o comportamento de univalentes, bem como para avaliação de aberrações cromossômicas. Posteriormente, foi analisado o pareamento nas fases de paquíteno e diplóteno, para investigação de aberrações cromossômicas.

Foram avaliadas 120 células na fase de diacinese e 120 células na fase de anáfase I por planta. A avaliação de paquítenos foi qualitativa, não havendo um número fixo de figuras avaliadas.

No caso do subclone 1-MS2 da cultura 12-F, os cromossomos 7 na fase de paquíteno foram fotografados e medidos para análise de aberrações. Foram selecionados cromossomos que apresentavam o mesmo nível de contração. As medidas foram transformadas em porcentagem para comparação entre cromossomos, corrigindo-se assim pequenas diferenças de contração. Os parâmetros avaliados, foram o tamanho do knob do braço longo (K7L) e segmento eucromático distal do braço longo.

Foi realizada uma análise de variância para comparação dos parâmetros citados acima em cromossomos normais e com amplificação no knob em estado homozigótico e heterozigótico. A análise de variância foi feita pelo método dos quadrados mínimos, mas sem uso das

expressões tradicionais, conforme orientado pelo Prof. Antonio Augusto Garcia (Depto. Matemática e Estatística, ESALQ/USP). Os dados obtidos foram analisados segundo delineamento inteiramente casualizado, pelo programa SAS (Statistical Analysis System), através de sua rotina GLM (General Linear Models Procedure) (SAS, 1988). Utilizou-se o teste de Tukey.

Foram também realizados teste para coloração de microsporócitos na fase de diacinese pela metodologia de bandamento-C, baseando-se no protocolo descrito por Aguiar-Perecin (1985), visando a avaliação de univalentes e pares heteromórficos. Os testes envolveram alteração na temperatura e no tempo de incubação em solução saturada de bário, que variou de 30°C a 37 °C e de 15 a 25 min., respectivamente. A obtenção de preparações citológicas de melhor qualidade foi possível reduzindo-se o aquecimento e o esmagamento das células.

3.2. Genótipos para regeneração de plantas após curto período de cultivo *in vitro* (2-3 meses)

Foram usadas três linhagens derivadas de uma variedade de milho tipo flint de origem tropical (Jac-Duro, Sementes Agrocere, Brasil), pertencentes à família 1-3 (Fluminhan e Aguiar-Perecin, 1998) e seus respectivos híbridos. As linhagens utilizadas são homózigóticas para presença de knobs heterocromáticos em 6L₂, 6L₃, 7L, 7S e 8L₁, diferindo para os knobs no braço longo do cromossomo 3 (K3L) e no braço curto do cromossomo 9 (K9S), conforme indicado na Tabela 3: a linhagem 13342/2 é homózigótica para presença de K3L e ausência de K9S; a linhagem 13342/5 não apresenta knob nos cromossomos 3 e 9; e a linhagem 132331 é homózigótica para ausência de K3L e presença de K9S.

Tabela 3. Composição de knobs nos cromossomos 3 e 9 das linhagens e híbridos utilizados na obtenção de culturas de curta duração.

Genótipo	K3L*	K9S
Linhagem		
13342/2	++	00
13342/5	00	00
132331	00	++
Híbrido		
13342/2 X 13342/5	+0	00
13342/2 X 132331/1	+0	+0
13342/5 X 132331/1	00	+0

*K = knob; Número = cromossomo; L = braço longo; S = braço curto

++ = homozigoto para presença do knob

00 = homozigoto para ausência do knob

+0 = heterozigótico

3.2.1. Obtenção das culturas

As culturas foram iniciadas a partir de embriões imaturos com 1,5 - 2,0 mm, removidos de espigas 12-14 dias após a polinização, e inoculados em placas de Petri contendo meio N6 (Chu et al., 1975) com componentes orgânicos de acordo com Fluminhan et al. (1996), e suplementado com 1,5 mg/l de 2,4-D e prolina 12 mM, de acordo com Santos (1995). O pH foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem e o meio foi solidificado com agar a 8%. Aproximadamente 60 embriões por espiga e no mínimo duas espigas por genótipo foram testados. As culturas foram mantidas no escuro a 28 °C e subcultivadas a cada 15-21 dias.

3.2.2. Avaliação da resposta embriogênica

A resposta embriogênica foi avaliada 45 dias após a inoculação, através da relação entre número de calos embriogênicos e número de embriões inoculados. Foram considerados embriogênicos os calos que apresentavam pelo menos um grupo de embriões somáticos na sua superfície.

3.2.3. Regeneração de plantas

A capacidade para regeneração de plantas foi avaliada 2-3 meses após o início da cultura, utilizando-se uma amostra de oito calos embriogênicos por genótipo, distribuídos em duas placas.

O protocolo para regeneração foi otimizado a partir o protocolo estabelecido por Fluminhan (1992) e Santos (1995), e está apresentado nos item Resultados.

3.2.4. Avaliação da estabilidade cromossômica em plantas R₀

Amostras de raízes de plântulas R₀, obtidas a partir da germinação de embriões somáticos, foram coletadas *in vitro* para investigação da estabilidade cromossômica. As raízes com 1-2 cm de comprimento foram coletadas de embriões recém-germinados em placas de Petri e de plântulas em frascos, em câmara de fluxo laminar, e pré-tratadas com uma combinação de 8-hidroxiquinolina (300ppm) e cicloheximida (6,25 ppm), por 2h e 30 min. Em seguida foram mantidas em fixador álcool:ácido acético (3:1), para procedimento de bandamento-C. Foram avaliadas 5-10 metáfases e prometáfases por genótipo.

Anteras coletadas de plantas regeneradas foram fixadas em álcool:ácido acético (3:1), para coloração pelo bandamento-C. Para coloração com carmin propiônico as anteras fixadas foram transferidas para álcool 70%.

4. RESULTADOS

4.1. Cultura 12-F

4.1.1. Análise mitótica de plantas R₁ derivadas da cultura 12-F

Foram avaliadas plantas R₁ derivadas de dois subclones da cultura 12-F: 1-MS2 e 2-N6. A análise prévia dos calos, através de metáfases coradas pelo bandamento-C, mostrou a ocorrência de um cromossomo do par 7 com a banda do braço longo (K7L) significativamente maior que a banda do cromossomo normal 7, no subclone 1-MS2. Por outro lado, no subclone 2-N6 não foram detectadas alterações no cariótipo (Santos, 1995).

Uma vez que o subclone 1-MS2 apresentava K7L amplificado em estado heterozigótico, seria esperada a ocorrência de segregação Mendeliana para este knob em plantas R₁, obtidas através da autofecundação de plantas R₀.

A análise de bandas-C em metáfases de pontas de raiz de plantas R₁ derivadas do subclone 1-MS2, cultura 12-F, foi realizada com o auxílio do aluno de iniciação científica Mateus Mondin.

Houve casos em que a identificação da amplificação foi difícil na metáfase, devido a contração dos cromossomos. Nestes casos foram também analisadas prometáfases, onde os cromossomos estão menos condensados, permitindo assim uma identificação mais precisa.

A análise de bandas-C em metáfases e prometáfases de pontas de raiz de plantas R₁ derivadas do subclone 1-MS2 da cultura 12-F, coradas através da metodologia de bandamento-C, mostrou a ocorrência de plantas homozigóticas para presença ou ausência do cromossomo 7 portador do knob do braço longo amplificado (K7L amplificado), bem como heterozigóticas para amplificação (Figuras 1 e 2; Tabela 4).

A cultura a partir da qual se obtiveram as plantas R₁ eram heterozigóticas para o knob do braço longo do cromossomo 3 (K3L) (veja Tabela 1). Portanto, as plantas R₁ segregam para este knob. A análise da segregação de bandas-C correspondentes a K3L, mostrou a ocorrência de segregação Mendeliana (Tabelas 5 e 6). Observa-se que alguns somaclones não apresentaram determinadas constituições de knobs, talvez devido à amostragem. Contudo, essas variações não alteraram a frequência esperada.

Por outro lado, a análise da segregação de K7L amplificado mostrou um desvio em relação a segregação esperada. A frequência de plantas homozigóticas para presença de K7L amplificado foi significativamente menor (a nível de 5% pelo teste de χ^2) do que o esperado, enquanto que o homozigoto normal apresentou uma frequência muito superior ao esperado (Tabelas 7 e 8). A frequência de ocorrência do heterozigoto seguiu o esperado, sugerindo que algum mecanismo pode estar favorecendo o acúmulo de cromossomos normais e reduzindo a transmissão do cromossomo com amplificação em estado homozigótico, conforme será discutido adiante.

Figura 1. Bandamento-C em células de pontas de raiz de plantas R₁ derivadas do subclone 1-MS2 da cultura 12-F, homozigóticas para ausência de K3L. a) Metáfase apresentado todos os cromossomos normais; b) Metáfase de uma planta heterozigótica para K7L amplificado; c) Metáfase de uma planta homozigótica para K7L amplificado. Os cromossomos apresentando bandas-C (knobs) e respectivos homólogos aparecem identificados. Ao lado de cada figura são apresentados pares de cromossomos 7 correspondentes.

Figura 2. Bandamento-C em células de pontas de raiz de plantas R₁ derivadas do subclone 1-MS2 da cultura 12-F, homozigóticas para presença de K3L. a) Prometáfase normal; b) Prometáfase mostrando a amplificação de K7L em estado homozigótico bem evidente. c) Prometáfase mostrando nitidamente a amplificação de K7L em estado heterozigótico.

Tabela 4. Número de plantas R₁ derivadas do subclone 1-MS2, da cultura 12-F, com as combinações esperadas dos knobs (bandas-C) do braço longo do cromossomo 3 (3L) e do cromossomo 7 portador de amplificação (7LA).

Somacloone	Knob													
	3L	7LA	3L	7LA	3L	7LA	3L	7LA	3L	7LA	3L	7LA	3L	7LA
	++	++	++	+0	++	00	++	+0	++	+0	00	++	00	+0
A1	1	-	1	1	2	-	2	2	-	-	2	-	2	2
A7	2	1	-	-	3	1	3	3	1	-	-	-	2	2
A8	1	2	-	1	5	-	5	5	1	-	-	1	-	-
A26	-	-	-	-	1	1	1	1	1	1	1	1	-	-
A29	-	-	-	2	2	2	2	2	-	-	1	-	2	2
A38	-	-	-	-	2	1	2	2	1	-	1	-	-	-
A44	-	2	-	1	3	-	3	3	1	-	1	1	1	1
A52	1	1	-	1	4	1	4	4	1	1	2	-	-	-
A56	2	2	-	-	3	-	3	3	-	-	1	-	2	2
A64	-	-	-	-	1	5	1	1	-	-	2	-	-	-
A66	1	1	-	-	1	1	1	1	1	-	1	-	2	2
A77	-	-	-	-	2	3	2	2	-	-	-	-	1	1
A78	-	1	2	-	1	4	1	1	1	1	-	1	-	-
A86	-	1	1	-	3	3	3	3	3	1	2	1	-	-
Total	8	11	5	6	33	22	5	6	33	22	5	14	12	12

Tabela 5. Número de plantas R₁ derivadas do subclone 1-MS2, da cultura 12-F, homozigóticas para presença (++) ou ausência (00) do knob do braço longo do cromossomo 3 (K3L), e heterozigóticas para K3L (+0).

Somaclone*	K3L		
	++	+0	00
A1	2	3	4
A7	3	4	2
A8	3	6	1
A26	0	2	2
A29	0	6	3
A38	1	3	1
A44	2	4	3
A52	2	6	2
A56	4	3	3
A64	0	6	2
A66	2	2	3
A77	0	5	1
A78	3	5	1
A86	2	6	3
Total	24	61	31

*Somaclone = progênie de uma planta R₀

Tabela 6. Análise da segregação de K3L pelo teste de χ^2

K3L	fo	fe	χ^2
++	24	29	0,8621
+0	61	58	0,1552
00	31	29	0,1379
TOTAL	116		1,1552 ^{ns}

GL = 2 (*5% = 5,991; **1% = 9,210; ^{ns} = Não significativo)

Tabela 7. Número de plantas R₁ derivadas do subclone 1-MS2, da cultura 12-F, homozigóticas para presença (++) ou ausência (00) do knob do braço longo do cromossomo 7 (K7L) amplificado, e heterozigóticas para K7L amplificado (+0).

Somaclone*	K7L amplificado		
	++	+0	00
A1	2	4	3
A7	2	4	3
A8	3	7	0
A26	1	2	1
A29	2	3	4
A38	0	3	2
A44	2	6	1
A52	2	7	1
A56	2	6	2
A64	0	3	5
A66	1	3	3
A77	0	2	4
A78	1	2	6
A86	1	6	4
Total	19	58	39

* Somaclone = progênie derivada de uma planta R₀

Tabela 8. Análise da segregação de K7L pelo teste de χ^2

K7L amplificado	fo	fe	χ^2
++	19	29	3,4482
+0	58	58	0
00	39	29	3,4482
TOTAL	116		6,8964*

GL = 2 (*5% = 5,991; ** 1% = 9,210)

Das 116 plantas analisadas, foi selecionada para análise meiótica uma amostra de 33 plantas composta de plantas homozigóticas e heterozigóticas para presença de K7L amplificado, bem como plantas com os cromossomos 7 normais.

As plantas restantes foram utilizadas para cruzamentos ou autofecundação visando posterior investigação do mecanismo que poderia estar afetando a transmissão do cromossomo com aberração. Apesar de um grande número de cruzamentos e autofecundações ser realizado apenas um pequeno número de espigas foi obtido, devido a uma diferença entre o tempo de florescimento masculino (mais precoce) e feminino (tardio). Foram obtidas 3 espigas homozigóticas para K7L amplificado, 4 espigas com cromossomo 7 normal, uma espiga heterozigótica para K7L amplificado e 15 espigas segregantes. As espigas homozigóticas para K7L amplificado apresentaram baixo rendimento de sementes.

Por outro lado, a análise de bandas-C em metáfases de pontas de raiz de plantas R₁ derivadas do subclone 2-N6, da cultura 12-F, mostrou que o cariótipo era aparentemente normal. Este resultado era esperado, uma vez que na análise prévia do calo não foram detectadas alterações no cariótipo.

A linhagem original apresentava K3L em estado heterozigótico, portanto, esperava-se a ocorrência de segregação Mendeliana, o que foi confirmado pelos dados apresentados nas Tabelas 9 e 10.

Tabela 9. Número de plantas R₁ derivadas do subclone 2-N6, da cultura 12-F, homozigóticas para presença (++) ou ausência (00) do knob do braço longo do cromossomo 3 (K3L) e heterozigóticas para K3L (+0).

Somaclone	K3L*		
	++	+0	00
Q2	2	4	2
Q23	1	1	3
Q42	-	3	1
Q54	2	4	2
Q79	-	3	2
Total	5	15	10

Tabela 10. Análise da segregação de K3L pelo teste de χ^2

K3L	fo	fe	χ^2
++	5	7,5	0,8333
+0	15	15,0	0
00	10	7,5	0,8333
TOTAL	30		1,6666 ^{ns}

GL = 2 (*5% = 5,991; **1% = 9,210)

^{ns} = Não significativo

4.1.2. Análise meiótica de plantas R₁ derivadas da cultura 12-F

Foram realizadas análises de plantas derivadas do subclone 1-MS2, cujo cariótipo foi investigado através de bandamento-C em metáfases mitóticas. A análise de microsporócitos na fase de diacinese mostrou a ocorrência de dois univalentes grandes ou pequenos (Figura 3). Raramente se observaram a ocorrência de células com quatro univalentes (dois grandes e dois pequenos).

Nas plantas regeneradas, bem como nas plantas controle, foi encontrado um bivalente grande, na diacinese, que apresentava uma região descondensada (Figura 4). A análise de diacineses coradas pelo método de bandamento-C mostrou que este bivalente não apresenta knob, e que o univalente grande refere-se ao cromossomo 7 (Figura 5).

Na anáfase I foram observados univalentes retardatários (Figura 6), e outros tipos de pontes sem fragmentos. A ocorrência de pontes com fragmento na anáfase I indica a ocorrência de inversão paracêntrica. Entretanto, nas plantas analisadas foram observadas figuras de pontes sem fragmento. Neste caso, as pontes devem ter origem em algum outro mecanismo. Sugere-se que estas pontes sem fragmentos, sejam resultantes de eventos de "misdivision", ou seja, quebra no centrômero no seu estágio final (Figura 7), ou da separação de cromossomos que formam um bivalente que apresenta uma região descondensada na diacinese (Figuras 4 e 8).

A ocorrência de 'misdivision' em univalentes na anáfase I resulta em quebras dentro do centrômero, de forma que os dois braços migram para polos opostos, podendo originar novos cromossomos (como telocêntricos e isocromossomos).

Figura 3. Microsporócitos na fase de diacinese, observados em plantas derivadas do subclone 1-MS2 da cultura 12-F. a) univalente grande; b) univalente pequeno.

Figura 4. Microsporócitos na fase de diacinese, observados em plantas regeneradas a partir do subclone 1-MS2 da cultura 12-F, apresentando um bivalente com uma região descondensada.

Figura 5. Microsporócitos na fase de diacinese, observados em plantas regeneradas a partir do subclone 1-MS2 da cultura 12-F, apresentando um e dois univalentes retardatários (5a e 5b, respectivamente).

Figura 6. Microsporócitos na fase de diacinese, corados através de bandamento-C, observados em plantas R₁ derivadas do subclone 1-MS2 da cultura 12-F, apresentando o cromossomo 7 univalente.

Figura 7. Microsporócitos na fase de anáfase I, observados em plantas R_1 derivadas do subclone 1-MS2 da cultura 12-F, apresentando pontes decorrentes de eventos de quebra no centrômero ("misdivision").

Figura 8. Microsporócitos na fase de anáfase I, observados em plantas R_1 derivadas do subclone 1-MS2 da cultura 12-F, apresentando pontes sem fragmento, provavelmente resultantes da segregação de cromossomos que formam um bivalente apresentando uma região descondensada na diacinese.

Na Tabela 11 são apresentados os dados da análise de diacinese e anáfase I, de plantas R1 derivadas do subclone 1-MS2 da cultura 12-F, considerando-se simultaneamente as segregações dos knobs do braço longo dos cromossomos 3 e 7.

De maneira geral, a frequência de univalentes grandes foi maior em relação a univalentes pequenos. Os somaclones homozigóticos para K3L e K7L amplificado e os heterozigóticos para ambos os knobs apresentaram maior frequência de univalentes (4,59% e 4,45%, respectivamente). Nos demais somaclones a frequência de univalentes variou de 1,94% a 3,33%.

A análise de microsporócitos na fase de metáfase I mostrou baixa frequência de segregação precoce de univalentes, portanto, esses dados não são incluídos na Tabela 11.

A frequência de segregação tardia (univalentes retardatários) na anáfase I variou de 0,42% (em homozigóticos para ausência de K3L e presença de K7L amplificado) a 3,61 (em homozigóticos para presença de K7L amplificado e heterozigóticos para K3L).

Eventos de "misdivision" não foram observados em somaclones homozigóticos para K7L amplificado, exceto para dois somaclones homozigóticos para ausência de K3L.

A análise de microsporócitos na fase de paquíteno permitiu uma melhor avaliação do cromossomo 7. A Figura 9 mostra cromossomos 7 de plantas homozigóticas para presença e ausência da amplificação em K7L. Os cromossomos apresentados nas Figuras 10 e 11 são provenientes de plantas heterozigóticas para a amplificação, nas fases de paquíteno e diplóteno, respectivamente. Em algumas figuras observa-se a presença de um cromômero proeminente na extremidade da eucromatina distal (Figuras 10a-d, 10g, 10j, 11c-e, 12b).

Figura 9. Microsporócitos na fase de paquíteno, observados em plantas R_1 derivadas do subclone 1-MS2 da cultura 12-F, homozigóticas para o cromossomos 7 normal (a, b, c) e portador de uma amplificação (d-j).

Figura 10. Microsporócitos na fase de paquíteno, observados em plantas R_1 derivadas do subclone 1-MS2 da cultura 12-F, heterozigóticas para o cromossomo 7 portador de uma amplificação em K7L.

Figura 11. Microsporócitos na fase de diploteno, observados em plantas R_1 derivadas do subclone 1-MS2 da cultura 12-F, heterozigóticas para K7L amplificado. Em alguns casos não ocorreu pareamento da eucromatina distal (e).

Em plantas R₁ heterozigóticas para K7L amplificado o knob amplificado parece se dobrar, ou então a eucromatina se 'estica' para permitir o pareamento da eucromatina após o knob (Fig. 10a; Fig. 11). Foi observado também que em alguns casos parece não ocorrer pareamento da eucromatina distal, e que esta se condensa (Fig. 11e).

Foram levantadas algumas hipóteses quanto à origem do cromossomo 7 com amplificação em K7L, que serão discutidas adiante.

As Tabelas 12 e 13 apresentam os resultados da análise das medidas (em porcentagem) dos cromossomos 7 paquitênicos em plantas R₁ derivadas dos subclones 1-MS2 da cultura 12-F. Convém ressaltar que não houve diferenças significativas, pelo teste de Tukey, entre a medida do seguimento eucromático após o knob do braço longo (SE) do cromossomo 7 normal e com amplificação em K7L em estado homozigótico.

Outro resultado importante refere-se ao comprimento do knob do braço longo, que nas plantas portadoras de K7L amplificado esta medida foi quase o dobro do knob de cromossomos normais, concordando com os dados da análise de metáfases realizada previamente (Santos, 1995).

A investigação da ocorrência de outras aberrações, não detectadas através da análise de bandas-C em metáfases mitóticas, foi realizada pela observação de paquítenos. Não foram encontradas figuras características de translocações e inversões, conforme pode-se observar na Figura 12, onde todos os cromossomos podem ser vistos. Nesta figura o cromossomo 7 apresenta K7L amplificado em estado heterozigótico.

Tabela 11. Frequência de univalentes na diacinese e anormalidades na anáfase I de plantas R₁ derivadas do subclone 1-MS2 da cultura 12-F, cujo cariótipo foi previamente analisado em metáfases de ponta de raiz coradas pelo bandamento-C.

Designação das plantas		Genótipo		Diacinese			Anáfase I				
		K3L	K7L ampl.	Total	Univ. Grande	Univ. Peq.	Total Univ.	Total	Segr. tardia	Misdivision	Outros
A7-7	++	++		120	5,0 (6)	2,5 (3)	7,5 (9)	93	1,08 (1)	-	5,38 (5)
A52-2	++	++		120	0,83 (1)	0,83 (1)	1,67 (2)	56	-	-	-
Média					2,91	1,67	4,59		0,54	-	2,69
A1-8	+0	++		120	2,5 (3)	-	2,5 (3)	120	2,50 (3)	-	0,83 (1)
A8-3	+0	++		120	2,5 (3)	0,83 (1)	3,33 (4)	120	1,67 (2)	-	-
A52-3	+0	++		120	-	-	-	120	6,67 (8)	-	0,83 (1)
Média					1,67	0,28	1,94		3,61	-	0,55
A1-12	00	++		120	5,0 (6)	1,67 (2)	6,67 (8)	120	3,33 (4)	1,67 (1)	1,67 (2)
A86-10	00	++		120	-	-	-	120	0,83 (1)	1,67 (2)	-
Média					2,5	0,83	3,33		2,08	1,67	0,83
A1-6	+0	+0		120	5,0 (6)	2,5 (3)	7,5 (9)	93	1,08 (1)	-	5,38 (5)
A7-14	+0	+0		120	2,5 (3)	-	2,5 (3)	120	2,5 (3)	-	0,83 (1)
A7-19	+0	+0		120	5,0 (6)	1,67 (2)	6,67 (8)	120	3,33 (4)	1,67 (2)	1,67 (2)
A44-1	+0	+0		120	3,33 (4)	-	3,33 (4)	50	-	4,0 (2)	2,0 (1)
A52-1	+0	+0		120	0,83 (1)	0,83 (1)	1,67 (2)	120	2,50 (3)	-	1,67 (2)
A52-4	+0	+0		120	0,83 (1)	1,67 (2)	2,5 (3)	120	5,0 (6)	0,83 (1)	3,33 (4)
A52-8	+0	+0		120	5,83 (7)	2,5 (3)	8,33 (10)	63	1,58 (1)	9,52 (6)	1,58 (1)
A52-9	+0	+0		120	2,5 (3)	0,83 (1)	3,33 (4)	120	0,83 (1)	3,33 (4)	2,5 (3)
A86-7	+0	+0		120	2,5 (3)	1,67 (2)	4,17 (5)	120	4,17 (5)	1,67 (2)	2,5 (3)
Média					3,15	1,30	4,45		2,33	2,33	2,38
A52-5	00	+0		120	1,67 (2)	-	1,67 (2)	77	1,3 (1)	-	-
A52-6	00	+0		120	1,67 (2)	0,83 (1)	2,5 (3)	50	-	-	-
Média					1,67	0,41	2,09		0,65	-	-
A1-10	00	00		120	1,67 (2)	0,83 (1)	2,5 (3)	40	-	-	-
A1-14	00	00		120	2,5 (3)	0,83 (1)	3,33 (4)	120	1,67 (2)	-	-
A7-18	00	00		120	1,67 (2)	0,83 (1)	2,5 (3)	40	-	-	-
A44-3	00	00		120	0,83 (1)	0,83 (1)	1,67 (2)	120	-	2,5 (3)	-
Média					1,67	0,83	2,5		0,42	0,62	-

Tabela 12. Tamanho do knob do braço longo do cromossomo 7 (K7L) normal e amplificado, e do segmento eucromático distal, em cromossomos paquitênicos de plantas regeneradas a partir do subclone 1-MS2 da cultura 12-F.

Genótipo	K7L	Eucromatina distal
K7L Normal	4,7575a	20,6813a
K7L amplificado (homozig.)	7,9163b	20,6425a
DMS	1,0098	1,5944

DMS = Diferença mínima significativa

Valores com diferentes letras diferem ao nível de 5% pelo teste de Tukey.

Tabela 13. Análise de variância do tamanho do knob do braço longo do cromossomo 7 (K7L) normal e amplificado, e do segmento eucromático distal, em cromossomos paquitênicos de plantas R₁ do subclone 1-MS2, cultura 12-F.

QM			
FV	GL	K7L	Eucromatina distal
Tratamento	1	39,9108**	0,0060 ^{ns}
Resíduo	14	0,8867	2,2104

** significativo a 1% pelo Teste F

^{ns} não significativo

Figura 12. Paquíteno de uma planta R₁ do subclone 1-MS2 da cultura 12-F, heterozigótica para K7L amplificado, mostrando todos os demais cromossomos normais.

A análise meiótica de plantas R₁ derivadas do subclone 2-N6 da cultura 12-F revelou a ocorrência de univalentes na diacinese, sendo que plantas heterozigóticas para K3L apresentaram menor frequência (2,68 %). Também verificou-se a presença de um bivalente com uma região descondensada na diacinese, semelhante ao observado no subclone 1-MS2. A análise de anáfases I revelou baixa frequência de cromossomos retardatários e de eventos de "misdivision" (Tabela 14).

As plantas controle heterozigóticas para K3L apresentaram menor frequência de univalentes na anáfase I em relação à plantas homozigóticas para ausência deste knob. Não foram observados eventos de 'misdivision' na anáfase I, porém uma baixa frequência de outros eventos como pontes sem fragmentos foi observada (Tabela 15).

Comparando-se os dados da análise mitótica de somaclones da cultura 12-F e plantas controle da cultura 12-F (CCT 12-F), observa-se as plantas com cromossomo 7 normal e as homozigóticas para K7L amplificado apresentaram maior frequência de univalentes em relação às plantas controle (Tabela 16), e que plantas heterozigóticas para K7L amplificado apresentam maior frequência de univalentes na diacinese e de anormalidades na anáfase I.

Em uma etapa anterior, foi realizada uma análise de microsporócitos nas fases de diacinese, metáfase I e anáfase I, de plantas R₁ derivadas dos subclones 1-MS2 e 2-N6, cuja análise prévia de metáfases de ponta de raiz, para investigação de aberrações, não foi realizada (Tabelas 17 e 18). A análise de plantas derivadas do subclone 1-MS2 da cultura 12-F mostrou a ocorrência de nove bivalentes e dois univalentes (9II + 2I) na maioria dos somaclones analisados. Foram observados univalentes grandes e pequenos, em 2,1% e 2,54% das células analisadas, respectivamente.

Tabela 14. Frequência de univalentes na diacinese e anormalidades na anáfase I de plantas R₁ derivadas da subclone 2-N6 da cultura 12-F, cujo cariótipo foi previamente analisado em metáfases de ponta de raiz coradas pelo bandamento-C.

Designação das plantas	K3L	Diacinese				Anáfase I			
		Total Célul.	Univalente		Total	Total Célul.	Segr. tardia	Misdivision	Outros*
			Grande	Pequeno					
Q23-6	++	120	4,16 (5)	3,33 (4)	7,50 (9)	120	4,16 (5)	-	-
Q2-7	++	120	0,83 (1)	-	0,83 (1)	120	2,50 (3)	2,50 (3)	-
Média			2,50	1,67	4,16		3,33	1,25	-
Q42-2	+0	120	0,83 (1)	1,67 (2)	2,50 (3)	120	0,83 (1)	-	-
Q42-6	+0	120	3,33 (4)	1,67 (2)	5,00 (6)	120	4,16 (5)	-	1,67 (2)
Q42-10	+0	120	0,83 (1)	2,5 (3)	3,33 (4)	120	1,67 (2)	0,83 (1)	-
Q54-7	+0	120	-	-	-	80	2,50 (2)	-	-
Q54-10	+0	120	-	-	-	120	-	-	-
Q79-1	+0	120	2,5 (3)	-	2,5 (3)	120	0,83 (1)	-	-
Q79-2	+0	120	-	3,33 (4)	3,33 (4)	120	1,67 (2)	-	-
Q2-4	+0	120	-	-	1,67 (2)	120	2,50 (3)	1,67 (2)	1,67 (2)
Q2-10	+0	120	2,50 (3)	3,33 (4)	5,83 (7)	120	3,33 (4)	-	-
Média			1,29	1,39	2,68		2,27	0,28	0,37
Q79-7	00	120	0,83 (1)	0,83 (1)	1,67 (2)	120	-	-	-
Q79-9	00	120	2,50 (3)	1,67 (2)	4,16 (5)	120	3,33 (4)	0,83 (1)	-
Q23-7	00	45	6,67 (3)	2,22 (1)	8,89 (4)	120	2,50 (3)	-	1,67(2)
Q23-10	00	120	1,67 (2)	-	1,67 (2)	120	0,83	-	-
Média			2,92	1,18	4,10		1,67	0,21	0,41

* Outros = pontes sem fragmento

Tabela 15. Frequência de univalentes na diacinese e anormalidades na anáfase I de plantas controle da cultura 12-F (CCT 12-F).

Genótipo	K3L	Diacinese				Anáfase I			
		Total	Univalente			Total	Segr. tardia	Misdivision	Outros*
			G	P	Total univ.		-	-	
13342/5-1	00	190	2,64 (5)	1,58 (3)	4,21 (8)	81	-	-	1,25 (1)
13342/5-2	00	115	0,87 (1)	3,48 (4)	4,35 (5)	61	-	-	1,64 (1)
13342/5-3	00	122	-	0,82 (1)	0,82 (1)	39	-	-	2,56 (1)
13342/5-4	00	100	-	-	-	50	-	-	-
Média			0,88	1,47	2,35		-	-	1,36
13342/5x13342/2 -1	+0	190	-	3,82 (7)	3,82 (7)	119	-	-	1,68 (1)
13342/5x13342/2 -2	+0	156	-	3,01 (5)	3,01 (5)	66	-	-	-
13342/5x13342/2 -4	+0	122	-	-	-	20	-	-	-
13342/5x13342/2 -6	+0	100	-	1,00 (1)	1,00 (1)	35	2,86 (1)	-	-
Média				1,96	1,96		0,72	-	0,42

* Outros = pontes sem fragmento

Tabela 16. Comparação da frequência de univalente na diacinese e de anormalidades na anáfase I de plantas R₁ derivadas dos subclones 1-MS2 e 2-N6, da cultura 12-F, e de plantas controle da cultura 12-F (CCT 12-F).

Genótipo	Diacinese			Anáfase I		
	Univalentes %			Segreg. Tardia	Misdivision	Outros
	G	P	G+P			
12-F 1-MS2						
Homozigótico para K7L amplificado	2,26	0,83	3,09	2,30	0,48	1,24
Heterozigótico para K7L amplificado	2,88	1,06	3,94	2,02	1,91	1,94
K7L Normal	1,67	0,83	2,5	0,42	0,62	-
12-F 2-N6						
K7L Normal	2,24	1,41	3,65	2,42	0,58	0,26
CCT 12-F						
K7L Normal	0,44	1,71	2,15	0,36	-	0,82-

G = univalente grande; P = univalente pequeno

Tabela 17. Frequência de univalentes na diacinese e anormalidades na anáfase I de plantas R1 derivadas do subclone 1-MS2, da cultura 12-F, sem análise prévia de bandas-C em metáfases mitóticas.

Somacclone	Diacinese				Anáfase I			
	Univalentes			Total Univ.	Total	Segregação Tardia	Misdivision	Outros*
	Total	Grande	Pequeno					
A1-1	247	2,83 (7)	1,21 (3)	4,05 (10)	50	-	-	2,0 (1)
A1-2	129	3,88 (5)	4,65 (6)	8,53 (11)	50	4,0 (2)	-	4,0 (2)
A7-1	91	2,20 (2)	1,10 (1)	3,30 (3)	50	2,0 (1)	-	-
A7-2	147	0,68 (1)	2,72 (4)	3,40 (5)	50	-	-	-
A7-4	101	0,97 (1)	2,91 (3)	3,88 (4)	50	2,0 (1)	-	-
A8-1	162	-	1,85 (3)	1,85 (3)	50	-	-	-
A8-2	209	0,48 (1)	3,35 (7)	3,83 (8)	50	2,0 (1)	-	2,0 (1)
A8-4a	112	1,79 (2)	0,89 (1)	2,68 (3)	50	-	-	-
A44-1a	127	-	3,15 (4)	3,15 (4)	50	-	2,0 (1)	-
A44-2	124	4,03 (5)	2,42 (3)	6,45 (8)	50	-	-	-
A44-3a	240	3,75 (9)	4,17 (10)	7,92 (19)	50	6,0 (1)	2,0 (1)	-
A64-1	176	0,57 (1)	1,71 (3)	2,27 (4)	40	-	-	2,5 (1)
A64-3	159	0,63 (1)	0,63 (1)	1,26 (2)	32	-	-	-
A64-5	116	4,31 (5)	0,86 (1)	5,17 (6)	69	-	-	2,9 (2)
A86-1	329	3,65 (12)	2,43 (8)	6,08 (20)	50	2,0 (1)	2,0 (1)	2,0 (1)
A86-3	179	3,35 (6)	5,59 (10)	8,94 (16)	66	1,51 (1')	-	-
A86-4	229	2,62 (6)	3,49 (8)	6,11 (14)	115	0,87 (1)	-	2,61 (3)
Média		2,10	2,54	4,64		1,20	0,35	1,03

* Outros = pontes sem fragmento

Tabela 18. Frequência de univalentes na diacinese e anormalidades na anáfase I de plantas R₁ derivadas do subclone 2-N6 da cultura 12-F, do sem análise prévia de bandas-C em metáfases mitóticas.

Genótipo	Diacinese			Anáfase I			
	Total	Univalente		Total	Segregação Tardia	Misdivision	Outros*
		Grande	Pequeno				
Q2-1	196	2,04 (4)	0,51 (1)	50	-	2,0 (1)	2,0 (1)
Q2-3	123	1,62 (2)	2,44 (3)	111	1,8 (2)	0,9 (1)	-
Q2-4a	106	0,94 (1)	2,83 (3)	50	4,0 (2)	-	-
Q23-1	100	6,00 (6)	4,00 (4)	50	2,0 (1)	-	-
Q23-2	100	2,00 (2)	2,00 (2)	50	4,0 (2)	2,0 (1)	-
Q23-3	100	6,00 (6)	1,00 (1)	50	2,0 (1)	2,0 (1)	2,0 (1)
Q42-1	100	3,00 (3)	4,00 (4)	50	2,0 (1)	-	-
Q42-3	100	1,00 (1)	8,00 (8)	50	8,0 (4)	-	-
Q54-1	100	3,00 (3)	2,00 (2)	50	-	-	-
Q54-2	100	3,00 (3)	2,00 (2)	50	-	-	-
Q54-5	100	1,00 (1)	3,00 (3)	50	-	-	-
Q79-1a	168	4,17 (7)	1,19 (2)	65	-	-	-
Q79-2a	180	3,89 (7)	1,11 (2)	46	-	-	-
Q79-3	125	3,20 (4)	1,60 (2)	118	0,85 (1)	-	5,08 (6)
Média		2,92	2,54		1,76	0,49	0,65

* Outros = pontes sem fragmento

Segregação precoce na metáfase I ocorreu em uma frequência muito baixa, não sendo incluídos esses dados na tabela.

Na anáfase I foram observados univalentes retardatários e eventos de 'misdivision' em 47% e 17% das plantas R₁ derivadas do subclone 1-MS2 da cultura 12-F analisadas, respectivamente. Além disso, outros eventos como pontes sem fragmentos na anáfase I foram observados em 41% dos somaclones. Foi observada uma correlação entre a presença de anormalidades na anáfase I e a presença de univalentes na diacinese.

Em alguns casos foi possível identificar, através da análise de paquítenos, plantas do subclone 1-MS2 portadoras de amplificação, entretanto, a distinção entre plantas homozigóticas ou heterozigóticas para a aberração foi difícil.

A análise meiótica de plantas derivadas do subclone 2-N6 da cultura 12-F, sem análise prévia de bandas-C em metáfases mitóticas, mostrou a ocorrência de univalentes grandes e pequenos na diacinese (2,92% e 2,54%, respectivamente), baixa frequência de univalentes retardatários (1,72%) e de eventos de quebra no centrômero ("misdivision"), sendo que os somaclones Q-54 e Q-79 não apresentaram nenhum tipo de anormalidade na anáfase I, embora tenham sido observados univalentes na diacinese (Tabela 18).

4.2. Cultura 3-57

4.2.1. Análise da transmissão do cromossomo 7 alterado em plantas R₁ e R₂ derivadas da cultura 3-57

A análise prévia do calo (Santos, 1995; Fluminhan et al., 1996) mostrou que a cultura 3-57 apresentava deficiência e duplicação (DP-DF) no braço curto do cromossomo 7 (7S/DF-DP) em estado heterozigótico, interpretado como resultante de ciclo de quebra-fusão-ponte e posterior cicatrização telomérica.

A análise de metáfases de ponta de raiz de plantas R₁ e R₂, coradas pela metodologia de bandamento-C, mostrou a ocorrência de plantas normais e plantas heterozigóticas para o cromossomo 7 portador de DF-DP no braço curto (Figura 13). Plantas homozigóticas para esta aberração não foram encontradas. Foi analisada uma espiga de cada somaclone. Um somaclone equivale a uma espiga R₁. As plantas R₂ são provenientes de 3-4 espigas de cada somaclone.

Os resultados da análise de bandas-C em metáfases mostraram que o cromossomo 7 portador de DF-DP no braço curto foi transmitido para 45,83 % das plantas R₁ analisadas. Na geração R₂ a frequência de ocorrência deste cromossomo foi de 15,38 % (Tabela 19). Os dados indicam que algum mecanismo deve estar envolvido nesta distorção da segregação normal.

A ausência de homozigotos para 7S/DP-DF pode ser devida a uma falha na transmissão do cromossomo aberrante por um dos parentais. Outra possibilidade seria de que sementes homozigóticas para esta aberração não germinassem. Foi observado que 26,9% das sementes não germinaram.

Figura 13. Cariótipo de plantas R_1 derivadas da cultura 3-57. a) Planta com cromossomo 7 normal. b) Planta heterozigótica para o cromossomo 7 portador de deficiência e duplicação no braço curto (7S/DF-DP).

Tabela 19. Análise de metáfases de ponta de raiz de plantas R₁ e R₂ derivadas da cultura 3-57, para avaliação da transmissão do cromossomo 7 portador de deficiência e duplicação (DF-DP) no braço curto.

Somaclone*	R ₁			R ₂		
	++	+0	00	++	+0	00
H9	-	7	4	-	1	21
H17	-	3	6	-	7	23
H21	-	1	3	-	-	-
Total	-	11	13	-	8	44
%		45,83	54,17		15,38	84,61

++ homozigótico para presença de DP-DF

00 homozigótico para ausência de DP-DF

+0 heterozigótico

* Um somaclone equivale a uma espiga R₁. As plantas R₂ são provenientes de 3-4 espigas de cada somaclone.

As plantas normais derivadas da cultura 3-57 eram férteis, e apresentaram o mesmo aspecto morfológico das plantas controle da cultura 3-57 (CCT 3-57). Por outro lado, as plantas heterozigóticas para 7S/DF-DP no braço curto apresentaram a ocorrência de inflorescência masculina parcialmente feminilizada, o que dificultou a análise meiótica, bem como a realização de cruzamentos. Foram obtidas quatro espigas resultantes de cruzamentos entre plantas que apresentavam 7S/DF-DP com plantas normais e vice-versa, 8 espigas com cromossomo 7 normal e uma espiga segregando para 7S/DF-DP resultantes de autofecundação.

4.2.2. Análise do comportamento meiótico de plantas R₁ derivadas da cultura 3-57 e de plantas controle

Foram analisadas plantas apresentando cromossomo 7 normal e plantas portadoras de 7S/DF-DP em estado heterozigótico, bem como plantas controle da cultura 3-57 (CCT 3-57).

A análise meiótica de plantas controle (CCT 3-57) mostrou a ocorrência de adesão entre knobs no paquíteno, envolvendo os knobs de tamanho médio e grande, formando um bloco (Figura 14). Em alguns casos foram observadas adesões entre o knob do braço longo do cromossomo 7 e o knob do braço curto do cromossomo 9 que persistiram até o final do paquíteno (Figura 15).

Semelhante ao observado em plantas derivadas da cultura 12-F e em plantas CCT-12-F, a análise de diacineses de plantas R₁ com cromossomo 7 normal e portadoras de 7S/DF-DP, bem como das plantas controle mostrou a ocorrência de um bivalente com uma região descondensada (Figuras 16), sugerindo que esta pode ser uma

característica do material original, haja visto que as linhagens utilizadas na obtenção das culturas 12-F e 3-57 são relacionadas, ou seja, são derivadas de uma planta da variedade Jac-Duro que foi utilizada para obtenção de linhagens isogênicas que apresentam diferentes conteúdos de knobs (Decico; 1991; Aguiar-Perecin & Decico, 1988).

A maioria das plantas portadoras do cromossomo 7 com DF-DP apresentou-se com inflorescência masculina parcialmente ou totalmente feminilizada.

A ocorrência de adesão entre knobs no paquíteno de plantas R₁ heterozigóticas para 7S/DF-DP dificultou a análise do cromossomo 7 (Figura 17). Poucas figuras do cromossomo 7 portador de DF-DP isolado dos demais cromossomos foram obtidas (Figuras 18 e 19). Na Figura 18 é apresentado um cromossomo 7 na fase de paquíteno onde se observa que o segmento com deficiência e duplicação não está pareado. Na Figura 19, o cromossomo 7 portador de DF-DP apresenta adesão entre o knob do braço longo (K7L) e o knob do segmento duplicado do braço curto (K7S). Convém ressaltar a presença de um segmento eucromático distal no braço curto do cromossomo paquitênico, correspondente ao observado em metáfases mitóticas (veja Figura 13). Figuras características de translocação, inversão ou outras aberrações não foram observadas nos paquítenos analisados, dando evidências adicionais de que o cromossomo com DP-DF resultou de ciclos de quebra-fusão-ponte e posterior cicatrização telomérica.

Em plantas heterozigóticas para 7S com DP-DF foi observada a ocorrência de um par heteromórfico na diacinese, que corresponde ao cromossomo 7, conforme esperado (Figuras 20 e 21). Algumas vezes o par heteromórfico formava univalentes ou figuras de aparentes quadrivalente (V) ou trivalente+univalente (III+I) (Figuras 22 e 23), que foram interpretadas como decorrentes da associação entre knobs.

Figura 14. Paquíteno de uma planta controle da cultura 3-57 (CCT 3-57) mostrando adesão entre knobs.

Figura 15. Paquíteno de uma planta controle da cultura 3-57 (CCT 3-57) mostrando adesão entre os knobs do braço longo do cromossomo 7 e do braço curto do cromossomo 9 (a, b). Diacinese de uma planta controle da cultura 3-57 (CCT 3-57) mostrando adesão entre dois bivalentes possivelmente decorrente de adesão dos knobs no paquíteno(c).

Figura 16. Microsporócitos na fase de diacinese, observado em plantas controle da cultura 3-57 (CCT 3-57), mostrando um bivalente com uma região descondensada.

Figura 17. Microsporócitos na fase de paquíteno, observado em plantas derivadas da cultura 3-57, mostrando adesão entre knobs.

Figura 18. Paquíteno final de uma planta R_1 derivada da cultura 3-57, heterozigótica para o cromossomo 7 portador de DF-DP (a). Representação esquemática indicando a posição dos knobs e do centrômero (b).

Figura 19. Paquíteno de uma planta R_1 derivada da cultura 3-57, heterozigótica para o cromossomo 7 portador de DF-DP, mostrando adesão entre os knobs do braço curto e longo do cromossomo 7 (a). Representação esquemática indicando a posição dos knobs e do centrômero (b).

Figura 20. Microsporócitos nas fases de diacinese (a) e diplóteno (b) mostrando presença de um par heteromórfico em plantas R_1 derivadas da cultura 3-57, heterozigóticas para cromossomo 7 portador de DF-DP no braço curto.

Figura 21. Diacinese de uma planta R_1 derivada da cultura 3-57 heterozigótica para 7S com DF-DP, mostrando presença de um par heteromórfico e um bivalente com uma região descondensada.

Figura 22. Microsporócitos na fase de diacinese, observados em plantas R_1 derivadas da cultura 3-57 heterozigóticas para 7S com DF-DP, mostrando associação do par heteromórfico com um bivalente, provavelmente decorrente de associação entre knobs no paquíteno.

Figura 23. Diacinese de uma planta R_1 derivada da cultura 3-57 heterozigótica para 7S com DF-DP, mostrando associação do par heteromórfico e outro bivalente (a), provavelmente o 9, conforme se observa no detalhe ampliado (b).

Os resultados da análise de diacineses e anáfases I são apresentados na Tabela 20. A alta frequência de univalentes na diacinese (10,8%), em plantas portadoras de 7S/DF-DP, refletiu numa alta frequência de univalentes retardatários na anáfase I (7,92%), muito superior ao observado nas plantas controle da cultura 3-57 (0,18% e 1,9%, respectivamente). As plantas R₁ que apresentaram cromossomo 7 normal mostraram 6% de univalentes na diacinese.

Embora eventos de quebra no centrômero ("misdivision") não tenham sido observados em plantas heterozigóticas para 7S/DF-DP, outros eventos como ponte sem fragmento, as quais podem ser resultantes de "misdivision" ou da separação do bivalente com uma região descondensada, foram observados em 5,48% das anáfases I analisadas.

4.3. Genótipos avaliados para regeneração de plantas após curto período de cultivo *in vitro* (2-3 meses)

4.3.1. Resposta embriogênica e regeneração de plantas

As linhagens investigadas foram selecionadas a partir de vários experimentos (Fluminham & Aguiar-Perecin, 1991, 1998; Santos, 1995; Gardingo, 1998), desenvolvidos como parte de programa que cisa a seleção de genótipos tropicais que sejam capazes de formar calos altamente embriogênicos, friáveis e com capacidade para regenerar plantas após curto e longo período de cultivo *in vitro*, que vem sendo desenvolvido no Departamento de Genética, ESALQ/USP.

Tabela 20. Frequência de univalentes na diacinese e anormalidades na anáfase I de plantas R₁ derivadas da cultura 3-57, e de plantas controle da cultura 3-57(CCT)

	Diacinese						Anafase I				
Genotipo	Total células	2 Univalentes		4 Univ.	Total Univ.	III+I*	IV*	Total.	Segreg. tardia	Misdivision	Outros**
		Par heter	Outro								
3-57											
7S Normal	882	-	6,01	-	6,01	-	-	318	5,03	0,63	2,51
			(53)		(53)				(16)	(2)	(8)
7S/DF-DP	352	2,84	7,39	0,57	10,8	2,84	8,24	164	7,92	-	5,48
		(10)	(26)	(2)	(38)	(10)	(29)		(13)		(9)
CCT 3-57											
7S Normal	607	-	0,18	-	0,18	-	-	368	1,90	-	0,27
			(11)		(11)				(7)		(1)

Entre parêntesis número de células observadas.

*Os trivalentes + univalentes (III+I) e quadrivalentes (IV) são interpretados como associação do par heteromórfico e outro par de cromossomos decorrentes de fusão de knobs no paquíteno.

** Pontes sem fragmento

Na presente estudo foram investigadas a resposta embriogênica, bem como a capacidade para regeneração de plantas a partir de culturas de curta duração (2-3 meses), de três linhagens (13342/2, 13342/5 e 132331/1), e respectivos híbridos.

Os genótipos utilizados foram os mesmos investigados por Gardingo & Aguiar-Perecin (submetido) para avaliação da resposta embriogênica em culturas de calos de curta duração (45 dias) e de longa duração (6 e 12 meses). A linhagem 13342/2 foi utilizada em substituição à 13342/1 com a mesma composição de knobs, analisada pelos referidos autores. É interessante notar que as linhagens 13342/5, 13342/2 e 132331 podem ser consideradas isogênicas, diferindo pela ausência ou presença do knob do cromossomo 3 (K3L).

Em todos os genótipos analisados foi observada a formação de embriões somáticos sobre a superfície dos calos duas semanas após a inoculação. Calos tipo II, friáveis e altamente embriogênicos, semelhantes aos descritos por Armstrong & Green (1985), foram observados nas linhagens 13342/5 e 132331, e no respectivo híbrido. A linhagem 13342/2 apresentou calos embriogênicos de aparência mais compacta, com alguns pontos friáveis (Figura 24). Esta característica foi observada também nos híbridos que envolveram esta linhagem. A Figura 25 mostra placas de culturas dos genótipos 132331/1 e do híbrido 132331/1 x 13342/2 em que se pode distinguir neste último a ocorrência de maior frequência de calos compactos. É interessante que a linhagem 13342/1 também apresentou o mesmo tipo de resposta nos experimentos de Gardingo & Aguiar-Perecin (submetido).

Figura 24. Calos embriogênicos com 45 dias de cultivo, dos genótipos a) 13342/2; b) 13342/5; c) 132331/1. O genótipo 13342/2 tem tendência de formar calos mais compactos.

Figura 25. Placas de culturas com 45 dias de cultivo. a) Linhagem 132331/1, altamente embriogênica; b) Híbrido 132331/1 x 13342/2, com ocorrência de maior frequência de calos compactos.

A frequência de embriogênese somática aos 45 dias variou de 83,8 no híbrido 13342/2 X 13342/5 a 99,2 % na linhagem 13342/5 (Tabela 21), confirmando a superioridade destes genótipos observada em experimentos anteriores (Fluminhan e Aguiar-Perecin, 1998; Gardingo, 1998).

A regeneração de plantas foi realizada 2-3 meses após o início da cultura, selecionando-se oito calos por genótipo (quatro calos por placa). O protocolo de regeneração de plantas foi otimizado. Os calos foram transferidos para placas contendo N6 suplementado com 0,5 mg/l de 2,4-D, onde permaneceram por 3-5 dias no escuro e 7-10 dias sob luz (fotoperíodo 16:8 horas). Em seguida foram transferidos para placas contendo MS (Murashige e Skoog, 1962) sem 2,4-D e sem prolina. A medida que os embriões somáticos 'germinaram' (14 - 20 dias) foram transferidos para frascos contendo MS sem hormônio.

As plântulas com sistema radicular bem desenvolvido foram transplantadas para potes plásticos contendo uma mistura de terra e vermiculite (1:1) e aclimatizadas em estufa. Após 1 a 3 dias foram transferidas para vasos de cerâmica e finalmente para sacos plásticos em estufa climatizada (Figura 26).

As frequências de plantas regeneradas a partir dos genótipos estudados estão expressas na Tabela 21. O número médio de regenerantes variou de 2 a 8,15 por calo entre os genótipos analisados. O híbrido 13342/2 x 13342/5 apresentou o maior número de plantas regeneradas, sendo que 18 produziram espigas. O maior rendimento de plantas por calo foi obtido no híbrido 132331/1 x 13342/5.

Do total de 185 plantas regeneradas, 48 foram sacrificadas para análise citológica que mostrou estabilidade cromossômica em todos os genótipos (dados não publicados), e 68 (aproximadamente 50% do restante das plantas) produziram espigas com sementes. Algumas

plantas apresentaram inflorescência masculina parcialmente feminilizada ou seca, provavelmente devido a estresse fisiológico durante a aclimatação das mesmas. A Figura 26 apresenta plantas regeneradas a partir de culturas com 2-3 meses, derivadas da linhagem 132331/1 e do híbrido 132331/1 x 13342/5.

4.3.2. Análise citogenética de plantas R₀

Foram coletadas pontas de raiz de plantas R₀ *in vitro*, para procedimento de coloração pelo bandamento-C. O rendimento de metáfases foi muito pequeno. Não foram detectadas alterações no cariótipo em metáfases mitóticas de uma amostra de plantas R₀.

A análise meiótica de uma amostra de três plantas por genótipo mostrou a ocorrência de baixa frequência de univalentes na diacinese (Figura 27), variando de 0,84% no híbrido 13342/2 x 13342/5 a 3,84% no híbrido 132331/1 x 13342/5 (3,84%) (Tabela 22).

Na tabela 22 não são apresentados dados referentes a linhagem 13342/5 devido ao baixo número de plantas regeneradas. Esta linhagem apresentou oxidação, na etapa de regeneração correspondente à passagem dos embriões germinados para os frascos, o que afetou o rendimento final de plantas regeneradas.

Na anáfase I foram observados univalentes retardatários em algumas plantas R₀, e eventos de "misdivision" não foram observados (Tabela 22). Os dados são comparáveis aos resultados obtidos das plantas utilizadas no primeiro experimento (Tabela 16).

Tabela 21. Frequência de calos embriogênicos 45 dias após o início da cultura, número de plantas regeneradas e de espigas produzidas.

Genótipo	Calos embriogênicos %	NCR*	Plantas regeneradas		Espigas
			Total	Plantas/calor	
13342/2	85,24 (104/122)**	6	34	5,67	15
13342/5	99,22 (128/129)	2	4	2,0	-
132331/1	90,53 (220/243)	7	41	5,86	22
13342/2 x 13342/5	83,46 (106/127)	7	51	7,29	18
13342/2 x 132331/1	90,27 (232/257)	4	19	4,75	2
132331/1 x 13342/5	97,54 (238/244)	5	36	8,15	11

*NCR = número de calos que regeneraram plantas. Foram testados oito calos por genótipo.

**Entre parêntesis número de calos embriogênicos por número de embriões inoculados.

Figura 26. Plantas regeneradas a partir de culturas com 2-3 meses.

a) Linhagem 132331/1; b) Híbrido 132331/1 x 13342/5.

Figura 28. Microsporócitos de plantas regeneradas (R₀) a partir de calos embriogênicos com 2-3 meses de cultivo. a) Diacinese normal. b) Diacinese mostrando um bivalente grande. c) Anáfase I normal. d) Anáfase I mostrando ponte sem fragmento.

Tabela 22. Frequência de univalentes na diacinese e anormalidades na anáfase I de plantas R₀ derivadas de culturas de com 2-3 meses de idade.

Genotipo	Knob K3L K9S	Diacinese				Anafase I			
		Total	Univalentes**			Total	Segr. tardia	Misdivision	Outros***
			G	P	Total				
13342/2	C1 Pl 1*	120	-	-	-	112	-	-	-
	C3 Pl 1	120	0,83 (1)	-	0,83 (1)	120-	-	-	-
	C4 Pl 1	120	0,83 (1)	2,50 (3)	3,33 (4)	120	3,33 (4)	-	-
	Média		0,55	0,83	1,38		1,11	-	-
132331	C3 Pl 1	120	-	0,83 (1)	0,83 (1)	120	1,67 (2)	-	2,50 (3)
	C6 Pl 4	120	1,67 (2)	-	1,67 (1)	120	0,83 (1)	-	1,67 (1)
	C6 Pl 5	120	-	2,50 (3)	2,50 (3)	120	2,50 (3)	-	0,83 (1)
	Média		0,56	1,11	1,67		1,67	-	1,67
13342/2 x 13342/5	C2 Pl 3	120	-	0,83 (1)	0,83 (1)	88	3,40 (3)	-	-
	C5 Pl 2	120	-	-	-	120	0,83 (1)	-	-
	C5 Pl 3	120	1,67 (2)	-	1,67 (2)	120	0,83 (1)	-	0,83 (1)
	Média		0,56	0,28	0,84		1,69	-	0,28
132331 x 13342/5	C1 Pl 1	120	5,83 (7)	-	5,83 (7)	120	5,00 (6)	-	3,33 (4)
	C4 Pl 3	120	0,83 (1)	0,83 (1)	1,67 (2)	82	0,83 (1)	-	10,97(9)
	C7 Pl 3	120	0,83 (1)	0,83 (1)	1,67 (2)	120	2,50 (3)	-	5,00 (6)
	Média		3,29	0,55	3,84		2,78	-	6,43
13342/2 x 131331	C5 Pl 1	120	-	-	-	120	-	-	0,83 (1)
	C8 Pl 2	120	0,83 (1)	0,83 (1)	1,67 (2)	120	0,83 (1)	-	-
	C8 Pl 3	120	-	1,67 (1)	1,67 (2)	120	1,67 (2)	-	0,83 (1)
	Média		0,28	0,83	1,11		0,83	-	0,55

* C = calo; P1 = designação da planta R₀

** G = univalentes grandes; P = univalentes pequenos

*** Outros = pontes sem fragmento

5. DISCUSSÃO

5.1. Plantas regeneradas a partir de duas culturas de longa duração (12-29 meses)

5.1.1. Cultura 12-F

A análise de bandas-C em metáfases de plantas R₁ derivadas do subclone 1-MS2 mostrou que o cromossomo 7 com amplificação no knob do braço longo foi transmitido para os somaclones, sem alterações, tanto pelo gameta masculino quanto pelo feminino, pois foram observadas plantas homozigóticas para K7L amplificado (Figuras 1 e 2; Tabela 5).

Esperava-se a ocorrência de segregação Mendeliana do cromossomo 7 com amplificação. Entretanto, ocorreu um desvio na segregação do K7L amplificado (Tabelas 7 e 8), especialmente em plantas que apresentavam K3L em estado heterozigótico, indicando que algum mecanismo pode estar envolvido no controle da transmissão deste cromossomo, como a competição entre gametas. Os gametas que apresentam o knob do braço longo do cromossomos 3 e o knob do braço longo do cromossomo 7 amplificado, ou seja, que apresentam maior conteúdo de heterocromatina, são transmitidos com menor frequência, provavelmente pelo pólen, em relação aos gametas com menor conteúdo de heterocromatina.

Mecanismos de segregação preferencial na presença de cromossomo 10 anormal foram descritos por Rhoades (1942, 1952) e Rhoades & Dempsey (1966). Tais mecanismos favorecem a presença do cromossomo 10 anormal na célula que originará o óvulo, bem como a segregação de cromossomos com knobs através de atividade neocentromérica.

Em um programa de obtenção de linhagens isogênicas apresentando diferentes composições de knobs, desenvolvido no Departamento de Genética, ESALQ/USP, foram investigadas várias linhagens relacionadas, derivadas da variedade Jac-Duro (inclusive linhagens pertencentes à família 1-3), e verificou-se que não houve variação na competição de grãos de pólen com diferentes combinações de knobs, ou seja, não ocorreu segregação preferencial (Decico, 1991).

O mecanismo envolvido no desvio na segregação de K7L amplificado deverá ser investigado através de retrocruzamentos.

Foram levantadas duas hipóteses quanto à origem da amplificação do knob do braço longo do cromossomo 7 *in vitro*: a) ciclo de quebra-fusão-ponte (Fluminhan et al., 1996; Santos, 1995), b) troca desigual entre cromátides irmãs (Gardingo, 1998). Segundo Wintersberger (1994), ambos mecanismos podem levar à amplificação do DNA.

A ocorrência de ciclos de quebra-fusão-ponte devido ao cultivo *in vitro* tem sido relatada na literatura. Murata e Orton (1984, 1983) encontraram uma alta frequência de alterações estruturais em cromossomos de aipo, envolvendo a heterocromatina telomérica de replicação tardia, e propuseram que tais alterações poderiam ter sido produzidas por ciclos de quebra-fusão-ponte. Stelly et al. (1989) sugeriram que monossômicos terciários, observados em plantas de

algodão regeneradas a partir de culturas com 18 meses de idade, eram resultantes de ciclos de quebra-fusão-ponte *in vitro*.

Em culturas de tecidos de *Allium fistulosum*, Joachmiack et al. (1995) observaram, através da análise de metáfases coradas pela metodologia de bandamento-C, alta frequência de alterações estruturais envolvendo regiões de heterocromatina. A observação de alterações estruturais secundárias, evidentemente produzidas por repetidas quebras cromossômicas e fusões subsequentes, levaram os autores a sugerirem que muitas células tinham iniciado ciclos de quebra-fusão-ponte.

Em milho, Fluminhan et al. (1996) encontraram evidências de ocorrência de ciclo de quebra-fusão-ponte em calos embriogênicos, iniciado por um atraso na separação das cromátides na região do knob. Através da análise de anáfases coradas através de bandamento-C mostrou a presença de pontes decorrentes de atraso na separação de cromátides, bem como pontes típicas, com e sem banda. A análise de metáfases coradas pelo bandamento-C mostrou a ocorrência de aberrações envolvendo os knobs do cromossomo 7, tais como: amplificação da banda do braço longo, na cultura 14-1 (linhagem 132331/1), e deficiência e duplicação no braço curto (cultura 3-57, cuja transmissão e comportamento meiótico foi investigado no presente estudo). Todas estas aberrações foram interpretadas como resultantes de ciclo de quebra-fusão-ponte.

Considerando-se a hipótese de ocorrência de ciclos de quebra-fusão-ponte, um atraso na separação das cromátides na região do knob do braço longo do cromossomo 7, devido à replicação mais tardia da heterocromatina em cultura de tecidos, poderia causar uma quebra no knob, originando um cromossomo com extremidade quebrada, apresentando K7L terminal. Na replicação seguinte, o cromossomo com

extremidade quebrada se fundiria dando origem a um dicêntrico, iniciando um ciclo de quebra-fusão-ponte. O cromossomo dicêntrico formaria uma ponte na anáfase, a qual poderia se quebrar entre o centrômero e o knob, resultando num cromossomo com uma duplicação do knob e do segmento eucromático adjacente a K7L, e uma deficiência do segmento eucromático distal do braço do cromossomo 7 (Santos, 1995). Este cromossomo seria mantido na cultura devido a ocorrência de cicatrização telomérica. A transmissão deste cromossomo para plantas R₁ seria possível se os genes localizados na eucromatina terminal do braço longo não fossem essenciais ao desenvolvimento da planta.

Os genes que estão localizados no segmento distal do braço longo do cromossomo 7 são: bd (branched silkless) e pn (papyrescent glumes) (Neuffer et al., 1968; Vetturini, 1968), ambos relacionados ao florescimento feminino e masculino, e o gene px3 (peroxidase 3) (MNL, 1994). Isto sugere que dificilmente uma planta homozigótica para deficiência destes genes poderia sobreviver e produzir progênie fértil.

A sobrevivência de plantas homozigóticas para uma deficiência é rara. Johnson et al. (1987) analisaram a progênie de plantas de aveia regeneradas que apresentavam um cromossomo telocêntrico. Embora o delineamento experimental tenha sido determinado de forma que permitisse a ocorrência de homozigotos para deficiência, estes não foram observados. Os autores sugeriram que os gametas deficientes podem não ser viáveis ou apresentaram alguma desvantagem em relação aos normais, tanto no pólen quanto no óvulo.

Em milho, Benzion e Phillips (1988) regeneraram plantas a partir de culturas derivadas de embriões imaturos, por um período de 3 a 20 meses. Do total de 59 plantas regeneradas, 12 apresentavam uma deleção, que consistia de aproximadamente 10% do braço curto do

cromossomo 5, em estado heterozigótico. Estas plantas apresentaram 50% de redução da fertilidade do pólen.

Analisando culturas embriogênicas, derivadas de linhagens e híbridos de milho da família 1-3, Gardingo (1998) observou a ocorrência vários tipos de alterações envolvendo os knobs do braço curto e longo do cromossomo 7, inclusive amplificação de K7L, e sugeriu que poderia ter ocorrido troca desigual entre cromátides irmãs dentro da região de DNA repetitivo. Esta hipótese foi reforçada pela observação de metáfases onde o cromossomo 7 apresentava cromátides irmãs com tamanhos diferentes de banda-C. Esta via permitiria o surgimento de alterações internas do tamanho do knob sem alterar o segmento terminal eucromático do braço longo do cromossomo 7.

Em *Allium sativa*, Dolezel & Novak (1986, 1987) observaram que a frequência de trocas entre cromátides irmãs aumentou significativamente *in vitro*, em presença de baixa concentração de 2,4-D. Por outro lado, a análise de trocas entre cromátides em cultura de tecidos de trigo mostrou que a frequência deste evento é dependente do genótipo, e aumenta a medida que a concentração de 2,4-D ou sacarose no meio de cultura é aumentada (Pijnacker e Ferwerda, 1994).

Dimitrov (1987) observou que em *Crepis capillaris* a maioria dos eventos de trocas entre cromátides irmãs ocorreram nas junções entre regiões de replicação tardia (heterocromatina) e a eucromatina. Portanto, as regiões de DNA repetitivo são candidatas à ocorrência de troca desigual entre cromátides. Peschke e Phillips (1992) sugeriram que a hipótese da ocorrência de atraso maior que o usual na replicação da heterocromatina, confirmada por Fluminhan et al. (1996), talvez possa explicar o aumento na frequência de trocas entre cromátides irmãs em cultura de tecidos.

Se o cromossomo 7 com amplificação no knob fosse resultante de ciclos de quebra-fusão-ponte, o segmento eucromático após o knob poderia ser de tamanho diferente do observado no cromossomo normal. Entretanto, se fosse resultante de troca desigual entre cromátides irmãs, este segmento necessariamente seria do mesmo tamanho do observado no cromossomo normal.

A análise de cromossomos paquitênicos mostrou que não existe diferença entre o tamanho do segmento após K7L do cromossomo normal e do cromossomo com amplificação (em estado homozigótico ou heterozigótico) (Tabela 15 e 16). Estes resultados sugerem a ocorrência de troca desigual entre cromátides irmãs, mas não descarta definitivamente a hipótese da ocorrência de ciclos de quebra-fusão-ponte, pois a quebra no cromossomo dicêntrico poderia ocorrer de forma a resultar num segmento eucromático do mesmo tamanho do observado no cromossomo normal.

Em plantas heterozigóticas para K7L amplificado, se tivesse ocorrido ciclo de quebra-fusão-ponte o segmento eucromático, correspondente a uma duplicação da região adjacente ao knob, poderia de se parear com a região correspondente do homólogo, ou do próprio cromossomo, ou ainda não se parear.

A Figura 12e parece indicar a ocorrência de não pareamento na região distal do braço longo do cromossomo 7 com amplificação e condensação e uma condensação do segmento eucromático.

No caso da ocorrência de troca desigual entre cromátides irmãs, o segmento eucromático distal do braço longo seria igual ao do cromossomo normal, e portanto poderia ocorrer o pareamento. O tamanho do knob amplificado é muito maior (quase o dobro) do knob normal, sendo necessário, no caso de plantas heterozigóticas para K7L amplificado, que este se curve, ou então que a eucromatina se estique

para permitir o pareamento. Várias figuras observadas parecem indicar a ocorrência de pareamento entre a extremidade final dos homólogos, inclusive em alguns casos pode-se observar a presença de um cromômero na extremidade (Figura Figuras 11, 12c, 12d). A medida do tamanho do knob em plantas heterozigóticas para K7L amplificado foi maior que o do cromossomo normal, mas ligeiramente menor que o de plantas homozigóticas. Isto sugere que o knob pode estar se dobrando para permitir o pareamento. Figuras de paquíteno e diplóteno, mostram que em alguns casos a eucromatina se estica (Figuras 10a, 11c, 11d) para alcançar o segmento final do homólogo.

Embora as evidências apresentadas pareçam indicar a ocorrência de troca desigual entre cromátides irmãs durante o cultivo, não podemos descartar totalmente a hipótese de que o cromossomo 7 com knob amplificado tenha sido resultante de ciclo de quebra-fusão-ponte. Através de hibridação *in situ* fluorescente (FISH), utilizando-se como sonda sequências de genes localizados nas extremidade do braço longo do cromossomo 7 ou sequências referentes a esta região identificadas através de RFLP, esta questão poderá ser melhor esclarecida.

Laptan et al. (1988) investigaram a ocorrência de amplificação de sequências repetitivas da heterocromatina telomérica de centeio em híbridos trigo x centeio, regeneradas a partir de embriões imaturos. A análise de metáfases, através de hibridação *in situ*, permitiu a detecção da amplificação de uma família de sequência repetitiva em plantas regeneradas, e mostrou ainda que houve diferenças entre plantas no número de sequências amplificadas, indicando a ocorrência de diferentes eventos de amplificação em cultura de tecidos. Entretanto, o mecanismo pelo qual ocorreu a amplificação não foi discutido.

A análise de diacineses mostrou a ocorrência de nove bivalentes e dois univalentes (grandes ou pequenos) (9II+2I). Foi verificado, através da análise de diacineses coradas pela metodologia de bandamento-C, que o univalente grande corresponde aos cromossomo 7, e o univalente pequeno não apresenta banda-C (Figura 3).

Em todas as plantas analisadas (somaclones e controle) foi observada a presença de um bivalente grande com uma região descondensada (Figura 4). A análise de bandas-C revelou que este cromossomo não apresenta banda, e devido ao seu tamanho, pode corresponder ao cromossomo 1.

Aberrações cromossômicas como inversões paracentrômicas originam uma ponte com fragmento na anáfase I. Entretanto, nos materiais analisados foi observada a presença de uma ponte sem fragmento, o que sugere que estas não estão relacionadas a inversões. Provavelmente estas pontes podem ser resultantes do cromossomo com uma região descondensada, como sugere a Figura 8, ou resultam de eventos de 'misdivision' em seu estágio final (Figura 7).

A análise de paquíteno foi realizada com o objetivo de avaliar a ocorrência de outras aberrações não detectadas através do bandamento-C de metáfases mitóticas. Figuras características da ocorrência de translocação e de inversão não foram observadas nos somaclone analisados. Isto indica que todos os outros cromossomos permaneceram intactos durante o cultivo *in vitro*, conforme pode ser observado na Figura 12.

Recentemente, Gardingo (1998) analisou vários calos embriogênicos obtidos a partir de embriões imaturos derivadas de linhagens e híbridos pertencentes à família 1-3. Foi observado que o cromossomo 7 apresentou a maior frequência de aberrações, envolvendo K7L e K7S. Isto sugere que o knob do cromossomo 7 apresenta uma

propensão maior a quebras durante o cultivo *in vitro*, em relação a outros cromossomos que apresentam knobs.

Um estudo recente sobre a estrutura do knob do cromossomo 9 do milho mostrou a ocorrência de retrotransposons intercalando sequências de 185 pb característica do knob do milho (Ananiev et al., 1998). É possível que no knob do cromossomo 7 ocorram também inserções de elementos transponíveis, os quais poderiam ser ativados durante o cultivo *in vitro*, conforme proposto por Phillips et al. (1990) e Peschke e Phillips (1992). A investigação da estrutura do knob do cromossomo 7, através de hibridação *in situ* de sequências características de retrotransposons e transposons, contribuirá para uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na quebra deste knob.

A plantas regeneradas do subclone 2-N6 não apresentaram alterações detectadas pelo bandamento-C em cromossomos mitóticos e através da análise meiótica, porém sua frequência de univalentes na diacinese, bem como a do subclone 1-MS2, foram maiores que a das plantas controle. Indicando que este genótipo apresenta-se muito promissor obtenção de culturas de longa duração, mantendo sua capacidade para regeneração de plantas e com estabilidade cromossômica.

Os subclones 1-MS2 e 2-N6 foram obtidos a partir de um mesmo embrião imaturo, mas reagiram diferentemente ao estresse causado pelo cultivo *in vitro*, indicando que a seleção de regiões embriogênicas tem um papel importante na obtenção de culturas com estabilidade cromossômica.

5.1.2. Cultura 3-57

O cromossomo 7 com uma deficiência e duplicação no braço curto (7S/DF-DP) foi observado previamente na cultura 3-57, através da análise de metáfases coradas pelo bandamento-C (Fluminhan et al., 1996; Santos, 1995). A análise periódica de diferentes subclones mostrou a ocorrência de outros tipos de cromossomos 7 com alterações no braço curto, evidenciando a ocorrência de ciclos de quebra-fusão-ponte *in vitro*. O cromossomo 7 portador de DF-DP foi mantido na cultura sem novas alterações, provavelmente pela adição de um telômero na extremidade quebrada (Santos, 1995).

A transmissão deste cromossomo para plantas regeneradas foi investigada através da análise de metáfases mitóticas, coradas pelo bandamento-C (Tabela 19). Foi verificado que aproximadamente 46% das plantas R₁ apresentaram o cromossomo 7 com DF-DP em estado heterozigótico. Nenhuma planta homozigótica para esta aberração foi observada. Plantas R₂ também apresentaram este cromossomo mas com uma frequência muito menor.

O cromossomo observado nas metáfases analisadas é semelhante ao cromossomo encontrado nos calos (Santos, 1995), o que indica a ocorrência de cicatrização telomérica *in vitro*. Estudos sobre a adição de telômero relatam o envolvimento da telomerase no processo (revisão em Greider et al., 1993). Em tabaco, Fajkus et al. (1998) mostraram que ocorre alta atividade da telomerase *in vitro*, refletindo um mecanismo regulatório em células vegetais que controla a ação da telomerase para compensar a perda de sequências teloméricas durante a replicação, uma vez que na cultura de tecidos ocorre intensa multiplicação celular.

A ausência de homozigotos sugere que a transmissão deste cromossomo através do pólen, ou do óvulo, não ocorre. É possível que o pólen com o cromossomo 7 alterado, com uma região a mais de heterocromatina, seja menos eficiente na competição pela fecundação do óvulo. Outra possibilidade seria que sementes homozigóticas para DF-DP não germinam. Cerca de 26% das sementes não germinaram, entretanto, não se pode afirmar que estas eram homozigóticas para DF-DP. A análise de espigas obtidas do cruzamento entre plantas que apresentam DF-DP e plantas normais e vice-versa, poderá fornecer novas informações sobre o assunto.

O comportamento meiótico do cromossomo 7 com DF-DP foi investigado. A análise de paquíteno foi dificultada pela ocorrência de adesão entre knobs, que é uma característica da linhagem original, uma vez que adesões entre cromossomos foram observadas também em plantas controle (Figura 14, 15 e 17). Entretanto, algumas figuras do cromossomo 7 isolado foram obtidas (Figuras 18 e 19). Foi observado que o segmento duplicado em tandem reverso não se pareou com a região correspondente no cromossomo homólogo, e que em alguns casos ocorreu adesão entre K7L e K7S, ou entre estes knobs e o knob de outros cromossomos.

Em plantas controle foi verificado que em alguns casos esta adesão entre knobs poderia perdurar até o final do paquíteno, com indícios de que mesmo na diacinese os cromossomos ainda estariam ligados (Figura 15). Estas observações podem explicar a ocorrência de aparentes trivalentes e quadrivalentes na diacinese.

A ausência de figuras no paquíteno características de translocação descarta a possibilidade de que o cromossomo com DF-DP tenha se originado de uma translocação, e constitui em forte argumento para a proposta de que o cromossomo 7 com deficiência e duplicação no

braço curto é resultante de ciclos de quebra-fusão-ponte, e que se estabilizou em decorrência de cicatrização telomérica (Fluminhan et al., 1996; Santos 1995).

A análise de diacineses mostrou a ocorrência de um par heteromórfico bem característico, conforme esperado para esta aberração (Figuras 20 e 21). Em algumas figuras pode-se visualizar os knobs, embora não tenha sido realizada a coloração pelo método de bandamento-C.

McClintock (1939, 1942) demonstrou que ocasionalmente, durante o ciclo de quebra-fusão-ponte os cromossomos que apresentavam as extremidades quebradas tornavam-se estáveis ou "cicatrizavam". O processo de cicatrização foi assumido como adição de um novo telômero (McClintock, 1984), embora isto não tenha sido caracterizado molecularmente.

As investigações sobre o processo de cicatrização a nível molecular são muito recentes (revisão em Blackburn, 1991; Richards et al., 1993; Greider et al., 1993; Beissmann & Mason, 1992 e 1994).

Os eventos de cicatrização parecem ocorrer por dois caminhos: a recombinação entre homólogos e a síntese de um novo telômero. A adição de novas sequências teloméricas foi observada na cicatrização de cromossomos em *Schizoccharomyces pombe*, *Plasmodium* e humanos. Nestes dois últimos, os cromossomos cicatrizados foram caracterizados a nível de sequência de DNA. Foi observada uma transição abrupta da sequência codificadora de um gene conhecido, para sequências teloméricas, sugerindo que os telômeros foram adicionados nas extremidades quebradas (revisão em Blackburn, 1991). A telomerase é capaz de promover a cicatrização do cromossomo pela adição de sequências teloméricas em DNA não telomérico (revisão em Greider et al, 1993).

Werner et al. (1992) estudaram a distribuição de sequências teloméricas em trigo e sua função na cicatrização de cromossomos que sofreram deleção. Através de hibridação *in situ* com sondas sintéticas de sequências teloméricas de *A. thaliana*, foi observado que todos os cromossomos, inclusive aqueles com deleções, apresentaram sítio de hibridação em ambas extremidades. Estes resultados sugerem a ocorrência de mecanismos de cicatrização envolvendo a adição de sequências teloméricas nas extremidades quebradas dos cromossomos.

Wang et al. (1992) obtiveram resultados semelhantes em *Hordeum vulgare*, através de hibridação *in situ* com sequências teloméricas de *A. thaliana*. Foi observada a ocorrência de cicatrização em cromossomos de linhagens aneuplóides contendo cromossomos quebrados, através de adição de sequências teloméricas nas extremidades quebradas, o que explica a estabilidade desses cromossomos alterados através de muitas gerações.

A análise prévia da cultura 3-57 (Santos, 1995) mostrou aberrações envolvendo os knobs do braço curto dos cromossomos 7 e 9, interpretadas como deficiência e duplicação, resultantes de ciclos de quebra-fusão-ponte. Várias destas alterações (inclusive um micro-cromossomo que se derivou do cromossomo 9) permaneceram estáveis na cultura. Análise de anáfases mitóticas mostrou uma tendência à diminuição da frequência de pontes anafásicas com o aumento da idade da cultura. Estas observações dão evidências de que ciclos de quebra-fusão-ponte não se acumulam indefinidamente nas culturas, e que os cromossomos com extremidades quebradas cicatrizam, isto é, adquirem um novo telômero *in vitro*. Os resultados obtidos no presente estudo confirmam, portanto, que o cromossomo 7 com deficiência e duplicação no braço curto é resultante de ciclos de quebra-fusão-ponte, e que

ocorreu estabilização do cromossomo pela adição de sequências teloméricas na extremidade quebrada.

A aplicação da técnica de hibridação *in situ* para análise dos cromossomos com aberrações permitirá a obtenção de novas evidências e informações sobre a cicatrização dos cromossomos, regiões dos cromossomos em que as sequências são adicionadas, bem com o tamanho dos telômeros em culturas de longa duração que poderiam estar “imortalizadas”.

5.2. Resposta embriogênica e regeneração de plantas a partir de culturas de curta duração (2-3 meses)

A correlação entre genótipo e resposta embriogênica em cultura de calos iniciados a partir de embriões imaturos é bem documentada (Green e Phillips, 1975; Vasil et al., 1984; Tomes e Smith, 1985; Kamo et al., 1986; Bhaskaran e Smith, 1990).

Poucos genótipos de milho são capazes de formar calos tipo II, o que sugere a ocorrência de um controle genético na determinação do nível de resposta ao cultivo *in vitro* (Tomes e Smith, 1985; Henry et al., 1994).

Os resultados da frequência de embriogênese obtidos no presente estudo (Tabela 21), são comparáveis aos melhores genótipos descritos na literatura (Bohorova et al., 1995; Prioli e Silva, 1989; Hodges et al., 1986), e superior aos genótipos de origem tropical e subtropical testados por Furini e Jewell (1994). Os dados confirmam os resultados obtidos por Gardindo (1998) que utilizou as mesmas linhagens, exceto a linhagem 13342/2, para avaliação da resposta embriogênica.

As Figuras 25 e 26 mostram calos com 45 dias de idade, apresentando grande quantidade de embriões somáticos em sua superfície. Os calos apresentam-se com características dos calos tipo II descritos por Armstrong & Green (1985), exceto a linhagem 13342/2 que apresentou calo uma tendência de formar calos mais compactos.

A resposta embriogênica de linhagens adaptadas a regiões tropicais e subtropicais tem sido investigada (Prioli e Silva, 1989; Furini & Jewell, 1994; Bohorova et al., 1995). Foi verificado que algumas linhagens apresentam alta frequência de genes que controlam a resposta embriogênica e a regeneração de plantas, entre elas encontram-se linhagens derivadas a raça Cateto (Prioli e Silva, 1989), que é um dos componentes da variedade usada como fonte das linhagens utilizadas no presente estudo (Fluminhan e Aguiar-Perecin, 1998). Portanto, estas linhagens podem ter acumulado segmentos cromossômicos importantes para a resposta embriogênica, derivados do ancestral da raça Cateto.

A regeneração de plantas foi realizada 2-3 meses após o início da cultura. A etapa de manutenção do calo com embriões somáticos em sua superfície em meio contendo 0,5 mg/l de 2,4-D, no escuro e depois sob luz, foi importante para que os embriões que estavam muito pequenos se desenvolvessem, permitindo uma sincronização no processo de regeneração de plantas. Alguns pontos no processo foram críticos, como por exemplo a passagem dos embriões germinados para frascos, onde a densidade de embriões é importante, sendo indicado 8-15 embriões germinados por frasco. Outra etapa importante refere-se à aclimação das plantas em estufa. Outra etapa importante refere-se à aclimação das plantas em casa de vegetação, sendo que o grau de umidade, temperatura, época do ano e intensidade de luz são pontos

que ainda devem ser melhorados para obtenção de maior rendimento de regenerantes férteis

De maneira geral, a média de plantas regeneradas por calo foi alta (Tabela 23), sendo semelhante ao obtido para a linhagem A188 por Hodges et al. (1986). Os resultados são superiores aos obtidos por Furini e Jewell (1994) em genótipos tropicais e subtropicais, e por Hodges et al. (1986) em diversas linhagens e em híbridos obtidos através do cruzamento destas linhagens com A188. O maior rendimento de plantas por calo foi obtido no híbrido 132331/1 x 13342/5, o qual apresentou maior frequência de calos embriogênicos e maior estabilidade cromossômica no estudo realizado por Gardingo (1998).

A análise mitótica e meióticas das plantas regeneradas mostrou que os genótipos investigados apresentam estabilidade cromossômica. Gardingo (1998) encontrou baixa frequência de aberrações na análise de calos com 2-4 meses de idade, derivados de genótipos semelhantes aos utilizados no presente estudo. Embora não tenha sido realizada a análise do calos para investigação de aberrações na cultura, pode-se afirmar que se ocorreram alterações nos calos estudados, estas aberrações não foram transmitidas para plantas regeneradas no início da cultura. Isto pode ocorrer porque as células com alterações cromossômicas observadas nos calos nem sempre participam na regeneração de plantas.

Os dados revelam que os genótipos utilizados no presente estudo são excelentes para a obtenção de culturas de curta, com capacidade para regeneração de plantas com estabilidade cromossômica. Portanto, serão promissoras para obtenção de plantas transgênicas de milho.

6. CONCLUSÕES

1. O cromossomo 7 com amplificação no knob do braço longo, observado no subclone 1-MS2 da cultura 12-F, foi transmitido para plantas R₁, entretanto, ocorreram desvios da segregação mendeliana esperada.
2. A constatação da presença de plantas homozigóticas para o cromossomo com K7L amplificado, bem como a observação de que o segmento eucromático distal do braço longo não difere entre plantas homozigóticas para presença e ausência da amplificação, sugere que a interpretação anterior de esta aberração seria decorrente de ciclo de quebra-fusão-ponte deve ser reavaliada. Esta amplificação pode ter se originado de troca desigual entre cromátides irmãs *in vitro*.
4. A estabilidade mitótica e meiótica observada no subclone 2-N6 sugere que a linhagem original (13342/5) permite a seleção para culturas de longa duração (28-29 meses), apresentando capacidade para regeneração de plantas férteis e com estabilidade cromossômica.
5. O cromossomo 7 com deficiência e duplicação no braço curto, observado na cultura 3-57, foi transmitido para plantas R₁ e R₂, sem ocorrência de novas alterações, indicando que este é resultante de ciclos de quebra-fusão-ponte e posterior cicatrização telomérica. Não foram observados homozigotos para esta aberração.

6. As linhagens utilizadas na obtenção das culturas 12-F e 3-57 apresentam um bivalente com uma região descondensada na diacinese. É possível que este bivalente seja formado pelo cromossomo 1.
7. As linhagens 13342/2, 13342/5 e 132331/1, e seus respectivos híbridos, apresentam alta capacidade para obtenção de calos embriogênicos tipo II e para regeneração de plantas férteis e com estabilidade cromossômica, a partir de culturas de curta duração (2-3 meses) que poderão ser utilizadas em programas envolvendo transformação de plantas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR-PERECIN, M.L.R. de. C-banding in maize. I. Band patterns. **Caryologia**, v.38, p.23-30, 1985.

AGUIAR-PERECIN, M.L.R. de; DECICO, J.U. Preliminary results on the segregation of knobs (C-bands) in inbred lines from a flint variety. **Maize Genetics Cooperation Newsletter**, v.62, p.100, 1988.

AGUIAR-PERECIN, M.L.R. de & FLUMINHAN JUNIOR, 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, p.37-42, 1985.

ANANIEV, E.V.; PHILLIPS, R.L.; RINES, H.W. Complex structure of knob DNA on maize chromosome: retrotransposon invasion into heterochromatin. **Genetics**, v. 149, p. 2025-2037, 1998.

ARMSTRONG, C.L. The first decade of maize transformation: a review and future perspective. **Maydica**, v.44, p.101-109, 1999.

ARMSTRONG, C.L. & GREEN, C.E. Establishment and maintenance of friable, embryogenic maize callus and the involvement of L-proline. **Planta**, v.164, p.207-214, 1985.

- ARMSTRONG, C.L. & PHILLIPS, R.L. Genetic and cytogenetic variation in plants regenerated from organogenic and friable, embryogenic tissue cultures of maize. **Crop Science**, v.28, p.363-369, 1988.
- 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.
- ARMSTRONG, C.L.; PARKER, G.B.; PERSHING, J.C.; BROWN, S.M.; SANDERS, P.R.; DUNCAN, D.R.; STONE, T.; DEAN, D.A.; DEBOER, D.L.; HART, J.; HOWE, A.R.; MORRISH, F.M.; PAJEAU, M.E.; PETERSEN, W.L.; REICH, B.J.; RODRIGUEZ, R.; SANTINO, C.G.; SATO, S.J.; SCHULER, W.; SIMS, S.R.; STEHLING, S.; TAROCHIONE, L.; FROMM, M.E. Field evaluation of European corn borer control in progeny of 173 transgenic corn events expressing na insecticidal protein from *Bacillus thuringiensis*. **Crop. Science**, v.35, p.550-557, 1995.
- 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 Pflanzenzuechtung**, v.91, p.233-245, 1983.
- BAYLISS, M.W. Chromosomal variation in plant tissues in culture. **International Review of Cytology Suppl.**, v.11, p.113-144, 1980.
- BENZION, G. & PHILLIPS, R.L. Cytogenetic stability of maize tissue cultures: a cell line pedigree analysis. **Genome**, v.30, p.318-325, 1988.
- BHASKARAN, S.; SMITH, R.H. Regeneration in cereal tissue culture: A review. **Crop Science**, v.30, p.1328-1337, 1990.

- BIESSMANN, H. & MASON, J.M. Genetics and molecular biology of telomeres. **Advances in Genetics**, v.30, p.185-249, 1992.
- BIESSMANN, H. & MASON, J.M. Telomeric repeats sequences. **Chromosoma**, v.103, p.154-161, 1994.
- BLACKBURN, E.H. Structure and function of telomeres. **Nature**, v.350, p.569-573, 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, p.275-281, 1995.
- BROWN, P.T.H. DNA methylation in plants and its role in tissue culture. **Genome**, v.31, p.717-729, 1989.
- CHU, C.C.; WANG, C.C.; SUN, C.S.; HSU, K.C.; YIN, C.Y.; CHU, C.Y.; BI, 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.
- DECICO, J.U. Análise da segregação de knobs em progênies F2 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. & PEACOCK, W.J. Knob heterochromatin homology in maize and its relatives. **Journal of Molecular Evolution**, v.20, p.341-350, 1984.
- DIMITROV, B. Relationship between sister-chromatid exchanges and heterochromatin or DNA replication in chromosomes of *Crepis capillaris*. **Mutation Research**, v.190, p. 271-276, 1987.

- DOERSCHUG, E.B. S. Studies of Dotted, a regulatory element in maize. I. Induction of Dotted by chromatid breaks. II. Phase variation of Dotted. **Theoretical and Applied Genetics**, v.43, p.182-189, 1973.
- DOLEZEL, J.; NOVAK, F.J. Sister chromatid exchanges in garlic (*Allium sativum* L.) callus cells. **Plant Cell Reports**, v.5, p.280-283, 1986.
- DOLEZEL, J.; LUCRETTI, S.; NOVAK, F.J. The influence of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on cell cycle kinetics and sister-chromatid exchange frequency in garlic (*Allium sativa* L.) meristem cells. **Biologia Plantarum**, v.29, p.253-257, 1987.
- 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, p.39-56, 1981.
- FAJKUS, J.; FULNECKOVÁ, J; HULÁNOVÁ, H; BERKOVÁ, K.; RÍHA, K.; MATYÁSEK, R. Plant cells express telomerase activity upon transfer to callus culture, without extensively changing telomere lengths. **Molecular and General Genetics**, v.260, p.470-474, 1998.
- FLUMINHAN JUNIOR, A. Cultivo *in vitro* de milho (*Zea mays*) e análise de sua instabilidade mitótica. Piracicaba, 1992, 213p. (Mestrado-Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).
- FLUMINHAN JUNIOR, 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 JUNIOR, A.; AGUIAR-PERECIN M.L.R.. Embriogenic response and mitotic instability in callus cultures derived from maize

- inbred lines differing in heterochromatic knob content of chromosomes. **Annals of Botany**, v.82, p. 569-576, 1998.
- FLUMINHAN JUNIOR, A., AGUIAR-PERECIN M.L.R.; SANTOS, J.A. Evidence for heterochromatin involvement on chromosome breakage in maize callus culture. **Annals of Botany**, v.78, p.73-81, 1996.
- FROMM, M.E.; MORRISH, F.; ARMSTRONG, C.; WILLIAMS, R.; THOMAS, J.; KLEIN, T.M. inheritance and expression of chimeric genes in the progeny of transgenic maize plants. **Bio/Technology**, v.8, p.833-839, 1990.
- 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, p.155-164, 1994.
- GANAL, M.W., LAPITAN, N.L.V., TANKSLEY, S.D. Macrostructure of the tomato telomeres. **The Plant Cell**, v.3, p.87-94, 1991.
- GARDINGO, J.R. Resposta embriogênica e estabilidade cromossômica em calos derivados de linhagens e híbridos de milho (*Zea mays* L.). Piracicaba, 1998, 125p. Dissertação (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- GILL, B.S.; BURNHAM, C.R.; STRINGAM, G.R.; STOUT, J.T.; WEINHEIMER, W.W. Citological analysis of chromosomal translocations in the tomato: preferential breakage in heterochromatin. **Canadian Journal of Genetics and Cytology**, v.22, p.333-341, 1980.
- GORDON-KAMM, W.J.; SPENCER, T.M.; MANGANO, M.L.; ADAMS, T.R.; DAINES, R.J.; START, W.G.; O'BRIEN, J.V.; CHAMBERS, S.A.; ADAMS JUNIOR, W.R.; WILLETTS, N.G.; RICE, T.B.; MACKEY, C.J.; KRUEGER, R.W.; KAUSCH, A.P.; LEMAUX, P.G. Transformation of

- maize cells and regeneration of fertile transgenic plants. **The Plant Cell**, v.2, p.603-618, 1990.
- GREEN, C.E. *In vitro* plant regeneration in cereals and grasses. In: THORPE, T.A., ed. **Fronteirs of plant tissue culture**. Calgary, University of Calgary Press, 1978. p.411-418.
- GREEN, C.E. Somatic embriogenesis and plant regeneration from the friable callus of *Zea mays*. In: FUJIWARA, A., ed. **Plant tissue culture**. Tokyo, Maruzen., 1982. p.107-108.
- GREEN, C.E. & PHILLIPS, R.L. Plant regeneration from tissue cultures of maize. **Crop Science**, v.15, p.417-421, 1975.
- GREEN, C.E.; ARMSTRONG, C.L.; ANDERSON, P.A. Somatic cell genetic systems in corn. In: DOWNEY, K.; VOELLMY, R.W.; AHMAD, F.; SCHULTZ, J., ed. **Advances in gene technology: molecular genetics of plants and animals**. New York, Academic Press, 1983. p.147-157 (Miami Winter Symposia, 20).
- 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.
- GREIDER, C.W. Telomeres, telomerase and senescence. **BioEssays**, v.12, p.363-369, 1990.
- GREIDER, C.W. Chromosome first aid. **Cell**, v.67, p.645-647, 1991
- GREIDER, C.W.; AUTEXIER, C.; AVILION, A.A.; COLLINS, K.; HARRINGTON, L.A.; MANTELL, L.L.; PROWSE, K.R.; SMITH, S.K.; ALLSOPP, R.C.; COUNTER, C.M.; VAZIRI, H.; BACCHETTI, S.; HARLEY, C.B. Telomeres and telomerase: biochemistry and regulation in senescence and immortalization. In: HESLOP-HARRISON, J.S. & FLAVELL, R.B., ed. **The chromosome**. John

Innes Centre, Colney Leane, Norwich NR4 7UH, UK, Bios Scientific Publishers, 1993. p.115-125.

HADLACZKY, G.Y. & KALMAN, L. Discrimination of homologous chromosomes of maize with Giemsa staining. **Heredity**, v.35, p.371-374, 1975.

HARBER, J.E. & THORBURN, P.C. Healing of broken linear dicentric chromosomes in yeast. **Genetics**, v.106, p.207-26, 1984.

HARBER, J.E.; THORBURN, P.C.; ROGERS, D. Meiotic and mitotic behavior of dicentric chromosomes in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics**, v.106, p.185-208, 1984.

HARTWELL, L.H.; SMITH, D. Altered fidelity of mitotic chromosome transmission in cell cycle mutants of *S. cerevisiae*. **Genetics**, v.110, p.381-395, 1985.

HENRY, Y.; VAIN, P.; DE BUYSER, J. Genetic analysis of in vitro plant tissue culture responses and regeneration capacities. **Euphytica**, v.79, 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.

HOLM, C.; STEARNS, T; BOTSEIN, D. DNA topoisomerase II must act at mitosis to prevent nondisjunction and chromosome breakage. **Molecular Cell and Biology**, v.9, p.159-168, 1989.

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

- 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, p.439-46, 1987.
- KAEPLER, S.M.; PHILLIPS, R.L. DNA methylation and tissue culture-induced variation in plants. **In Vitro Cell Development and Biology**, v.29, p.125-130, 1993b.
- KAEPLER, S.M.; PHILLIPS, R.L. Tissue culture-induced DNA methylation variation in maize. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.90, p.8773-8776, 1993b.
- KAMO, K.K. & HODGES, T.K. Establishment and characterization of long-term embryogenic maize callus and cell suspension cultures. **Plant Science**, v.45, p.111-117, 1986.
- KLEIN, T.M.; WOLF, E.D.; WU, R.; SANFORD, J.C. High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. **Nature**, v.327, p.70-73, 1987.
- KLEIN, T.M.; KORNSTEIN, L.; SANFORD, J.C.; FROMM, M.E. Genetic transformation of maize cells by particle bombardment. **Plant Physiology**, v.91; p.440-444, 1989.
- KLEIN, T.M.; FROMM, M.; WEISSINGER, A.; TOMES, D.; SCHAAF, S.; SLETTEN, M.; SANFORD, J.C. Transfer of foreign genes into intact maize cells with high-velocity microprojectiles. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.85, p.4305-4309, 1988.
- KOZIEL, M.G.; BELAND, G.L.; BOWAMAN, C.; COROZZI, N.B.; CRENSHAW, R.; CROSSLAND, L.; DAWSON, J.; DESAI, N.; HILL, M.; KADWELL, S.; LAUNIS, K.; LEWIS, K.; MADDOX, D.; McPHERSON, K.; MEGHJI, M.R.; MERLIN, E.; RHODES, R.;

- WARREN, G.W.; WRIGHT, M.; EVOLA, S.V. Field performance of elite transgenic maize plants expressing an insecticidal protein derived from *Bacillus thuringiensis*. **Bio/Technology**, v.11, p.194-200, 1993.
- 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, p.547-554, 1984.
- LAPITAN, N.L.V.; SEARS, R.G.; GILL, B.S. Amplification of regenerated DNA sequences in wheat x rye hybrids regenerated from tissue culture. . **Theoretical and Applied Genetics**, v.75, p.381-388, 1988.
- LAURIE, D.A.; BENNETT, M.D. Nuclear DNA content in the genera *Zea* and *Sorghum*: intergeneric, interspecific and intraspecific variation. **Heredity**, v.55, p.307-313, 1985.
- LEE, M. & PHILLIPS, R.L. Genomic rearrangements in maize induced by tissue culture. **Genome**, v.29, p.122-128, 1987.
- 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. p.277-325.
- LONGLEY, A.E. Knob positions on corn chromosomes. **Journal of Agricultural Research**, v.57, p.475-490, 1939.
- 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, p.125-132, 1985.

- LU, C.; VASIL, I.K.; OZIAS-AKINS, P. Somatic embryogenesis in *Zea mays* L. **Theoretical and Applied Genetics**, v.62, p.109-112, 1982.
- LUKASZEWSKI, A.J. Chromatid and chromosome type breakage-fusion-bridges cycles in wheat (*Triticum aestivum* L.). **Genetics**, v.140, p.1069-1085, 1995.
- Maize Genetics Cooperation Newsletter**, v.68, p.176, 1994
- McCLINTOCK, B. Chromosome morphology in *Zea mays*. **Science**, v.60, p.629, 1929.
- McCLINTOCK, B. Genetic and cytological studies of maize. **Carnegie Institute Wash. Year Book**, v.58, p.452-467, 1959.
- McCLINTOCK, B. Chromosome organization and genic expression. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**, v.16, p.13-47, 1951.
- 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 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.
- McCLINTOCK, B. The significance of responses of the genome to challenge. **Science**, v.226, p.792-801, 1984.
- 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 stability of broken ends of chromosomes in *Zea mays*. **Genetics**, v.26, p.234-282, 1941.
- 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, 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, p.37-50, 1982.
- MILES, J.H. Probable weak fusion of chromatids during a breakage-fusion-bridge cycle. **Maize Genetics Cooperation Newsletter**, v.45, p.136-139, 1971.
- MOLINA, M.C. & GARCIA, M.D. Citogenetic 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.
- MOROCZ, S; DONN, G; NÉMETH, J.; DUDITS, D. An improved system to obtain fertile regenerats via maize protoplasts isolated from a highly embiogenic suuspension cuulture. **Theoretical and Applied Genetics**, v.80, p.721-726, 1990.
- MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-497, 1962.
- 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.
- MURRY, L.E.; ELLIOT, L.G.; CAPITANT, S.A.; WEST, J.A.; HANSON, K.K.; SCARAFIA, L.; JOHNSTON, S.; DELECA-FLAHERTY, C.; NICHOLS, S.; CUNANAN, D.; DIETRICH, P.S.; METTLER, I.J.; DEWALD, S.; WARNICK, D.A.; RODES, C.; SINIBALDI, R.M.; BRUNKE, K.J. Transgenic corn plants expressing MDMV strain B coat protein are resistant to mixed infections of maize dwarf mosaic virus and maize chlorotic mottle virus. **Bio/Technology**, v.11, p.1559-1564, 1993.
- NEUEFFER, M.G.; COE, E.H.; WESSLER, S.R. Cytological map. In: **Mutantes of Maize**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, NY. p.32, 1997.
- NEUEFFER, M.G.; JONES, L.; ZUBER, M.S. **The mutants of maize**. Crop Science Society of America, 1968. 74p.
- 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 of Sciences of the United States of America**, v.78, p.4490-4494, 1981.
- 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, p.121-129, 1991.
- PETERSON, C.L. The SMC family: novel motor proteins for chromosome condensation? **Cell**, v.79, p.389-392, 1994.

- PHILLIPS, R.L. Somaclonal and gametoclonal variation. **Genome**, v.31, p.1119-1120, 1989.
- PHILLIPS, R.L.; KAEPPLE, S.M.; OLHOFT, P. Genetic instability of plant tissue cultures: breakdown of normal controls. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.91, p.5222-5226, 1994.
- PHILLIPS, R.L.; KAEPPLE, S.M.; PESCHKE, V.M. Do we understand somaclonal variation? In: NIJKAMP, H.J.J.; VAN DER PLAS, L.H.W.; VAN AARTRIJK, J. **Progress in plant cellular and molecular biology**. 1990. p.131-141.
- PIJNACKER, L.P.; FERZERDA, M.A. Sister chromatid exchanges in cultured immature embryos of wheat species and regenerants. **Theoretical and Applied Genetics**, v.89, p.287-292, 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**. 3ed. Madison, ASA/CSSA/SSSA, 1988. p.345-387. (Agronomy Monographs, 18).
- PRIOLI, L.M. & SILVA, W.J. Somatic embryogenesis and plant regeneration capacity in tropical maize inbreds. **Revista Brasileira de Genética**, v.12, p.553-66, 1989.
- PRIOLI, L.M. & SÖNDHAL, M.R. Plant regeneration and recovery of fertile plants from protoplasts of maize (*Zea mays* L.). **Bio/Technology**, v.7, p.589-594, 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 United States of America**, v.77, p.6705-6709, 1980.

- RHOADES, M.M. Preferential segregation in maize. **Genetics**, v.27, p.395-407, 1942.
- RHOADES, M.M. Preferential segregation in maize. **Heterosis**, Iowa State College Press. 1952. pp.66-80.
- 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.; DEMPSEY, E. The effects of abnormal chromosome 10 on preferential segregation and crossing-over in maize. **Genetics**, v.53, p.989-1020, 1966.
- RHOADES, M.M.; DEMPSEY, E. Further studies on two-unit mutable systems found in our high-loss studies and on the specificity of interaction of responding and controlling elements. **Maize Genetics Cooperation Newsletter**, v.57, p.14-17, 1983.
- RHODES, C.A.; LOWE, K.S.; RUBY, K.L. Plant regeneration from protoplasts isolated from embryogenic maize cell cultures. **Bio/Technology**, v.6, p.56-60, 1988a.
- RHODES, C.A.; PIERCE, D.A.; METTLER, I.J.; MASCARENHAS, D.; DETMER, J.J. Genetically transformed maize plants from protoplasts. **Science**, v.240, p.204-207, 1988b.
- RICHARDS, E.J.; AUSUBEL, F.M. Isolation of a higher eukaryotic telomere from *Arabidopsis thaliana*. **Cell**, v.53, p.127-136, 1988.
- RICHARDS, E.J.; VONGS, A.; WALSH, M.; YANG, J.; CHAO, S. Substructure of telomere repeat arrays. In: HESLOP-HARRISON, J.S. & FLAVELL, R.B., ed. The chromosome. John Innes Centre, Colney Leane, Norwich NR4 7UH, UK, **Bios Scientific Publishers**, 1993. p.103-123.

- RIERA-LIZARAZU, O.H.; RINES, W.; PHILLIPS, R.L. Cytological and molecular characterization of oat x maize partial hibrids. **Theoretical and Applied Genetics**, v.93, p.123-135, 1996.
- RONCHI, V.N. 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.
- SACRISTÁN, M.D. Karyotypic changes in callus cultures from haploid and diploid plants of *Crepis capillaris* (L.) Wallr. **Chromosoma**, v.33, p.273-283, 1971.
- SANTOS, J.A. Estudo da instabilidade cromossômica em culturas de longa duração de calos de milho (*Zea mays* L.). Piracicaba, 1995. 187p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- SANTOS, J.A.; AGUIAR-PERECIN, M.L.R. Chromosome instability in long-term maize callus cultures. In: **Chromosome Research**, v.3, p.60, 1995a. Suppl./ 12th International Chromosome Conference, Madri, Spain, 1995 - Resumo/
- SAS Institute. The GLM procedure. In: **SAS/STAT user's guide**. Cary, N.C. 1998.
- SHILLITO, R.D.; CARSWEL, G.R.; JONHSON, C.M.; DiMAIO, J.J.; HARMS, C.T. Regeneration of the plants from protoplasts of elite inbred maize. **Bio/Technology**, v.7, p.581-7, 1989.
- SPRINGER, W.D.; GREEN, C.E.; KOHN, K.A. A histological examination of tissue culture initiation from immature embryos of maize. **Protoplasma**, v.101, p.269-281, 1979.

- 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.
- TITO, C.M.; POGGIO, L.; NARANJO, C.A. Cytogenetic studies in the genus *Zea*. 3. DNA content and heterochromatin in species and hybrids. **Theoretical and Applied Genetics**, v.83, p.58-64, 1991.
- 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, p.505-509, 1985.
- UEMURA, T.; OHKURA, H.; ADACHI, Y.; MORINO, K.; SHIOZAKI, K.; YANAGIDA, M. DNA topoisomerase II is required for condensation and separation of mitotic chromosomes in *S. pombe*. **Cell**, v.50, p.917-925, 1987.
- VANLAMMEREN, 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, p.49-61, 1988.
- VASIL V.; LU, C.; VASIL, I.K. Histology of somatic embryogenesis in cultured immature embryos of maize (*Zea mays* L.). **Protoplasma**, v.127, p.1-8, 1985.
- VASIL, V. & VASIL, I.K. Plant regeneration from friable embryogenic callus and cell suspension cultures of *Zea mays* L. **Journal of Plant Physiology**, v.124, p.399-408, 1986.
- 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, p.158-161, 1984.

- VETTURINI, M. Cromosomi e mutanti di mais. **Quaderno di Maydica**, 1968, 61p.
- VIOTTI, A.; PRIVITERA, E.; SALA, E.; POGNA, N. Distribution and clustering of two highly repeated sequences in the A and B chromosomes of maize. **Theoretical and Applied Genetics**, v.70, p.234-239, 1985.
- WALTERS, D.A.; VETSCH, C.S.; POTTS, D.E.; LUNDQUIST, RC. Transformation and inheritance of a hygromycin phosphotransferase gene in maize plants. **Plant Molecular Biology**, v.18, p.189-200, 1992.
- 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, p.360-365, 1992.
- WAN, Y.; WIDHOLM, J.M.; LEMAUX, P.G. Type I callus as a bombardment target for generating fertile transgenic maize (*Zea mays* L.). **Planta**, v.196, p.7-14, 1995.
- WANG, S.; LAPITAN, N.L.V.; RODER, M.; TSUCHIYA, T. Characterization of telomeres in *Hordeum vulgare* chromosomes by *in situ* hybridization. II. Healed broken chromosomes in telotrisomic 4L and acrotrisomic 4L^{4S} lines. **Genome**, v.35, p. 975-980, 1992.
- WANG, S.; LAPITAN, N.L.V.; TSUCHIYA, T. Characterization of telomeres in *Hordeum vulgare* chromosomes by *in situ* hybridization. I. Normal diploid barley. **Japanese Journal of Genetics**, v.86, p.313-316, 1991.
- WATT, P.M.; HICKSON, I.D. Structure and function of type II DNA topoisomerases. **Biochemistry Journal**, v.303, p.681-695, 1994.

- WEIL, C.F. & WESSLER, S.R. Molecular evidence that chromosome breakage by Ds elements is caused by aberrant transposition. **The Plant Cell**, v.5, p.515-522, 1993.
- 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, p.844-848, 1992.
- WINTERSBERGER, E. DNA amplification: new insights into its mechanism. **Chromosoma**, v.103, p.73-81, 1994.
- ZAKIAN, V. Structure and function of telomers. **Annual Review of Genetic**, v.23, p.579-604, 1989.