**CARACTERIZAÇÃO CITOGENÉTICA DE LINHAGENS DE MILHO
(*Zea mays* L.) ATRAVÉS DE BANDAMENTO CROMOSSÔMICO E
HIBRIDAÇÃO MOLECULAR *in situ***

MÔNICA ROSA BERTÃO

Bióloga

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

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

PIRACICABA

Estado de São Paulo - Brasil

Junho - 1998

BERTÃO, Mônica Rosa. Caracterização citogenética de linhagens de milho (*Zea mays* L.) através de bandamento cromossômico e hibridação molecular *in situ*. Piracicaba, Tese (Doutorado) Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo. 1998. 127p.

ERRATA & CORRIGENDA N. 1

p.	item	linha	onde se lê	leia-se
xi	summary	4	... pretreatment ...	... pretreatment ...
xi	summary	7	... with treatment ... The spread ...	... with the treatment ... The spreads ...
xi	summary	10	Na biometric ...	A biometric ...
xi	summary	14	... chromosome arms, a ...	...chromosome arms, as ...
2	1.	5	... Aguiar-Perecin, 1985;	... Aguiar-Perecin, 1985 a,b;
2	1.	13	... novas investigações o polimorfismo	... investigações do polimorfismo ...
3	1.	15	... métodos de detecção ...	... métodos de detecção ...
19	2.4.	24	... 10 anormal e o cromossomo ...	... 10 anormal e um cromossomo ...
20	2.4.	12	..., demonstraram que além ...	..., demonstrou que além ...
21	2.4.	27	... e a região organizadora ...	... e na região organizadora ...
22	2.4.	14	Carvalho & Saraiva (1993) ...	Carvalho & Saraiva (1993a) ...
22	2.4.	21	... aplicabilidade deste método ...	... aplicabilidade do método ...
23	2.5.	20	... evidenciaram as ...	... evidenciaram que as ...
26	2.6.	23	... que produziram melhor ...	... que produzem melhor ...
28	2.6.	7	... Heslop-Harrison et al., (1993), ...	...Heslop-Harrison & Schwarzscher (1993), ...
30	2.6.	16	... apresentar-se inderdispersas ...	... apresentar-se interdispersas ...
30	2.6.	21	... os padrões ...	... os padrões de ...
33	3.1.	7	... analisou-se linhagens ...	... analisaram-se duas linhagens ...
35	3.2.	2	... sementes dos referidos ...	... raízes dos referidos ...
35	3.2.1.	3	... coletadas e pré-tratadas com fixador Carnoy (...); ...	... coletadas diretamente em fixador Carnoy (...) ou pré-tratadas com ...
37	3.2.1.b.	4	O fixador foi decantado ...	O fixador ou o etanol 70% foram decantados ...
45	3.6.3.	7	... e estes centrifugados a ...	... e centrifugado a ...
46	3.6.3.	1	Após esta etapa procedeu-se ...	Após a etapa de lise procedeu-se ...
53	3.6.6.	11	... kit de detecção sinal ...	... kit de detecção do sinal ...
58	3.6.8.	5	... papel de filtro e estavam ...	... papel de filtro e quando estavam ...
68	4.1.	23	... 5 raízes para material ...	... cinco raízes por material ...
90	4.2.2.	12	... metafásicos, indicando ...	... metafásicos, confirmando ...
118	Referências	14	ANAMTHAWAT-JÓSSON, ...	ANAMTHAWAT-JÓNSSON ...

Inclusão de Referências Bibliográficas:

GOMES, P. **Curso de Estatística Experimental**. 2ed. Piracicaba: Nobel, 430p. 1982.

LEITCH, A.; SCHWARZACHER, T.; JACKSON, D.; LEITCH, I. S. **In situ hybridization: a practical guide**. Oxford: BIOS Scientific Publishers Limited, 118p. 1994.

VOSA, C. G. Plant Chromosome Banding and Cytotaxonomy. In: AGUIAR-PERECIN, M. L. de; MARTINS, P. S.; BANDEL, G. (Ed.). **Tópicos de Citogenética e Evolução de Plantas**. Ribeirão Preto: SBG, 1985, p.17-25.

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

Bertão, Mônica Rosa

Caracterização citogenética de linhagens de milho (*Zea mays* L.) através de bandamento cromossômico e hibridação molecular *in situ* / Mônica Rosa Bertão. - Piracicaba, 1998.

127 p. : il.

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

1. Bandamento cromossômico 2. Citogenética vegetal 3. Cromossomo vegetal 4. Hibridação 5. Linhagem vegetal 6. Milho híbrido I. Título

CDD 633.15

**CARACTERIZAÇÃO CITOGENÉTICA DE LINHAGENS DE MILHO
(*Zea mays* L.) ATRAVÉS DE BANDAMENTO CROMOSSÔMICO E
HIBRIDAÇÃO MOLECULAR *in situ***

MÔNICA ROSA BERTÃO

Aprovada em: 21 de agosto de 1998.

Comissão julgadora:

Prof ^a . Dr ^a . Margarida L. R. de Aguiar-Perecin	ESALQ/USP
Prof ^a . Dr ^a . Maria Lúcia Carneiro Vieira	ESALQ/USP
Prof. Dr. Gerhard Bandel	ESALQ/USP
Prof ^a . Dr ^a . Claudete de Fátima Ruas	UEL
Prof ^a . Dr ^a . Eliana Regina Forni Martins	UNICAMP

Prof^a. Dr^a. Margarida L. R. de Aguiar-Perecin
Orientador

“ Porque eu estou vestida com as roupas e as armas de Jorge . . .

e de Ivone também . . .

agora e sempre !!! ”

À

meus queridos pais

Jorge e Ivone e seus

maravilhosos filhos e netos

DEDICO

À

*Meu querido cunhado e irmão, **Pedrinho Cataneli Junior** (in memorian), pelos maravilhosos momentos que nos proporcionou em sua existência e por representar o AMOR, a FORÇA e a UNIÃO de minha tão amada FAMÍLIA, a saber: meus PAIS, Jorge e Ivone; meus IRMÃOS, Luiz e Érica, Jorginho e Maria Inês, Cássia, Enzo e Flávia e meus SOBRINHOS, Anna Clara, João Victor, Luiza, Maria Victoria, Lucas e Vinicius.*

OFEREÇO

*“ O **SENHOR** é meu pastor; nada me faltará.*

Deitar-me faz em verdes pastos, guia-se mansamente a águas tranquilas.

*Refrigera a minha alma; guia-me pelas veredas da justiça, por amor do seu
nome.*

*Ainda que eu andasse pelo vale da sombra da morte, não temeria mal algum,
porque tu estás comigo; a tua vara e o teu cajado me consolam.*

*Preparas uma mesa perante mim na presença dos meus inimigos, unges a
minha cabeça com óleo, o meu cálice transborda.*

*Certamente que a bondade e a misericórdia me seguirão todos os dias de
minha vida, e habitarei na casa do Senhor por longos dias”.*

(Salmo 23)

*A **DEUS** com imensa gratidão*

AGRADECIMENTOS

- À Prof^a. Dr^a. **Margarida Lopes Rodrigues de Aguiar-Perecin** por sua orientação, assistência e imensuráveis contribuições, meu agradecimento e minha admiração.
- Ao Prof. Dr. **Paulo Sodero Martins** (*in memoriam*), uma grande personalidade que sempre nos fez acreditar que é possível realizar grandes feitos com muita simplicidade, ainda um agradecimento pelo incentivo ao ingresso e desenvolvimento do Curso de Doutorado, a partir do qual se originou este trabalho e por todo o valioso conhecimento transmitido durante nossa convivência.
- Aos **Professores** do Curso de Pós Graduação do Departamento de Genética da ESALQ/USP, pelos valiosos ensinamentos transmitidos, em especial aos Professores **Maria Lúcia Carneiro Vieira e Márcio Castro Silva Filho** pelas informações sobre as técnicas de Biologia Molecular.
- À **Janay Almeida dos Santos, José Raulindo Gardingo, Maria Angélica Martinho Ferreira e Mateus Mondin**, companheiros de trabalho, pela amizade, convivência, paciência, sugestões no desenvolvimento das atividades laboratoriais e por contribuírem para que nossa rotina fosse mais alegre.
- A **Marcelo Afonso Vallim, Renata Castiglioni Pascon e Vera Quencini** pelas valiosas informações e ensinamentos sobre as técnicas de biologia molecular empregadas neste trabalho.
- A **Silvia Marina Cuco** pelo grande apoio e amizade durante todos esses anos.

Aos **Funcionários** do laboratório de Citologia do Departamento de Genética da ESALQ/USP **Carlos Alberto Veríssimo e Silvia Cristina Menuzo Molina**, não somente pela imensa colaboração durante o desenvolvimento das atividades laboratoriais, mas pela grande amizade estabelecida nos últimos anos.

A **Todos os Funcionários** do Departamento de Genética da ESALQ/USP que de uma forma ou de outra colaboraram para o desenvolvimento e conclusão deste trabalho, e em menção especial à **Antônio de Pádua Gorga, Fernando Leopoldino, Silvana Gregório e Valdir Próspero**.

A **Luis Carlos Rodrigues**, desenhista do Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial - ESALQ/USP, que mais uma vez contribuiu na excelente reprodução dos ideogramas.

A **Carlos Daniel Giaveno e Rhainer Gleico Cardoso** pelas valiosas sugestões e discussões no desenvolvimento das análises estatísticas .

Ao **Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq)** pela concessão de bolsa de estudos.

A **“ MINHA FAMÍLIA PIRACICABANA ”** que compartilhou dos momentos alegres e tristes vividos durante estes últimos anos, desta e de tantas outras conquistas. Aos membros dessa maravilhosa família: **Renata Castiglione Pascon, Marcelo Afonso Vallim, Salete Gaziola, Nirlei Aparecida Silva e Carlos Daniel Giaveno**, o meu agradecimento e o meu imenso carinho.

A **“ TODOS OS AMIGOS ”** próximos ou distantes pelo apoio, incentivo, amizade e convivência

ÍNDICE

	Página
RESUMO	ix
SUMMARY	xi
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	5
2.1. Estrutura dos cromossomos de milho	5
2.2. Pré-tratamentos para obtenção de preparações citológicas de cromossomos mitóticos	7
2.2.1. Pré-tratamentos para sincronização celular e acumulação de metáfases e prometáfases	7
2.2.2. Pré-tratamentos para maceração dos tecidos	12
2.3. Métodos de bandamento cromossômico em plantas	15
2.4. Bandamento-C em milho	18
2.5. Identificação dos cromossomos mitóticos em milho através do bandamento-C	23
2.6. Hibridação in situ	26
3. MATERIAIS E MÉTODOS	33
3.1. Genótipos utilizados	33
3.2. Metodologias de pré-tratamento para obtenção de preparações citológicas	35
3.2.1. Obtenção das preparações citológicas de cromossomos mitóticos	35

3.3. Bandamento C.....	38
3.4. Método de Feulgen	39
3.5. Obtenção das preparações citológicas de cromossomos meióticos.....	40
3.6. Hibridação <i>in situ</i>	40
3.6.1. Linhagens bacterianas e sondas de DNA utilizadas.....	41
3.6.2. Transformação Bacteriana.....	41
3.6.3. Isolamento do DNA plasmidial.....	45
3.6.4. Eletroforese em minigel de agarose.....	47
3.6.5. Marcação da sonda de DNA.....	49
3.6.6. Detecção do sinal de marcação em filtro de nitrocelulose	52
3.6.7. Obtenção das preparações citológicas para hibridação <i>in situ</i>	53
3.6.8. Hibridação <i>in situ</i>	54
3.7. Análise do material	60
3.7.1. Análise de preparações mitóticas coradas pelo método de Feulgen.....	60
3.7.2. Análise de preparações mitóticas coradas pelo método de bandamento-C.....	61
3.7.2.1. Análise morfométrica dos cromossomos	61
3.7.2.2. Análise estatística dos dados morfométricos	64
3.7.3. Análise das preparações meióticas - Paquítenos	64

3.7.4. Análise de preparações mitóticas submetidas à hibridação	
<i>in situ</i>	65
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	66
4.1. Avaliação dos pré-tratamentos na acumulação de metáfases	
e prometáfases	66
4.2. Análise das preparações mitóticas coradas pelo bandamento-C....	74
4.2.1. Análise morfométrica dos cromossomos metafásicos	74
4.2.2. Análise comparativa dos cromossomos metafásicos	
e prometáfásicos.....	90
4.2.3. Análise comparativa dos cromossomos metafásicos	
e prometáfásicos heterozigóticos para presença de bandas.....	101
4.3. Análise das preparações meióticas	107
4.4. Padronização da metodologia de hibridação <i>in situ</i>	111
5. CONCLUSÕES	116
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	118

CARACTERIZAÇÃO CITOGENÉTICA DE LINHAGENS DE MILHO (*Zea mays* L.) ATRAVÉS DE BANDAMENTO CROMOSSÔMICO E HIBRIDAÇÃO MOLECULAR *in situ*

Autor: MÔNICA ROSA BERTÃO

Orientador: MARGARIDA L. R. DE AGUIAR-PERECIN

RESUMO

O presente estudo foi realizado como parte de uma linha de pesquisa desenvolvida no Departamento de Genética, ESALQ/USP, visando a caracterização citogenética de linhagens endogâmicas, envolvendo as metodologias de bandamento-C e hibridação molecular *in situ*.

Foram realizados experimentos para a padronização de um protocolo para a obtenção de preparações citológicas com alto índice de metáfases de boa qualidade, com cromossomos bem espalhados e com a morfologia dos cromossomos bem nítida, utilizando-se pré-tratamento com inibidores do fuso mitótico e da síntese de proteínas.

O pré-tratamento empregando uma combinação de 8-hidroxiquinolina a 0,03% e cicloheximida a 0,00125 % promoveu maior acúmulo de metáfases e prometáfases em comparação ao tratamento com 8-hidroxiquinolina a 0,03%. As lâminas foram preparadas através de esmagamento das células meristemáticas após tratamento enzimático (com celulase e pectinase) da raiz e dissecção da mesma para remoção das células meristemáticas.

Foi realizada uma análise biométrica dos cromossomos somáticos em preparações coradas pela metodologia de bandamento-C, de duas linhagens com diferenças em seu conteúdo de knobs heterocromáticos e respectivo híbrido. Foram constatadas novas evidências de que bandas-C correspondentes a knobs de tamanho grande ou médio (observados no paquíteno) alteram o tamanho dos braços de cromossomos somáticos, conforme observação anterior (Aguiar-Perecin & Vosa, 1985).

A análise comparativa entre cromossomos mitóticos e cromossomos paquítenicos evidenciou nítida correspondência entre os valores de comprimento relativo e relação de braços para a maioria dos cromossomos, além de demonstrar claramente a correspondência entre as bandas-C e os knobs heterocromáticos.

Durante o desenvolvimento do presente trabalho foi padronizado um protocolo para hibridação molecular *in situ*, através do método de marcação não isotópica da sonda de DNA com biotina e detecção do sinal de hibridação através de digestão enzimática, empregando-se fosfatase alcalina conjugada com avidina/estreptavidina. Foi utilizada uma sonda da sequência de DNA altamente repetitivo de 185 pb, característica dos knobs heterocromáticos, para a investigação do padrão de distribuição destas sequências ao longo dos cromossomos.

O material utilizado foi o híbrido 441123 x 4443. O sinal de hibridação da sonda de DNA de 185 pb apresentou estreita correspondência com a localização e tamanho das bandas-C. A eficiência da presente metodologia pode ser amplamente explorada para o mapeamento de diversos tipos de sequências de DNA ao longo do complemento cromossômico nesta espécie e em outras espécies vegetais.

**CYTOGENETIC CHARACTERIZATION OF MAIZE (*Zea mays* L.)
LINES THROUGH CHROMOSOME BANDING AND *in situ*
MOLECULAR HYBRIDIZATION**

Author: MÔNICA ROSA BERTÃO

Adviser: MARGARIDA L. R. DE AGUIAR-PERECIN

SUMMARY

A protocol employing mitotic fuse inhibitors is described for cytological preparations with high frequency of high quality metaphases, with well-spread chromosomes showing clear details of their morphology. A pretreatment using a combination of 0,03% 8-hydroxyquinoline and 0,00125% cycloheximide promoted a better degree of metaphase and prometaphase accumulation in comparison with treatment with 0,03% 8-hydroxyquinoline. The spread were prepared by squashing the meristematic cells, after enzymatic treatment (with cellulase and pectinase) and dissection of the root and remotion of meristematic cells.

Na biometric analysis of C-banded somatic chromosomes was carried out. Two inbred lines differing in their heterochromatic knobs content and respective hybrid were used. This study provided new evidences that C-bands corresponding to large and medium size knobs (observed at pachytene) alter the length of somatic chromosome arms, a shown previously (Aguiar-Perecin & Vosa, 1985).

Comparison between mitotic and pachytene chromosomes provided clear evidences of correspondence between the values of relative length and arm ratio for most chromosomes, and between C-bands and knobs.

Also, a protocol was developed for molecular *in situ* hybridization, using non-radioactive DNA labelling with the biotin-streptavidin system and signal detection by enzymatic digestion. A probe of 185 pb highly repetitive DNA sequence, characteristic of knobs was used to investigation the pattern of the distribution of these sequences along the chromosomes.

The material used was the hybrid 441123 x 4443. The signal of hybridization of the 185 pb sequence was correspondent to knobs sites observed in C-banded preparations. The methodology described will be useful for the mapping of different types of DNA sequences in maize chromosomes and other species, as well.

1. INTRODUÇÃO

A citogenética de milho teve um grande impulso ainda na década de 30 quando McClintock reportou que os cromossomos desta espécie poderiam ser identificados com sucesso através de análises citológicas utilizando-se a fase de paquíteno da meiose.

Demonstrando a ocorrência e distribuição de blocos heterocromáticos nos cromossomos paquitênicos e considerando parâmetros como, comprimento relativo, relação de braços, padrão de cromômeros e heterocromatina pericentromérica, tais estudos permitiram a identificação dos cromossomos e a elaboração de um mapa citológico detalhado para esta espécie, o qual foi complementado em estudos posteriores (veja-se Neuffer et al., 1968; McClintock et al., 1981).

Somente no final da década de 60, quando da introdução de técnicas de análise de cromossomos somáticos e das técnicas de bandamento cromossômico, é que uma nova perspectiva se abriu aos estudos de morfologia cromossômica em espécies vegetais.

Em milho, estudos iniciais empregando cromossomos somáticos demonstraram que estes podem ser identificados em metáfases convencionalmente coradas, através do seu comprimento relativo e relação de braços (Chen, 1969; Fillion & Walden, 1973).

Com o advento do bandamento-C, o qual revela padrões de ocorrência e distribuição de regiões heterocromáticas ao longo do

complemento cromossômico mitótico, novas informações puderam ser obtidas sobre a estrutura do cromossomo metafásico, dando maiores subsídios à identificação de cromossomos individuais (Vosa & Aguiar-Perecin, 1972; Hadlaczký & Kálmán, 1975; Sachan & Tanaka, 1976, 1977; Ward, 1980; Aguiar-Perecin, 1985; Aguiar-Perecin & Vosa, 1985; Rayburn et al., 1985).

Um aspecto interessante discutido em alguns destes estudos foi a verificação de que existe uma nítida correspondência entre as banda-C e os knobs paquitênicos e que a presença de bandas-C em cromossomos somáticos de milho pode alterar o comprimento de braços cromossômicos. Entretanto, existem poucas referências na literatura reportando variações da morfologia dos cromossomos somáticos nesta espécie (Filion & Walden, 1973; Aguiar-Perecin & Vosa, 1985).

Neste sentido, novas investigações o polimorfismo de knobs, bem como da variabilidade quanto ao comprimento relativo e relação de braços dos cromossomos se fazem necessárias para melhor elucidação da morfologia cromossômica e identificação dos cromossomos somáticos nesta espécie e é dentro deste contexto que o presente projeto se enquadra. Para tanto, a obtenção de metáfases e prometáfases com cromossomos bem espalhados e de morfologia nítida, em que a variabilidade do comprimento dos braços cromossômicos, decorrente da presença de knobs heterocromáticos grandes possa ser visualizada, é de suma importância.

Outro aspecto interessante nos estudos de organização do genoma vegetal tem sido as perspectivas quanto à localização e distribuição de sequências específicas de DNA ao longo do complemento cromossômico.

Desde que os dados obtidos com a aplicação da metodologia de bandamento-C também permitiram a verificação da ocorrência de

diferentes classes de heterocromatina nos cromossomos somáticos de milho, através do grau diferencial de coloração de determinadas regiões, passou-se a se questionar qual seria a composição de bases desses tipos de heterocromatina.

Quando Peacock et al. (1981) relataram que as sequências altamente repetitivas características da heterocromatina constitutiva (knobs) eram constituídas por uma unidade repetitiva de 185 pares de bases, e que estas sequências também poderiam ser detectadas intercaladas em regiões eucromáticas (Viotti et al., 1985), uma nova perspectiva se abriu aos estudos citogenéticos de milho.

Atualmente, esforços tem sido feitos no sentido de se estabelecer o mapeamento físico de diversos tipos de sequências de DNA no genoma desta espécie, utilizando-se metodologias de hibridação *in situ*. Com o desenvolvimento de sondas de DNA não-isotópicas (marcação com biotina ou digoxigenina) e de métodos de detecção enzimática e fluorescência (FISH) estas técnicas têm permitido a localização de diversas sequências de DNA diretamente em cromossomos mitóticos ou meióticos, possibilitando assim o estabelecimento de comparações entre as informações moleculares sobre a estrutura das sequências de DNA com dados obtidos a partir de análises da morfologia cromossômica (Aledo et al., 1995; Edwards et al., 1996; Riera-Lizarazu et al., 1996).

Existe, portanto, uma área aberta para o desenvolvimento de pesquisas envolvendo análises da morfologia cromossômica, bem como da distribuição de sequências que integram o genoma do milho e é dentro deste contexto que o presente projeto se enquadra, utilizando-se de técnicas para a obtenção de preparações citológicas de alta qualidade, bem como de metodologias de citogenética molecular, como bandamento cromossômico e hibridação molecular *in situ*.

Dentro deste contexto, o presente projeto de pesquisa teve por objetivos:

1. Obtenção de preparações citológicas com alto índice de metáfases de boa qualidade, adequadamente bem espalhadas e com nítida morfologia cromossômica, aspectos essenciais à aplicação do Bandamento-C e Hibridação *in situ*. Tal objetivo envolveu a aplicação de pré-tratamentos com agentes inibidores do fuso mitótico e agentes enzimáticos, bem como a seleção de genótipos com elevado índice mitótico.
2. Análise morfométrica dos cromossomos mitóticos, para comparação do tamanho de bandas e respectivos knobs no paquíteno, como dado adicional em relação aos existentes na literatura, dando assim novos subsídios à identificação de cromossomos, demonstrando a correspondência existente entre knobs e bandas-C, bem como o aumento do tamanho dos braços cromossômicos decorrente da presença de knobs heterocromáticos grandes.
3. Padronização da metodologia de hibridação molecular *in situ*, através do método de marcação com biotina e detecção enzimática do sinal utilizando-se sondas específicas como DNA satélite altamente repetitivo de 185 pb, característico de knobs heterocromáticos, para a investigação do padrão de distribuição destas sequências de DNA ao longo dos cromossomos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Estrutura dos cromossomos de milho

Análises citológicas tem sido extensivamente desenvolvidas em *Zea mays* desde que McClintock (1929, 1930, 1931) demonstrou que os cromossomos dessa espécie poderiam ser identificados através de seu comprimento relativo, relação de braços (índice definindo a posição do centrômero), padrão de cromômeros proeminentes, heterocromatina pericentromérica, bem como pela presença de grandes blocos heterocromáticos (knobs) na fase do paquíteno da meiose. O desenvolvimento de tais análises possibilitou assim a identificação e caracterização de cada um dos 10 cromossomos do complemento meiótico em milho e conduziu a elaboração de um mapa citológico detalhado nesta espécie (para revisão veja Neuffer et al., 1968; McClintock, 1978).).

Destas análises cariomorfológicas várias linhas de pesquisas surgiram, visando principalmente a caracterização de raças ou linhagens através dos padrões de distribuição de knobs ao longo do complemento cromossômico, permitindo a investigação do valor adaptativo desta estruturas, bem como de seu papel na origem evolutiva e relações filogenéticas desta espécie.

Além das análises de cromossomos paquitênicos de milho alguns autores demonstraram que os cromossomos mitóticos, obtidos a partir de preparações de ponta de raiz coradas pelo método de Feulgen, também poderiam ser utilizados com sucesso na identificação cromossômica.

Chen (1969) analisando cromossomos somáticos de milho obtidos a partir do método convencional de esmagamento de ponta de raiz e coloração pelo método de Feulgen, demonstrou que estes podem ser nitidamente identificados através de seu comprimento relativo e relação de braços.

Posteriormente, Filion & Walden (1973) utilizaram preparações de cromossomos metafásicos na tentativa de se evidenciar alterações cromossômicas no cariótipo somático. Empregando estoques normais e estoques contendo translocações recíprocas envolvendo o braço curto do cromossomo 9, os autores apresentaram evidências experimentais de que acréscimos ou decréscimos do comprimento dos braços cromossômicos podem ser observados particularmente em cromossomos metacêntricos e que a relação de braços de determinados cromossomos apresenta-se variável entre os estoques analisados.

Ainda no início da década de 70, uma nova perspectiva se abriu aos estudos de cromossomos somáticos de milho com a introdução das técnicas de bandamento cromossômico, particularmente o bandamento-C, o qual, até então, tem se mostrado uma ferramenta importante para análises de regiões heterocromáticas e para a identificação de cromossomos somáticos individuais.

Antes, porém, de tecermos quaisquer considerações a respeito das contribuições das técnicas de bandamento cromossômico aos estudos do complemento somático de espécies vegetais, particularmente em milho, torna-se imprescindível reportar alguns aspectos importantes descritos na literatura quanto a obtenção de preparações citológicas.

2.2. Pré-tratamentos para obtenção de preparações citológicas de cromossomos mitóticos

A obtenção de preparações de cromossomos metafásicos com morfologia intacta e espalhamento adequado, a partir de tecidos meristemáticos de pontas de raízes, é o procedimento mais comum nas análises citológicas, entretanto este particular nem sempre é conseguido com sucesso.

Diversos trabalhos têm levantado uma série de fatores técnicos capazes de impedir ou prejudicar a obtenção de tais preparações e consequentemente conduzir a dificuldades na interpretação dos dados sobre a morfologia cromossômica. A utilização de genótipos que apresentam índice mitótico baixo, ou seja baixa frequência de células em divisão, a sobreposição de metáfases ou mesmo dos cromossomos metafásicos, bem como a perda ou fragmentação de cromossomos devido ao espalhamento cromossômico e celular inadequados são alguns dos fatores que podem alterar a qualidade das preparações citológicas (Rayburn & Gold, 1982; Pan et al., 1993; Schubert et al., 1993; Jewell & Islan-Faridi, 1994; Schwarzacher et al., 1994).

Dentro deste contexto, diversos estudos tem sido realizados com o intuito de se selecionarem os pré-tratamentos mais eficientes à obtenção de preparações citológicas com elevados índices mitóticos, bem como um espalhamento celular e cromossômico adequado.

2.2.1. Pré-tratamentos para sincronização celular e acumulação de metáfases e prometáfases.

A utilização da 8-hidroxiquinolina como pré-tratamento para obtenção de preparações metafásicas tem sido uma constante em diversos estudos de cromossomos vegetais, em virtude deste agente

inibidor do fuso mitótico promover o acúmulo de células metafásicas bem espalhadas com detalhes de morfologia cromossômica nitidamente visíveis. Outro composto também empregado no desenvolvimento de novas técnicas citológicas tem sido a cicloheximida, um inibidor de síntese protéica, que promove a contração dos cromossomos em prófase e metáfase, devido a sua interferência com a síntese de determinadas proteínas envolvidas no ciclo de espiralização cromossômica, ou com o mecanismo de transferência de energia celular.

Num estudo envolvendo a análise quantitativa das frequências mitóticas e aspectos da morfologia de cromossomos de milho sob a influência de várias concentrações de 8-hidroxiquinolina e cicloheximida, separadas ou combinadas, Tlaskal (1980) discutiu as possibilidades de se combinar as vantagens desses dois agentes. Tal investigação evidenciou que enquanto o tratamento isolado das raízes com cicloheximida resultou em uma frequência mitótica menor (4,79%), o índice mitótico de raízes expostas apenas à hidroxiquinolina diminuiu aproximadamente 10 vezes (0,60%). As raízes expostas ao tratamento combinado, por sua vez, apresentaram um índice mitótico maior (5,80%), demonstrando claramente que este tratamento foi superior aos demais quanto a frequência mitótica. Os resultados apresentados evidenciaram que o tratamento combinado de 8-hidroxiquinolina com cicloheximida apresenta vantagens superiores aos tratamentos isolados, principalmente pelo fato de tornar disponível para contagens cromossômica, não somente metáfases adequadas (onde detalhes de morfologia cromossômica podem ser avaliados), mas também prófases com cromossomos contraídos e espalhados.

Silvarolla & Aguiar-Perecin (1994), também reportaram resultados sobre a aplicação de tratamentos isolados e combinados de inibidores do fuso mitótico, como 8-hidroxiquinolina, cicloheximida,

bromonaftaleno e colchicina, na obtenção de preparações citológicas adequadas ao estudo da estabilidade cromossômica em variedades de cana de açúcar. Segundo as autoras (Silvarolla & Aguiar-Perecin, 1994), preparações contendo elevado número de metáfases intactas com cromossomos de morfologia nítida, adequadas à contagem do número de cromossomos foram obtidas com a utilização combinada de 8-hidroxiquinolina e cicloheximida e bromonaftaleno e cicloheximida, dependendo da variedade analisada. Os resultados indicaram ainda que a aplicação isolada dos agentes inibidores do fuso resultou em preparações com alta frequência de células com cromossomos sobrepostos, de morfologia indistinta.

Considerando-se que a frequência de células em divisão no tecido meristemático de ponta de raiz é baixa, vários autores tem descrito técnicas que podem permitir a sincronização de células de tais tecidos em diversas espécies vegetais.

Pan et al. (1993) demonstraram um método para sincronização de tecidos meristemáticos de ponta de raiz de diversas espécies de monocotiledôneas (cereais) e dicotiledôneas através da aplicação de hidroxiuréia e amiprofos-metil ou colchicina em combinação com água gelada. Os resultados evidenciaram consideráveis acréscimos na taxa de divisão celular, com índices metafásicos em torno de 50% em todos os materiais avaliados, particularmente no tratamento envolvendo hidroxiuréia, amiprofos-metil e água gelada. Enquanto a hidroxiuréia induziu a sincronização celular na fase S do ciclo (síntese de DNA), a amiprofos-metil promoveu o bloqueio das células na fase de metáfase. O tratamento com água gelada, além de colaborar para o acréscimo no índice metafásico, favoreceu a separação dos cromossomos, produzindo preparações metafásicas bem espalhadas.

Schubert et al. (1993) reportaram a utilização de dois métodos para o isolamento de cromossomos metafásicos de espécies vegetais envolvendo agentes inibidores do fuso mitótico e agentes para sincronização de células do tecido meristemático da raiz. Apesar dos autores não reportarem valores numéricos para o aumento no índice mitótico e acúmulo de células metafásicas, as evidências qualitativas apresentadas refletem a eficiência de ambos os métodos. Segundo os autores, o primeiro método, que emprega colchicina para acumulação de metáfases, mostrou ser particularmente útil para o desenvolvimento de técnicas de micromanipulação visando o isolamento de cromossomos individuais que podem servir de moldes para a construção de bibliotecas de DNA cromossomo-específico e mapeamento via PCR.

Os autores relatam que o segundo método, envolvendo a etapa de sincronização celular com hidroxiuréia, a qual bloqueia o ciclo celular na fase S, seguido do tratamento com colchicina para bloquear as células na fase de metáfase e posterior tratamento do tecido meristemático com tampão de lise específico, foi eficiente na obtenção de uma suspensão de cromossomos e núcleos. De acordo com os autores, os protocolos testados mostraram ser extremamente adequados à obtenção de um número considerável de cromossomos isolados que podem ser empregados em análises de citometria de fluxo, seleção de cromossomos ("sorting chromosome") e para consequentemente para análises mais detalhadas da estrutura do cariótipo de diferentes espécies, seja através de bandamento com endonuclease de restrição, imunocoloração de antígenos cromossomais ou metodologias de hibridação *in situ* e em estudos de microscopia eletrônica.

Carvalho (1995), num estudo visando o desenvolvimento de técnicas para análise de cromossomos mitóticos e meióticos de milho, empregou diversos pré-tratamentos para sincronização do ciclo celular e

obtenção de elevados índices mitóticos. Entre os compostos utilizados nestas avaliações (hidroxiuréia, colchicina, cicloheximida, brometo de etídio e 8-hidroxiquinolina) os resultados mais significativos foram obtidos com a aplicação sequencial de hidroxiuréia, para sincronização celular, e colchicina combinada à cicloheximida, para acumulação de metáfases. Índices mitóticos (34%) e metafásicos (22%) elevados foram obtidos com a utilização de tais compostos.

Mais recentemente, Lee et al. (1996) demonstraram um procedimento para otimização de pré-tratamentos visando a sincronização do ciclo celular em células meristemáticas de ponta de raiz em milho, envolvendo a aplicação de hidroxiuréia, como agente inibidor da síntese de DNA, seguido do tratamento das raízes com trifluralina, um inibidor mitótico, o que conduziu à obtenção de preparações cromossômicas com índice mitótico superior a 70%, permitindo assim um eficiente isolamento dos cromossomos para análises de citometria de fluxo. Este mesmo procedimento foi empregado em trigo para a obtenção de preparações cromossômicas e os resultados foram bastante similares, demonstrando índices mitóticos elevados, bem como a eficiência no isolamento de cromossomos individuais (Lee et al., 1997).

Gaulberti et al. (1996) também descreveram um método altamente produtivo para a obtenção de núcleos e cromossomos isolados em suspensão a partir do tecido meristemático de ponta de raiz em ervilha. O método, que envolveu as etapas de sincronização com hidroxiuréia e bloqueio das células na metáfase com amiprofos-metil, seguidos de fixação em formaldeído e posterior homogenização do tecido em tampão de lise, mostrou ser eficiente para a produção de suspensões contendo núcleos e cromossomos isolados, adequados à análises de citometria de fluxo e seleção de cromossomos inteiros.

Assim, estes dados abrem uma nova perspectiva para a obtenção de preparações citológicas de alta qualidade, com índices metafásicos elevados, úteis ao desenvolvimento de estudos diversos, envolvendo vários enfoques como análises mais detalhadas da estrutura e morfologia cromossômica, para a detecção de sequências de DNA através de hibridação *in situ*, para o isolamento de frações cromossômicas específicas necessárias à construção de bibliotecas de genes cromossomo-específicos, e para o mapeamento gênico em espécies vegetais.

2.2.2. Pré-tratamentos para maceração dos tecidos

Técnicas convencionais de esmagamento da raiz ou empregando digestão enzimática do tecido meristemático tem sido exploradas em milho e diversas outras espécies vegetais visando a obtenção de preparações citológicas de alta qualidade contendo cromossomos adequadamente espalhados.

A literatura relacionada ao presente assunto demonstra que diferentes combinações de pectinase e celulase tem sido utilizadas na tentativa de se obterem preparações citológicas contendo células bem espalhadas, livres de citoplasma e que apresentem o complemento cromossômico completo e sem sobreposição (Hadlaczký & Kálmán, 1975; Rayburn & Gold, 1982; Carvalho & Saraiva 1993b; Jewell & Islan-Faridi, 1994; Schubert, et al. 1993; Schwarzacher & Leitch, 1994).

Em milho, Rayburn & Gold (1982) descreveram um procedimento para obtenção de cromossomos mitóticos a partir da digestão enzimática da raiz com uma mistura específica de celulase e pectinase. A suspensão celular obtida após a digestão enzimática apresentou células intactas e soltas, o que favoreceu a dispersão

adequada das metáfases e bom espalhamento dos cromossomos dentro da célula. Segundo os autores (Rayburn & Gold, 1982), outra vantagem deste procedimento seria a eliminação das etapas de esmagamento e remoção da lamínula, empregadas com a finalidade de quebrar a parede celular para liberação das células e remover o citoplasma, e que acabam conduzindo à perda e fragmentação dos cromossomos.

Pan et al. (1993), reportando os resultados da aplicação de um protocolo para obtenção de preparações citológicas em espécies de monocotiledôneas e dicotiledôneas, também demonstraram a eficiência da digestão enzimática na maceração de tecidos meristemáticos de ponta de raiz. Segundo os autores, o método como um todo mostra ser bastante adequado para obtenção de um elevado índice de células metafásicas livres de citoplasma e com cromossomos espalhados, particularmente úteis para o desenvolvimento de diversos estudos citogenéticos nas espécies avaliadas.

Outros compostos enzimáticos como “flaxzyme” tem sido utilizados na maceração de pontas de raízes de milho, produzindo preparações cromossômicas bem espalhadas, livres de citoplasmas e morfológicamente intactas (Carvalho & Saraiva, 1993a; 1997). Tais preparações mostraram ser particularmente adequadas ao emprego da técnica de bandamento HKG desenvolvida nestes estudos, o qual evidencia bandas centroméricas e intercalares ou intersticiais nos cromossomos de milho.

Considerando-se que as técnicas de esmagamento podem conduzir a perda e fragmentação cromossômica e que o emprego de digestão enzimática pode afetar a estabilidade cromossômica, outros procedimentos alternativos tem sido testados para a obtenção de preparações citológicas espalhadas a partir de meristemas de ponta de raiz em milho, como o caso da técnica de secagem ao ar proposta por

Carvalho & Saraiva (1993b). Segundo os autores, esta técnica, que se baseia na fixação de raízes em metanol : ácido acético, seguida de hidrólise ácida do tecido meristemático, fragmentação e maceração do tecido meristemático (o que produz uma suspensão celular), secagem ao ar e posterior secagem em placa aquecedora, mostrou ser eficiente na produção de preparações prometafásicas e metafásicas de alta qualidade.

Kindiger & Bechett (1993) demonstraram a aplicabilidade do método de esmagamento após hidrólise ácida das raízes de milho à temperatura elevada. Os autores relatam que a eficiência deste método se baseia no fato de que é possível se obter células espalhadas sem a necessidade da aplicação de compostos enzimáticos.

Schwarzacher & Leitch (1994), reportam dois métodos que empregam digestão enzimática e podem ser eficientemente utilizados na obtenção de preparações contendo cromossomos bem espalhados e livres do citoplasma e de resíduos: o método de gotejamento e o método de esmagamento. No método de gotejamento o processo de digestão enzimática é conduzido de tal forma a produzir uma suspensão de células isoladas ou protoplastos e isto mostrou ser extremamente vantajoso pois, várias preparações uniformes em espessura, densidade e qualidade podem ser obtidas a partir da mesma suspensão. As limitações deste método estariam relacionada à quantidade de material requerido, particularmente células em divisão e ao fato de que para as espécies que apresentam cromossomos grandes ou muitos cromossomos o espalhamento por gotejamento seria mais difícil. Entretanto, a despeito destas limitações, os autores recomendam o uso preferencial deste método de gotejamento. Quanto ao método de esmagamento, a digestão enzimática seria mais branda, de modo que o material tratado permanecesse intacto, evitando assim a perda de células. De acordo

com os autores ambos os métodos podem ser amplamente explorados na obtenção de preparações citológicas de alta qualidade essenciais ao sucesso das metodologias de hibridação *in situ*.

Com base no panorama exposto acima, o qual demonstra a diversidade de técnicas empregadas para obtenção de preparações citológicas adequadas ao estudo de cromossomos mitóticos de milho, é possível se evidenciar a considerável dificuldade em se estabelecer tais preparações, de modo que este campo ainda permanece em aberto para novas especulações.

2.3. Métodos de bandamento cromossômico em plantas

O desenvolvimento das técnicas de bandamento cromossômico representou um dos maiores avanços na citogenética vegetal, em virtude da sua potencialidade em demonstrar uma diferenciação estrutural ao longo dos cromossomos somáticos (revisão em Friebe et al., 1996).

Dentre tais técnicas, que evidenciam a afinidade diferencial das sequências de DNA ao longo dos cromossomos a corantes específicos ou fluorocromos e reportam métodos e mecanismos diferentes na formação de bandas, somente o bandamento-Q e bandamento-C tem sido amplamente empregados nos estudos de cromossomos de plantas, sendo estes capazes de diferenciar apenas regiões heterocromáticas de composição nucleotídica diferencial e regiões de heterocromatina constitutiva preferencialmente localizadas (Vosa & Marchi, 1972; Vosa, 1985).

O bandamento-Q produz bandas fluorescentes de intensidade diferencial em regiões de heterocromatina constitutiva, sendo tal intensidade de coloração dependente da composição e repetitividade de bases do DNA heterocromático. Assim, bandas de fluorescência intensa

refletem sequências repetitivas ricas em AT, enquanto bandas de fluorescência reduzida evidenciam sequências repetitivas ricas em pares de bases CG (Vosa, 1985).

A metodologia de bandamento-C surgiu a partir dos experimentos de hibridação *in situ* desenvolvidos com o objetivo de localizar DNA satélite altamente repetitivo marcado com radioisótopos em cromossomos metafásicos de camundongos (Pardue & Gall, 1970). Os autores demonstraram que o DNA satélite se hibridizava com o DNA da heterocromatina centromérica, sendo que tais regiões apresentavam-se intensamente coradas quando as preparações de cromossomos somáticos eram submetidas à coloração com Giemsa, enquanto o restante do cromossomo apresentava-se diferencialmente ou menos intensamente corado.

Num estudo posterior, Arrighi & Hsu (1971) demonstraram que a localização do DNA satélite em cromossomos humanos correspondia às regiões centroméricas e ao segmento distal do cromossomo Y, observando também que tais áreas apresentavam-se intensamente coradas pelo Giemsa. Segundo os autores, tais regiões corresponderiam a heterocromatina constitutiva dos cromossomos humanos. Com base nestas observações, os referidos autores descreveram então o bandamento-C como um método capaz de evidenciar particularmente regiões de heterocromatina constitutiva intensamente coradas pelo Giemsa. Dessa forma, as regiões de heterocromatina constitutiva, que apresentavam sequências de DNA altamente repetitivo, passaram a ser evidenciadas por este método e, portanto, foram denominadas de bandas-C.

O método de bandamento-C foi desenvolvido posteriormente para cromossomos de plantas (Vosa e Marchi, 1972), permitindo assim a coloração diferencial de regiões heterocromáticas constituídas de

sequências de DNA repetitivo. A partir deste marco na citogenética, a metodologia de bandamento-C passou a ser considerada como uma das principais ferramentas na identificação de cromossomos de plantas e de milho particularmente, conforme reportado mais adiante.

Outro método de bandamento cromossômico, o bandamento-G, tem sido amplamente explorado para a análise de cromossomos de animais, especificamente mamíferos e aves, principalmente por sua capacidade em evidenciar diferenciação linear por todo o cromossomo, inclusive em regiões de heterocromatina constitutiva.

A despeito de suas potencialidades, a aplicação deste método em cromossomos vegetais não têm permitido a diferenciação de bandas-G correspondentes às de animais e muitas discussões têm sido levantadas na tentativa de explorar este aspecto. Em geral, a descrição de bandas-G para cromossomos vegetais, apresentadas em algumas investigações, têm conduzido a sérias controvérsias (Vosa, 1989).

Kakeda et al. (1990) apresentou resultados da aplicação de métodos de bandamento-G em cromossomos mitóticos de milho, demonstrando que bandas-G típicas podem ser produzidas em cromossomos na metáfase inicial e em prometáfases após tratamento com tripsina e actinomicina-D, sendo este padrão de bandas-G de alta resolução variável com a progressão da fase mitótica. Os autores discutem ainda os vários mecanismos propostos para explicar a indução de bandas-G em animais, como a macroespiralização dos cromossomos mitóticos, a ocorrência de regiões de DNA base-específicas, de regiões de replicação tardia, além dos processos de modificação e degradação de proteínas não histônicas, relacionando-os com aspectos da organização dos cromossomos vegetais.

Assim, a aplicação do bandamento-G nos estudos de identificação cromossômica em espécies vegetais tem sido limitada, e

isto mostra ser particularmente desvantajoso para espécies com baixo ou nenhum conteúdo de heterocromatina detectável pelo bandamento-C, de modo que em tais espécies somente é possível a caracterização cromossômica através de métodos de coloração convencional (Vosa, 1985).

Outros tipos de bandamento foram desenvolvidos para o estudo de cromossomos vegetais, como aqueles empregando corantes fluorescentes como DAPI ou cromomicina, entretanto, estes métodos têm sido hábeis em demonstrar apenas padrões de bandas correspondentes às bandas-C, ou seja, evidenciando regiões de heterocromatina constitutiva (revisão em Verma & Babu, 1995; Friebe et al., 1996).

2.4. Bandamento-C em milho

A metodologia de bandamento-C em espécies vegetais, particularmente em milho, surgiu como uma poderosa ferramenta para identificação dos cromossomos somáticos, bem como para análise de knobs e outras regiões heterocromáticas.

Experimentos desenvolvidos inicialmente em milho por Vosa & Aguiar (1972), empregando-se da técnica de bandamento-C descrita para plantas (Vosa & Marchi, 1972), demonstraram a presença de bandas-C terminais e subterminais intensamente coradas nos cromossomos metafásicos e apresentaram evidências de que tais bandas poderiam corresponder aos knobs heterocromáticos.

Estudos subsequentes, utilizando-se de variantes do método descrito por Vosa & Marchi (1972), demonstraram a existência de um padrão variável de bandas-C entre variedades e raças de milho e relataram a possível correspondência entre essas bandas e os knobs

identificados nos cromossomos paquitênicos (revisão em Carlson, 1988).

Hadlaczky & Kálmán (1975), descrevendo um método de bandamento-C para identificação de cromossomos somáticos e caracterização de estoques em milho, evidenciaram que além dos padrões de bandas serem correspondentes aos knobs paquitênicos, existem diferentes tipos de heterocromatina, o que foi demonstrado através da coloração diferencial da heterocromatina centromérica e pericentromérica.

Sachan & Tanaka (1976), também empregando um método de bandamento-C derivado daquele descrito por Vosa & Marchi (1972), reportaram a ocorrência de variabilidade quanto ao tamanho, número e posição de bandas-C entre raças primitivas e atuais de milho.

Num estudo subsequente, os mesmos autores (Sachan & Tanaka, 1977), reportaram os padrões de banda-C em cromossomos mitóticos de várias linhagens de milho e teosinte e apresentaram evidências de variação nestes padrões. Entretanto, em nenhum dos dois trabalhos os autores fazem menção sobre a correspondência entre bandas e knobs.

Posteriormente, Ward (1980) utilizando estoques de milho com constituição de knobs conhecida, foi hábil em demonstrar que as regiões intensamente coradas pelo método de bandamento-C apresentavam nítida correspondência com os knobs heterocromáticos. Analisando estoques contendo o complemento cromossômico normal, bem como estoques contendo o cromossomo 10 anormal e o cromossomo supernumerário B, o autor encontrou evidências de que o padrão diferencial de coloração de determinadas regiões cromossômicas frente ao bandamento-C poderia refletir a existência de diferentes tipos de heterocromatina no complemento cromossômico de milho.

Mastenbroek & Wet (1983), reportaram a correspondência entre padrões de bandas-C de preparações mitóticas e as posições de knobs heterocromáticos dos cromossomos meióticos num estudos envolvendo a diferenciação cromossômica em diversos taxas de milho. Mostrando diferenças e similaridades nas posições e quantidades de heterocromatina em várias espécies do gênero *Zea*, os autores questionaram se toda a heterocromatina constitutiva característica dos knobs poderia realmente ser visualizada como bandas-C nos cromossomos mitóticos.

Aguiar-Perecin (1985b), utilizando-se da metodologia de bandamento-C, padronizada para a identificação de cromossomos somáticos de milho, demonstraram que além de existir uma correspondência entre bandas-C e knobs este método era capaz de evidenciar diferentes tipos de heterocromatina nesta espécie.

Neste ponto torna-se imprescindível mencionar algumas informações importantes referentes às classes de heterocromatina em milho.

Várias regiões do complemento cromossômico de milho tem sido descritas como sendo de natureza heterocromática, entre elas: os knobs intersticiais e terminais, a heterocromatina da região organizadora do nucléolo, localizada no cromossomo 6, a heterocromatina pericentromérica, bem como os blocos de heterocromatina cêntrica e distal localizados no cromossomo supernumerário B e o bloco heterocromático localizado no segmento distal do cromossomo 10 anormal.

Como demonstrados por vários autores, em comparação com os knobs, as demais regiões heterocromáticas dos cromossomos mitóticos de milho mostram padrões diferenciais de coloração pelo bandamento-C (Hadlaczký & Kálmán, 1975; WARD, 1980; Aguiar-Perecin, 1985b).

A heterocromatina que constitui a região organizadora do nucléolo e o satélite do cromossomo 6 apresenta uma coloração instável entre células e menos intensa que os knobs. A inconstância de diferenciação dessas regiões tem sido atribuída à diferenças quanto a manipulação das preparações citológicas, seja pelo grau de aquecimento ou esmagamento das preparações, que poderiam conduzir a perdas diferenciais do DNA cromossômico e proteínas durante a aplicação do bandamento-C. A heterocromatina centromérica, por sua vez, não é evidenciada pela coloração com Giemsa em metáfases condensadas, mas pode entretanto ser observada na forma de tênues bandas em cromossomos metafásicos pouco condensados. Quanto aos cromossomos B, estes não apresentam coloração diferencial pelo bandamento-C, enquanto o cromossomo 10 anormal, por sua vez, apresenta a região heterocromática distal densamente corada, com coloração diferencial semelhante aos knobs (revisão em Aguiar-Perecin, 1985a).

Uma nova perspectiva à elucidação desse comportamento diferencial de coloração surgiu ainda na década de 80, através dos experimentos de Peacock et al. (1981). Nestes estudos, os autores isolaram uma classe de DNA altamente repetitivo constituído de sequências de 185 pares de bases e demonstraram, através da metodologia de hibridação *in situ* seguida de autorradiografia, que este DNA satélite estava presente apenas nos knobs, na região heterocromática distal do cromossomo 10 anormal e em uma pequena fração do knob proximal do cromossomo B. Tais sequências específicas não seriam detectadas, portanto, em regiões de heterocromatina centromérica e a região organizadora do nucléolo (RON).

Estudos subsequentes demonstraram que as demais regiões heterocromáticas no genoma do milho, que apresentavam pouca

intensidade de coloração ou nenhuma coloração diferencial através do bandamento-C, não eram, consequentemente, constituídas de sequências de DNA altamente repetitivo do tipo 185 pares de bases (Hadlaczky & Kálmán, 1975; WARD, 1980; Aguiar-Perecin, 1985b).

Assim, os experimentos anteriormente relatados levaram à constatação de que realmente existem diferentes tipos de heterocromatina que podem ser distinguidos através de seus padrões de replicação durante o ciclo celular (Pryor et al., 1980) e que diferem quanto à presença de tipos de DNA repetitivo (Peacock et al., 1981).

Dentro do contexto das análises dos diferentes tipos de heterocromatina em milho, é interessante reportar os estudos envolvendo a aplicação da técnica HKG, um método variante a partir do bandamento-C (Carvalho & Saraiva, 1993a; 1995; 1997).

Carvalho & Saraiva (1993) demonstraram um padrão de bandas diferente do padrão obtido pelo Bandamento-C em cromossomos de milho, através da técnica HKG modificada (HCl-KOH-Giemsa). Neste caso particular, a técnica HKG evidenciou bandas centroméricas e intercalares ou intersticiais variáveis adjacentes aos knobs, enquanto o bandamento-C revelou apenas heterocromatina constitutiva (Knobs).

Num estudo posterior Carvalho (1995), demonstrou a aplicabilidade deste método de bandamento HKG para a identificação tanto de cromossomos mitóticos, quanto de cromossomos meióticos de milho, avaliando comparativamente os resultados obtidos com o emprego desta técnica com aqueles provenientes do bandamento-C. Novamente, os resultados evidenciaram bandas centroméricas e intercalares ou intersticiais adjacentes aos knobs, para a técnica HKG e bandas correspondentes ao knobs heterocromáticos, para o bandamento-C, demonstrando assim que estas regiões podem realmente representar diferentes tipos de heterocromatina.

2.5 Identificação dos cromossomos mitóticos em milho através do bandamento-C

Conforme observado nos relatos acima citados, diversos estudos desenvolvidos em milho demonstraram que os segmentos heterocromáticos (knobs) observados no paquíteno da profase meiótica mostram-se correspondentes aos padrões de bandas-C detectados em cromossomos mitóticos.

Outro aspecto interessante evidenciado em algumas dessas investigações é a relação existente entre presença de bandas grandes e alterações no comprimento dos braços cromossômicos.

Aguiar-Perecin (1985b) analisando preparações mitóticas coradas pelo método de bandamento-C, em estoques de milho com alta e baixa frequência de knobs e respectivo híbrido, reportou que a presença de knobs grandes podem alterar o comprimento dos braços cromossômicos e evidenciou que estas diferenças de comprimento entre cromossomos com e sem bandas podem ser significativas para cada par de homólogos.

Num trabalho subsequente Aguiar-Perecin & Vosa (1985), demonstraram, através de análises biométricas de cariótipos de estoques com diferentes composições de bandas-C, que bandas de tamanho médio e grande realmente alteravam o comprimento dos braços cromossômicos. Os resultados apresentados evidenciaram as diferenças nos índices de comprimento relativo (expresso como percentagem do comprimento do cromossomo 10, que não apresenta bandas, nem diferenças no comprimento absoluto) foram significativas para os cromossomos com bandas e sem bandas. Quanto aos valores de relação de braços, foi possível se verificar que ocorreram diferenças significativas entre os homólogos com bandas e sem bandas em alguns

casos, sendo estas diferenças dependentes do tamanho das bandas. Assim, a ocorrência de diferenças entre os valores de comprimento relativo e relação de braços mostraram-se dependentes da constituição das bandas dos dois braços de cada cromossomo. Estimando o tamanho de bandas a partir de diferenças entre braços cromossômicos heteromórficos, evidenciadas pela análise do cariótipo representativo de um dos estoques utilizados, os autores (Aguilar-Perecin & Vosa, 1985) demonstraram claramente a existência de correlação entre tamanho de bandas e o grau de alteração do comprimento dos braços cromossômicos e sugeriram que tais blocos heterocromáticos podem representar material adicional nos cromossomos.

Considerando a possibilidade dos knobs representarem material adicional nos cromossomos de milho, Bennett et al. (1976) levantaram algumas questões interessantes sobre a relação entre este aspecto e o conteúdo de DNA nuclear 4C, entre elas: a possibilidade de ocorrência de variação intraespecífica no conteúdo de DNA nuclear 4C nesta espécie; a possibilidade das variações no número de knobs envolver alterações na quantidade de DNA nuclear 4C; bem como a possibilidade de correlação positiva entre números de knobs e quantidade de DNA. Tais questões foram discutidas em investigações posteriores envolvendo milho e outras espécies de cereais, como o centeio.

Num estudo posterior Bennett et al. (1977) demonstraram que além da ocorrência de variabilidade de blocos heterocromáticos teloméricos em linhagens de *Secale*, foi possível se observar correlações positivas entre presença de grandes blocos heterocromáticos e acréscimos no comprimento de braços cromossômicos. Os resultados obtidos a partir destas análises indicaram a ocorrência de uma variação em torno de 20% no conteúdo de DNA nuclear 4C e que esta variação mostra ser positivamente correlacionada com variações na quantidade

de heterocromatina telomérica.

Posteriormente a estas investigações, Rayburn et al. (1985) demonstram que tanto o número de knobs, quanto a quantidade de heterocromatina mostram correlação positiva com o tamanho do genoma (conteúdo de DNA nuclear) entre diferentes linhagens de milho, sendo que tais variações podem estar relacionadas à variações na quantidade de sequências de DNA satélite altamente repetitivas características dos knobs heterocromáticos.

Porter & Rayburn (1990), analisando o número de bandas-C e cromossomos B em diferentes populações de milho, demonstraram que apesar de existir correlação significativa apenas para número de knobs e tamanho do genoma, não parece provável que somente a variação na quantidade de heterocromatina característica das bandas-C seja responsável pela considerável variação no conteúdo de DNA nuclear observado nestas populações. Segundo os autores, sequências de DNA diferentes daquelas constituintes dos knobs e dos cromossomos B poderiam estar envolvidas nas variações de DNA nuclear observadas.

Dentro deste contexto geral, é possível se observar que ainda existe uma grande necessidade em se proceder avaliações mais detalhadas do complemento cromossômico mitótico, seja para melhor caracterização dos parâmetros de morfologia cromossômica, que possibilitam a identificação de cromossomos individuais, quanto para a elucidação das correlações observadas acima.

Neste ponto, é interessante se mencionar que a técnica de hibridização *in situ*, idealizada para localização de sequências específicas de DNA ao longo do complemento cromossômico em animais, tem surgido como uma ferramenta muito valiosa, não somente para os estudos de mapeamento, como também para elucidar correlações que possam existir entre variações no tamanho de regiões heterocromáticas,

variações no conteúdo de DNA nuclear e variações nas quantidades de sequências específicas de DNA em espécies vegetais.

2.6. Hibridação *in situ*

A potencialidade da metodologia de hibridação *in situ* tem sido consideravelmente avaliada desde sua aplicação inicial, na década de 70, por Pardue & Gall, em experimentos visando investigar a distribuição de famílias de sequências repetitivas dentro do genoma eucarioto.

A técnica de hibridação *in situ* originalmente descrita por Pardue e Gall (1970) envolvia o reanelamento de sequências de DNA repetitivo marcadas com isótopos radioativos em preparações de cromossomos mitóticos de camundongo, e sua detecção por autorradiografia. Os resultados obtidos com a aplicação desta metodologia permitiram assim a determinação da presença e localização de sequências específicas de DNA complementares a sonda marcada ao longo dos cromossomos e dentro do núcleo, revelando o padrão de distribuição destas sequências. A partir destes experimento, uma nova perspectiva se abriu aos estudos de localização e mapeamento de sequências específicas em plantas superiores utilizando-se desta técnica.

Um grande avanço na utilização desta metodologia se deu na década de 80 a partir do desenvolvimento de sondas marcadas com biotina e digoxigenina e dos métodos de detecção por digestão enzimática do sinal, através de fosfatase alcalina conjugada com avidina/estreptavidina (biotina) ou através do uso de anticorpos específicos (digoxigenina), que produziram melhor resolução dos sinais nos sítios de hibridação e redução nos níveis de "background" em

comparação aos experimentos envolvendo marcação com radioisótipos e detecção por autoradiografia (revisão em Manuelidis et al., 1982; Rayburn & Gill, 1985).

O grande impacto nesta área se deu com a introdução das técnicas de hibridação *in situ* fluorescente (FISH), as quais utilizam fluorocromos conjugados com anticorpos específicos para a detecção dos sítios de hibridação DNA-DNA nos cromossomos. A principal vantagem do método de detecção com fluorescência é que várias sondas com diferentes marcadores podem ser utilizadas e detectadas simultaneamente utilizando-se diferentes corantes fluorescentes, possibilitando assim a determinação da ordem física de várias sequências de DNA em um determinado cromossomo (revisão em Trask, 1991).

Diferentes tipos de sequências podem ser utilizadas como sondas para experimentos de hibridização *in situ*, desde sequências cópia única, repetidas em tandem, repetidas interdispersas, altamente repetitivas, não transcritas, sequências moderadamente repetitivas (como rDNA), mRNAs específicos e DNA genômico total, e atualmente, vários métodos têm sido desenvolvidos para a construção dessas sondas, empregando desde fragmentos de DNA clonado de bibliotecas de DNA recombinante, DNA genômico total, cromossomos isolados por citometria de fluxo, oligonucleotídeos sintéticos e fragmentos obtidos via enzimas de restrição (revisão em Jiang & Gill, 1994b; Schwarzscher et al., 1994).

Várias técnicas de hibridação *in situ*, utilizando marcadores não radioativos como a biotina e digoxigenina e/ou fluorocromos, tem sido extensivamente empregadas em diferentes espécies vegetais, principalmente em cereais. Tais técnicas tem-se utilizado principalmente de preparações de cromossomos mitóticos espalhados, entretanto, preparações de cromossomos meióticos também tem sido empregadas (Mukai et al., 1990; Heslop-Harrison et al., 1991; Leitch et al., 1991;

Mukai & Gill, 1991; Leitch & Heslop-Harrison, 1992; Anamthawat-Jönsson et al., 1993; Jiang & Gill, 1993; Maluszynska & Heslop-Harrison, 1993; Mukai et al., 1993; Nkongolo et al., 1993; Schwarzacher et al., 1994; Cuadrado et al., 1995; Pedersen & Linde-Laursen, 1995; Schwarzacher & Heslop-Harrison, 1995; Fuchs et al., 1996; Heslop-Harrison, 1996).

Segundo Heslop-Harrison et al., (1993), o grande potencial desta técnica está na sua habilidade em combinar informações citológicas sobre a morfologia cromossômica e nuclear com informações sobre a estrutura da sequência de DNA, permitindo a localização de quaisquer sequências particulares sobre os cromossomos somáticos ou meióticos.

Em uma extensa revisão sobre o assunto, Schwarzacher et al. (1994) reportaram as principais contribuições desta metodologia, entre elas: a possibilidade de se combinar informações citológicas sobre o cromossomo e morfologia nuclear com informações moleculares sobre a estrutura das sequências de DNA; permitir a localização de quaisquer sequências de DNA ao longo dos cromossomos mitóticos e meióticos, ou seja, o mapeamento físico das sequências, determinando, assim a organização do genoma; permitir o estabelecimento de comparações sobre a localização e distribuição de sequências em espécies relacionadas, para elucidação das relações do genoma e evolução do cariótipo; permitir o estabelecimento dos aspectos estruturais relativos à arquitetura nuclear e ao empacotamento cromossômico, além dos principais aspectos ligados aos mecanismos de condensação e descondensação cromossômica, dos mecanismos de expressão gênica e interações cromossômicas; possibilitar o acompanhamento do comportamento de genomas inteiros e cromossomos individuais através do ciclo celular; esclarecer a organização de genes rDNA expressos e não

expressos em diferentes núcleos, além de permitir a avaliação da estrutura bi e tridimensional do núcleo *in vivo*, através da localização de sondas específicas; e possibilitar a identificação cromossômica, através de análises comparativas com padrões preestabelecidos via morfologia cromossômica normal (métodos de coloração convencionais), morfologia cromossômica alterada (uso de estoques com aberrações estruturais) ou padrões de bandamento cromossômico.

Em milho, algumas investigações foram levadas a efeito na perspectiva de se estabelecer um mapeamento detalhado de sequências específicas ao longo do complemento cromossômico desta espécie. Em geral, a maioria dos estudos de mapeamento de sequências nesta espécie foi desenvolvida utilizando-se sondas marcadas com isótopos radioativos e preparações de cromossomos meióticos na fase de paquíteno.

Phillips *et al.* (1979) reportaram a localização de genes ribossômicos na heterocromatina da região organizadora do nucléolo e na constrição secundária do cromossomo 6, através da utilização de um método de hibridação *in situ* rRNA-DNA com detecção por autoradiografia, em preparações de cromossomos paquítenicos. Segundo os autores, a técnica apresentou adequada resolução para a identificação dos cromossomos, permitindo assim a localização e quantificação de genes específicos.

Na mesma linha de investigação, Mascia *et al.* (1981) utilizaram o método descrito por Phillips *et al.* (1979) e demonstraram a localização de genes rRNA-5S no braço longo do cromossomo 2. Os resultados evidenciaram também que estes genes estão organizados numa unidade de repetição de 320 pares de bases e são susceptíveis à modificações que podem ocorrer após o processo de replicação do DNA, conforme comprovado através de análises envolvendo digestão com endonucleases de restrição.

Peacock et al. (1981) foram pioneiros em demonstrar, através da metodologia de hibridação *in situ* com marcadores radioativos, que uma classe de DNA altamente repetitivo de 185 pares de bases apresentava padrões de hibridização apenas nos knobs, na região heterocromática distal do cromossomo 10 anormal e em uma pequena fração do knob proximal do cromossomo B. Tais sequências específicas não seriam detectadas, portanto, em regiões de heterocromatina centromérica e região organizadora do nucléolo.

Viotti et al. (1985) demonstraram a caracterização e distribuição de 2 sequências altamente repetitivas (H2a - 184pb e H2b - 185pb) nos cromossomos paquitênicos A e B de *Zea mays*, através de hibridização *in situ*, com sondas radioativas (^3H -TTP) e autoradiografia. Neste caso, as sequências repetitivas mostram localização preferencial na heterocromatina dos Knobs nos cromossomos A e na heterocromatina pericentromérica dos cromossomos B. Segundo os autores, tais sequências poderiam também apresentar-se inderdispersas na eucromatina.

Num estudo posterior, Shen et al. (1987) utilizaram sondas correspondentes ao mRNA do locus *waxy* (fragmentos de 10.8 kb), marcados com nucleotídeos radioativos para determinar a localização desta sequência nos cromossomos paquitênicos e estabelecer os padrões distribuição de genes de baixo número de cópias no genoma do milho. Sinais de hibridização foram especificamente localizados no cromossomo 9. Os autores discutiram ainda a eficiência na utilização de preparações meióticas para a obtenção de tais informações, demonstrando que nesta fase da meiose os cromossomos mostram-se bem distendidos, facilitando a avaliação de aspectos estruturais que podem conduzir a precisa identificação e mapeamento cromossomal.

Mais recentemente algumas investigações foram levadas a efeito

para a localização de sequências repetitivas em cromossomos mitóticos de milho, utilizando a metodologia de hibridação *in situ* com detecção fluorescente do sinal (FISH).

Num estudo mais abrangente, Aledo et al. (1995) levantaram uma discussão sobre a localização e possível função de uma família de DNA moderadamente repetitivo (9,0 kb) interdisperso no genoma de espécies do gênero *Zea*, inclusive *Zea mays*. Utilizando-se de clones de sequências repetitivas isoladas de teosinte, os autores demonstraram a localização preferencial dos sítios de hibridação de sequências desta família em regiões distais de todos os braços cromossômicos e ausência destes em regiões de heterocromatina centromérica e pericêntrica. Outro aspecto interessante apresentado neste estudo refere-se à organização interna altamente conservada de tais elementos entre as espécies e subespécies do gênero *Zea*. Os autores discutiram ainda os possíveis mecanismos responsáveis pelo padrão de interdispersão observado para estas sequências e evidenciaram algumas dificuldades encontradas no mapeamento cromossômico via hibridação *in situ* em cromossomos mitóticos de vegetais, como o difícil acesso das sondas aos cromossomos devido à parede celular, o grau diferencial de condensação cromatínica comparado aos cromossomos de animais e aos cromossomos meióticos e a falta de sondas para o desenvolvimento de tais análises.

Na mesma linha de investigação, Edwards et al. (1996) demonstraram a caracterização e localização de famílias de sequências repetitivas do genoma de milho utilizando hibridação *in situ* fluorescente (FISH). Os resultados deste estudo sugeriram um padrão de dispersão casual destas famílias em todos os cromossomos mitóticos desta espécie, exceto nas regiões centroméricas, na região organizadora do nucléolo e nas regiões heterocromáticas características dos knobs.

Riera-Lizarazu et al. (1996) demonstraram a potencialidade do uso da técnica de hibridação *in situ* fluorescente (FISH) para a caracterização citológica e molecular de híbridos interespecíficos, através do uso de DNA genômico como sonda em combinação com dados do RFLPs. Os resultados evidenciaram a possibilidade de identificação de cromossomos individuais de cada parental em híbridos de aveia-milho, através deste tipo de sonda, bem como utilizando-se da sonda correspondente à sequência repetitiva de 185pb, específica dos knobs de milho. Além da avaliação de caracteres de morfologia da planta foram investigados os possíveis mecanismos responsáveis pela eliminação de cromossomos nos híbridos parciais obtidos, comparando tais informações com relatos anteriormente discutidos na literatura relacionada a cereais. Segundo os autores, um dos aspectos mais interessantes neste estudo foi a obtenção das linhagens de adição cromossômica de aveia, as quais representam um material de excelência para estudos posteriores de mapeamento de genes e marcadores em milho, manipulação cromossômica de milho, estudos de expressão de genes de milho em aveia e transferência de DNA, genes ou mesmo transposons para aveia.

Conforme exposto nos relatos anteriormente citados, os vários métodos utilizados atualmente têm uma enorme importância na área de citogenética molecular, seja para o mapeamento genético, para estudos de evolução ou programas de melhoramento envolvendo a manipulação do DNA. Dentro de um contexto mais geral, a investigação da localização e distribuição de sequências heterocromáticas nos cromossomos, seja através de métodos de bandamento cromossômico ou hibridação molecular *in situ*, mostra ser um ponto chave para a elucidação de aspectos de estrutura dos cromossomos e dos processos envolvidos na manutenção da estabilidade cromossômica.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Genótipos utilizados

O presente projeto envolve parte de uma linha de pesquisa que vem se desenvolvendo no Departamento de Genética da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - USP, desde a década de 70, cujos objetivos estão relacionados ao estudo da estrutura dos cromossomos, resposta ao cultivo *in vitro* e estudos de variabilidade cromossômica em linhagens de milho.

Neste trabalho analisou-se linhagens endogâmicas e respectivo híbrido de milho (*Zea mays*), originadas a partir da Variedade Comercial Jac-Duro (endosperma tipo flint - sementes Agrocere), com diferentes composições de Knobs (Decico, 1991), conforme sumarizado na tabela 1.

Tais análises envolveram a obtenção de preparações citológicas de alta qualidade de cromossomos mitóticos, através da aplicação de pré-tratamentos específicos e seleção de genótipos com alto índice mitótico, visando a identificação de cromossomos individuais e dando novas evidências de que a presença de knobs heterocromáticos médios a grandes, correspondentes às bandas-C, alteram o tamanho dos braços cromossômicos.

Tabela 1. Constituição de knobs heterocromáticos dos genótipos utilizados.

Designação dos genótipos	Posição dos Knobs * (= bandas-C)								
	K2L	K3L	K6L ₂	K6L ₃	K7S	K7L	K8L ₁	K8L ₂	K9S
441123	++	++	++	++	++	++	++	++	++
4443	++	00	++	++	00	++	++	++	00
441123 x 4443	++	+0	++	++	+0	++	++	++	+0

* K = knob

L = braço longo

S = braço curto

Os números correspondem aos cromossomos.

00 = homozigótico para ausência de knobs

++ = homozigótico para presença de knobs

Em todas as linhagens selecionadas K6L₂ - K6L₃ e K8L₁ e K8L₂ formam uma banda única nos cromossomos metafásicos.

As análises envolveram também a obtenção de preparações de cromossomos meióticos, para identificação dos cromossomos através dos padrões de distribuição de knobs no paquíteno e posterior comparação com os padrões de bandas-C dos cromossomos mitóticos.

3.2. Metodologias de pré-tratamento para obtenção de preparações citológicas

Para a obtenção de preparações mitóticas adequadas às análises via bandamento-C e hibridação *in situ* sementes dos referidos materiais foram pré-tratadas com 8-hidroxiquinolina e cicloheximida, empregados para promover a acumulação de células metafásicas e prometafásicas, bem como a condensação dos cromossomos somáticos, permitindo assim uma melhor resolução destas estruturas, conforme informações relacionadas na literatura (Tlaskal, 1980; Jewell & Islan-Faridi, 1994; Silvarolla & Aguiar-Perecin, 1994;).

Diferentes combinações de pectinase e cellulase foram utilizadas na tentativa de se obter preparações livres de fragmentos celulares e sem sobreposição cromossômica (Hadlaczky & Kálmán, 1975; Rayburn & Gold, 1982; Carvalho & Saraiva, 1993a; Schubert, et al. 1993; Schwarzachner & Leitch, 1994; Jewell & Islan-Faridi, 1994;).

3.2.1. Obtenção das preparações citológicas de cromossomos mitóticos

Sementes foram germinadas em potes de plásticos contendo *Sphagnum* umedecido a 28°C. Após 2 dias de germinação, as pontas de raízes com 0,5 a 2,0 cm de comprimento foram coletadas e pré-tratadas com fixador Carnoy (3 partes de etanol : 1 parte de ácido acético glacial);

0,03% 8-hidroxiquinolina, por 2 horas e 30 minutos e 0,03% 8-hidroxiquinolina combinado a 0,00125 %cicloheximida, por 2 horas e 30 minutos.

As raízes pré-tratadas foram então fixadas em Carnoy por 12 horas à temperatura ambiente. Após fixação parte dos materiais foi mantida no fixador e parte foi transferida para álcool a 70%, sendo ambos estocados a 4°C.

Após esta etapa as raízes foram retiradas da geladeira e ao atingirem temperatura ambiente procedeu-se a obtenção das preparações citológicas através dos métodos de dissecação sem tratamento enzimático e tratamento enzimático seguido de dissecação.

a) Dissecação sem tratamento enzimático

Este método empregado na obtenção das preparações citológicas constou basicamente de remoção da coifa, dissecação das raízes longitudinalmente sob lupa, liberação das células meristemáticas e esmagamento das células entre lâmina e lamínula, sendo as principais modificações dependentes do método de coloração empregado, seja Feulgen, bandamento-C ou hibridação *in situ*, conforme será especificado na descrição desses métodos.

b) Tratamento enzimático e dissecação

As raízes foram submetidas à maceração enzimática, usando uma combinação de pectinase e celulase, conforme as variáveis: genótipo empregado; tempo de fixação da raiz; atividade do produto utilizado.

Raízes mantidas no fixador (para aplicação do bandamento-C ou à hibridação *in situ*) ou em etanol (selecionadas para a coloração pelo método de Feulgen) foram retiradas da geladeira até atingirem

temperatura ambiente. Para as raízes submetidas à coloração pelo método de Feulgen procedeu-se inicialmente às etapas de coloração e posteriormente à aplicação do tratamento enzimático.

O fixador foi decantado e foi adicionada água desmineralizada às raízes, 2 vezes, por 10 minutos, à temperatura ambiente. Utilizando-se um vidro de relógio ou placa de Petri pequena contendo água desmineralizada, procedeu-se então a excisão da região meristemática, a qual foi colocada em um tubo eppendorf (1,5 ml) contendo água desmineralizada.

A água desmineralizada foi então substituída por tampão citrato pH 4,5 (0,147g de citrato trisódio dihidratado ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$); 0,105g de ácido cítrico monohidratado ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$) em 50,0 ml água) com auxílio de pipeta Pasteur, 2 x 10 minutos, à temperatura ambiente.

O tampão citrato foi removido e substituído pela solução enzimática preparada previamente à concentração de celulase a 2% (Serva) e pectinase a 10% (Macerozyme Onozuka R10) e as raízes foram então incubadas a 37°C, durante 30 minutos, sendo necessária a ressuspensão da solução em intervalos regulares.

Após remoção da solução enzimática, com auxílio de pipeta Pasteur, as raízes foram lavadas em tampão citrato, 2 x 10 minutos, a 37°C e posteriormente em água desmineralizada, 2 x 10 minutos a 37°C, sendo então mantidas à temperatura ambiente.

O material foi então colocado em ácido acético a 45%, por 1 a 4 minutos e procedeu-se à remoção da coifa, dissecação das raízes longitudinalmente sob lupa, liberação das células meristemáticas e esmagamento entre lâmina e lamínula, em solução de ácido acético a 45%, para as raízes destinadas ao bandamento-C ou à hibridação *in situ*. Tais preparações foram então examinadas em microscópio de contraste de fase para monitoramento da dissociação das células

meristemáticas e do espalhamento dos cromossomos. Após a separação de lâmina e laminula em Nitrogênio líquido as preparações foram secas à temperatura ambiente.

No caso das preparações selecionadas para o bandamento-C, estas foram mantidas em álcool absoluto, em geladeira, por no mínimo 24 horas. Para o procedimento de hibridização *in situ*, as preparações foram armazenadas em cubas altas contendo sílica gel, vedadas e mantidas a -20°C. Para as raízes coradas pelo método de Feulgen as etapas de dissecação e esmagamento foram realizadas em solução de carmim acético a 1%, após o qual procedeu-se a separação de lâmina e laminula em nitrogênio líquido, seguida de secagem das preparações ao ar e posterior montagem em bálsamo do Canadá.

3.3. Bandamento C

A metodologia de bandamento-C utilizada no presente trabalho seguiu o procedimento descrito por Aguiar-Perecin (1985b), com modificações.

As preparações obtidas conforme descrito nos itens 3.2.1a e 3.2.1b foram retiradas da geladeira até atingirem temperatura ambiente, novamente secas à temperatura ambiente e então submetidas ao tratamento com solução saturada de hidróxido de bário (Ba(OH)_2) a 37°C, por 20 minutos. O material foi lavado duas vezes com água deionizada, transferido para solução salina 2 x SSC (cloreto de sódio 0,3 M + citrato de sódio 0,03 M) à temperatura ambiente, por 5 minutos e em seguida incubado na mesma solução de 2 x SSC a 60°C por 1 hora. Após lavagem em água deionizada, desidratação em uma série de álcoois (70%, 95% e 100%) e secagem à temperatura ambiente, as preparações foram coradas em solução de Giemsa R66 (Gurr) a 1% (pH 6,8), por 2-5

minutos. As lâminas foram então lavadas em água deionizada, novamente secas à temperatura ambiente e montadas em Bálsamo do Canadá.

3.4. Método de Feulgen

O método de Feulgen, utilizado para a avaliação geral dos pré-tratamentos com 8-hidroxiquinolina e 8-hidroxiquinolina combinada a cicloheximida empregados na obtenção das preparações citológicas, foi conduzido como descrito previamente por Aguiar-Perecin e Vosa (1985) com algumas modificações.

As etapas de coleta de raízes, pré-tratamento e fixação das raízes foram conduzidas conforme descrito no item 3.2.1.

As raízes mantidas em álcool a 70% foram previamente retiradas da geladeira, até atingirem temperatura ambiente, seguindo-se a lavagem em água desmineralizada, por 5 minutos. Após hidrólise ácida em HCl 1N a 60°C, por 5 minutos, as raízes foram submetidas à coloração com Reativo de Schiff (fucsina-leuco-básica), por 45 minutos, no escuro, seguindo-se então a lavagem em água corrente, por 5 minutos. Para obtenção das preparações citológicas, as raízes foram submetidas ao processo de dissecação e esmagamento em solução de carmim acético a 1% ou à maceração enzimática seguida de dissecação e esmagamento em solução de carmim acético a 1%, conforme descrito nos itens 3.2.1a e 3.2.2b. Após observação das preparações ao microscópio óptico, para monitoramento da dissociação das células meristemáticas e do espalhamento dos cromossomos procedeu-se a separação da lâmina e lamínula em nitrogênio líquido, secagem à temperatura ambiente e montagem das preparações permanentes em bálsamo do Canadá.

3.5. Obtenção das preparações citológicas de cromossomos meióticos

Para obtenção de prófases meióticas foi empregada a técnica de esmagamento de microsporócitos, segundo McClintock (1930), conforme descrito abaixo.

Inflorescências masculinas imaturas foram coletadas, fixadas em CARNOY (3 partes de álcool absoluto : 1 parte de ácido acético glacial), por 12 horas no mínimo, seguindo-se transferência para álcool a 70% e armazenamento em geladeira 4°C.

Após a retirada das inflorescências da geladeira, até atingirem temperatura ambiente, procedeu-se à remoção das anteras em álcool a 70%. A ponta da antera foi excisada em uma lâmina escavada contendo 1 gota de carmim propiônico a 1% e os microsporócitos liberados na lâmina pelo leve esmagamento da antera. Após adição da lamínula sobre o material, aquecimento e esmagamento leve as preparações semi-permanentes foram seladas com esmalte ou pasta de borracha e observadas ao microscópio, sendo imediatamente fotografadas em alguns casos. Em geral procedeu-se a separação da lâmina e lamínula em ácido acético a 45%, secagem e montagem permanente das melhores preparações em bálsamo do Canadá.

3.6. Hibridação *in situ*

Para a padronização da metodologia de hibridação molecular *in situ* apresentada no presente trabalho foi elaborado um protocolo adaptado a partir Schwarzacher et al. (1994) e do protocolo cedido pela Dra. Angela Karp (Long Ashton Research Station, U.K.).

3.6.1. Linhagens bacterianas e sondas de DNA utilizadas

Para os experimentos de transformação e multiplicação e isolamento das sondas foram utilizadas as linhagens de *Escherichia coli* JM83 e JM83 transformada, respectivamente.

Sondas

As sondas de DNA utilizadas durante o desenvolvimento desta metodologia foram cedidas pelo Dr. R. L. Phillips (University of Minesota, U.S.A.)

a) pGEM2-185pb correspondendo ao plasmídeo pGEM2 contendo a sequência de 185 pares de bases, característica dos knobs heterocromáticos de milho, inserida no sítio HindIII, e o gene marcador seletivo que confere resistência à ampicilina (DAGERT, et al. 1979. Gene 6:23-8), inserida na linhagem de *Escherichia coli* JM83.

Esta construção foi utilizada nas etapas de marcação com biotina e hibridação *in situ* de forma integral, ou seja o plasmídeo íntegro contendo a sequência de 185pb foi usado como sonda.

b) pUC8-rDNA correspondendo ao plasmídeo pUC8 contendo a sequência de 9,1kb do DNA ribossômico de milho inserida no sítio EcoRI, e o gene marcador seletivo que confere resistência à ampicilina, inserida na linhagem de *Escherichia coli* JM83.

3.6.2. Transformação Bacteriana

Conforme citado anteriormente, para esta etapa foi utilizado o plasmídeo pUC8 contendo a sequência de 9,1 kb do DNA ribossômico de milho, inserida no sítio de restrição EcoRI. O primeiro passo no desenvolvimento do processo de transformação foi a obtenção de células competentes da linhagem JM83 de *Escherichia coli*, descrito a seguir.

Preparo de células competentes

No preparo do pré-inóculo, células de uma única colônia da bactéria JM83 foram inoculadas em 10,0 ml de meio L-Broth (100,0 mg triptona; 50,0 mg extrato de levedura e 100,0 mg NaCl; pH 7,2; volume final = 10,0 ml) e incubadas a 37°C, sob agitação (200 rpm), por 12 horas, conforme os procedimentos usuais de biologia molecular (Sambrook *et al.*, 1989).

Após este período, uma alíquota de 500,0 μ l foi retirada do pré-inóculo, inoculada em 50,0 ml de meio L-Broth pré-aquecido e incubada a 37°C, sob agitação (200 rpm), até atingir DO 650 = 0,2 - 0,3. A medida de densidade óptica (DO 650) foi feita em intervalos regulares de 30 minutos, em espectrofotômetro, a partir de alíquotas de 1,0 μ l retiradas da cultura em crescimento.

Ao atingir a densidade óptica desejada (DO 650 = 0,2 - 0,3), a cultura foi resfriada em gelo por 10 minutos, separada em 2 tubos e centrifugada a 5.000 rpm, por 5 minutos a 4°C. Após centrifugação, os sobrenadantes contendo apenas o meio de cultura foram descartados e os “pellets” ressuspensos em 20,0 ml de CaCl₂ 0,1M gelado e mantidos em gelo por 20 a 25 minutos. Procedeu-se então nova centrifugação a 5.000 rpm, por 5 minutos a 4°C e ressuspensão leve em 500,0 μ l de CaCl₂ 0,1M, sendo o material mantido em gelo por 30 minutos até a etapa de transformação descrita a seguir.

Transformação

Para a transformação das células competentes, 1,2 μ l do estoque inicial da sonda pUC8-rDNA (312 ng/ μ l) foi adicionado à alíquotas de 75,0 μ l de células competentes, misturando-se a solução

levemente por inversão do eppendorf e mantendo-a em gelo, por 10 minutos.

A solução contendo as células competentes e o DNA foi então submetida a um choque térmico de 5 minutos a 37°C. Após esta etapa foi acrescido ao tubo 1,0 ml de meio L-Broth + ampicilina e este incubado a 60°C, por 60 minutos.

O material foi então centrifugado a 5.000 rpm, por 5 minutos, ressuspendido novamente em quantidades variáveis de meio LB + ampicilina pré-aquecido (3, 10, 25, 50 e 100,0 µl) e inoculado em placas de Petri contendo 20,0 ml de meio LB acrescido de 100,0 µg / ml ampicilina, as quais foram devidamente seladas com parafilme. Após crescimento a 37°C, por 12 horas as culturas foram avaliadas e mantidas a 5°C para serem posteriormente manipuladas.

A eficiência do processo de transformação foi determinada pelo crescimento ou não das colônias nas placas de Petri e posteriormente confirmada através do isolamento do DNA plasmidial das bactérias transformadas, subsequente digestão com EcoRI e corrida em gel de agarose, conforme as etapas descritas nos itens 3.6.3. e 3.6.4.

Manutenção das linhagens bacterianas e dos plasmídeos

Dois processos foram utilizados para manutenção das linhagens transformadas e consequentemente dos plasmídeos vetores contendo as sequências de interesse: plaqueamento em meio sólido e estoque em glicerol. Tais procedimentos também foram utilizados para a manutenção da linhagem de *E. coli* JM83 não transformada, empregada originalmente no processo de transformação.

a) Plaqueamento em meio sólido.

Este método consistiu do cultivo regular (a cada 2 meses) das linhagens em meio líquido seguido de inoculação em meio sólido. Células de uma única colônia da bactéria foram inoculadas em 5,0 ml de meio LB (acrescido de ampicilina para as linhagens transformadas) e incubadas a 37°C, sob agitação (200 rpm), por 12 horas.

Após o período de crescimento procedeu-se à inoculação em placas de Petri contendo 20,0 ml de meio L-Broth (acrescido de 100,0µg/ml ampicilina para as linhagens transformadas), as quais foram devidamente seladas, incubadas a 37°C, por 12 horas e posteriormente mantidas a 5°C por aproximadamente 2 meses.

b) Estoque em glicerol

Para a manutenção prolongada das linhagens bacterianas utilizou-se o método de estocagem em glicerol a -20°C.

Células de uma única colônia da bactéria foram inoculadas em 5,0 ml de meio L-Broth (acrescido de ampicilina para as linhagens transformadas) e incubadas a 37°C, sob agitação (200 rpm), por 12 horas. Após este período de crescimento o meio foi distribuído em tubos de centrifuga (10,0 ml) e centrifugados a 4.000 rpm, por 10 minutos.

O sobrenadante foi descartado e o “pellet” cuidadosamente ressuspensionado em 5,0 ml de solução salina estéril a 0,85% (850,0 mg NaCl em 100,0 ml água milli-Q). Após centrifugação a 4.000 rpm, por 10 minutos, o “pellet” foi novamente ressuspensionado em 5,0 ml de solução salina estéril a 0,85% e centrifugado a 4.000 rpm, por 10 minutos. Após descarte da solução salina o “pellet” foi gentilmente ressuspensionado em 2,0 ml de solução de glicerol a 15% (3,0 ml glicerol em 17,0 ml água milli-Q), a suspensão distribuída em alíquotas de 1,0 ml em tubos eppendorfs e estocada a -20°C.

3.6.3. Isolamento do DNA plasmidial

Cultivo e lise bacteriana

Bactérias da linhagem de *E. coli* JM83 transformada com o plasmídeo vetor pGEM2 - 185 pb foram cultivadas em 5,0 ml de meio LB (50,0 mg de triptona; 25,0 mg de extrato de levedura e 50,0 mg de NaCl) acrescido de 50,0 μ l amplicilina na concentração de 10,0 mg/ml, durante 12 horas a 37°C, sob agitação (200 rpm).

Após crescimento, o meio contendo as bactérias foi separado em 4 tubos eppendorf (1,25 ml de cultura / tubo), e estes centrifugados a 13.000 rpm, durante 5 minutos a 5°C.

Os sobrenadantes foram cuidadosamente descartados e os “pellets” ressuspensos em 400,0 μ l de solução de lisozima (2,0 mg/ml) em 50 mM Tris / HCl (pH 7,4) mantida em gelo, promovendo assim a lise das células e liberação do DNA cromossômico e plasmidial. A ressuspensão foi feita do 1º ao último tubo eppendorf, sucessivamente. Este material foi então incubado em gelo, durante 10 minutos.

Foram adicionados 100,0 μ l de EDTA 0,5 M (pH 8,0) à solução, e esta novamente incubada em gelo, por 10 minutos. Após a adição de 20,0 μ l de Triton X-100 a 2%, seguida de leve agitação por inversão do tubo eppendorf, o material foi centrifugado a 13.000 rpm, por 30 minutos a 5°C.

O sobrenadante contendo o DNA (450,0 μ l) foi transferido para um novo tubo eppendorf e a este foram adicionados 90,0 μ l NaCl 5 M e 25,0 μ l Mops 1M (pH 7,0), misturando-se a solução através de leve inversão do tubo eppendorf.

Isolamento do DNA plasmidial via Qiagen-tip

Após esta etapa procedeu-se ao isolamento do DNA plasmidial utilizando-se o protocolo de extração específico da Qiagen ("Qiagen-tip": Qiagen Product Guide, 1996. Qiagen Plasmid Handbook - for plasmid minikit, 1993).

O Qiagen-tip foi fixado a uma micropipeta Gilson P1000 ajustada para 600,0 μ l e lavado 4 vezes com 300,0 μ l tampão A (NaCl 400 mM, Mops 50 mM; etanol a 15%), equilibrando assim a coluna.

A micropipeta foi ajustada para 1000,0 μ l e procedeu-se a adsorção do DNA, pipetando a solução contendo o DNA 4 vezes. O Qiagen-tip foi então lavado com tampão C (NaCl 1000 mM, Mops 50 mM; etanol a 15 %), 3 vezes em um tubo eppendorf (1,5 ml) e 2 vezes em outro tubo eppendorf (1,5 ml), promovendo assim a remoção do DNA cromossômico, de proteínas e RNA contidos na solução, de modo que somente o DNA plasmidial permaneceu no Qiagen-tip.

Para eluição do DNA plasmidial foram colocados 200,0 μ l de tampão F (NaCl 1500 mM, Mops 50 mM; etanol a 15%; pH7,5) em 3 tubos eppendorfs e a micropipeta ajustada para 500,0 μ l. Após pipetar 3 vezes em cada tubo contendo 200,0 μ l de tampão F, o material foi reunido num único tubo eppendorf (600,0 μ l) e iniciou-se o processo de precipitação do DNA plasmidial.

Precipitação do DNA plasmidial

Ao tubo eppendorf contendo o DNA plasmidial isolado foram adicionados 0,8 volumes de isopropanol mantido a -23°C (480,0 μ l), o material incubado a 0°C por 15 minutos e posteriormente centrifugado a 13.000 rpm, por 30 minutos a 4°C .

Após descartar o isopropanol, o “pellet” foi lavado em 100,0 μ l de etanol a 70% mantido a -23°C e novamente centrifugado a 15.000 rpm, por 30 minutos a 4°C. Após descarte do etanol a 70% e secagem em “speed vacuum” por 2 minutos o “pellet” foi ressuspendido em 25,0 μ l de TE (10 mM Tris / HCl pH 8,0 / 1 mM EDTA pH 8,0) e armazenado a -20°C. Uma alíquota de 2,0 μ l do DNA isolado foi separada para posterior quantificação e visualização da integridade do DNA plasmidial em gel de agarose 0,8% e 1,2%, respectivamente, conforme descrito no item a seguir.

3.6.4. Eletroforese em minigel de agarose

Preparo do minigel e condições de corrida

Esta técnica foi aplicada na quantificação do DNA plasmidial isolado contendo o fragmento de interesse, na visualização da integridade dos fragmentos de DNA plasmidial e inserto após digestão com enzima de restrição e na verificação da eficiência do processo de marcação do vetor pGEM2-185pb com biotina via “nick translation”, o qual produz uma população de fragmentos de 200 a 500 pares de bases marcados.

Para a etapa de quantificação utilizou-se gel de agarose a 0,8% preparado em tampão TBE 1X (0,24 g de agarose Sigma em 30,0 ml TBE 1X), enquanto que para as demais etapas a concentração da agarose foi de 1,2% (0,36 g de agarose em 30,0 ml TBE 1X) (TBE 5X = 54,0 g de Trisbase; 27,5 g de ácido bórico; 20,0 ml de EDTA 0,5M).

Na agarose fundida por ebulição foi adicionado 1,0 μ l de brometo de etídio (10,0 mg / ml) para que o gel pudesse ser posteriormente analisado e fotografado em transiluminador. Após montagem da cuba de eletroforese o gel foi coberto com tampão TBE 1X

e as amostras adicionadas cuidadosamente em cada canaleta, conforme as indicações abaixo.

Para controle foi adicionado a uma das canaletas um DNA marcador, normalmente o DNA do vírus Lambda íntegro ou digerido com HindIII em concentrações variáveis. Para cada amostra foi acrescido 1,0 µl de "Loading Buffer" (5,0 ml de EDTA 0,2 M; 0,8 ml de azul de bromofenol saturado em água; 6,0g de glicerol; volume final = 10,0 ml), o qual auxilia no carregamento dos fragmentos no gel e no acompanhamento da corrida.

Para as amostras destinadas à digestão com enzima de restrição, procedeu-se o preparo da solução de digestão, a qual consistia de 1,0 µl do DNA plasmidial, 1,0 µl do tampão específico para a enzima de restrição selecionada, 7,0 µl de água Milli-Q estéril e 1,0 µl da enzima de restrição (HindIII para o vetor pGEM2-185pb ou EcoRI para o vetor pUC8-rDNA), (volume final da solução de digestão = 10,0 µl). Após rápida homogenização esta solução foi incubada a 37°C, por 1 hora, sendo posteriormente acrescida de 1,0 µl de "Loading Buffer" e adicionada na canaleta para corrida.

As corridas foram realizadas inicialmente a 50 Voltz / 0,02 Amperes, por 30 minutos e depois a 75 Voltz / 0,02 Amperes, por mais 60 minutos, sendo este processo de migração dos fragmentos no gel monitorado a cada 30 minutos através da visualização em transiluminador.

As etapas de preparo da agarose em TBE, montagem da cuba, adição das amostras nas canaletas e monitoramento da corrida seguiram os mesmos procedimentos para os géis de quantificação, para os géis destinados à visualização da integridade plasmidial, bem como para os géis utilizados para a verificação dos fragmentos produzidos pela reação de "nick translation" durante a marcação com biotina.

Quantificação do DNA plasmidial

Os cálculos para a determinação da concentração do DNA plasmidial contendo o inserto de interesse foram feitos com base no padrão das bandas das amostras visualizadas no gel de agarose em comparação com as bandas do DNA do vírus Lambda (λ) íntegro ou Lambda HindIII, utilizado como marcador de peso molecular e concentração conhecidos.

O DNA do vírus Lambda tem 48,7 kb de comprimento e quando cortado com a enzima de restrição HindIII produz 6 fragmentos de diferentes tamanhos: 23.9kb, 9.4kb, 6.7kb, 4.4kb, 2.3kb e 2.0kb. Estes fragmentos podem ser usados como marcadores de tamanho quando corridos em gel, permitindo assim a estimativa da produção do plasmídeo.

Aplicando-se no gel uma amostra de 1,0 μ g do Lambda HindIII cada fragmento produzido irá conter o volume de DNA proporcional a sua percentagem em relação ao genoma Lambda original, ou seja, no caso do fragmento de 23.9 kb, que corresponde a 50% do tamanho total do Lambda, para cada 1,0 μ g de amostra do λ aplicada no gel este fragmento seria equivalente a 500,0 ng de DNA. Assim, verificando-se a correspondência entre as bandas produzidas no gel e comparando-se a intensidade das bandas do plasmídeo com aquelas do DNA λ foi possível estimar a concentração de DNA.

3.6.5. Marcação da sonda de DNA

Para a marcação da sonda de DNA pGEM2-185pb com biotina foi empregado o “Bionick Labelling Kit” / Gibco - BRL, o qual promove a incorporação de nucleotídeos biotinilados na molécula de DNA molde

através do processo de “nick translation”, levando assim à produção de uma população de fragmentos de tamanhos variáveis entre 200 a 500 pares de bases. Os procedimentos de marcação seguiram as recomendações do kit.

Após a reação de marcação foi realizada a etapa de separação dos nucleotídeos não incorporados à sonda através do processo de fracionamento em coluna de Sephadex G-50, conforme o item descrito a seguir.

Separação dos nucleotídeos não incorporados

Esta etapa, realizada com a finalidade de separar os nucleotídeos que não foram incorporados à molécula de DNA usada como molde (sonda pGEM2-185pb), utilizou-se o processo de fracionamento em coluna de Sephadex G-50.

No preparo da coluna de fracionamento o fundo de uma seringa de 1,0 ml foi forrado com algodão de vidro siliconizado e a solução de sephadex G-50 equilibrada com 1 x SSC + 0,1 % SDS foi adicionada à coluna, de modo a evitar bolhas, que causariam uma fluxo inadequado através da coluna.

A sonda marcada (50,0 μ l) foi então preparada para o fracionamento através da adição de 15,0 μ l de dextran blue (mantido em congelador), o qual permite o acompanhamento de todo o processo de fracionamento e coleta das amostras marcadas. Este material foi então adicionado à coluna, o tubo eppendorf lavado com 100,0 μ l de 1 x SSC + 0,1 % SDS e esta fração também foi adicionada à coluna. Após o escoamento das primeiras gotas adicionou-se 100,0 μ l de 2 x SSC à coluna e iniciou-se então a coleta das amostras em 6 tubos eppendorfs devidamente enumerados.

Após a coleta no primeiro tubo, quando as gotas cessaram, procedeu-se novamente a adição de 100,0 μ l de 2 x SSC à coluna e coleta da amostra no 2º tubo, sendo o 1º tubo descartado imediatamente. O procedimento foi conduzido até a coleta da 6ª amostra, sendo que apenas os tubos azulados (3º e 4º tubos) continham a sonda.

Uma alíquota da 1,0 μ l de cada amostra foi separada para a etapa de detecção da marcação em membranas de nitrocelulose (item 3.6.6.) e o restante das frações coletadas a partir da coluna de fracionamento (cerca de 400 - 500 μ l) foi reunido em um único tubo eppendorf para dar prosseguimento a precipitação e coleta da sonda marcada, conforme descrito abaixo.

Precipitação e coleta da sonda biotinilada

Às frações combinadas num único eppendorf (cerca de 400,0 - 500,0 μ l) foi adicionado 1/10 de volume de acetato de sódio 3M pH 5,4 (50,0 μ l) e 2 volumes de álcool absoluto gelado (1,0 ml).

A solução foi cuidadosamente misturada através da leve inversão do tubo eppendorf e este material foi então mantido a -70°C, por 15 minutos a 2 horas ou a -20°C, por 2 a 12 horas.

Após a precipitação procedeu-se à centrifugação do material a 15.000 rpm, por 10 a 30 minutos, à temperatura de 4°C a -10°C. O sobrenadante foi cuidadosamente removido, o “pellet” lavado com 500,0 μ l de etanol a 70% e novamente centrifugado a 15.000 rpm, por 10 a 30 minutos, à temperatura de 4°C a -10°C. O sobrenadante foi então removido cuidadosamente e o “pellet” colocado para secagem em “speed vacuum”, por 2 minutos. Para uso imediato, o “pellet” foi ressuspensionado em 20,0 μ l de formamida deionizada, deixado à temperatura ambiente para

dissolução total e posteriormente estocado a -20°C até o momento do uso.

No caso de estoque prolongado da sonda o “pellet” foi ressuspendido em 20,0µl de TE (10 mM Tris / HCl pH8,0 / 1 mM EDTA pH 8,0) e armazenado a -20°C. Para a utilização deste estoque, foram adicionados 470,0 µl de TE ao material e este foi precipitado novamente conforme descrito nas etapas anteriores.

Opcionalmente, foi retirada uma alíquota de 2,0 µl da sonda marcada e procedida a corrida em gel de agarose 1,2 % para avaliação do padrão de fragmentos marcados (200 a 500 pares de bases).

3.6.6. Detecção do sinal de marcação em filtro de nitrocelulose

Para detecção da marcação da sonda com biotina foram empregados o “DNA Detection Sistem Kit” - Gibco / BRL e filtros de nitrocelulose “Bio-Dot Blotting Media”.

Uma tira de 1cm x 4cm do filtro de nitrocelulose foi dividida em 5 secções e estas enumeradas sequencialmente (papel azul foi usado como fundo para essas manipulações, evitando o manuseio direto do filtro de nitrocelulose).

Um µl de cada amostra fracionada a partir da coluna de Sephadex G-50 foi adicionada em cada uma das secções e o filtro foi colocado em forno a 80°C, por 1 hora.

Após a incubação a 80°C, o filtro foi então rehidratado, durante 1 minuto, em 10,0 ml de tampão 1 (tubos de 15,0 ml siliconizados, com tampa de baquelita), à temperatura ambiente (tampão 1 = 2,5ml Tris 1M (pH 8,0); 2,5 ml NaCl 1M; 200µl MgCl 1M; 50µl de Triton X-100; volume final de 100,0 ml).

O filtro foi então incubado durante 20 minutos em 10,0 ml de tampão 2 (pré-aquecido) a 42°C (tampão 2 = 0,6 g de BSA em 20,0 ml de

tampão 1) e posteriormente colocado entre 2 folhas de papel de filtro e seco em forno a 80°C, durante 10 a 20 minutos.

Após secagem, o filtro foi reidratado em 10,0 ml de tampão 2, durante 10 minutos, à temperatura ambiente, com agitação contínua, sendo esta etapa de reidratação seguida da incubação do filtro em 1,0 ml de tampão 1 + 2,0 µl de estreptavidina, durante 10 minutos, no escuro (tubo envolvido em papel alumínio), sob agitação leve e contínua.

O filtro foi então lavado com 10,0 ml de tampão 1, durante 3 minutos, por 2 vezes consecutivas, após o qual procedeu-se à incubação por 10 minutos em 1,0 ml de tampão 1 + 1,0 µl de “biotin alkaline phosphatase” do kit de detecção sinal, à temperatura ambiente, no escuro (tubo envolvido em papel alumínio).

Após 2 lavagens sequenciais em 10,0 ml de tampão 1 e uma lavagem de 2 minutos em 10,0 ml de tampão 3 (4,0 ml Tris 1M pH 9,5; 4,0 ml NaCl 1M; 2,0 ml MgCl; volume final = 30,0 ml) o filtro foi incubado em 7,5 ml de tampão 3 + 33,0 µl de NBT (nitro-blue tetrazolium / kit) + 25,0 µl de BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato / kit), o tubo vedado com parafilme e incubado à temperatura ambiente, no escuro, durante 30 minutos ou até adquirir coloração adequada.

Seguindo-se a esta etapa de detecção, o filtro foi lavado em 10,0 ml de TE (20 mM Tris/HCl pH 7,5 / 5 mM EDTA pH 8,0) para terminar a reação, e colocado a 80°C para secagem, durante 1 a 2 horas.

3.6.7. Obtenção das preparações citológicas para hibridação *in situ*

As etapas de germinação de sementes, coleta, pré-tratamento e fixação das raízes, bem como as técnicas de obtenção das preparações citológicas empregadas ao desenvolvimento e padronização desta metodologia seguiram os procedimentos descritos nos itens 3.2.1.

3.6.8. Hibridação *in situ*

Para as etapas de hibridação *in situ* foram utilizadas as preparações citológicas obtidas como descrito no item 3.2.1. e a sonda de DNA pGEM2-185pb biotinilada obtida como descrito nos itens 3.6.3. e 3.6.5.

Para as etapas de incubação em câmara úmida foram utilizados uma caixa plástica (tapeweare) contendo uma placa suporte para as lâminas e lamínulas plásticas 22 x 22 mm previamente lavadas em dextran 2% e mantidas em etanol 70%.

Para as etapas de lavagens foram utilizados beckers de 50,0ml contendo a solução específica para remoção das lamínulas e cubas de vidro ("Coplin jars") contendo um suporte para as lâminas, sendo todos os beckers, cubas e soluções previamente preparados antes de se iniciar os procedimentos.

Pré-tratamentos e lavagens das preparações citológicas

As preparações citológicas foram retiradas do congelador a -20°C e colocadas sob papel de filtro até atingirem temperatura ambiente. Em cada preparação foram adicionados 100,0 µl de RNase (100,0µg / ml em 2 x SSC + 1% BSA), o material coberto com uma lamínula plástica 22 x 22 mm e incubado em câmara úmida a 37°C, por 1 hora.

Após tratamento com RNase as lamínulas foram removidas por imersão em 2 x SSC, as preparações dispostas no suporte, lavadas 2 vezes em cubas contendo 2 x SSC por 5 minutos cada e posteriormente em HCl 0,01 M por 2 minutos. As preparações foram então retiradas do suporte, dispostas sob papel de filtro, tratadas com 100,0 µl de pepsina (5,0 µg / ml em 0,01 M HCl), cobertas com lamínula e incubadas a 37°C,

por 10 minutos.

As lamínulas foram removidas por flutuação em um becker contendo água milli-Q, as preparações dispostas no suporte e lavadas em água milli-Q, por 2 minutos. Após 2 lavagens de 5 minutos cada em 2 x SSC as preparações foram tratadas com solução de paraformaldeído a 4 %, à temperatura ambiente, por 5 minutos, seguido de 3 lavagens de 5 minutos cada em 2 x SSC, à temperatura ambiente.

As preparações foram então desidratadas em uma série de álcoois a 70%, 96% e 100%, por 5 minutos cada e dispostas sob papel de filtro para secagem à temperatura ambiente, por um período variável de 30 minutos a 24 horas.

Preparo da solução de formamida

A solução de formamida a 70% em 2 x SSC empregada para a desnaturação do DNA cromossômico foi preparada utilizando-se 70,0 ml de formamida pura deionizada com Amberlite e 10,0 ml de 20 x SSC, completando-se o volume final para 100,0 ml com água milli-Q. Esta solução foi então colocada em cuba de vidro ("Coplin jar"), tampada e disposta em banho maria a 71°C, de modo que a temperatura da formamida dentro da cuba fosse mantida em 70°C.

Foram também preparadas cubas contendo álcoois 70%, 96% e 100%, as quais foram tampadas e dispostas num recipiente com gelo.

Preparo da mistura de hibridação

Todos os componentes da mistura de hibridação foram previamente retirados do congelador e deixados para atingir temperatura ambiente antes de se iniciar o preparo da solução.

O dextran sulfato (50% em água) foi previamente aquecido até fervura, num tubo eppendorf preso a um suporte flutuador, durante 5 minutos, para reduzir a viscosidade desta solução. Para as manipulações envolvendo o dextran sulfato e o DNA “carrier” foi necessário cortar a ponta da ponteira antes do uso).

Para a manipulação de 8 lâminas foram preparados 80,0 µl da mistura de hibridação (10,0µl de mistura de hibridação/lâmina), acrescentando à sonda previamente mantida em 20,0 µl de formamida os seguintes componentes (mantidos previamente a -20°C) :

20,0 µl Formamida deionizada

16,0 µl Dextran sulfato

4,0 µl DNA “carrier” = 100,0 ng / µl (DNA degraded Herring Sperm)

8,0 µl 20 x SSC

2,0 µl SDS a 10%

10,0 µl água milli-Q estéril

Concentração final da sonda na mistura de hibridação = 12,5 ng/µl.

(10,0 µl da mistura de hibridação / lâmina = 125,0 ng de sonda/lâmina)

O tubo eppendorf contendo a mistura de hibridação foi tampado, vedado com fita crepe, mantido em gelo e então deixado à temperatura ambiente no momento de se iniciar as etapas de desnaturação.

Desnaturação da sonda e do DNA cromossômico

As etapas de desnaturação da sonda e do DNA cromossômico foram feitos quase que simultaneamente, de modo a evitar possível renaturação das sequências de DNA, conforme descrito abaixo.

Após o período de secagem, 2 lâminas foram colocadas na cuba contendo a solução de formamida 70% a 70°C e o tempo de

desnaturação de 2 minutos e 30 segundos precisamente controlado. As preparações foram então desidratadas na série de álcoois 70%, 96% e 100%, durante 3 minutos cada e colocadas sob papel de filtro para secagem à temperatura ambiente.

Enquanto as primeiras 2 lâminas estavam sendo desidratadas no álcool 70% iniciou-se a desnaturação de mais 2 lâminas, conforme descrito acima. Quando as 2 últimas lâminas foram colocadas para desnaturação em formamida iniciou-se a desnaturação da sonda.

O tubo eppendorf contendo a mistura de hibridação (sonda) devidamente selado com fita crepe foi acoplado a um suporte adequado e colocado em um becker contendo água fervendo a 98°C (temperatura da água controlada a 98°C) por 10 minutos.

A fita crepe foi então removida, a mistura homogeneizada rapidamente no vortex, deixada para atingir temperatura ambiente e sequencialmente adicionada sob cada preparação num volume de 10,0 µl de mistura de hibridação / lâmina (a ponta da ponteira foi cortada para facilitar a passagem da sonda).

Hibridação DNA:DNA *in situ*

Após adição da mistura de hibridação as preparações foram cobertas com lamínula plástica 22 x 22 mm, incubadas a 10°C por 10 minutos e posteriormente em câmara úmida a 37°C, por 8 horas, sendo a temperatura da câmara úmida precisamente controlada.

Lavagens pós-hibridação

Após a etapa de hibridação, as lamínulas foram cuidadosamente removidas em um becker contendo 2 x SSC e as preparações lavadas

sequencialmente em 2 x SSC à temperatura ambiente, por 5 minutos; 2 x SSC a 37°C, por 10 minutos; 2 x SSC à temperatura ambiente, por 5 minutos; PBS + 0,1% Triton X-100 à temperatura ambiente, por 2 minutos e PBS à temperatura ambiente, por 5 minutos. As preparações foram colocadas sob papel de filtro e estavam quase secas procedeu-se ao tratamento com estreptavidina-horsehadish peroxidase.

Deteccção enzimática do sinal de hibridação

Para a detecção dos sítios de hibridação nos cromossomos empregou-se o sistema de digestão enzimática através da reação entre estreptavidina conjugada com peroxidase (BRL streptavidin horseradish peroxidase, BRL), 3-3'diamino-benzidina-tetrahidroclorato-dihidratado (DAB) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Este sistema de detecção apresenta alta sensibilidade, especificidade e baixo background, se baseia na interação biotina-streptavidina peroxidase, e tem no DAB o substrato para a reação da peroxidase, produzindo depósitos coloridos (marrom ou preto) insolúveis, que evidenciam o sinal de hibridação da sonda nos sítios correspondentes nos cromossomos.

Nas preparações quase secas foram adicionados 100,0 µl por lâmina da solução de streptavidina “horsehadish” peroxidase previamente preparada, as lâminas cobertas com lamínula plástica e incubadas a 37°C, por 30 minutos, no escuro.

Para a manipulação de 8 lâminas foram diluídos 8,0 µl de estreptavidina peroxidase em 792,0 µl de Tris / HCl 0,05 M pH 7,6 (volume total = 800,0 µl / tubo eppendorf mantido no escuro, envolto em papel alumínio). O preparo desta solução se deu enquanto as preparações estavam sendo submetidas ao último passo de lavagem pós-hibridação).

Após incubação com estreptavidina-peroxidase as laminulas foram removidas por imersão em um becher contendo PBS, as preparações colocadas no suporte e lavadas em PBS + 0,1 % Triton X-100 à temperatura ambiente, por 5 minutos e PBS à temperatura ambiente, por 5 minutos.

As preparações foram então retiradas do suporte, colocadas sob papel de filtro e quando apresentavam-se quase secas foi adicionado 80,0 μ l por lâmina da solução de DAB previamente preparada, no escuro. As preparações foram cobertas com lamínula plástica e incubadas à temperatura ambiente ou a 37°C, por 5 minutos, no escuro. Neste passo procurou-se evitar a secagem completa do material, o que contribuiria para aumento no “background” das preparações.

A solução de DAB foi preparada previamente (enquanto as lâminas estavam sendo lavadas em PBS) diluindo-se 33,75 μ l da solução estoque de DAB e 18,75 μ l de peróxido de hidrogênio em 575,0 μ l de Tris / HCl 0,05M pH 7,6 + Imidazol, sendo o tubo eppendorf contendo a solução, envolvido em papel alumínio durante toda a manipulação. Antes de se preparar esta solução, o pH do Tris / HCl 0,05 M foi corrigido para 7,6 e então foi adicionado o imidazol.

Após a incubação com a solução de DAB as laminulas foram removidas em PBS, as preparações colocadas no suporte e lavadas em PBS + 0,1% Triton X-100 à temperatura ambiente, por 2 a 10 minutos e PBS à temperatura ambiente, por 5 a 10 minutos.

As preparações foram então coradas com solução Giemsa a 2% (R66 - Gurr / pH6,8) por 2 a 4 minutos, lavadas brevemente em água milli-Q, colocadas para secagem por no mínimo 12 horas, à temperatura ambiente, e posteriormente montadas em bálsamo do Canadá.

3.7. Análise do material

3.7.1. Análise de preparações mitóticas coradas pelo método de Feulgen

As preparações mitóticas coradas pelo método de Feulgen (3.4.) foram utilizadas para a avaliação dos pré-tratamentos envolvendo 8-hidroxiquinolina e 8-hidroxiquinolina combinada a cicloheximida, nas linhagens e híbrido selecionados.

Cinco pontas de raiz de cada pré-tratamento e genótipo foram analisadas e as frequências das fases mitóticas determinadas através da contagem de 500 células selecionadas ao acaso em cada preparação. Tais contagens foram feitas em células coradas pelo método de Feulgen e no caso do híbrido utilizou-se também preparações coradas pelo bandamento-C.

Para avaliação dos efeitos dos pré-tratamentos e do efeito híbrido vs. linhagens foram estimados o índice metafásico (IMe = número total de células metafásicas e prometáfásicas expresso como percentagem do número total de células contadas). O índice mitótico foi avaliado em raízes não tratadas (IM = número total de células em divisão expresso como percentagem do número total de células contadas) e utilizado para a comparação entre os genótipos.

Os critérios utilizados para classificação e contagem das células nas fases de metáfase e prometáfases foram baseados no grau de condensação e detalhes de morfologia cromossômica, sendo considerado como prometáfases as células mitóticas onde a extremidade dos cromossomos sem knob apresentavam-se um pouco descondensadas ou incompletamente condensadas, e as cromátides não separadas completamente ao nível dos knobs, conforme evidenciado nas células

coradas pelo bandamento-C.

A distinção entre metáfases e prometáfases foi realizada considerando-se que várias células classificadas como metafásicas e que apresentam cromossomos bem condensados correspondem, na verdade, à prometáfases condensadas pelo efeito da cicloheximida, e estas foram computadas separadamente para posterior avaliação de sua utilização na identificação de cromossomos, bem como de aberrações cromossômicas.

Campos evidenciando o acúmulo de prometáfases e metáfases foram fotografados em fotomicroscópio Zeiss, com objetiva de imersão 40 x, fator de projetiva 3,2 x e optovar 1,25 J, utilizando filme Agfa COPEX PAN A.H.U. TRI 13 (asa 32) e papel fotográfico ILFORD F3 para as ampliações fotográficas (magnitude de 700 x).

3.7.2. Análise de preparações mitóticas coradas pelo método de bandamento-C

3.7.2.1. Análise morfométrica dos cromossomos

As preparações mitóticas coradas pelo método de bandamento-C (3.3.) foram utilizadas para identificação de cromossomos individuais, para a análise morfométrica dos cromossomos e para a reavaliação de alterações dos braços cromossômicos com relação à presença de bandas-C, estabelecendo-se comparações entre os genótipos e pré-tratamentos empregados, bem como entre metáfases e prometáfases. Para esta análise foram selecionadas as prometáfases e metáfases intactas que apresentavam cromossomos morfologicamente nítidos e adequadamente espalhados, além de nítida coloração de banda-C.

Para as medidas cromossômicas foram utilizadas de 5 a 13

plantas de cada genótipo em cada pré-tratamento e foram fotografadas 5 a 13 metáfases e prometáfases de cada um dos genótipos.

As células prometafásicas e metafásicas foram fotografadas em fotomicroscópio Zeiss, com objetiva de imersão 100 x, fator de projetiva 3,2 x e optovar 1,25 J. Os filmes utilizados foram Agfa COPEX PAN A.H.U. TRI 13 (asa 32), para a maioria das fotomicrografias e IMAGE CAPTURE em alguns casos. Para as ampliações fotográficas (magnitude de 1.500 x e 2.000 x) foram empregados papel KODABROME PRINT RC F3 autobrilho Kodak e ILFORD F3.

As medidas cromossômicas foram feitas com auxílio de compasso de ponta seca e papel milimetrado (limite de 0,5 mm) em ampliações fotográficas de 2.000 x, determinando-se os valores de comprimento cromossômico em milímetros (comprimento do braço maior e do braço menor, distância entre o centrômero e o início da banda-C e distância entre o centrômero e o final da banda-C. Com base nestes dados foram determinados os parâmetros comprimento absoluto (em milímetros), comprimento relativo (CR), relação de braços (RB) e tamanho de banda.

Os valores de comprimento relativo e relação de braços foram estimados de acordo com a metodologia descrita por Aguiar-Perecin & Vosa (1985), conforme apresentado a seguir.

$$\text{Relação de braços} = \frac{\text{braço maior}}{\text{braço menor}}$$

Para cada célula analisada foi determinada a média de relação de braços dos dois elementos de cada par de homólogos.

O comprimento relativo foi estimado em termos de percentagem em relação ao comprimento do cromossomo 10, ou seja, dividindo-se o

comprimento absoluto de cada cromossomo pelo valor médio do comprimento absoluto do cromossomo 10. Em seguida foi calculada a média de cada par de homólogos, para cada célula analisada.

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

O cromossomo 10 foi utilizado para as estimativas do comprimento relativo em virtude de não apresentar bandas-C nos genótipos avaliados, representando assim um ponto de referência invariável para a comparação dos cromossomos. O tamanho da banda-C foi calculado pela diferença entre a medida da distância entre o centrômero e o início da banda e entre o centrômero e o final da banda, sendo o valor obtido também expresso em termos de percentagem em relação ao cromossomo 10.

A partir desses dados foram determinados os cariótipos e ideogramas dos materiais analisados, onde os cromossomos foram pareados conforme seus valores de comprimento relativo, relações de braços e padrões de banda-C, sendo então dispostos em ordem decrescente de tamanho.

Outro parâmetro utilizado para comparação entre os cromossomos dos diferentes genótipos analisados foi a distância entre o centrômero e o início da banda, também expresso em termos de percentagem em relação ao cromossomo 10. A relação entre o tamanho da banda e o tamanho do braço cromossômico também foi estimada conforme apresentado a seguir, sendo este índice utilizado para comparação com os valores obtidos pela análise dos cromossomos paquitênicos.

$$\% \text{ TBa/TBr} = \frac{\text{tamanho relativo da banda-C}}{\text{tamanho relativo do braço cromossômico}} \times 100$$

3.7.2.2. Análise estatística dos dados morfométricos

Todos os dados obtidos através dos índices acima citados foram analisados estatisticamente segundo delineamentos fatorial ou inteiramente casualizados, sendo os valores médios comparados através do teste de Tukey (Gomes, 1978), utilizando-se o programa SAS (Statistical Analysis System) - GLM (General Linear Models Procedure) para dados desbalanceados (SAS, 1988). Este programa (SAS-PGLM) fornece quatro tipos de análise de variância, de acordo com os vários tipos de hipóteses testáveis estatisticamente, e no presente caso foi utilizada a análise do Tipo III.

A análise de variância para os valores de comprimento relativo e relação de braços de todos os cromossomos foi realizada com o objetivo de se verificar a ocorrência de possíveis alterações nos cromossomos corados pelo bandamento-C e que não foram detectadas visualmente.

3.7.3. Análise das preparações meióticas - Paquítenos

As melhores preparações de paquítenos coradas com carmim propiônico (3.5.) foram utilizadas para a identificação de cromossomos individuais, comparando-se a composição de knobs com o padrão das bandas-C detectadas nos cromossomos mitóticos corados pelo bandamento-C, visando-se demonstrar a correspondência existente entre bandas-C e knobs paquitênicos, bem como avaliando a variabilidade no tamanho dos braços cromossômicos decorrentes da presença de knobs grandes.

As micrografias dos cromossomos paquitênicos foram feitas em fotomicroscópio Zeiss, com objetiva de imersão 100x (40x para o cromossomo 3), fator de projetiva 3,2 x e optovares 1,25 e 1,6 J. O filme utilizado foi Agfa COPEX PAN A.H.U. TRI 13 (asa 32) e para as ampliações fotográficas (magnitude de 2.000 x para o cromossomo 3 e de 1.400 x para os demais cromossomos) foi empregado papel fotográfico ILFORD Multigrade.

As medidas dos cromossomos na fase de paquíteno foram feitas com auxílio de carretilha e papel vegetal em ampliações fotográficas de 2.000 x, determinando-se os valores de comprimento do braço maior e do braço menor de cada um dos cromossomos, e os valores de distância centrômero-knob e tamanho do knob. Tais medidas foram feitas através da contagem do número de pontos, em unidades arbitrárias, para comparação com dados reportados na literatura (Neuffer *et al.*, 1968).

3.7.4. Análise de preparações mitóticas submetidas à hibridação *in situ*

As melhores preparações citológicas obtidas pelas técnicas de dissecação e tratamento enzimático (3.2.1a e 3.2.1b) e que foram submetidas à metodologia de hibridação *in situ* foram avaliadas qualitativamente através do grau de espalhamento celular e cromossômico e da morfologia cromossômica.

A eficiência da metodologia de hibridação *in situ* foi avaliada através da análise dos sinais de marcação da sonda selecionada, visando a investigação dos padrões de distribuição destas sequências específicas ao longo dos cromossomos mitóticos dos materiais selecionados. As micrografias das preparações citológicas submetidas a hibridação *in situ* foram feitas em fotomicroscópio Zeiss, com dispositivo fotográfico MC80, objetiva de imersão 100 x, fator de projetiva 3,2 x e optovar 1,6 J, sendo utilizado Kodak Gold Plus (asa 100).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Avaliação dos pré-tratamentos na acumulação de metáfases e prometáfases

Conforme citado anteriormente, as avaliações dos pré-tratamentos para acumulação de metáfases e prometáfases envolveram a análise de preparações coradas pelo método de Feulgen para as duas linhagens (441123 e 4443) e o respectivo híbrido (441123 x 4443) e de preparações coradas pelo bandamento-C apenas para o híbrido.

Os valores de índice mitótico e os resultados da ação dos pré-tratamentos na frequência de metáfases e prometáfases de cada um dos genótipos avaliados são apresentados na Tabela 2.

Os materiais pré-tratados com 0,03% 8-hidroxiquinolina e 0,03% 8-hidroxiquinolina combinado a 0,00125% cicloheximida apresentaram um acréscimo considerável na taxa de metáfases e prometáfases condensadas (IMe), nos três genótipos avaliados, em comparação com os controles não tratados.

A avaliação comparativa entre os valores de índice mitótico das linhagens e do híbrido nos controles não tratados e com dados relatados na literatura, que reportam um índice mitótico em torno de 4 a 6% para raízes não tratadas de milho (Tlaskal, 1980; Lee et al., 1996;), evidenciou que não existem diferenças discrepantes entre as duas linhagens (IM 7,8% para 441123 e 6,44% para 4443), enquanto o híbrido apresentou um índice mitótico relativamente maior (IM 9,24%).

O mesmo comportamento superior foi demonstrado através da análise dos efeitos dos pré-tratamentos, onde o acúmulo de células em divisão (metáfases e prometáfases) mostrou ser mais pronunciado no híbrido (Tabela 2.).

A despeito da inexistência de relatos na literatura sobre diferenças significativas no comportamento citológico de linhagens de híbridos de espécies vegetais é possível se inferir que tais variações existem e podem ser exploradas na seleção de genótipos mais responsivos ou mais promissores para avaliações citológicas.

No presente caso, os valores superiores de índice mitótico e metafásico observados para o híbrido podem refletir um certo tipo de heterose, haja visto que tais valores mostram ser superiores à média das linhagens parentais e, mais especificamente, superiores ao parental que apresenta a maior média (Hallauer & Miranda Filho, 1988).

Este aspecto sugere a ocorrência de efeitos genéticos ou de sua interação com a presença de knobs em estado heterozigoto, o que mostra ser um assunto interessante a ser investigado.

Assim, o comportamento diferencial observado para estes materiais tende a refletir, particularmente, a superioridade de genótipos híbridos em relação à linhagens parentais, evidenciando portanto, a excelência desses materiais para análises citológicas.

A utilização de 8-hidroxiquinolina e cicloheximida como pré-tratamentos para obtenção de preparações metafásicas tem sido um constante em diversos estudos de cromossomos vegetais, particularmente em milho (Tlaskal, 1980; Jewell, 1994; Jewell & Islan-Faridi, 1994; Kindiger, 1994).

Tabela 2. Valores de índice mitótico (controles não tratados) e índice metafásico (% de metáfases + prometáfases) dos genótipos, nos pré-tratamentos analisados.

Genótipos	Índice Mitótico (IM %)	Pré-Tratamentos	Índice Metafásico (IMe%)
441123	7,80 (195/2500)	Controle	1,96 (49/2500)
		8-hidroxiquinolina	4,72 (118/2500)
		8-hidroxiquinolina +	6,20 (155/2500)
		Cicloheximida	
4443	6,44 (161/2500)	Controle	1,92 (48/2500)
		8-hidroxiquinolina	3,00 (75/2500)
		8-hidroxiquinolina +	5,56 (139/2500)
		Cicloheximida	
441123 x 4443	9,24 (231/2500)	Controle	2,44 (61/2500)
		8-hidroxiquinolina	6,08 (152/2500)
			5,84* (146/2500)
		8-hidroxiquinolina +	8,56 (214/2500)
		Cicloheximida	9,12* (228/2500)

* Avaliações de preparações citológicas coradas pelo bandamento-C

IM = número total de células em divisão / total de células analisadas.

IMe = número de metáfases e prometáfases/número total de células analisadas

Números entre parênteses correspondem a frequência original de células analisadas.

Avaliação de 5 raízes para material, nos controles não tratados e em cada pré-tratamento

A despeito da potencialidade da 8-hidroxiquinolina e cicloheximida em promover acumulação de metáfases e prometáfases condensadas, alguns estudos mais recentes (Gaulberti et al., 1996; Lee et al., 1996; Carvalho & Saraiva, 1997; Lee et al., 1997) têm explorado a potencialidade da utilização de diferentes compostos para a sincronização de células de tecidos meristemáticos combinados com agentes inibidores do fuso mitótico, para a obtenção de preparações com elevado índice de células metafásicas apresentando cromossomos morfológicamente nítidos. Empregando-se hidroxiuréia em combinação com colchicina, trifluralina, amiprofos-metil ou cicloheximida índices mitóticos altamente elevados (superiores a 70%), têm sido obtidos com sucesso.

No presente estudo, em que se utilizaram pré-tratamentos apenas para acumulação de metáfases, o rendimento foi claramente maior que o controle (raízes não tratadas) e foram obtidas preparações citológicas de excelente qualidade (Figuras 1 e 2), tanto nas linhagens quanto para o híbrido empregados para as análises.

A 8-hidroxiquinolina produz metáfases com cromossomos bem contraídos, estritamente convenientes para a identificação dos cromossomos e para análises envolvendo o estudo de aberrações cromossômicas (Fluminhan et al., 1996). O uso deste inibidor do fuso mitótico combinado a cicloheximida, um agente inibidor da síntese protéica, promove o aparecimento de metáfases com cromossomos mais contraídos e maior número de prometáfases com cromossomos condensados, os quais mostram ser facilmente identificáveis.

Silvarolla & Aguiar-Perecin (1994) também reportaram que, em cana-de-açúcar, esta combinação foi efetiva na obtenção de boas preparações contendo metáfases intactas e cromossomos morfológicamente nítidos, possibilitando uma avaliação mais precisa da estabilidade cromossômica em variedades desta espécie, as quais

apresentam cromossomos pequenos e numerosos.

Quanto aos padrões de condensação cromossômica observados após a aplicação de ambos os pré-tratamentos, nas preparações coradas pelo método de Feulgen e pelo bandamento-C, foi possível se evidenciar que, tanto nas metáfases (Figuras 2a; 2b; 2c e 2d) quanto nas prometáfases (Figuras 2e e 2f), detalhes da morfologia cromossômica podem ser avaliados, mesmo nas prometáfases condensadas onde a extremidade dos cromossomos apresentam-se ligeiramente descondensadas ou não completamente condensadas.

O efeito do pré-tratamento combinado de 8-hidroxiquinolina e cicloheximida no grau de condensação dos cromossomos na metáfase e prometáfase foi avaliado através da análise morfométrica dos cromossomos, conforme será discutido no item 4.2.

Outro fator de considerável importância na obtenção das preparações de excelente qualidade observadas nas Figuras 1 e 2, além da acumulação de metáfases e prometáfases morfologicamente distintas, relacionou-se ao método de espalhamento empregado.

O procedimento de dissecação das raízes em ácido acético 45%, sob lupa, avaliado nas preparações coradas pelo método de Feulgen e bandamento-C, conduziu à fácil liberação das células meristemáticas da ponta da raiz, de modo que pouco esmagamento e aquecimento se fez necessário para a liberação e separação das células e dos cromossomos. Resultados semelhantes foram obtidos para o método do digestão enzimática seguido de dissecação das raízes sob lupa, empregado para a obtenção das preparações que foram submetidas à metodologia de hibridação *in situ*.

As preparações obtidas através destes dois métodos apresentaram-se, em geral, livres de citoplasma e de resíduos celulares, sendo portanto extremamente promissoras, particularmente, à aplicação

da metodologia de hibridação molecular *in situ*, haja visto que para esta técnica específica a ocorrência de tais fatores pode conduzir à redução do acesso das sondas e soluções de detecção ao alvo, além de contribuírem para o aumento nos níveis de "background" das preparações.

A literatura relacionada tem apresentado indicações de que diversos métodos podem ser empregados para a obtenção de preparações citológicas apresentando células e cromossomos espalhados, livres de citoplasma e resíduos celulares em milho (Carvalho & Saraiva, 1993a; Schwarzacher & Leitch, 1993; Kindiger & Bechett, 1993; Carvalho, 1995; Lee et al., 1996). Esta variabilidade de técnicas tende a refletir, principalmente, a dificuldade em se obter preparações citológicas de alta qualidade para esta espécie. Assim, alguns fatores devem ser considerados para o estabelecimento de preparações mais adequadas, como por exemplo, as diferenças existentes entre genótipos e métodos de coleta e fixação de raízes (soluções empregadas e tempo de fixação).

Conforme exposto acima, como os pré-tratamentos e métodos empregados neste trabalho mostraram ser adequados e efetivos na obtenção de preparações citológicas com taxa relativamente superior de metáfases e prometáfases, apresentando cromossomos morfológicamente nítidos, eles podem ser amplamente explorados em investigações futuras envolvendo a aplicação de metodologias de bandamento-C e hibridação *in situ*, bem como para análise de aberrações induzidas *in vitro*, para uma melhor visualização de detalhes da morfologia cromossômica e conseqüentemente para melhor identificação dos cromossomos somáticos de milho.

Figura 1. Acúmulo de células metafásicas e prometafásicas em meristema de ponta de raiz do híbrido, 441123 x 4443, promovido pelo pré-tratamento combinado de 8-hidroxiquinolina e cicloheximida. (a) Feulgen, (b) bandamento-C. Barra = 10 μ m

Figura 2. Detalhes de morfologia dos cromossomos metafásicos e prometáfásicos. Metáfases pré-tratadas com 8-hidroxiquinolina coradas pelos métodos de (a) Feulgen e (b) bandamento-C. Metáfase pré-tratadas com 8-hidroxiquinolina combinada a cicloheximida corados pelos métodos de (c) Feulgen e (d) bandamento-C. Prometáfases pré-tratadas com 8-hidroxiquinolina combinada a cicloheximida corados pelos métodos de (e) Feulgen e (f) bandamento-C. Barra = 10 μ m

4.2. Análise das preparações mitóticas coradas pelo bandamento-C

4.2.1. Análise morfométrica dos cromossomos metafásicos

Através dos valores de comprimento relativo e relação de braços dos cromossomos mitóticos metafásicos e prometáfásicos obtidos a partir dos pré-tratamentos com 8-hidroxiquinolina e 8-hidroxiquinolina combinada a cicloheximida e corados pelo bandamento-C (Figuras 2b, 2d, 2f), foi possível a identificação de todos os cromossomos (Tabela 3) e a elaboração dos cariótipos e ideogramas (Figuras 3 e 4) apresentando o padrão de bandas-C correspondente aos knobs heterocromáticos, nas linhagens e no híbrido empregado para estas análises.

Assim, os resultados apresentados na Tabela 3 evidenciam o comportamento dos cromossomos metafásicos dos três genótipos avaliados em relação aos dois pré-tratamentos empregados.

Considerando-se que 8-hidroxiquinolina produz metáfases com cromossomos bem contraídos e que a cicloheximida promove o aparecimento de metáfases com cromossomos mais condensados, procedeu-se uma avaliação comparativa dos cromossomos metafásicos provenientes de preparações obtidas após a aplicação de 8-hidroxiquinolina e 8-hidroxiquinolina combinada a cicloheximida, visando determinar a possível ocorrência de variações no comprimento dos cromossomos devido ao efeito combinado desses dois compostos no grau de condensação dos cromossomos.

Os resultados da análise de variância e do teste de Tukey para os valores de comprimento relativo (CR) e relação de braços (RB) de cada um dos cromossomos, em cada um dos genótipos e para cada pré-tratamento são apresentados nas Tabelas 4 e 5, 6 e 7, respectivamente.

Figura 3. Cariótipos de metáfases coradas pelo bandamento-C das linhagens (a,b) 441123, (c, d) 4443 e do híbrido 441123 x 4443 (e, f), pré-tratadas com hidroxiquinolína (a, c, e) e hidroxiquinolína combinada a cicloheximida (b, d, f) respectivamente, mostrando diferenças nos padrões de bandas-C. Barra = 10µm

Figura 4. Ideogramas evidenciando o padrão de bandas-C dos cariótipos das linhagens (a) 441123, (b) 4443 e (c) do híbrido 441123 x 4443, no qual são apresentados os cromossomos 3, 7 e 9, com e sem knobs, respectivamente, K3L, K7S e K9S. Barra = 10µm

Tabela 3. Comprimento relativo (CR) e relação de braços (RB) dos cromossomos dos genótipos 441123 x 4443, 441123 e 4443, de preparações metafásicas coradas pelo bandamento-C, obtidas pelos pré-tratamentos com 8-hidroxiquinolina e 8-hidroxiquinolina combinada a cicloheximida.

Pré-tratamentos / Genótipos			CROMOSSOMOS									
Hidroxiquinolina			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
441123	CR	179.94	155.06	153.21K ⁺	151.47	143.99	126.83	164.64K ⁺	137.23	136.56K ⁺	100.00	
	RB	1.20	1.33	1.78	1.43	1.26	1.75	1.62	2.53	0.88	1.78	
	CR			146.35K ⁻				141.26K ⁻		104.75K ⁻		
	RB			1.70				2.25		1.57		
441123	CR	176.31	154.99	154.38K ⁺	142.11	141.54	124.61	154.75K ⁺	133.79	136.92K ⁺	100.00	
	RB	1.20	1.33	1.87	1.45	1.29	1.80	1.69	2.53	0.92	1.61	
4443	CR	177.92	156.12	154.74K ⁻	152.82	146.61	126.77	148.72K ⁻	137.81	112.23K ⁻	100.00	
	RB	1.18	1.36	1.68	1.45	1.18	1.81	2.44	2.47	1.50	1.81	

Pré-tratamentos / Genótipos			CROMOSSOMOS									
Hidroxiquinolina + Cicloheximida			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
441123	CR	184.24	157.47	155.56K ⁺	152.32	144.19	127.14	165.76K ⁺	138.04	137.47K ⁺	100.00	
	RB	1.18	1.36	1.86	1.43	1.22	1.74	1.64	2.44	0.84	1.68	
4443	CR			148.73K ⁻				145.34K ⁻		106.63K ⁻		
	RB			1.74				2.42		1.40		
441123	CR	180.09	157.06	158.25K ⁺	146.69	144.05	125.43	156.74K ⁺	140.32	143.28K ⁺	100.00	
	RB	1.15	1.38	1.78	1.39	1.26	1.74	1.62	2.51	0.89	1.65	
4443	CR	188.18	164.26	155.42K ⁻	155.37	150.71	130.09	152.78K ⁻	142.68	117.37K ⁻	100.00	
	RB	1.17	1.36	1.74	1.44	1.28	1.68	2.40	2.44	1.64	1.91	

Tabela 4. Quadro geral da análise de variância para os valores de comprimento relativo dos cromossomos metafásicos dos genótipos 441123, 4443 e 441123 x 4443, nos pré-tratamentos com 8-hidroxiquinolina e 8-hidroxiquinolina combinada a cicloheximida.

CROMOSSOMO												
FV	1		2		3K+		3K-		4		5	
	QM	F	QM	F	QM	F	QM	F	QM	F	QM	F
Genótipos (GL)	207.76 (2)	0.78	49.05 (2)	0.36	0.78 (1)	0.01	71.01 (1)	0.74	331.47 (2)	2.93	92.94 (2)	0.74
Tratamentos (GL)	651.33 (1)	2.43	291.10 (1)	2.13	121.16 (1)	1.20	113.00 (1)	1.18	60.32 (1)	0.53	137.12 (1)	1.09
Resíduo (GL)	267.64 (32)		136.46 (32)		101.20 (22)		95.54 (31)		112.45 (31)		125.99 (32)	
Xm	181.62 ± 16.36		157.36 ± 11.68		155.41 ± 10.06		150.07 ± 9.77		150.51 ± 10.63		144.86 ± 11.22	
cv (%)	9.00		7.42		6.47		6.51		7.06		7.75	

CROMOSSOMO												
FV	6		7K+		7K-		8		9K+		9K-	
	QM	F	QM	F	QM	F	QM	F	QM	F	QM	F
Genótipos (GL)	86.96 (2)	0.96	799.22 (1)	6.94 *	200.81 (1)	1.55	34.41 (2)	0.40	32.04 (1)	0.26	223.97 (1)	1.59
Tratamentos (GL)	127.82 (1)	1.41	49.35 (1)	0.43	146.95 (1)	1.13	139.00 (1)	1.60	145.71 (1)	1.18	74.95 (1)	0.53
Resíduo (GL)	90.76 (29)		115.21 (21)		1298.94 (17)		87.08 (31)		123.48 (21)		140.92 (17)	
Xm	126.74 ± 9.52		161.41 ± 10.73		145.88 ± 11.39		138.37 ± 9.33		138.75 ± 11.11		108.75 ± 11.87	
cv (%)	7.51		6.65		7.81		6.74		8.00		10.91	

** significativo ao nível de 1%

* significativo ao nível de 5%

Tabela 5. Resultados do teste de Tukey para os valores de comprimento relativo dos cromossomos metafásicos dos genótipos 441123, 4443 e 441123 x 4443, nos pré-tratamentos com 8-hidroxiquinolina e 8-hidroxiquinolina combinada a cicloheximida.

CROMOSSOMO						
Cromossomos/ Variáveis	1	2	3K+	3K-	4	5
Pré-tratamentos						
H300	178.56 a	155.26 a	153.59 a	148.93 a	149.69 a	143.89 a
H+C12,5	183.62 a	158.73 a	156.65 a	150.84 a	151.01 a	145.49 a
DMS	9.83	7.02	6.98	7.42	6.504	6.748
Genótipos						
441123 x 4443	182.37 a	156.42 a	154.53 a	147.76 a	151.95 a	144.10 a
441123	178.83 a	156.36 a	156.86 a	-	145.38 a	143.21 a
4443	184.07 a	161.00 a	-	155.14 a	154.35 a	149.07 a
DMS	15.04	10.74	7.07	7.86	9.90	10.32

CROMOSSOMO						
Cromossomos/ Variáveis	6	7K+	7K-	8	9K+	9K-
Pré-tratamentos						
H300	126.23 a	161.34 a	143.39 a	136.44 a	136.68 a	106.88 a
H+C12,5	127.11 a	161.46 a	147.82 a	139.68 a	140.23 a	110.21 a
DMS	5.88	7.546	8.570	5.65	7.812	8.925
Genótipos						
441123 x 4443	126.99 a	165.22 a	143.49 a	137.68 a	137.03 a	105.77 a
441123	125.13 a	156.07 b	-	138.14 a	141.16 a	-
4443	128.61 a	-	151.15 a	140.51 a	-	115.31 a
DMS	9.17	7.54	9.17	8.82	7.81	9.55

Médias seguidas da mesma letra não são significativamente diferentes ao nível de 5%
DMS = Diferença mínima significativa

Tabela 6. Quadro geral da análise de variância para os valores de relação de braços dos cromossomos metafásicos dos genótipos 441123, 4443 e 441123 x 4443, nos pré-tratamentos com 8-hidroxiquinolina e 8-hidroxiquinolina combinada a cicloheximida.

CROMOSSOMO													
FV		1		2		3K+		3K-		4		5	
		QM	F	QM	F	QM	F	QM	F	QM	F	QM	F
Genótipos (GL)	0.0001 (2)	0.02	0.002	0.002	0.23	0.003 (1)	0.13	0.005 (1)	0.30	0.003 (2)	0.56	0.072 (2)	1.02
Tratamentos (GL)	0.014 (1)	2.00	0.003 (1)	0.009 (1)	0.29	0.009 (1)	0.41	0.01 (1)	0.59	0.0003 (1)	0.001	0.0008 (1)	0.0001
Resíduo (GL)	0.007 (32)		0.01 (32)	0.02 (22)		0.02 (22)		0.02 (31)		0.006 (31)		0.007 (32)	
Xm	1.18 ± 0.08		1.35 ± 0.10	1.81 ± 0.15	1.72 ± 0.13	1.42 ± 0.08		1.24 ± 0.08					
cv (%)	7.22		7.87	8.40	7.97	5.62		6.72					

CROMOSSOMO													
FV		6		7K+		7K-		8		9K+		9K-	
		QM	F	QM	F	QM	F	QM	F	QM	F	QM	F
Genótipos (GL)	0.004 (2)	0.21	0.009 (1)	0.009 (1)	0.70	0.11 (1)	2.51	0.012 (2)	0.23	0.03 (1)	6.74	0.19 (1)	6.61
Tratamentos (GL)	0.002 (1)	1.36	0.008 (1)	0.008 (1)	0.63	0.05 (1)	1.23	0.001 (1)	0.00	0.02 (1)	4.94	0.02 (1)	0.79
Resíduo (GL)	0.021 (29)		0.01 (21)	0.01 (17)		0.04 (17)		0.05 (30)		0.004 (21)		0.02 (16)	
Xm	1.75 ± 0.14		1.63 ± 0.11	2.36 ± 0.21	2.49 ± 0.23	2.49 ± 0.23		0.88 ± 0.07		1.50 ± 0.17		1.73 ± 0.14	
cv (%)	8.29		7.27	8.94	9.33	8.00		11.30				8.35	

** significativo ao nível de 1%

* significativo ao nível de 5%

Tabela 7. Resultados do teste de Tukey para os valores de relação de braços dos cromossomos metafásicos dos genótipos 441123, 4443 e 441123 x 4443, nos pré-tratamentos com 8-hidroxiquinolina e 8-hidroxiquinolina combinada a cicloheximida.

CROMOSSOMO						
Cromossomos/ Variáveis	1	2	3K+	3K-	4	5
Pré-tratamentos						
H300	1.19 a	1.34 a	1.80 a	1.69 a	1.44 a	1.25 a
H+C12,5	1.16 a	1.36 a	1.82 a	1.74 a	1.41 a	1.24 a
DMS	0.05	0.06	0.10	0.10	0.04	0.05
Genótipos						
441123 x 4443	1.19 a	1.35 a	1.82 a	1.72 a	1.42 a	1.23 a
441123	1.16 a	1.36 a	1.81 a	-	1.41 a	1.26 a
4443	1.17 a	1.36 a	-	1.71 a	1.44 a	1.24 a
DMS	0.07	0.09	0.10	0.11	0.07	0.07

CROMOSSOMO						
Cromossomos/ Variáveis	6	7K+	7K-	8	9K+	9K- 10
Pré-tratamentos						
H300	1.77 a	1.64 a	2.30 a	2.51 a	0.89 a	1.53 a 1.74 a
H+C12,5	1.73 a	1.63 a	2.41 a	2.47 a	0.86 a	1.48 a 1.71 a
DMS	0.08	0.08	0.15	0.14	0.04	0.13 0.08
Genótipos						
441123 x 4443	1.74 a	1.63 a	2.34 a	2.48 a	0.86 a	1.46 a 1.72 b
441123	1.76 a	1.64 a	-	2.51 a	0.90 a	- 1.64 b
4443	1.73 a	-	2.42 a	2.45 a	-	1.59 a 1.87 a
DMS	0.13	0.08	0.17	0.22	0.04	0.13 0.13

Médias seguidas da mesma letra não são significativamente diferentes ao nível de 5%

DMS = Diferença mínima significativa

Os dados apresentados revelam que não houve diferenças significativas para os valores de comprimento relativo entre a maioria dos cromossomos das metáfases obtidas após o pré-tratamento com 8-hidroxiquinolina e 8-hidroxiquinolina combinada a cicloheximida, evidenciando, portanto, a potencialidade do uso deste pré-tratamento combinado para a obtenção de cromossomos metafásicos adequados à avaliações morfométricas e consequentemente para estudos de aberrações cromossômicas nesta espécie.

Conforme observado através dos resultados do teste de Tukey para os valores de comprimento relativo (Tabela 5), apesar de não terem sido detectadas diferenças significativas para a quase totalidade dos cromossomos é possível se observar que, de uma maneira geral, os cromossomos da linhagem 4443 apresentaram-se ligeiramente maiores que aqueles encontrados na linhagem 441123 e no híbrido. Estas pequenas diferenças observadas no comprimento dos cromossomos tendem a refletir, principalmente, as variações que ocorrem no comprimento dos braços cromossômicos devido ao grau de contração dos cromossomos.

Esta consideração é baseada no fato de que os genótipos utilizados para estas análises são estritamente aparentados, de modo que quaisquer diferenças que venham a ocorrer no comprimento cromossômico demonstram, portanto, diferenças no grau de condensação dos cromossomos. Assim, para a linhagem 4443 foram analisadas metáfases mais descondensadas ou prometáfases, em comparação com a linhagem 441123 e o híbrido 441123 x 4443.

A análise da tabela 5 evidencia, entretanto, a ocorrência de diferença significativa para os valores de comprimento relativo do cromossomo 7, que apresenta knobs heterocromáticos em ambos os braços cromossômicos, (K7S/K7L) entre a linhagem 441123 e o híbrido

441123 x 4443. Os resultados do teste de Tukey para os valores de comprimento relativo do cromossomo 7, indicam que este par cromossômico foi maior para o híbrido (CR = 165,22) em comparação a referida linhagem 441123 (CR = 156,07). Para este caso, também é possível se estabelecer que esta diferença ocorreu provavelmente devido à análise de um número maior de células metafásicas mais descondensadas ou de prometáfases para o híbrido em relação a linhagem.

Dentro deste contexto, é importante mencionar que, apesar de não terem sido detectadas diferenças significativas nos valores de comprimento absoluto (expresso em unidades arbitrárias) para o cromossomo 10 entre as linhagens e o híbrido analisados (Tabelas 8 e 9), o comprimento absoluto deste cromossomo apresentou-se menor na linhagem 4443 (CA = 6,30) em comparação com a linhagem 441123 (CA = 6,86) e o híbrido (CA = 6,08). Esta diferença foi refletida nos valores de relação de braços para este cromossomo, onde a linhagem 4443 apresentou uma relação de braços ligeiramente maior (RB = 1,87) em comparação com a linhagem 441123 (RB = 1,64) e o híbrido (RB = 1,72). Neste caso, tal diferença pode ser atribuída ao fato de que a amostra analisada para a linhagem 4443 foi pequena.

Nenhuma diferença significativa foi observada para os valores de relação de braços entre os demais cromossomos (Tabelas 6 e 7), para os pré-tratamentos e genótipos avaliados.

A comparação dos valores de comprimento relativo (CR) e relação de braços (RB) dos cromossomos obtidos nestas análises (Tabela 3) mostraram nítida correspondência com dados apresentados por Aguiar-Perecin & Vosa (1985), obtidos através da avaliação morfométrica dos cromossomos dos estoques Zapalote Chico e Cerimonial, com diferentes constituições de knobs heterocromáticos.

Tabela 8. Quadro geral da análise de variância para os valores de comprimento absoluto do cromossomo 10 dos genótipos 441123, 4443 e 441123 x 4443, nos pré-tratamentos com 8-hidroxiquinolina e 8-hidroxiquinolina combinada a cicloheximida.

CROMOSSOMO 10			
FV	GL	QM	F
Genótipos	2	1.33	2.52
Tratamentos	1	0.006	0.01
Resíduo	29	0.53	
Xm		6.72 ± 0.72	
cv (%)		10.83	

** significativo ao nível de 1%

* significativo ao nível de 5%

Tabela 9. Resultados do teste de Tukey para os valores de comprimento absoluto do cromossomo 10 dos genótipos 441123, 4443 e 441123 x 4443, nos pré-tratamentos com 8-hidroxiquinolina e 8-hidroxiquinolina combinada a cicloheximida.

Cromossomos/ Variáveis	10
Pré-tratamentos	
H300	6.737 a
H+C12,5	6.710 a
DMS	0.4377
Genótipos	
441123 x 4443	6.807 a
441123	6.863 a
4443	6.310 a
DMS	0.6697

Médias seguidas da mesma letra não são significativamente diferentes ao nível de 5% - DMS = Diferença mínima significativa

As diferenças observadas entre os valores de comprimento relativo e relação de braços demonstrados na tabela 3, e aqueles reportados por Aguiar-Perecin & Vosa (1985) evidenciam claramente a ocorrência de variações no complemento cromossômico entre os diversos estoques utilizados, variações estas que podem estar relacionadas à variabilidade no conteúdo de DNA entre as diversas raças e variedades de milho existentes, ou que podem refletir a variabilidade no conteúdo de heterocromatina entre estes estoques (Bennett *et al.*, 1977).

Para a detecção de possíveis alterações nos cromossomos decorrentes da presença de bandas, em relação aos pré-tratamentos e genótipos testados, foi realizada uma avaliação mais detalhada envolvendo a determinação dos valores de distância centrômero-banda e tamanho de bandas (para os cromossomos 2, 3, 6, 7, 8, e 9 - Tabela 10). Para fins comparativos procedeu-se a análise da relação tamanho de banda/tamanho do braço cromossômico (%).

Os resultados da análise de variância e do teste de Tukey, apresentados nas Tabelas 11, 12, 13, 14, 15 e 16, evidenciam que nenhuma diferença significativa foi observada para os valores de distância centrômero-banda entre os pré-tratamentos e os genótipos analisados, enquanto que diferença significativa foi observada para tamanho de banda entre os genótipos e relação tamanho de banda/tamanho do braço, especificamente para o cromossomo 3. Os dados revelam que o tamanho da banda do cromossomo 3 foi relativamente menor para a linhagem 441123 (TB = 21,10) em comparação com o híbrido (TB = 24,67), sendo a banda correspondente a 24 % do braço longo no híbrido e 22 % do braço longo na linhagem 441123. Considerando-se que não houve diferença significativa para os valores de comprimento relativo e relação de braços do cromossomo 3 com banda entre estes dois genótipos (Tabelas 4 e 5, 6 e 7), tais resultados evidenciam, particularmente às diferenças quanto ao grau de condensação dos cromossomos, como discutido anteriormente.

Tabela 10. Médias dos valores de distância centrômero-banda (DCB), tamanho de banda (TB) e relação tamanho de banda / tamanho do braço cromossômico (%) dos cromossomos com bandas, de preparações coradas pelo bandamento-C, para os genótipos e pré-tratamentos avaliados.

PRÉ-TRATAMENTOS / GENÓTIPOS / CROMOSSOMOS								
H300	2L	3L	6L	7S	7L	8L	9S	
441123 x 4443								
DCB	47.21 ± 5.71	53.86 ± 5.95	50.69 ± 5.52	33.54 ± 6.08	50.49 ± 4.98	55.87 ± 4.39	34.98 ± 5.80	
TB	28.22 ± 3.90	22.88 ± 4.24	18.17 ± 2.77	29.07 ± 3.06	37.99 ± 2.94	28.11 ± 5.01	37.62 ± 4.81	
%TB	32.14 ± 2.35	23.37 ± 3.27	22.58 ± 2.90	46.67 ± 5.22	38.49 ± 3.52	28.98 ± 4.39	51.90 ± 5.72	
441123								
DCB	49.66 ± 3.79	58.99 ± 2.57	52.06 ± 5.81	32.78 ± 5.28	46.12 ± 6.08	53.75 ± 5.00	32.86 ± 2.71	
TB	26.30 ± 2.63	20.53 ± 2.48	15.60 ± 1.05	24.98 ± 3.43	37.89 ± 5.09	31.89 ± 2.51	39.07 ± 3.71	
%TB	29.84 ± 2.73	23.58 ± 5.24	21.15 ± 3.17	44.92 ± 4.02	37.70 ± 2.84	32.14 ± 3.81	53.05 ± 4.66	
4443								
DCB	47.75 ± 3.39	-	52.51 ± 6.94	-	53.02 ± 4.30	57.78 ± 3.59	-	
TB	29.49 ± 2.36	-	15.84 ± 0.45	-	36.30 ± 4.50	27.18 ± 3.93	-	
%TB	28.86 ± 5.18	-	19.84 ± 0.35	-	35.18 ± 5.03	27.65 ± 4.53	-	

PRÉ-TRATAMENTOS / GENÓTIPOS / CROMOSSOMOS								
H+C12,5	2L	3L	6L	7S	7L	8L	9S	
441123 x 4443								
DCB	49.66 ± 6.43	54.58 ± 5.77	50.91 ± 7.82	34.51 ± 4.02	51.74 ± 6.72	56.23 ± 4.62	35.18 ± 5.23	
TB	29.04 ± 4.99	26.04 ± 2.73	18.63 ± 4.72	30.68 ± 2.73	39.87 ± 5.96	30.20 ± 5.90	38.49 ± 4.04	
%TB	31.88 ± 4.12	25.79 ± 2.49	23.27 ± 4.30	46.14 ± 6.05	39.37 ± 4.49	30.87 ± 5.72	52.36 ± 4.39	
441123								
DCB	45.87 ± 3.06	52.53 ± 3.83	51.69 ± 4.96	33.52 ± 3.27	48.08 ± 5.06	55.59 ± 5.31	35.22 ± 4.94	
TB	29.95 ± 3.15	21.48 ± 2.96	17.30 ± 1.13	28.95 ± 4.29	39.54 ± 3.89	32.13 ± 5.40	40.76 ± 3.24	
%TB	32.47 ± 3.67	21.52 ± 2.34	21.27 ± 2.05	46.20 ± 4.50	40.56 ± 3.81	31.85 ± 4.60	53.81 ± 4.69	
4443								
DCB	51.33 ± 3.37	-	50.24 ± 0.96	-	51.31 ± 1.97	59.19 ± 4.84	-	
TB	31.46 ± 2.09	-	17.57 ± 1.37	-	40.60 ± 4.96	30.75 ± 1.99	-	
%TB	31.51 ± 4.04	-	23.45 ± 4.39	-	37.58 ± 3.01	27.14 ± 4.01	-	

Tabela 11. Quadro geral da análise de variância para os valores de distância centrômero-banda dos cromossomos metafásicos dos genótipos 441123, 4443 e 441123 x 4443, nos pré-tratamentos com 8-hidroxiquinolina e 8-hidroxiquinolina combinada a cicloheximida.

FV	CROMOSSOMO																					
	2L			3L			6L			7S			7L			8L			9S			
	QM	F		QM	F		QM	F		QM	F		QM	F		QM	F		QM	F		
Genótipos (GL)	17.32 (2)	0.59		2.36 (1)	0.07		1.83 (2)	0.05		1.84 (1)	0.08		72.81 (2)	2.70		44.40 (2)	2.07		42.75 (1)	1.53		
Tratamentos (GL)	20.23 (1)	0.69		11.15 (1)	0.35		0.52 (1)	0.01		1.68 (1)	0.07		0.24 (1)	0.01		18.29 (1)	0.85		51.55 (1)	1.85		
Resíduo (GL)	29.27 (30)			32.08 (22)			37.89 (27)			23.11 (20)			26.92 (32)			21.48 (30)			27.89 (22)			
Xm	48.47 ± 5.41			54.48 ± 5.66			51.18 ± 6.15			33.73 ± 4.80			50.15 ± 5.18			56.21 ± 4.63			34.83 ± 5.28			
cv (%)	11.16			10.39			12.02			14.25			10.34			8.24			15.16			
** significativo ao nível de 1%																						
* significativo ao nível de 5%																						

Tabela 12. Resultados do teste de Tukey para os valores de distância centrômero-banda dos cromossomos metáfásicos dos genótipos 441123, 4443 e 441123 x 4443, nos pré-tratamentos com 8-hidroxiquinolina e 8-hidroxiquinolina combinada a cicloheximida.

CROMOSSOMO							
Cromossomos/ Variáveis	2L	3L	6L	7S	7L	8L	9S
Pré-tratamentos							
H300	47.9 a	55.5 a	51.3 a	33.28 a	49.87 a	55.71 a	34.28 a
H+C12,5	48.7 a	53.7 a	51.0 a	34.10 a	50.34 a	56.53 a	35.20 a
DMS	3.33	3.93	3.93	3.50	3.14	2.85	3.66
Genótipos							
441123 x 4443	48.5 a	54.2 a	50.7 a	34.00 a	51.17 a	56.08 a	35.09 a
441123	47.2 a	54.8 a	51.8 a	33.36 a	47.42 a	54.98 a	34.43 a
4443	50.1 a	-	51.2 a	-	51.99 a	58.56 a	-
DMS	5.17	3.98	6.13	3.53	4.79	4.40	3.66

Médias seguidas da mesma letra não são significativamente diferentes ao nível de 5%
DMS = Diferença mínima significativa

Tabela 13. Quadro geral da análise de variância para os valores de tamanho de banda dos cromossomos metafásicos dos genótipos 441123, 4443 e 441123 x 4443, nos pré-tratamentos com 8-hidroxiquinolina e 8-hidroxiquinolina combinada a cicloheximida.

CROMOSSOMO													
FV	2L		3L		6L		7S		7L		8L		9S
	QM	F	QM	F	QM	F	QM	F	QM	F	QM	F	QM F
Genótipos	9.58	0.66	132.3	10.79*	48.47	7.38	52.75	5.09	2.340	0.11	35.09	1.24	40.09 2.16
(GL)	(2)	(1)	(2)		(2)		(1)		(2)		(2)		(1)
Tratamentos	59.15	4.05	62.19	5.07	35.88	5.46	46.23	4.46	65.46	3.06	12.15	0.43	5.26 0.28
(GL)	(1)	(1)	(1)		(1)		(1)		(1)		(1)		(1)
Resíduo	14.59		12.26		6.56		10.36		21.41		28.19		18.53
(GL)	(30)	(22)	(22)		(27)		(20)		(32)		(30)		(22)
Xm	29.08 ± 3.82		23.31 ± 3.50		17.59 ± 2.56		28.85 ± 3.21		38.98 ± 4.62		30.19 ± 5.31		38.95 ± 4.30
cv (%)	13.13		15.01		14.56		11.15		11.87		17.58		11.05

** significativo ao nível de 1%

* significativo ao nível de 5%

Tabela 14. Resultados do teste de Tukey para os valores de tamanho de banda dos cromossomos metafásicos dos genótipos 441123, 4443 e 441123 x 4443, nos pré-tratamentos com 8-hidroxiquinolina e 8-hidroxiquinolina combinada a cicloheximida.

CROMOSSOMO													
Cromossomos/ Variáveis	2L		3L		6L		7S		7L		8L		9S
Pré-tratamentos													
H300	27.89 a		22.09 a		17.08 a		27.70 a		37.60 a		28.95 a		38.10 a
H+C12,5	29.84 a		24.15 a		17.99 a		29.81 a		39.91 a		30.98 a		39.52 a
DMS	2.35		2.43		1.65		2.34		2.80		3.27		2.99
Genótipos													
441123 x 4443	28.68 a		24.66 a		18.41 a		29.83 a		39.01 a		29.34 a		38.09 a
441123	28.64 a		21.10 b		16.68 a		27.53 a		38.99 a		32.04 a		40.20 a
4443	30.80 a		-		16.80 a		-		38.88 a		29.16 a		-
DMS	3.65		2.46		2.59		2.36		4.27		5.05		2.99

Médias seguidas da mesma letra não são significativamente diferentes ao nível de 5%

DMS = Diferença mínima significativa

Tabela 15. Quadro geral da análise de variância para os valores obtidos pela relação tamanho de banda/tamanho do braço (%) dos cromossomos metafásicos dos genótipos 441123, 4443 e 441123 x 4443, nos pré-tratamentos com 8-hidroxiquinolina e 8-hidroxiquinolina combinada a cicloheximida.

CROMOSSOMO														
FV	2L		3L		6L		7S		7L		8L		9S	
	QM	F	QM	F	QM	F	QM	F	QM	F	QM	F	QM	F
Tratamentos	60.06	4.07	30.56	6.54*	5.88	31.08	107.84	1.54	12.66	0.88	2.49	0.04	2.01	0.10
(GL)	(1)		(1)		(1)		(1)		(1)		(1)		(1)	
Resíduo	15.25		4.67		0.18		70.13		14.36		82.17		20.29	
(GL)	(5)		(5)		(1)		(3)		(5)		(4)		(3)	
Xm	33.41 ± 3.90		24.39 ± 2.16		22.57 ± 0.43		46.70 ± 8.37		38.38 ± 3.79		31.09 ± 7.88		51.73 ± 4.50	
cv (%)	11.69		8.86		1.92		17.93		9.87		25.36		8.70	

** significativo ao nível de 1%

* significativo ao nível de 5%

Tabela 16. Resultados do teste de Tukey para os valores obtidos pela relação tamanho de banda/tamanho do braço (%) dos cromossomos metafásicos dos genótipos 441123, 4443 e 441123 x 4443, nos pré-tratamentos com 8-hidroxiquinolina e 8-hidroxiquinolina combinada a cicloheximida.

CROMOSSOMO									
		2L	3L	6L	7S	7L	8L	9S	
Cromossomos/ Variáveis									
Pré-tratamentos									
Metáfases		31.87 a	25.79 a	-	45.89 a	39.05 a	30.86 a	52.36 a	
Prometáfases		36.74 a	21.34 b	-	48.47 a	37.03 a	31.67 a	49.85 a	
DMS		4.95	2.74	-	12.54	4.870	11.52	8.36	

Médias seguidas da mesma letra não são significativamente diferentes ao nível de 5%

DMS = Diferença mínima significativa

4.2.2. Análise comparativa dos cromossomos metafásicos e prometáfásicos

O efeito do pré-tratamento combinado de 8-hidroxiquinolina com cicloheximida no grau de condensação dos cromossomos metafásicos e prometáfásicos também foi avaliado através da análise comparativa dos valores de comprimento relativo e relação de braços para todos os cromossomos.

As médias dos valores de comprimento relativo e relação de braços de todos os cromossomos metafásicos e prometáfásicos são apresentadas na Tabela 17, enquanto que os resultados da análise de variância e do teste de Tukey para estes dados são apresentados nas Tabelas 18 e 19, 20 e 21, respectivamente. De um modo geral, é possível se observar que os cromossomos prometáfásicos apresentam-se ligeiramente maiores que os cromossomos metafásicos, indicando portanto, o menor nível de condensação das prometáfases.

Através da comparação dos valores de comprimento relativo entre os cromossomos 1 e 10 de metáfases e prometáfases (Tabela 17) foi possível se verificar que apesar dos cromossomos apresentarem-se maiores nas prometáfases existe uma nítida correspondência entre eles, ou seja, a relação de tamanho entre estes cromossomos mostra ser a mesma tanto nas metáfases quanto nas prometáfases.

A despeito desta diferença nos níveis de condensação entre metáfases e prometáfases, os resultados obtidos através da análise de variância evidenciam que não houve diferenças significativas no comprimento relativo para a maioria dos cromossomos analisados, exceto para o cromossomo 3 sem banda que apresentou-se mais condensado nas metáfases (Tabela 18 e 19).

Tabela 17. Média dos valores de comprimento relativo (CR) e relação de braços (RB) dos cromossomos metafásicos e prometáfásicos obtidos a partir do pré-tratamento de raízes do híbrido 441123 x 4443 com 8-hidroxiquinolina combinada a cicloheximida

CROMOSSOMOS										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Metáfases										
CR	184.24	157.47	155.56	K ⁺ 152.32	144.19	127.14	165.76	K ⁺ 138.04	137.47	K ⁺ 100.00
RB	1.18	1.36	1.86	1.43	1.22	1.74	1.64	2.44	0.84	1.689
CR			148.73	K ⁻			145.34	K ⁻	106.63	K ⁻
RB			1.74				2.42		1.40	
Prometáfases										
CR	207.86	165.69	167.20	K ⁺ 165.47	154.89	137.88	162.40	K ⁺ 136.25	152.86	K ⁺ 100.00
RB	1.21	1.24	1.87	1.49	1.34	1.83	1.88	2.65	0.90	1.81
CR			161.54	K ⁻			147.88	K ⁻	106.54	K ⁻
RB			1.85				2.58		1.45	

Tabela 18. Quadro geral da análise de variância para os valores de comprimento relativo dos cromossomos metafásicos e prometáfásicos, obtidos a partir do pré-tratamento de raízes do híbrido 441123 x 4443 com 8-hidroxiquinolina combinada a cicloheximida

CROMOSSOMO																							
1			2			3K+			3K-			4			5								
FV	QM	F	QM	F	QM	F	QM	F	QM	F	QM	F	QM	F	QM	F	QM	F	QM	F	QM	F	QM
Tratamentos (GL)	717.40 (1)	098	2.97 (1)	0.03	247.70 (1)	2.18	261.93 (1)	3.97*	210.75 (1)	1.27	20.56 (1)												
Residuo (GL)	729.18 (4)		114.63 (5)				66.05 (4)		166.04 (5)		209.11 (4)												
Xm	190.80 ± 27.00		160.06 ± 10.70		158.79 ± 10.66		152.29 ± 8.12		156.47 ± 12.88		147.16 ± 14.46												
cv (%)	14.15		6.68		6.71		5.33		8.23		9.82												

CROMOSSOMO																							
6			7K+			7K-			8			9K+			9K-			10					
FV	QM	F	QM	F	QM	F	QM	F	QM	F	QM	F	QM	F	QM	F	QM	F	QM	F	QM	F	QM
Tratamentos (GL)	51.70 (1)	0.36	124.58 (1)	0.73	2.32	0.01	4.121 (1)	0.02	51.61 (1)	0.64	32.58 (1)	0.40	1.17 (1)										
Residuo (GL)	142.27 (5)		170.74 (3)		212.91 (4)		165.86 (4)		80.22 (3)		81.13 (4)		1.28 (5)										
Xm	130.71 ± 11.92		164.70 ± 13.06		146.19 ± 14.59		137.54 ± 12.87		141.57 ± 8.95		106.59 ± 9.00		7.15 ± 1.13										
cv (%)	9.12		7.93		9.98		9.36		6.32		8.44		15.83										

** significativo ao nível de 1%
 * significativo ao nível de 5%

Tabela 19. Resultados do teste de Tukey para os valores de comprimento relativo dos cromossomos metáfásicos e prometáfásicos, obtidos a partir do pré-tratamento de raízes do híbrido 441123 x 4443 com 8-hidroxiquinolina combinada a cicloheximida

CROMOSSOMO						
Cromossomos/ Variáveis	1	2	3K+	3K-	4	5
Pré-tratamentos						
Metáfases	184.24 a	157.47 a	155.55 a	148.73 a	152.32 a	144.19 a
Prometáfases	207.86 a	165.68 a	167.20 a	161.54 b	165.47 a	154.88 a
DMS	39.47	13.58	15.59	11.88	16.34	21.14
CROMOSSOMO						
Cromossomos/ Variáveis	6	7K+	7K-	8	9K+	9K-
Pré-tratamentos						
Metáfases	127.13 a	165.75 a	145.34 a	138.04 a	137.47 a	106.63 a
Prometáfases	137.87 a	162.40 a	147.88 a	136.25 a	152.86 a	106.53 a
DMS	15.32	22.67	20.26	18.82	16.82	12.51
						1.43

Médias seguidas da mesma letra não são significativamente diferentes ao nível de 5%

DMS = Diferença mínima significativa

Tabela 20. Quadro geral da análise de variância para os valores de relação de braços dos cromossomos metafásicos e prometafásicos, obtidos a partir do pré-tratamento de raízes do híbrido 441123 x 4443 com 8-hidroxiquinolina combinada a cicloheximida

CROMOSSOMO														
1			2			3K+			3K-			4		
FV	QM	F	QM	F	QM	QM	F	QM	QM	F	QM	QM	F	QM
Tratamentos (GL)	0.004 (1)	0.37	0.01 (1)	2.31*	0.0004 (1)	0.01	0.006 (1)	0.003 (1)	0.32	0.003 (1)	0.13	0.013 (1)	0.50	
Repetições (GL)	0.015 (12)	1.16	0.005 (12)	0.78	0.03 (12)	0.86	0.025 (12)	0.01 (12)	1.33	0.01 (12)	0.50	0.012 (12)	0.44	
Resíduo (GL)	0.01 (4)		0.007 (5)		0.03 (4)	0.03	0.019 (4)	0.02 (5)		0.02 (5)		0.027 (4)		
Xm	1.19 ± 0.11		1.32 ± 0.08		1.86 ± 0.19		1.77 ± 0.13		1.44 ± 0.16		1.25 ± 0.16			
cv (%)	9.64		6.45		10.46		7.86		11.21		13.24			

CROMOSSOMO														
6			7K+			7K-			8			9K+		
FV	QM	F	QM	F	QM	QM	F	QM	QM	F	QM	QM	F	QM
Tratamentos (GL)	0.01 (1)	0.33	0.14 (1)	3.93	0.06 (1)	1.23	0.09 (1)	1.25	0.01 (1)	1.63	0.003 (1)	0.01 (1)	5.81	
Repetições (GL)	0.01 (11)	0.44	0.02 (11)	0.56	0.06 (12)	1.38	0.07 (12)	0.97	0.01 (10)	1.70	0.013 (12)	0.37 (12)	1.49	
Resíduo (GL)	0.03 (5)		0.03 (3)		0.04 (4)	0.03	0.07 (4)	0.008 (3)	0.008 (3)	0.03 (4)	0.03 (4)	0.02 (5)		
Xm	1.77 ± 0.19		1.71 ± 0.19		2.47 ± 0.22		2.51 ± 0.27		0.85 ± 0.08		1.41 ± 0.19		1.72 ± 0.14	
cv (%)	11.04		11.31		9.00		10.89		9.66		13.44		8.20	

** significativo ao nível de 1%
 * significativo ao nível de 5%

Tabela 21. Resultados do teste de Tukey para os valores de relação de braços dos cromossomos metáfásicos e prometáfásicos, obtidos a partir do pré-tratamento de raízes do híbrido 441123 x 4443 com 8-hidroxiquinolina combinada a cicloheximida

CROMOSSOMO						
Cromossomos/ Variáveis	1	2	3K+	3K-	4	5
Pré-tratamentos						
Metáfases	1.18 a	1.36 a	1.86 a	1.74 a	1.49 a	1.22 a
Prometáfases	1.21 a	1.23 b	1.87 a	1.85 a	1.42 a	1.33 a
DMS	0.16	0.10	0.28	0.20	0.20	0.24
CROMOSSOMO						
Cromossomos/ Variáveis	6	7K+	7K-	8	9K+	10
Pré-tratamentos						
Metáfases	1.74 a	1.64 a	2.41 a	2.46 a	0.84 a	1.40 a 1.68 a
Prometáfases	1.83 a	1.88 a	2.58 a	2.65 a	0.89 a	1.45 a 1.81 a
DMS	0.25	0.33	0.30	0.40	0.15	0.31 0.17

Médias seguidas da mesma letra não são significativamente diferentes ao nível de 5%

DMS = Diferença mínima significativa

Quanto aos valores de relação de braços, não foram observadas diferenças significativas para a maioria dos cromossomos (Tabelas 20 e 21), exceto para o cromossomo 2, que apresentou relação de braços menor nas prometáfases (RB = 1,23), em função de se apresentar menos condensado que nas metáfases (RB = 1,36).

Para a detecção de possíveis alterações nos cromossomos metafásicos e prometáfásicos decorrentes da presença de bandas, foi realizada a avaliação dos valores de distância centrômero-banda e tamanho de bandas (para os cromossomos 2, 3, 6, 7, 8, e 9). Os valores médios para distância centrômero-banda e tamanho de banda são apresentados na Tabela 22.

Os resultados da análise de variância e teste de Tukey para os valores de distância centrômero-banda (DCB), apresentados nas Tabelas 23 e 24, respectivamente, evidenciam a não ocorrência de diferenças significativas para este parâmetro entre os cromossomos metafásicos e prometáfásicos com bandas, indicando novamente a correspondência de tamanho destes cromossomos nas diferentes fases avaliadas.

Para os valores de tamanho de banda, a análise de variância (Tabela 25) e os resultados do teste de Tukey (Tabela 26) demonstram que apesar do tamanho da banda ser variável entre os cromossomos metafásicos e prometáfásicos, tais variações não são estatisticamente significativas para as bandas dos cromossomos 2L, 6L, 7L, 8L e 9S. Assim, diferenças significativas foram detectadas especificamente para a banda do braço longo do cromossomo 3 (3L) e para a banda do braço curto do cromossomo 7 (7S).

Para fins comparativos procedeu-se a análise da relação tamanho de banda/tamanho do braço cromossômico (%) dos cromossomos 2, 3, 6, 7, 8 e 9, a partir dos dados apresentados na tabela 27.

Tabela 22. Média dos valores de distância centrômero-banda (DCB), tamanho de banda (TB) e relação tamanho de banda / tamanho do braço cromossômico (%) dos cromossomos metafásicos e prometáfásicos obtidos a partir do pré-tratamento de raízes do híbrido 441123 x 4443 com 8-hidroxiquinolina combinada a cicloheximida

CROMOSSOMOS						
	2L	3L	6L	7S	7L	8L 9S
Metáfase						
DCB	49.66 ± 6.43	54.58 ± 5.77	50.91 ± 7.82	34.51 ± 4.02	51.74 ± 6.72	56.23 ± 4.62 35.18 ± 5.23
TB	29.04 ± 4.99	26.04 ± 2.73	18.63 ± 4.72	30.68 ± 2.73	39.87 ± 5.96	30.20 ± 5.90 38.49 ± 4.04
%TB	31.88 ± 4.12	25.79 ± 2.49	23.27 ± 4.30	46.14 ± 6.05	39.37 ± 4.49	30.87 ± 5.72 52.36 ± 4.63
Prometáfases						
DCB	48.75 ± 6.93	58.99 ± 6.55	56.25 ± 5.30	29.59 ± 8.79	54.30 ± 6.48	55.46 ± 8.15 39.90 ± 6.28
TB	33.82 ± 3.19	22.83 ± 2.67	17.36 ± 1.56	27.06 ± 3.78	39.48 ± 4.51	30.87 ± 6.47 39.98 ± 4.64
%TB	36.75 ± 4.93	21.35 ± 2.00	19.51 ± 0.94	48.47 ± 9.28	37.04 ± 3.95	32.27 ± 7.53 49.85 ± 6.75

Tabela 23. Quadro geral da análise de variância para os valores de distância centrômero-banda dos cromossomos metáfásicos e prometafásicos, obtidos a partir do pré-tratamento de raízes do híbrido 441123 x 4443 com 8-hidroxiquinolina combinada a cicloheximida

CROMOSSOMO																				
FV	2L			3L			6L			7S			7L			8L			9S	
	QM	F		QM	F		QM	F		QM	F		QM	F		QM	F		QM	F
Tratamentos	44.23	0.73		9.34	0.35		0.70	0.06		79.69	1.13		2.64	0.14		0.88	0.02		0.013	0.00
(GL)		(1)			(1)			(1)			(1)			(1)			(1)			(1)
Resíduo	60.78			26.61			12.67			70.23			19.35			50.30			32.32	
(GL)		(5)			(5)			(1)			(3)			(5)			(4)			(3)
Xm	49.36 ±7.79			55.96 ± 5.15			51.71 ± 3.56			32.75 ±8.38			52.59 ±4.39			56.01 ±7.09			36.36 ± 5.68	
cv (%)	15.79			9.21			6.88			25.58			8.36			12.66			15.63	

** significativo ao nível de 1%

* significativo ao nível de 5%

Tabela 24. Resultados do teste de Tukey para os valores de distância centrômero-banda dos cromossomos metáfásicos e prometafásicos, obtidos a partir do pré-tratamento de raízes do híbrido 441123 x 4443 com 8-hidroxiquinolina combinada a cicloheximida.

CROMOSSOMO											
Cromossomos/ Variáveis	2L	3L	6L	7S	7L	8L	9S				
Pré-tratamentos											
Metáfases	49.658 a	54.576 a	50.885 a	34.516 a	51.740 a	56.235 a	35.189 a				
Prometafases	48.745 a	58.987 a	56.250a	29.588 a	54.298 a	55.456 a	39.898 a				
DMS	9.8887	6.5433		15.037	5.6538	10.369	10.559				

Médias seguidas da mesma letra não são significativamente diferentes ao nível de 5%

DMS = Diferença mínima significativa

Tabela 25. Quadro geral da análise de variância para os valores de tamanho de banda dos cromossomos metáfásicos e prometáfásicos, obtidos a partir do pré-tratamento de raízes do híbrido 441123 x 4443 com 8-hidroxiquinolina combinada a cicloheximida

CROMOSSOMO																
FV	2L		3L		6L		7S		7L		8L		9S			
	QM	F	QM	F	QM	F	QM	F	QM	F	QM	F	QM	F		
Tratamentos	38.02	1.42	18.13	3.19*	1.34	0.53	21.22	27.99*	5.68	0.46	0.016	0.00	3.781	0.67		
(GL)		(1)		(1)		(1)		(1)		(1)		(1)		(1)		
Resíduo	26.85		5.88		2.52		0.75	12.24	29.33		5.612					
(GL)		(5)		(5)		(1)		(3)		(5)		(4)		(3)		
Xm	30.54 ± 5.18		25.02 ± 2.38		18.43 ± 1.59		29.39 ± 0.87	39.74 ± 3.49	30.38 ± 5.41		38.86 ± 2.36					
cv (%)	16.96		9.52		8.62		2.96	8.80	17.82		6.09					

** significativo ao nível de 1%

* significativo ao nível de 5%

Tabela 26. Resultados do teste de Tukey para os valores de tamanho de banda dos cromossomos metáfásicos e prometáfásicos, obtidos a partir do pré-tratamento de raízes do híbrido 441123 x 4443 com 8-hidroxiquinolina combinada a cicloheximida.

CROMOSSOMO									
Cromossomos/ Variáveis		2L	3L	6L	7S	7L	8L	9S	
Pré-tratamentos									
Metáfases		29.03 a	26.04 a	23.13 a	30.68 a	39.87 a	30.20 a	38.49 a	
Prometáfases		33.81 a	22.83 b	19.50 a	27.06 b	39.48 a	30.87 a	39.98 a	
DMS		6.57	3.02	-	1.56	4.49	7.91	4.40	

Médias seguidas da mesma letra não são significativamente diferentes ao nível de 5%

DMS = Diferença mínima significativa

Tabela 27. Quadro geral da análise de variância para os valores obtidos pela relação tamanho de banda/tamanho do braço (%) dos cromossomos metafásicos e prometafásicos, obtidos a partir do pré-tratamento de raízes do híbrido 441123 x 4443 com 8-hidroxiquinolina combinada a cicloheximida

CROMOSSOMO																				
FV	2L			3L			6L			7S			7L			8L			9S	
	QM	F		QM	F		QM	F		QM	F		QM	F		QM	F	QM	F	
Tratamentos	60.06	4.07		30.56	6.54*		5.88	31.08	107.8	1.54	12.66	0.88	2.49	0.04		2.01		2.01	0.10	
(GL)	(1)			(1)			(1)		(1)		(1)		(1)			(1)		(1)		
Resíduo	15.25			4.67			0.18	70.13	14.36		82.17		20.29			20.29				
(GL)	(5)			(5)			(1)	(3)	(5)		(4)		(3)			(3)				
Xm	33.41 ± 3.90			24.39 ± 2.16			22.57 ± 0.43	46.70 ± 8.37	38.38 ± 3.79		31.09 ± 7.88		51.73 ± 4.50							
cv (%)	11.69			8.86			1.92	17.93	9.87		25.36		8.70							

** significativo ao nível de 1%

* significativo ao nível de 5%

Tabela 28. Resultados do teste de Tukey para os valores de tamanho de banda dos cromossomos metafásicos e prometafásicos, obtidos a partir do pré-tratamento de raízes do híbrido 441123 x 4443 com 8-hidroxiquinolina combinada a cicloheximida.

CROMOSSOMO									
Cromossomos/ Variáveis	2L	3L	6L	7S	7L	8L	9S		
Pré-tratamentos									
Metáfases	31.87 a	25.79 a	-	45.89 a	39.05 a	30.86 a	52.36 a		
Prometafases	36.74 a	21.34 b	-	48.47 a	37.03 a	31.67 a	49.85 a		
DMS	4.95	2.74	-	12.54	4.87	11.52	8.36		

Médias seguidas da mesma letra não são significativamente diferentes ao nível de 5%

DMS = Diferença mínima significativa

Novamente, diferenças significativas foram observadas especificamente para o cromossomo 3, onde o tamanho da banda representou 25% do braço longo nos cromossomos metafásicos e 21% do braço longo nos cromossomos prometáfásicos.

De um modo geral, as diferenças observadas especificamente para os cromossomos 3 e 7 podem ser explicadas pela diferença no grau de contração dos cromossomos metafásicos e prometáfásicos ou por efeito de amostragem se considerarmos que foram analisadas um número menor de prometáfases em relação ao número de metáfases mais condensadas.

Conforme observado através das análises discutidas acima, poucas diferenças significativas foram detectadas nas avaliações dos cromossomos, tanto entre os diferentes pré-tratamentos, quanto nos diferentes genótipos ou mesmo entre os diferentes graus de condensação cromossômica, evidenciando assim a constância dos parâmetros analisados.

4.2.3. Análise comparativa dos cromossomos metafásicos e prometáfásicos heterozigóticos para presença de bandas.

Com o objetivo de se detectar possíveis diferenças no comprimento relativo e relação de braços dos cromossomos, em função da presença de bandas-C e do grau de condensação cromossômica, foram comparados os cromossomos 3, 7 e 9, heterozigóticos para a presença de bandas (Figura 5).

Conforme citado anteriormente, para tais análises foram empregadas metáfases e prometáfases obtidas a partir do pré-tratamento combinado de 8-hidroxiquinilina com cicloheximida, no genótipo híbrido.

Os valores médios obtidos para os parâmetros comprimento relativo (CR) e relação de braços (RB) são apresentados na Tabela 29, enquanto que os resultados da análise de variância e do teste de Tukey para esses índices são apresentados nas Tabelas 30 e 31, respectivamente.

Os dados apresentados evidenciam diferenças significativas ao nível de 1% para os valores de comprimento relativo e relação de braços de alguns dos pares cromossômicos analisados.

No caso do par cromossômico 3 não foram observadas diferenças significativas entre os valores de comprimento relativo e relação de braços do homólogo com banda (K+) e do homólogo sem banda (K-), tanto nas metáfases, quanto nas prometáfases. Neste ponto é interessante mencionar que a banda-C, localizada no braço longo deste cromossomo, corresponde a um knob de tamanho médio no paquíteno.

As diferenças observadas para este par cromossômico foram devidas apenas ao grau de condensação dos cromossomos, ou seja, o comprimento relativo dos cromossomos com e sem bandas, analisados na metáfase, foi diferente daquele observado para os cromossomos analisados na fase de prometáfase.

Para o par cromossômico 7, heterozigoto para a presença de banda no braço curto e homozigoto para presença de bandas no braço longo, foram detectadas diferenças significativas ao nível de 1% entre os homólogos com banda e sem banda no braço curto, especificamente na fase de metáfase.

Apesar das discrepâncias observadas entre os valores de comprimento relativo dos homólogos com banda (CR=162.40) e sem banda (CR=147.88), analisados na prometáfase, estes valores não mostraram ser estatisticamente significativos.

Para os valores de relação de braços do par cromossômico 7, foram observadas diferenças significativas entre os homólogos com banda e sem banda, tanto na fase de metáfase, quanto na prometáfase.

Quanto ao par cromossômico 9, heterozigótico para a presença de uma banda grande no braço curto, os valores de comprimento relativo e relação de braços do homólogo com banda foi nitidamente diferente do homólogo sem banda, tanto nas metáfases quanto nas prometáfases.

Estas diferenças evidenciam portanto que, para alguns cromossomos, a presença de bandas-C, correspondentes aos knobs heterocromáticos grandes, pode alterar expressivamente o comprimento dos braços cromossômicos, corroborando assim os dados apresentados por Aguiar-Perecin (1985), e Aguiar-Perecin & Vosa (1985), sendo

Assim, os dados apresentados nas avaliações dos cromossomos heterozigóticos para presença de banda-C fornecem mais uma indicação de que tais blocos heterocromáticos (knobs) representam material adicional nos cromossomos, conforme discutido por Bennett et al. (1977) e Aguiar-Perecin & Vosa (1985).

Tabela 29. Média dos valores de comprimento relativo (CR) e relação de braços (RB) dos cromossomos metafásicos e prometáfásicos, com banda (CB) e sem banda (SB) obtidos a partir do pré-tratamento de raízes do híbrido 441123 x 4443 com 8-hidroxiquinolina combinada a cicloheximida

CROMOSSOMO				
		3	7	9
Metáfase				
CR		155.56 ± 9.27	K ⁺ 165.76 ± 11.83	K ⁺ 137.47 ± 10.26
RB		1.86 ± 0.14	1.64 ± 0.14	0.84 ± 0.10
CR		148.73 ± 12.42	K ⁻ 145.34 ± 12.79	K ⁻ 106.63 ± 13.04
RB		1.74 ± 0.13	2.42 ± 0.24	1.40 ± 0.11

CROMOSSOMO				
		3	7	9
Prometáfase				
CR		167.20 ± 13.54	K ⁺ 162.40 ± 11.46	K ⁺ 152.86 ± 14.16
RB		1.87 ± 0.27	1.88 ± 0.18	0.90 ± 0.11
CR		161.54 ± 12.23	K ⁻ 147.88 ± 17.18	K ⁻ 106.54 ± 5.19
RB		1.85 ± 0.20	2.58 ± 0.28	1.45 ± 0.17

Tabela 30. Quadro geral da análise de variância para os valores de comprimento relativo e relação de braços dos cromossomos metafásicos e prometafásicos, com e sem bandas, obtidos a partir do pré-tratamento de raízes do híbrido 441123 x 4443 com 8-hidroxiquinolina combinada a cicloheximida

CROMOSSOMO											
3				7				9			
FV		CR		RB		CR		RB		CR	
QM	F	QM	F	QM	F	QM	F	QM	F	QM	F
Tratamentos (GL)	270.24 (3)	5.71**	0.03 (3)	1.36	723.46 (3)	7.07 **	1.50 (3)	33.84**	3049.0 (3)	48.27**	0.73 (3)
Resíduo (GL)	47.31 (20)	0.02 (20)	102.32 (18)	0.04 (18)	63.17 (17)	0.01 (16)					

** significativo ao nível de 1%

* significativo ao nível de 5%

Tabela 31. Resultados do teste de Tukey para os valores de comprimento relativo e relação de braços dos cromossomos metafásicos e prometafásicos, com banda (CB) e sem bandas (SB) obtidos a partir do pré-tratamento de raízes do híbrido 441123 x 4443 com 8-hidroxiquinolina combinada a cicloheximida.

CROMOSSOMO							
Cromossomos/ Variáveis		3		7		9	
		CR	RB	CR	RB	CR	RB
Pré-tratamentos							
Metáfases	CB	155.55 bc	1.86 a	165.75 a	1.64 b	137.47 b	0.84 b
	SB	148.73 c	1.74 a	145.34 c	2.41 a	106.63 c	1.40 a
Prometáfases	CB	167.20 a	1.87 a	162.40 ab	1.88 b	152.86 a	0.89 b
	SB	161.54 ab	1.84 a	147.88 bc	2.58 a	106.53 c	1.45 a
DMS		10.13	0.22	14.86	0.31	12.28	0.20

Médias seguidas da mesma letra não são significativamente diferentes ao nível de 5%

DMS = Diferença mínima significativa

Figura 5. Aspectos dos cromossomos heterozigotos para presença de bandas-C, 3, 7 e 9 (a) em metáfases e (b) prometáfases. Barra = 10 μ m

4.3. Análise das preparações meióticas

Conforme descrito no item 3.7.3., as melhores preparações meióticas contendo cromossomos na fase de paquíteno foram utilizadas para a identificação de cromossomos individuais, através dos parâmetros comprimento absoluto, relação de braços e posição de knobs heterocromáticos, comparando-se a composição de knobs com as bandas detectadas nos cromossomos mitóticos corados pelo bandamento-C. Detalhes dos 10 cromossomos identificados no paquíteno podem ser visualizados na figura 6.

A comparação das figuras paquitênicas obtidas durante o desenvolvimento do presente trabalho com dados extensivamente relatados na literatura para identificação de cromossomos meióticos e elaboração do mapa citológico nesta espécie (Longley, 1939; Rhoades, 1950; Maguire, 1968; Neuffer et al., 1968; McClintock et al., 1981), em conjunto com a avaliação dos parâmetros comprimento relativo, relação de braços e posição de knobs heterocromáticos, possibilitou a identificação de cada um dos 10 cromossomos paquitênicos do genótipo híbrido (441123 x 4443) empregado nestas análises.

Conforme demonstrado na Figura 6, foram encontrados knobs nas posições 2L, 3L, 6L₂, 6L₃, 7S, 7L, 8L₁, 8L₂ e 9S, sendo os cromossomos 3, 7 e 9 heterozigotos para a presença de knobs em 3L, 7S e 9S, e os cromossomos 2, 6 e 8 homozigotos para a presença de knobs em 2L, 6L e 8L. Para os cromossomos 2 e 3 (Figura 6b, c) foram observados knobs de tamanho médio, enquanto que para os cromossomos 7, 8 e 9 (Figuras 6g, h, i) foram observados knobs de tamanho grande. Este padrão de knobs mostrou estreita correspondência com o padrão de bandas-C apresentado nos respectivos cromossomos mitóticos (Figuras 3c,d e 4c).

Para os cromossomos 6 e 8 foram observados dois knobs nos respectivos braços longos ($6L_2$ e $6L_3$, $8L_1$ e $8L_2$). Estes cromossomos mostraram apenas uma banda na metáfase devido ao elevado grau de contração dos cromossomos nesta fase, o que promove a fusão destas bandas. Assim, estas observações permitiram evidenciar a nítida correlação entre os knobs heterocromáticos dos cromossomos paquitênicos e as bandas-C dos cromossomos mitóticos.

Os dados obtidos através das medidas de comprimento absoluto e relação de braços (Tabela 32) demonstraram nítida correspondência aos valores determinados no mapa citológico de milho descrito por Neuffer et al. (1968). Ligeiras diferenças foram observadas para alguns dos cromossomos analisados, sendo estas condicionadas principalmente por variações nos padrões de condensação dos cromossomos.

Tabela 32. Valores de comprimento relativo e relação de braços dos cromossomos paquitênicos de milho (avaliação comparativa com * Neuffer et al., 1968).

Dados Neuffer (1968)	Cromossomos	Unidade de Comprimento (arbitrária)	Braço Longo	Braço Curto	Relação de Braços
*	1	229	126.3	102.7	1.23
	1	281	156.5	124.5	1.26
*	2	196	115.1	80.9	1.42
	2	196	104.4	91.6	1.14
	2	259	162.6	79.0	2.09
*	3	179	119.3	59	2.00
	3	171	109.5	50	2.01
*	4	175	108.5	66.5	1.63
	4	175	116.7	58.3	2.00
	4	174	103.6	59.0	1.76
*	5	175	90.4	84.6	1.07
	5	218	116.0	87.5	1.33
*	6	122	106.4	15.1	7.00
	6	125	109	16.0	6.80
*	7	140	101.2	38.8	2.60
	7	214	158.0	56.0	2.80
*	8	140	105	35.0	3.00
	8	165	122	42.6	2.85
*	9	122	81.3	40.7	2.00
	9	184	110.0	74.0	1.48
*	10	100	72.2	27.8	2.6
	10	93	66.5	26.7	2.34

Figura 6. Cromossomos paquítenicos do híbrido de milho 441123 x 4443, corados com carmim propiônico. Cromossomos sem knobs heterocromáticos: (a) 1, (d) 4, (e) 5, e (j) 10. Cromossomos com knobs heterocromáticos pequenos ou médios (b) 2, (c) 3, (f) 6 (h) 8 e knobs grandes (g) 7, (i) 9. Setas indicam a posição do centrômero. Barra = 10 μ m

4.4. Padronização da metodologia de hibridação *in situ*

Conforme descrito no item 3.6., várias foram as etapas necessárias para a padronização da metodologia de hibridação *in situ* e algumas considerações podem ser feitas quanto a eficiência obtida em alguns desses passos.

O método de transformação bacteriana, desenvolvido com o intuito de promover a inserção do plasmídeo vetor contendo o inserto de 9,1 kb do DNA ribossômico de milho na linhagem de *E. coli*, mostrou ser bastante adequado a este propósito, de modo que as células competentes de *E. coli* inicialmente produzidas foram eficientemente transformadas e multiplicadas.

Durante o processo de isolamento do DNA plasmidial contendo o inserto de interesse, utilizando-se o protocolo de extração específico da Qiagen (“Qiagen-tip”), quantidades variáveis de DNA plasmidial foram extraídas (entre 1 a 9 µg de DNA), evidenciando assim a eficiência relativa desse método.

As etapas de marcação com biotina e detecção enzimática do sinal de marcação nos filtro de nitrocelulose utilizando-se o “Bionick Labelling Kit” e o “DNA Detection System Kit” foram eficientemente desenvolvidas, demonstrando, portanto, a aplicabilidade dos kits empregados.

Quanto as preparações citológicas empregadas para os experimentos de hibridação *in situ*, estas foram analisadas previamente em microscópio de contraste de fase, ainda na fase de preparo das lâminas.

Os dois métodos empregados no preparo das lâminas, dissecação da raiz seguido de esmagamento das células e o método de digestão enzimática seguido de dissecação da raiz e esmagamento, mostraram-se

particularmente adequados à obtenção de preparações de alta qualidade, livres de citoplasma ou resíduos celulares, contendo cromossomos morfológicamente nítidos e adequadamente espalhados.

A análise das preparações ao microscópio de contraste de fase mostrou-se extremamente importante tanto para o monitoramento dos processos de dissecação e digestão enzimática da raiz e esmagamento das células, ainda na fase inicial de preparo das lâminas, quanto para o monitoramento das etapas de tratamento pré-hibridação e das etapas de lavagens pré e pós-hibridação, para avaliação de possíveis danos ocorridos na morfologia dos cromossomos e para a verificação de possíveis perdas de células durante estes procedimentos.

Os tratamentos pré-hibridação das preparações citológicas envolvendo RNase e pepsina foram eficientes na eliminação de RNA e resíduos proteicos, enquanto a incubação em paraformaldído foi bastante adequada à manutenção da morfologia cromossômica.

As etapas de desnaturação do DNA com formamida também foram estabelecidas adequadamente, de modo que foi possível se evitar o auto-anelamento de sequências do DNA biotinilado e a rápida renaturação do DNA cromossômico, fatores estes que prejudicariam a hibridação do DNA da sonda ao sítio correspondente no DNA cromossômico. Além de contribuir para tais aspectos, o controle preciso da temperatura e concentração da solução de formamida contribuiu para a preservação da morfologia cromossômica.

As etapas de lavagem pré e pós-hibridação além de promoverem melhores condições de acesso da sonda ao DNA alvo, auxiliaram na eliminação de resíduos e conseqüentemente na redução dos níveis de background das preparações.

Conforme descrito no item 3.6.10.7., a detecção dos sítios de hibridação nos cromossomos foi estabelecida através de digestão

enzimática empregando-se estreptavidina conjugada com peroxidase (“streptavidin horseradish peroxidase”/ BRL), 3-3’diamino-benzidina-tetrahidroclorato-dihidratado (DAB) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2).

Este método de detecção enzimática, baseado na formação de um complexo enzimático entre biotina-estreptavidina peroxidase e que tem no DAB o substrato para a reação da peroxidase, o qual produz depósitos coloridos insolúveis, que evidenciam o sinal de hibridação da sonda nos sítios correspondentes nos cromossomos, mostrou ser bastante eficiente, principalmente em função de apresentar alta sensibilidade, especificidade e baixo background.

Segundo Leitch et al. (1994), a escolha da enzima a ser utilizada por este sistema de detecção depende do material examinado, pois alguns tecidos podem apresentar atividade enzimática endógena, podendo ocorrer background de marcação inaceitável, confundindo os resultados. As maiores vantagens no uso dos sistemas de detecção mediados por enzima são a estabilidade do sinal e a simplicidade e custo do microscópio óptico necessário à visualização do sinal de marcação.

Rayburn & Gill (1985) utilizaram-se deste método de marcação com biotina e detecção enzimática do sinal com estreptavidina peroxidase e DAB para o mapeamento de sequências de DNA em cromossomos mitóticos de trigo, e demonstraram que este método apresenta vantagens, principalmente por se apresentar como uma técnica rápida, consistente e reproduzível.

Os resultados obtidos a partir da aplicação da presente metodologia de hibridação *in situ*, evidenciaram sinal de marcação para a sonda de DNA altamente repetitivo de 185 pares de bases, característica dos knobs heterocromáticos, nos sítios correspondentes aos knobs nos cromossomos mitóticos dos materiais selecionados.

Os dados apresentados aqui para o padrão de distribuição do

sinal de marcação da sonda de 185pb nos cromossomos mitóticos complementam os estudos desenvolvidos por Peacock et al. (1981) que demonstraram, através de uma metodologia de hibridação *in situ* com marcadores radioativos, que esta classe de DNA altamente repetitivo de 185 pares de bases apresenta padrões de hibridização especificamente nos knobs heterocromáticos.

A correspondência entre o padrão de distribuição do sinal de marcação da sonda de 185pb e o padrão de bandas-C comprovam assim, a nítida correspondência entre as bandas-C dos cromossomos mitóticos e knobs heterocromáticos observados no paquíteno em milho, conforme discutido no item anterior.

Considerando-se que, em geral, a literatura relacionada à aplicação de metodologias de hibridação *in situ* em cromossomos mitóticos e meióticos de milho, tem sido relativamente escassa (Phillips et al., 1979; Mascia et al., 1981; Shen et al., 1987; Aledo et al., 1995; Edwards et al., 1996; Riera-Lizarazu et al., 1996) comparada ao grande número de trabalhos desenvolvidos em outros cereais, como trigo, centeio ou cevada, a implantação e padronização desta metodologia, conforme descrito anteriormente, abre novas perspectivas para o desenvolvimento de investigações envolvendo o mapeamento citogenético de milho e outras espécies, através da localização *in situ* de sequências específicas no complemento cromossômico mitótico, bem como no complemento meiótico.

Figura 7. Metáfases mitóticas do híbrido 441123 x 4443, evidenciando (a) o padrão de knobs heterocromáticos detectados através do bandamento-C e (b) o sinal de hibridação da sonda de 185pb biotinilada, detectado enzimaticamente nos sítios correspondentes aos knobs heterocromáticos, revelando a nítida correspondência entre tamanho do sinal e tamanho das bandas.

5. CONCLUSÕES

Com base nos dados obtidos neste estudo foi possível se estabelecer as seguintes conclusões:

1. Os pré-tratamentos envolvendo a aplicação de 8-hidroxiquinolina e 8-hidroxiquinolina combinada a cicloheximida mostraram ser eficientes na obtenção de preparações citológicas apresentando um acúmulo de metáfase e prometáfase condensadas contendo cromossomos morfológicamente nítidos.
2. O método de dissecção e esmagamento de raízes, bem como o método de digestão enzimática da raiz, seguido de dissecção e esmagamento foram bastante eficientes na obtenção de preparações livres de citoplasma e resíduos celulares.

Assim, recomenda-se a utilização destes procedimentos técnicos para a obtenção de preparações citológicas de elevada qualidade que podem ser empregadas para o desenvolvimento de diversas metodologias de bandamento cromossômico e de hibridação molecular *in situ*.

3. Os dados apresentados a partir da análise morfométrica dos cromossomos, obtidos de preparações metafásicas e prometáfásicas coradas pelo método de bandamento-C, permitiram a identificação precisa de cada um dos 10 cromossomos do complemento mitótico em cada um dos genótipos, nos diferentes pré-tratamentos testados.

4. As diferenças significativas observadas para os valores de comprimento relativo, relação de braços e tamanho de bandas-C, para alguns cromossomos tendem a refletir diferenças no grau de contração dos cromossomos devido ao efeito dos pré-tratamentos, bem como devido à presença de bandas-C correspondentes aos knobs heterocromáticos.
5. A análise comparativa entre cromossomos com banda e sem banda permitiu concluir que a presença de bandas-C, correspondentes a knobs heterocromáticos grandes alteram significativamente o tamanho dos braços cromossômicos, enquanto que a observação de diferenças sutis podem refletir a ocorrência de diferenças nos níveis de contração dos braços cromossômico ou a presença de bandas correspondentes a knobs médios ou pequenos.
6. No presente trabalho foi também padronizada uma metodologia de hibridação molecular *in situ*, utilizando-se da sonda de DNA altamente repetitivo de 185pb biotinilada, característica dos knobs heterocromáticos de milho, e do método de digestão enzimática com estreptavidina peroxidase para detecção do sinal de hibridação nos cromossomos.
7. Os resultados obtidos a partir da aplicação da presente metodologia de hibridação *in situ*, evidenciaram sinal de marcação para a sonda de DNA altamente repetitivo de 185 pares de bases, nos sítios correspondentes aos knobs nos cromossomos mitóticos dos materiais selecionados.

Assim, considerando-se a eficiência desta metodologia recomenda-se a sua aplicação para o desenvolvimento de diversos estudos relacionados a localização de sequências de DNA no genoma de milho e de outras espécies vegetais, o que permitirá a elaboração e / ou o aprimoramento de mapas citogenéticos nessas espécies.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIAR-PERECIN, M.L.R.de. Bandamento-C e tipos de heterocromatina em milho. In: AGUIAR-PERECIN, M.L.R.de; MARTINS, P.S.; BANDEL, G; (Ed). **Tópicos de Citogenética e Evolução de Plantas**. Ribeirão Preto: SBG, 1985a, p.51-67.
- AGUIAR-PERECIN, M.L.R.de. C-Banding in maize. II. Identification of somatic chromosomes. **Heredity**, v. 54, n.1, p.37-42, 1985b.
- AGUIAR-PERECIN, M.L.R.de; VOSA, C.G. C-Banding in maize. I. Band patterns. **Caryologia**, v. 38, n.1, p.23-30, 1985.
- ALEDO, R.; RAZ, R.; MONFORT, A.; VICIENT, C.M.; PUIGDOMÈNECH, P. MARTÍNEZ-IZQUIERDO, J.A. Chromosome localization and characterization of a family of long interdispersed repetitive DNA elements from the genus *Zea*. **Theoretical Applied Genetics**, v. 90, p.1094-1100, 1995.
- ANAMTHAWAT-JÓSSON, K.; SCHWARZACHER, T.; HESLOP-HARRISON, J.S. Behavior of Parental genomes in the hybrids *Hordeum vulgare* x *H. bulbosum*. **The Journal of Heredity**, v.84, n.1, p.78-81, 1993.
- ARRIGHI, F.E.; HSU, T.G. Localization of heterochromatin in human chromosomes. **Cytogenetics**, v.10, n.2, p.81-86, 1971.
- BENNETT, M.D. DNA amount, latitude and crop plant distribution. In: K. Jones & Brandham, P. E. (Ed.). **Current chromosome research**. Elsevier, North Holland Biomed. Press, Amsterdam, 1976. p.151-158.
- BENNETT, M.D.; GUSTAFSON, J.P. and SMITH, J.B. Variations in nuclear DNA in the genus *Secale*. **Chromosoma**, v.61, p.149-176, 1977.
- CARLSON, W. R. The cytogenetics os corn. In: SPRAGUE, G. F.; DUDLEY, J.W.(Ed.). **Corn and corn improvement**. 3ed. Madison: ASA/CSSA/SSSA, 1988. p.259-343.

- CARVALHO, C.R. de. Desenvolvimento de tecnologia Citogenética em Milho (*Zea mays* L.). Viçosa, 1995. 127p. Tese (Doutorado) - Universidade de Viçosa.
- CARVALHO, C.R.de; SARAIVA, L.S. High-Resolution HKG-Banding in Maize Mitotic Chromosomes. **Journal Plant Research**, v.110, p.417-420, 1997.
- CARVALHO, C.R. de; SARAIVA, L.S. A new heterochromatin banding technique by modified HKG banding technique in maize chromosomes. **Heredity**, v.70, p.515-519, 1993a.
- CARVALHO, C.R.de; SARAIVA, L.S. An Air Drying Technique for Maize Chromosomes without Enzymatic Maceration. **Biotechnic & Histochemistry**, v.68, n.3, p.142-145, 1993b.
- CHEN, C.-C. The somatic chromosomes of maize. **Canadian Journal of Genetic and Cytology**, v.11, p.752-754, 1969.
- CUADRADO, A.; CEOLONI, C.; JOUVE, N. Variation in higher repetitive DNA composition of heterochromatin in rye studied by fluorescence *in situ* hybridization. **Genome**, v.38, p.1061-1069, 1995.
- DECICO, M.J.U. Análise da segregação de knobs em progênies F₂ e de retrocruzamento derivadas de uma variedade de milho. Piracicaba, 1991. 134p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- DEMPSEY, E. Traditional analysis of maize pachytene chromosomes. In: FREELING, M.; WALBOT, V.(Ed.) **The Maize Handbook**. New York: Springer-Verlag. 1994. p.432-441.
- EDWARDS, K. J.; VEUSKENS, J.; RAWLES, H.; DALY, A.; BENNETZEN, J.L. Characterization of four dispersed repetitive DNA sequences from *Zea mays* and their use in constructing contiguous DNA fragments using YAC clones. **Genome**, v.39, p.811-817, 1996.

- FILION, G.W.; WALDEN, D. B. Karyotype Analysis: the detection of chromosomal alterations in the somatic karyotype of *Zea mays* L. **Chromosoms**, v.41, p.183-194, 1973.
- FLUMINHAN, A.; AGUIAR-PERECIN, M.L.R.de; SANTOS, J.A. Evidence for Heterochromatin Involvement in Chromosome Breakage in Maize callus Culture. **Annals of Botany**, v.78, p.73-81, 1996.
- FRIEBE, B.; ENDO, T. R.; BIKRAM, S. G. Chromosome banding methods. In: Fukui, K.; Nakayama, S. (Ed.). **Plant Chromosomes: laboratory methods**. Boca Raton: CRC Press. 1996. pp:123-153.
- FUCHS, J.; HOUBEN, A.; BRANDES, A.; SCHUBERT, I. Chromosome 'painting' in plants - a feasible technique ? **Chromosoma**, v.104, p.315-320, 1996.
- GILL, B.S. The molecular cytogenetics of economically important traits in plants. In: BRANDHAM, P.E.; BENNETT, M.D. (Ed.) **Kew chromosome conference IV**, Royal Botanic Garden, Kew. 1995 p.47-53.
- GUALBERTI, G.; DOLEZEL, J.; MACAS, J.; LUCRETTI, S. Preparation of pea (*Pisum sativum*) chromosomes and nucleus suspensions from single root tips. **Theoretical and Applied Genetics**, v.92, p.744-751, 1996.
- HALLAUER, A. R.; MIRANDA FILHO, F. B. **Quantitative genetics in maize breeding**. 2ed. Ames: Iowa State University Press, 468p. 1988.
- HADLACZKY, G.Y.; KALMAN, L. Discrimination of homologous chromosomes of maize with Giemsa staining. **Heredity**, v.35, n.3, p.371-374, 1975.
- HESLOP-HARRISON, J.S. The molecular cytogenetics of plant. **Journal Cell Science**, v.100, p.15-21, 1991.

- HESLOP-HARRISON, J.S. Comparative analysis of plant genome architecture. In: HESLOP-HARRISON, J.S. (Ed.) **Unifying plant genomes 50th SEB symposium**. Cambridge:Company of Biologists. 1996 p.17-23.
- HESLOP-HARRISON, J.S.; SCHWARZACHER, T. Molecular cytogenetics - biology and applications in plant breeding. In: CHANDLY, A. C.; SUMMER, A. (Ed.) **Chromosome Today**, 1993, p.1-10.
- HESLOP-HARRISON, J.S.; HARRISON, G.E.; LEITCH, I.J. Reprobing of DNA:DNA *in situ* hybridization preparations. **Trends in Genetics**, v.8, n.11, p.372-373, 1992.
- HESLOP-HARRISON, J.S.; SCHWARZACHER, T.; ANAMTHAWAT-JÓSSON, K.; LEITCH, A.R.; LEITCH, M.S. *In Situ* hybridization with automated chromosome denaturation. technique - **A Journal of methods in cell and molecular biology**, v.3, n.3, p.109-116, 1991.
- JEWELL, D.C.; ISLAM-FARIDI, N. A technique for somatic chromosome preparation and C-banding of maize. In: FREELING, M.; WALBOT, V.(Ed.) **The Maize Handbook**. New York: Sprinige-Verlag. p.484-493. 1994
- JIANG, J.; GILL, B.S. Sequential chromosome banding *in situ* hybridization analysis. **Genome**, v.36, p.792-795, 1993.
- JIANG, J.; GILL, B.S. New 18S . 26S ribosomal RNA gene loci: chromosomal landmarks for the evolution of polyploid wheats. **Chromosoma**, v.103, p.179-185, 1994a.
- JIANG, J.; GILL, B.S. Nonisotopic *in situ* hybridization and plant genome mapping: the first 10 years. **Genome**, v.37, p.717-725. 1994b
- KAKEDA, K.; YAMAGATA, H.; FUKUY, K.; OHNO, M.; FUKUY, K.; WEI, Z. Z.; ZHU, F. S. High resolution bands in maize chromosomes by G-banding methods. **Theor. Appl. Gene.**, v.80, p.265-272, 1990.

- KINDIGER, B. A technique for the preparation of somatic chromosomes of maize. In: FREELING, M.; WALBOT, V. (Ed.) **The Maize Handbook**. New York. p.481-483. 1994.
- KINDIGER, B.; BECKETT, J.B. Modified root tip squash technique. **Maize Genet. Coop. Newslett.** v.57, p. 32-33, 1993.
- LEE, J.-H.; ARUMUGANATHAN, K.; KAEPPLE, S.M.; KAEPPLE, H. F.; PAPA, C.M. Cell synchronizaton and isolation of metaphases chromosomes from maize (*Zea mays* L.) root tips for flow cytometric analysis and sorting. **Genome**, v.39, p.687-703, 1996.
- LEE, J.-H.; ARUMUGANATHAN, K.; YEN, Y.; KAEPPLE, S.; KAEPPLE, H.; BAENZIGER, P.S. Root tip cell cycle synchronizaton and metaphase-chromosomes isolation suitable for flow sorting in common wheat (*Triticum aestivum* L.). **Genome**, v.40, p.633-638, 1997.
- LEITCH, I.J.; HESLOP-HARRISON, J.S. Physical mapping of the 18S-5.8S-26S rRNA genes by *in situ* hybridization. **Genome**, v.35, p.1013-18, 1992.
- LEITCH, I.J.; LEITCH, A.R.; HESLOP-HARRISON, J.S. Physical mapping of plant DNA sequences by simultaneous *in situ* hybridization of two differently labelled fluorescent probes. **Genome**, v.34, p.329-333, 1991.
- LONGLEY, A. E. Knob positions on corn chromosomes. **J. Agric. Res.**, v.59, p.475-490, 1939.
- MAGUIRE, M.P. Variability in length and arm ratio of the pachytene chromosomes of corn. **Cytologia**, v.27, p.248-257, 1962.
- MALUSZYNSKA, J.; HESLOP-HARRISON, J.S. Molecular cytogenetics of the genus *Arabidopsis*: *in situ* localization of rDNA sites, chromosome numbers and diversity in centromeric heterochromatin. **Annals of Botany**, v.71, p.479-484, 1993.

- MANUELIDIS, L. LANGER-SAFU, P.R.; WARD, D.C. High resolution mapping of satellite DNA using biotin-labeled DNA probes. **J. Cell Biology**, v.95, p.619-625, 1982.
- MASCIA, P.N.; RUBENSTEIN, I.; PHILLIPS, R.L.; WANG, A.S.; XIANG, L.Z. Localization of the 5S rRNA genes and evidence for diversity in the 5S rDNA region of maize. **Gene**, v.15, p.7-20, 1981.
- MASTENBROEK, I.; WET, J.M.J.de. Chromosome C-banding of *Zea mays* and its closet relatives. **Canadian Journal of Genetic and Cytology**, v.25, p.203-209, 1983.
- McCLINTOCK, B. Chromosome morphology in *Zea mays*. **Science**, v.69, p.629, 1929.
- McCLINTOCK, B. A cytological demonstration of the location of an interchange between two non-homologous chromosomes of *Zea mays*. **Genetics**, v.16, p.791-799, 1930.
- McCLINTOCK, B. Cytological observations of deficiencies involving known genes translocations and an inversion in *Zea mays*. **Mo. Agric. Exp. Sta. Bull.**, v.163, p.1-30, 1931.
- McCLINTOCK, B. Significance of chromosome constitution in tracing the origin and migration of races of maize in the Americas. In: WALDEN, D. B. (Ed.). **Maize Breeding and Genetics**, New York: Wiley. 1978. p.159-184.
- McCLINTOCK, B.; KATO, Y.; BLUMENSCHIN, A. Chromosome constitution of races of maize. **Colegio de Posgraduados**, Chapingo, México, p.516, 1981.
- McMURPHY, L.M.; RAYBURN, A.L. Chromosomal and cell size analysis of cold tolerant maize. **Theoretical Applied Genetics**, v.84, p.798-802, 1992.
- MUKAI, Y.; GILL, B.S. Detection of barley chromatin added to wheat by genomic *in situ* hybridization. **Genome**, v.34, p.448-52, 1991.

- MUKAI, Y.; ENDO, T.R.; GILL, B.S. Physical Mapping of the 5S rRNA Multigene Family in Common Wheat. **The Journal of Heredity**, v.81, p.290-295, 1990.
- MUKAI, Y.; NAKAHARA, Y.; YAMAMOTO, M. Simultaneous discrimination of the three genomes in hexaploid wheat by multicolor fluorescence *in situ* hybridization using total genomic and highly repeated DNA probes. **Genome**, v.36, p.489-94, 1993.
- MURATA, M.; MOTOYOSHI, F. Floral chromosomes of *Arabidopsis thaliana* for detecting low-copy DNA sequences by fluorescence *in situ* hybridization. **Chromosoma**, v.104, p.39-43, 1995.
- NEUFFER, M.G.; JONES, L.; ZUBER, M.S. **The mutants of maize**. Wisconsin, Crop Science Society of America. 1968. p.74.
- NKONGOLO, K.K.; LAPITAN, N.L.V.; QUICK, J.S. An optimized fluorescence *in situ* hybridization procedure for detecting rye chromosomes in wheat. **Genome**, v.36, p.701-705, 1993.
- PAN, W.H.; HOUBEN, A.; SCHLEGEL, R. Highly effective cell synchronization in plants roots by hydroxyurea and aminophosphomethyl or colchicine. **Genome**, v.36, p.387-390, 1993.
- PARDUE, M.L.; GALL, J.C. Chromosomal Localization of Mouse Satellite DNA. **Science**, v.168, n.3937, p.1356-1358, 1970.
- PEACOCK, W.J.; DENNIS, E.S.; RHOADES, M.M.; PRYOR, A.J. Highly repeated DNA sequences limited to knobs Heterochromatin in maize. **Proceedings of National Academic Science**, v.78, p.4490-4494, 1981.
- PEDERSEN, C.; LINDE-LAURSEN, I. The relationship between physical and genetic distances at the Hor 1 and Hor 2 loci of barley estimated by two-colour fluorescent *in situ* hybridization. **Theoretical Applied Genetics**, v.91, p.941-946, 1995.

- PHILLIPS, R. L.; WANG, A.S.; RUBENSTEIN, I.; PARK, W.D.
Hybridization of ribosomal RNA to maize chromosomes. **Maydica**, v.24, p.7-21, 1979.
- PRYOR, A.J.; FALKENER, K.; RHOADES, M.M.; PEACOCK, W.J.
Asynchronous replication of heterochromatin in maize. **Proceedings of National Academic Science**, v.77, n.11, p.6705-6709, 1980.
- PORTER, H. L.; RAYBURN, A. L. B-chromosome and C-band heterochromatin variation in Arizona maize populations adapted to different altitudes. **Genome**, v.33, p.659-662, 1990.
- RAYBURN, A.L.; GOLD, J.R. A procedure for obtaining mitotic chromosomes from maize. **Maydica**, v.27, p.113-21, 1982.
- RAYBURN, A.L.; GILL, B.S. Use of biotin-labeled probes to map specific DNA sequences on wheat chromosomes. **The Journal of Heredity**, v.76, p.78-81, 1985.
- RAYBURN, A.L.; PRICE, H.J.; SMITH, J.D.; GOLD, J.R. C-band heterochromatin and DNA content in *Zea mays*. **American Journal of Botany**, v.72, n.10, p.1610-1617, 1985.
- RIERA-LIZARAZU, O.; RINES, H.W.; PHILLIPS, R.L. Cytological and molecular characterization of oat x maize partial hybrids. **Theoretical Applied Genetics**, v.93, p.123-135, 1996.
- RHOADES, M. M. Meiosis in maize. **J. Heredity**, v.41, p.58-67, 1950.
- RHOADES, M. M. The cytogenetics of maize. In: SPRAGUE, S.F. (Ed.) **Corn and Corn improvement**. New York:Academic Press, p.123-219, 1955.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2ed. New York:Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- SACHAN, J.K.S.; TANAKA, R. A banding methods for *Zea* chromosomes. **Japan. J. Genetic**, v.51, p.139-145, 1976.

- SACHAN, J.K.S.; TANAKA, R. Variation and pattern of c-banding in *Zea* chromosomes. **The nucleus**, v.20, n.1-2, p.61-64, 1977.
- SCHWARZACHER, T.; HESLOP-HARRISON, J.S. *in situ* hybridization to plant telomeres using synthetic oligomeres. **Genome**, v.34, p.317-323. 1991.
- SCHWARZACHER, T.; HESLOP-HARRISON, J.S. Molecular cytogenetic investigations of meiosis. In: BRANDHAM, P.E.; BENNETT, M.D. (Ed.) **Kew Chromosome Conference IV**. Kew, Royal Bot. Gard., 1995. p.407-416.
- SCHWARZACHER, T.; LEITCH, A.R. Enzymatic Treatment of Plant Material to Spread Chromosomes for *in situ* Hybridization. In: ISAAC, P. G. (Ed.). **Methods in molecular biology**. Boca Raton: CRC Press, 1994. cap.24.
- SCHARZACHER, T.; LEITCH, A.R.; HESLOP-HARRISON, J.S. DND:DNA *in situ* hybridization - methods for light microscopy. In: HARRIS, N.; OPARKA, K.J. (Ed.). **Plant cell biology: a practical approach**. Oxford: Oxford University Press, 1994, p.2-20.
- SHEN, D.-L.; WANG, Z.-F.; WU, M. Gene mapping on maize pachytene chromosomes by *in situ* hybridization. **Chromosoma**, v.95, p.311-314, 1987.
- SCHUBERT, I.; DOLEZEL, J.; HOUBEN, A.; SCHERTHAN, H.; WANNER, G. Refined examination of plant metaphase chromosome structure at different levels made feasible by new isolation methods. **Chromosoma**, v.102, p.96-101, 1993.
- SILVAROLLA, M. B.; AGUIAR-PERECIN, M. L. R. de. Evaluation of chromosome number stability in two sugarcane varieties. **Brazilian Journal of Genetics**, v.17, n.2, p.237-242, 1994.
- TLASKAL, J. Combined cycloheximide and 8-hidroxyquinoline pretreatment for study of plant chromosomes. **Stain Technology**, v.54, n.6, p.313-319, 1980.

- TRASK, B.J. Fluorescence *in situ* hybridization: applications in cytogenetics and gene mapping. **Trends in Genetics**, v.7, n.5, p.149-54, 1991.
- VERMA, R.S.; BABU, A. **Human chromosomes: principles and techniques**. New York: McGraw-Hill, 1995. 419p.
- VOSA, C. G. Chromosome banding: plants. **Genome**, v.31, n.1, p.474-475, 1989.
- VOSA, C.G.; MARCHI, P. Quinacrine fluorescence and Giemsa staining in plants. **Nature (New Bio.)**, v.237, p.191-192, 1972.
- VOSA, C. G.; AGUIAR-PERECIN, M. L. R. de. New techniques for knob detection in mitotic chromosomes in maize and teosinte. **Maize Genet. Coop. Newsl.**, v.46, p.165-167, 1972.
- 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 Applied Genetics**, v.70, p.234-9, 1985.
- WARD, E. J. Banding patterns in maize mitotic chromosomes. **Canad. J. Genet. Cytol.**, V.22, P.61-67, 1980.