**ESTUDO DA INSTABILIDADE CROMOSSÔMICA EM CULTIVAR DE
LONGA DURAÇÃO DE CALOS DE MILHO (*Zea mays* L.)**

JANAY ALMEIDA DOS SANTOS

Engenheira Agrônoma

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

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

PIRACICABA

Estado de São Paulo - Brasil

Janeiro - 1995

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

Santos, Janay Almeida dos

Estudo da instabilidade cromossômica em culturas de longa duração de calos
de milho (*Zea mays* L.) / Janay Almeida dos Santos. - - Piracicaba, 1996.
172p. : il.

Dissertação (mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 1995.
Bibliografia.

1. Cromossomo - Distúrbio 2. Cultura de tecido 3. Milho - Cultivo "*in vitro*"
4. Milho - Cultura de calo I. Título

CDD 633.15
630.275

**ESTUDO DA INSTABILIDADE CROMOSSÔMICA EM CULTIVARES DE
LONGA DURAÇÃO DE CALOS DE MILHO (*Zea mays* L.)**

JANAY ALMEIDA DOS SANTOS

Aprovada em 03/04/95

Comissão Julgadora:

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

Prof. Dr. Gerhard Bandel ESALQ/USP

Profa. Dra. Laudemir Maria Prioli UNICAMP

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

- Orientador -

A

meus pais, Antonio e Estela Santos

meus avós, Leobino e Juvina Silva

meus irmãos, Leobino, Marco, Ívina e Isabela

DEDICO

AGRADECIMENTOS

- A **Deus**, Supremo Criador de todas as maravilhas;
- À **Profa. Dra. Margarida L.R. de Aguiar-Perecin**, pela orientação, ajuda e pelo exemplo de dedicação;
- Aos **pesquisadores do CNPMF/EMBRAPA Dr. Kenneth Shepherd, Dr. Jorge Luiz Loyola Dantas e Dr. Walter Soares**, pelo incentivo e confiança em mim depositada;
- À **Mônica Soubihe**, pela amizade e apoio em todos os momentos;
- À **Maria Dalila Mattos Carvalho e família**, pelo carinho e compreensão;
- À **Mônica Rosa Bertão**, pelo companheirismo, apoio e sugestões durante a elaboração deste trabalho;
- A **Antonio Augusto F. Garcia**, pelo empenho e grande colaboração nas análises estatísticas;
- Aos **professores do Curso de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas**, por compartilharem o saber;
- Aos **funcionários do Laboratório de Citologia** do Departamento de Genética da ESALQ/USP, **Carlos Alberto Veríssimo e Silvia Cristina Menuzzo Molina**, pela amizade e auxílio técnico no desenvolvimento deste trabalho.

- Aos **funcionários do Departamento de Genética da ESALQ/USP**, em especial, **Carmem M. F. Piloto, Vanderléia de Oliveira, Antonio Pádua Gorga (Oberdan), Fernando Leopoldino, Silvana Gregório e Elisabeth da Silva**, pela amizade, atenção e pelos inúmeros favores;
- Aos **colegas do Curso de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas**, pelo convívio e múltiplas atenções;
- À **CAPES** e ao **CNPq**, pela concessão de bolsa de estudo.
- À **FAPESP** pelo apoio ao projeto de pesquisa relacionado com a tese;
- Enfim, **a todos os amigos** que me apoiaram e contribuíram para que os dias fossem melhores.

ÍNDICE

	Página
RESUMO.....	vi
SUMMARY.....	x
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. Cultivo <i>in vitro</i> de milho.....	3
2.2. Instabilidade cromossômica em cultura de tecidos....	8
2.2.1. Fatores que afetam a ocorrência de instabilidade cromossômica em cultura de tecidos.....	10
2.2.1.1. Fonte de explante.....	10
2.2.1.2. Condições de cultivo.....	12
2.2.1.3. Idade da cultura.....	14
2.2.1.4. Genótipo do explante.....	19
2.2.2. Aberrações numéricas.....	21

	Página
2.2.3. Aberrações estruturais.....	23
2.2.3.1. Efeito da heterocromatina nas quebras cromossômicas.....	25
2.2.3.2. Ciclo de quebra-fusão-ponte.....	30
2.2.3.3. Cicatrização de telômeros.....	34
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	40
3.1. Genótipos utilizados.....	40
3.2. Obtenção de calos e linhagens celulares.....	42
3.3. Meios utilizados.....	43
3.4. Regeneração de plantas e avaliação da fertilidade do pólen.....	47
3.4.1. Regeneração de plantas.....	47
3.4.2. Avaliação da fertilidade do pólen.....	49
3.5. Análise citogenética de calos.....	50
3.5.1. Coleta de regiões meristemáticas dos calos.....	51
3.5.2. Coloração pelo Método de Feulgen.....	51
3.5.3. Metodologia de Bandamento-C.....	52
3.5.4. Análise de metáfases de plantas controle da cultura de tecidos.....	53
3.5.5. Análise de anáfases mitóticas dos calos.....	54
3.5.6. Análise morfométrica dos cromossomos.....	54
3.5.7. Análise estatística	56

	Página
4. RESULTADOS	58
4.1. Aspectos morfológicos da cultura.....	58
4.2. Análise de aberrações cromossômicas em calos de milho..	61
4.2.1. Alterações observadas em anáfases mitóticas.....	61
4.2.2. Análise de metáfases coradas pela metodologia de bandamento-C.....	72
4.2.3. Análise estatística dos cariótipos estudados	89
4.2.4. Análise de anáfases coradas pelo método de bandamento-C.....	110
4.3. Regeneração de plantas.....	111
5. DISCUSSÃO.....	126
5.1. Aspectos do cultivo <i>in vitro</i> de milho.....	126
5.2. Instabilidade cromossômica nas sublinhagens celulares	127
5.2.1. Anormalidades nas anáfases mitóticas.....	127
5.2.2. Análise de metáfases mitóticas.....	129
5.2.2.1. Sublinhagens do calo 12-F.....	129
5.2.2.2. Sublinhagens do calo 3-57.....	132
5.3. Capacidade de regeneração dos calos.....	144
6. CONCLUSÕES.....	147
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	149

**ESTUDO DA INSTABILIDADE CROMOSSÔMICA EM CULTURAS
DE LONGA DURAÇÃO DE CALOS DE MILHO (*Zea mays* L.)**

Autor: JANAY ALMEIDA DOS SANTOS

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

RESUMO

Tem sido evidente desde o início da metodologia de cultura de tecidos vegetais que podem ocorrer alterações no número e estrutura de cromossomos em consequência do cultivo *in vitro*. A maioria das alterações observadas em plantas regeneradas a partir de culturas de calos de milho são decorrentes de quebras cromossômicas. A ocorrência destas aberrações tem sido interpretadas como resultantes da formação de pontes anafásicas e quebra de cromátides, envolvendo frequentemente braços cromossômicos contendo knobs heterocromáticos, em consequência de distúrbios no ciclo mitótico que causariam atraso na replicação já tardia dos knobs.

O presente estudo teve como objetivos: analisar a ocorrência e frequência de aberrações cromossômicas em duas culturas de longa duração, investigando-se a ocorrência de ciclos de quebra-fusão-ponte em culturas de calo, avaliando-se também o envolvimento dos knobs na formação de pontes anafásicas, quebras cromossômicas e alterações no cariótipo.

Para isto foram utilizadas duas culturas de calos, designadas 12-F e 3-57, obtidas a partir de embriões imaturos derivados de uma linhagem 13342/5 e de um F2 do cruzamento 1315/1x13213/1, respectivamente. Os dois genótipos são homozigóticos para presença de knob em 6L₂, 6L₃, 7L, 7S, 8L₁, 8L₂. Além disso, o calo 12-F era originalmente heterozigótico em K3L, e o calo 3-57 homozigótico para presença de knob em 9S. Os calos foram induzidos em meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) suplementado com de 2,0 mg/l de 2,4-D. Amostras dos calos foram mantidas separadamente, em meio MS + 2,0 mg/l de 2,4-D, MS + 1,0 mg/l 2,4-D e N6 (CHU *et al.*, 1975) com 1,5 mg/l de 2,4-D + 12 mM de prolina, sendo consideradas como subclones. Coletas periódicas de amostras de cada subclone permitiram a análise de eventos de instabilidade mitótica e aberrações cromossômicas decorrentes dos mesmos durante o cultivo desses calos, por um período de 23 a 42 meses.

Os resultados obtidos sugerem que ocorreram eventos de atraso na separação de cromátides, com consequente quebra de cromátide, confirmando observações anteriores (AGUIAR-PERECIN & FLUMINHAN Jr., 1992; FLUMINHAN Jr., 1992). Vários eventos observados dão evidências de que cromátides quebradas iniciam ciclos de quebra-fusão-ponte *in vitro*, mas que também os cromossomos que sofreram deleções terminais se estabilizam, ou seja, suas extremidades se "cicatrizam". Estes eventos são ocorrência de pontes típicas; ocorrência de alterações em determinados cromossomos com knobs; multiplicação de células em que determinadas aberrações, sobretudo

deleções terminais, se estabilizaram e se perpetuaram através de sucessivas divisões celulares. Entretanto, à medida que aumentou a idade da cultura, as aberrações que ocorreram nas várias subculturas acumularam-se, mas aparentemente não ocorreu um aumento na frequência de pontes. O calo 12-F apresentou maior estabilidade cromossômica em relação ao calo 3-57. Este último apresentou quase 100% das células com alterações nos cromossomos 7 e 9. As plantas regeneradas a partir do calo 3-57, apresentaram crescimento lento e dificilmente produziram sementes, enquanto que as plantas regeneradas do calo 12-F eram mais vigorosas e férteis, independente da idade do calo no período da regeneração, o que sugere que a capacidade de regeneração de plantas férteis está mais relacionada com a estabilidade cromossômica do que com a idade da cultura.

**STUDY OF THE CHROMOSOMAL INSTABILITY IN LONG-TERM
TISSUE CULTURES OF MAIZE (*Zea mays L.*)**

Autor: JANAY ALMEIDA DOS SANTOS

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

SUMMARY

Since the beginning of the development of plant tissue culture in it has been evident that can occur in tissue culture changes in number and structure of chromosomes. Most alterations observed in maize plants regenerated are due to breakage in chromosomes. In maize, this phenomenon has been associated with formation of anaphase bridges and consequent breakage of chromatids, often involving chromosome arms possessing heterochromatic knobs, as a consequence of alterations in the mitotic cycle that would make the normally late-replicating knobs to replicate even later in callus cultures.

The objectives of the present study were: analysis of the occurrence and frequency of chromosomal aberrations in two long-term tissue cultures, investigation of the occurrence of breakage-fusion-bridge cycles in callus culture, evaluating the involvement of knobs in the formation of anaphasic bridges, chromosomal breakages and karyotype alterations.

The callus cultures 12-F and 3-57 were analysed. They were derived from immature embryos of the inbred line 13342/5 and the

F2 of the crossing 1315/1 x 13213/1, respectively. Both genotypes are homozygous for the presence of knob in 6L₂, 6L₃, 7L, 7S, 8L₁, 8L₂. The 12-F culture was derived from a line heterozygous at K3L, and the 3-57 culture homozygous for the presence of K9S. Both calli were induced in MS medium (MURASHIGE & SKOOG, 1962) containing 2,0 mg/L 2,4-D. Callus samples were cultured separated in medium MS + 2 mg/L 2,4-D, MS + 1 mg/L 2,4-D and N6 (CHU *et al.*, 1975) with 1,5 mg/L 2,4-D + 12 mM proline, being considered as subclones. Periodical sampling of each subclone allowed the analysis of the events promoted by mitotic instability and aberrations occurring during callus cultivation, for a period of 23-42 months.

The results obtained suggested the occurrence of delays during the separation of the chromatids, leading to chromatid breakages supporting previous observations (AGUIAR-PERECIN & FLUMINHAN Jr., 1992; FLUMINHAN Jr., 1992). Several observed events provided evidences that the broken chromatids initiate breakage-fusion-bridge cycles *in vitro*. Furthermore, chromosomes with terminal deletions apparently become stabilized, i.e., their broken ends are "healed". The evidences were the occurrence of typical bridges; alterations in some of the chromosomes bearing knobs; multiplication of cells with chromosomal aberrations, specially terminal deletions, which are stabilized and perpetuate through successive generations of cell divisions. However, as the culture age increased, aberrations were accumulated; however, no increase was observed in the frequency of bridges. The 12-F culture showed a higher karyotype stability as

compared to 3-57. Almost 100% of the analysed cells of 3-57 cultures had alterations in chromosomes 7 and 9. Plants regenerated from 3-57 cultures had delayed growth and hardly produced seeds. Plants regenerated from 12-F culture were more vigorous than those from 3-57 culture and they are fertile. This results suggest that the callus capability to regenerate fertile plants is mainly dependent to the chromosomal stability than to the culture age.

INTRODUÇÃO

Estudos diversos tem se acumulado na literatura, dando evidências de que alterações cromossômicas podem ocorrer durante o cultivo *in vitro* de tecidos vegetais. Os componentes do meio, o tipo de explante, a idade da cultura e o genótipo são fatores que afetam a ocorrência dessas alterações (PESCHKE & PHILLIPS, 1992).

Em milho, a análise de plantas regeneradas tem evidenciado que a frequência de aberrações cromossômicas aumenta com o tempo de cultura, entretanto, uma certa estabilidade tem sido relatada por alguns autores (para revisão veja PHILLIPS *et al.*, 1988).

McCOY et al (1982), através de estudos em aveia, propuseram que um atraso maior que o usual na replicação da heterocromatina seria responsável pela ocorrência de quebras cromossômicas. A maioria dos estudos para testar esta hipótese tem sido realizados em plantas regeneradas, através de análises meióticas, e não em células em cultura.

LEE & PHILLIPS (1987), através de análises meióticas de plantas de milho regeneradas, relacionaram a ocorrência de quebra cromossômica e formação de pontes na anáfase ao atraso na replicação dos knobs heterocromáticos.

Um estudo foi desenvolvido no Laboratório de Citologia do Departamento de Genética da ESALQ/USP, utilizando genótipos de milho com diferentes conteúdos de knobs. As análises mitóticas realizadas em calos com aproximadamente um ano de cultivo revelaram a presença de pontes na anáfase, indicando a possível ocorrência de ciclo de quebra-fusão-ponte, bem como de alterações estruturais envolvendo cromossomos contendo knobs. Além disso, foi observado que nem sempre as pontes envolviam cromossomos com knobs, o que indicou que a frequência de pontes deve ser decorrente da interação entre frequência de knobs, genótipo e condições de cultura (FLUMINHAN Jr., 1992; AGUIAR-PERECIN & FLUMINHAN Jr., 1992).

Surgiram então algumas questões: a formação de pontes está sempre relacionada com os knobs? Os cromossomos que se quebraram continuam o ciclo de quebra-fusão-ponte? As extremidades cromossômicas quebradas cicatrizam? A ocorrência e a frequência de alterações aumentam com a duração da cultura?

A fim de responder parcialmente estas questões, no presente estudo foram analisadas amostras de calos altamente embriogênicos de dois genótipos utilizados no trabalho referido acima. Investigou-se a ocorrência e frequência de aberrações cromossômicas em culturas de longa duração (23 a 42 meses de idade), investigando-se a ocorrência de ciclos de quebra-fusão-ponte de cromátides em anáfases mitóticas em culturas de calo, avaliando-se também o envolvimento dos knobs na formação de pontes anáfásicas e alterações no cariótipo.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Cultivo *in vitro* de milho

As primeiras tentativas de se estabelecer cultura de tecidos de milho (*Zea mays* L.) foram realizadas no final da década de 40, com estudos desenvolvidos por LA RUE (1947 e 1949), para cultura de endosperma. Entretanto, somente em 1975 foi descrita pela primeira vez a regeneração de plantas de milho, a partir de calos derivados de embriões imaturos da linhagem americana A188 (GREEN & PHILLIPS, 1975). Desde então, sucessos na regeneração de plantas foram relatados por vários autores, ficando restritos a poucos genótipos, com a maioria das investigações confinadas à linhagem A188, que exhibe alta frequência de embriogênese somática e capacidade para regeneração (GREEN *et al.*, 1977; SPRINGER, 1979; McCOY & PHILLIPS, 1982; ARMSTRONG & GREEN, 1982, 1985).

Avanços na área de cultura de tecidos de milho vem sendo obtidos, incluindo-se a descoberta de novos genótipos que respondem favoravelmente às condições de cultivo *in vitro* (NOVAK *et al.*, 1983; DUCAN *et al.*, 1985; LOWE *et al.*, 1985; RAPELA, 1985; TOMES & SMITH, 1985; FAHEY *et al.*, 1986; HODGES *et al.*, 1986; AGUIAR-PERECIN & FLUMINHAN Jr., 1986; PRIOLI & SILVA, 1989; SONGSTAD *et al.*, 1992; FLUMINHAN Jr., 1992).

Um fator importante para obtenção de cultura de tecidos com capacidade para regeneração de plantas foi a identificação do embrião imaturo como um explante totipotente. A disposição deste órgão com o eixo embrionário em contato com o meio retarda a germinação do embrião e induz a proliferação de células do escutelo permitindo a formação do calo (GREEN & PHILLIPS, 1975; GREEN, 1978; LU *et al.*, 1982; VASIL *et al.*, 1984 e 1985; VAN LAMMEREN, 1988).

Vários outros tipos de explantes tem sido testados quanto à indução de culturas com capacidade para regeneração tais como: mesocótilo (HARMS *et al.*, 1976), embriões maduros (TORNÉ *et al.*, 1980; WANG, 1987), inflorescência feminina imatura (RHODES *et al.*, 1986; PAREDDY & PETOLINO, 1990), tecidos foliares (CHANG, 1983; LOWE *et al.*, 1985; CONGER *et al.*, 1987; RAY & GHOSH, 1990), inflorescência masculina imatura (HODGES *et al.*, 1986; BOMMINENI & RANASIKOWASKA, 1991; SONGSTAD *et al.*, 1992) e glumas de flores masculinas imaturas (SUPRASANNA *et al.*, 1986, 1991). No entanto, os resultados obtidos utilizando-se estes tipos de explantes tem sido inferiores aos obtidos com o cultivo de embriões imaturos (revisão em BHASKARAN & SMITH, 1990).

Numerosos estudos têm sido conduzidos sobre o controle genético da resposta ao cultivo *in vitro* de tecidos vegetais. Foi observado que um número relativamente pequeno de genes está envolvido na determinação desta característica e que a herdabilidade é alta (referências em ARMSTRONG *et al.*, 1992).

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

Estes dados concordam com os resultados obtidos por ARMSTRONG *et al.* (1992). Os autores obtiveram sucesso na transferência de genes envolvidos no estabelecimento de culturas de calos friáveis e embriogênicos derivados de embriões imaturos de uma linhagem com alta resposta à indução de culturas friáveis e embriogênicas (A188) para uma linhagem de baixa resposta (B73), através de retrocruzamento. Cinco regiões localizadas nos cromossomos 1, 2, 3 e 9 foram identificadas pela análise de RFLP.

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

Calos Tipo I são caracterizados como compactos, opacos, com crescimento relativamente lento, morfologicamente complexos e organizados (ARMSTRONG & GREEN, 1985). Embora embriões somáticos bem desenvolvidos sejam observados

ocasionalmente em culturas Tipo I, o modo de origem das plantas nem sempre é claro.

Observações histológicas de culturas Tipo I tem provido evidências de que a regeneração de plantas pode ocorrer por organogênese e embriogênese somática (SPRINGER *et al.*, 1979; McCAIN & HODGES, 1987). Este tipo de calo tem sido descrito em um vasto número de linhagens e híbridos de milho (LU *et al.*, 1982 e 1983; TOMES & SMITH, 1985; BENZION & PHILLIPS, 1988) e é semelhante àqueles calos embriogênicos descritos em outras espécies de gramíneas (VASIL, 1985).

Embora calos Tipo I possam ser mantidos em cultura por um longo período de tempo em outras espécies (CHANDLER & VASIL, 1984), em milho são difíceis de serem mantidos após algumas subculturas devido ao alto grau de organização dentro da massa do calo e à formação de estruturas que provavelmente representam o escutelo de um embrião germinado precocemente (LU *et al.*, 1982; VASIL & VASIL, 1986).

Por outro lado, calos Tipo II são caracterizados como friáveis e não diferenciados, exceto para a presença de numerosos embriões somáticos globulares em sua superfície (ARMSTRONG & GREEN, 1985). Apresentam crescimento rápido e mantém sua capacidade embriogênica em culturas de longa duração (GREEN, 1982; TOMES & SMITH, 1985; VASIL & VASIL, 1986).

Estudos histológicos de calos Tipo II tem verificado que a regeneração de plantas ocorre via embriogênese somática (LOWE

et al., 1985). Apesar dos embriões somáticos de culturas Tipo II algumas vezes parecerem originar-se de uma única célula, a presença de suspensores em muitos dos embriões é indicativo de uma origem multicelular (HALPERIN, 1969). VASIL *et al.* (1985) e McCAIN & HODGES (1987) observaram que embriões somáticos desenvolvidos diretamente de escutelo imaturo de milho parecem ter uma origem multicelular.

Calos Tipo II podem ser obtidos a partir de culturas Tipo I de forma espontânea, ou podem ser induzidos pela adição de L-prolina ao meio de cultura (ARMSTRONG & GREEN, 1985).

Embora calos Tipo I tenham sido utilizados com sucesso no estabelecimento de suspensões celulares embriogênicas em diferentes espécies (VASIL, 1985), em milho a utilização de calo Tipo I para este fim tem se mostrado inadequada. Por outro lado, calos Tipo II de milho tem apresentado respostas favoráveis no estabelecimento de suspensões celulares (GREEN *et al.*, 1983; KAMO & HODGES, 1986; VASIL & VASIL, 1986) e na regeneração de plantas férteis a partir do cultivo de calos induzidos de protoplastos derivados de suspensões celulares embriogênicas (SHILLITO *et al.*, 1989; PRIOLI & SONDAHL, 1989; MÓROCZ *et al.*, 1990), as quais são alvo na transformação de milho através de bombardeamento com microprojéteis (KLEIN *et al.*, 1988; FROMM *et al.*, 1990; GORDON-KOMM *et al.*, 1990).

Portanto, tem sido crescente o interesse na obtenção de genótipos a partir dos quais se possa estabelecer culturas Tipo II, que possam ser mantidas por longos períodos, sem perderem a sua

capacidade para regeneração de plantas férteis. Com este objetivo, ARMOSTRONG *et al.* (1991) testaram vários genótipos e selecionaram duas linhagens derivadas do cruzamento entre A188 e B73 que apresentavam alta frequência de produção de calos Tipo II (aproximadamente 100%). O cruzamento entre estas duas linhagens produziu uma linhagem com melhor vigor de planta que seus parentais, mas com a mesma resposta ao cultivo *in vitro*.

2.2. Instabilidade cromossômica em culturas de tecidos

O cultivo *in vitro* de células vegetais pode causar alterações no genoma da planta, o que resulta em variação genética e citogenética. LARKIN & SCOWCROFT (1981) denominaram a variação observada entre plantas regeneradas de 'variação somaclonal'.

A princípio a ocorrência de variação somaclonal causou grande expectativa de avanços nos programas de melhoramento vegetal, devido à possibilidade de se utilizar a cultura de tecidos como uma fonte potencial de variabilidade genética, especialmente se fosse possível controlar a sua ocorrência, de forma que se pudesse evitá-la ou promovê-la quando desejado. Muitos trabalhos foram conduzidos e sucessos foram obtidos em muitas espécies (revisão em LARKIN & SCOWCROFT, 1981; ILLG, 1984). Entretanto, foi verificado que a variação somaclonal pode ser indesejável em alguns casos, principalmente quando esta reflete a ocorrência de alterações cromossômicas.

A variação somaclonal foi observada em diferentes espécies e envolve alterações tanto no DNA nuclear quanto no DNA mitocondrial da planta. Sua natureza, extensão e possível origem tem sido revisada em numerosas ocasiões e sob vários pontos de vista: variação cromossômica em células cultivadas e plantas regeneradas (BAYLISS, 1980; LEE & PHILLIPS, 1988; PHILLIPS *et al.*, 1988; PESCHKE & PHILLIPS, 1992), variação citoplasmática (PRING *et al.*, 1981), as bases biológicas e possível uso em proqramas de melhoramento vegetal (EVANS *et al.*, 1984; ILLG, 1984) e as bases epigenéticas (MEINS, 1983). Entretanto, consideraremos aqui a variação somaclonal sob o ponto de vista da variação cromossômica numérica e estrutural em células cultivadas e plantas regeneradas.

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

Análises citológicas tem provido informações importantes sobre os tipos e frequência de aberrações de cromossomos específicos e regiões do cromossomo afetadas pelos rearranjos. Estes

estudos tem sido usados para identificar o padrão de variação e, subsequentemente, uma possível compreensão dos mecanismos que geram algumas alterações estruturais (BAYLISS, 1980).

2.2.1. Fatores que afetam a ocorrência de instabilidade cromossômica em cultura de tecidos.

2.2.1.1. Fonte de explante

Investigações com relação à influência da fonte de explante sobre a variação cromossômica têm sido limitadas, possivelmente porque a fonte define se o sistema de cultivo funcionará, pois explantes de diferentes fontes de tecidos não respondem igualmente bem ao cultivo *in vitro*.

As plantas obtidas a partir de meristemas cultivados sem um estado de dediferenciação apresentam pouca ou nenhuma alteração cromossômica, comparadas àquelas cuja regeneração envolve a passagem pela fase de calo. Portanto, as plantas regeneradas de calos ou cultura de células em suspensão podem apresentar alterações genéticas envolvendo rearranjos cromossômicos, poliploidia ou aneuploidia (BAYLISS, 1980; D'AMATO, 1985; POTTER & JONES, 1991).

Em milho, vários tipos de explantes tem sido testados visando a indução de calos e regeneração de plantas, conforme

mentionado anteriormente. No entanto, relatos sobre o estado cromossômico destas culturas e das plantas regeneradas se restringem especialmente a culturas derivadas de embriões imaturos, o que dificulta a avaliação do efeito da fonte de explante sobre a ocorrência de instabilidade cromossômica.

WANG (1987), comparando fontes de explantes diferentes, observou que plantas regeneradas de embriões maduros da linhagem B73 eram mais estáveis que aquelas derivadas de embriões imaturos em termos de constituição cromossômica (refletida pela esterilidade do pólen).

ARMSTRONG & PHILLIPS (1988) em culturas obtidas a partir de um mesmo tipo de explante, o embrião imaturo de milho, mas com características morfológicas diferentes (calos Tipo I e Tipo II), observaram um comportamento diferente quanto à ocorrência de anormalidades cromossômicas. As análises citológicas de microsporócitos de 13 plantas regeneradas revelaram a ocorrência de dez diferentes anormalidades citológicas. A permuta de segmentos entre cromossomos foi a alteração mais frequente. Também foram observadas alterações no número de cromossomos (trissomia e setor tetraplóide) e irregularidades meióticas. A frequência de plantas regeneradas com anormalidades cromossômicas na meiose foi menor para cultura de calos Tipo I em relação a culturas Tipo II.

2.2.1.2. Condições de cultivo

Embora a escolha do explante possa apresentar alguma contribuição na variabilidade da cultura, há evidências de que todas as formas de alterações cromossômicas podem ser consequência direta do cultivo *in vitro*.

As condições de cultivo (consistência do meio e intervalos de subculturas) e os componentes do meio, especialmente hormônios e demais reguladores de crescimento, tem influenciado o estado citológico das células cultivadas (para revisão veja PESCHKE & PHILLIPS, 1992).

Segundo MORRISH *et al.* (1987), células proliferando *in vitro* estão em um ambiente estranho e sua taxa de divisão é significativamente aumentada pelos hormônios presentes no meio. Estes fatores podem ser responsáveis pelas alterações genéticas que ocorrem em calos e células cultivadas durante os subcultivos, as quais podem ter uma importante influência sobre a competência celular.

Quando reguladores de crescimento são usados para estimular crescimento desorganizado e divisão celular, há um concomitante aumento na incidência de anormalidades mitóticas, produzindo células filhas com diferentes complementos cromossômicos. Os reguladores de crescimento podem induzir mitoses anormais com núcleos endopoliploides e endoreduplicados. Isto deve contribuir para a variabilidade cromossômica da cultura resultante (BAYLISS, 1980).

A auxina 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) tem sido o fitorregulador mais utilizado para induzir a formação de calos a partir de embriões imaturos de milho. As referências da literatura sobre a ação mutagênica do 2,4-D *in vitro* são muito contraditórias e heterogêneas, não permitindo comparações corretas, uma vez que estão envolvidas outras variáveis, como por exemplo o meio de cultura utilizado e as condições de crescimento da cultura (luminosidade, aeração e temperatura entre outras). O efeito destas variáveis nem sempre é definido e conhecido, e muito menos as relações entre elas, e destas com o genótipo em cultura.

SINGH & HARVEY (1975) verificaram que o 2,4-D não induziu irregularidades mitóticas em suspensões celulares de *Vicia hajastana*, nas concentrações de 0,1 a 10 mg/l, e de *Haplopappus gracilis*, nas concentrações de 0,1 a 5,0 mg/l. Na realidade, ocorreu menor frequência de irregularidades mitóticas quanto maior a concentração de 2,4-D no meio, sendo esta conclusão obtida através da análise de anáfases.

BAYLISS (1980) comenta que no caso da auxina sintética 2,4-D é o crescimento desorganizado que leva a anormalidades mitóticas, e não algum efeito direto desse componente sobre a mitose. O efeito do 2,4-D *in vitro*, portanto, ainda necessita de maiores esclarecimentos.

Em estudos entre calos Tipo I e II de milho, empregando concentrações de 5,0 a 20 mg/l de 2,4-D no meio, verificou-

se um aumento no número de cromossomos na presença de maior concentração de auxina (REDDY & PETERSON, 1987).

ZIAUDDIN & KASHA (1990) observaram, em *Hordeum vulgare*, que prolongada exposição de cultura de células a altas concentrações de 2,4-D (2,0 mg/l ou mais) aumentou significativamente a frequência de mitoses poliplóides e houve um acréscimo das anormalidades do fuso.

2.2.1.3. Idade da cultura

A análise rigorosa do efeito da idade da cultura é limitada pela capacidade de avaliar a taxa de crescimento (isto é, número de gerações celulares/tempo), bem como o tempo para que o mutante possa proliferar suficientemente para ser detectado na planta regenerada. Entretanto, segundo PESCHKE & PHILLIPS (1992), o efeito da idade tem sido atribuído a uma causa ou a uma combinação de causas:

a) A cultura *per se* torna-se mais propensa a alterações à medida que envelhece, isto é, a taxa de mutação por geração celular aumenta.

b) A taxa de mutação é aproximadamente constante no tempo, assim o número de mutações aumenta durante o tempo, em virtude da seleção não eliminá-las.

c) Algumas alterações ocorrem no início da cultura mas não são detectadas senão mais tarde, quando um suficiente

número de células mutantes tenham sido acumuladas para serem incluídas em uma amostra de calos ou em uma planta regenerada.

d) Alterações que ocorrem no início da cultura são ativamente selecionadas, aumentando grandemente a proporção de células durante o tempo.

As primeiras investigações sobre variação originada a partir de cultura de tecidos em milho, usando A188 ou material relacionado, mostraram um alto grau de estabilidade genética e citogenética em cultura mantidas por períodos inferiores a um ano. As análises meióticas revelaram que mais de 90% das plantas regeneradas avaliadas apresentaram cariótipo e comportamento cromossômico normais (GREEN *et al.*, 1977; McCOY & PHILLIPS, 1982).

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

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

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

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

Análises meióticas mostraram que após 3-4 meses em cultura, nenhuma anormalidade cromossômica foi observada em plantas regeneradas de calos induzidos a partir de embriões imaturos de famílias F₂ de isolinhas da linhagem Oh43 segregando para genes de macho-esterilidade, enquanto que aproximadamente metade das plantas regeneradas após 8-9 meses apresentaram-se com translocações, pares heteromórficos heterozigotos para uma deficiência, presença de pontes na anáfase I indicando a ocorrência de inversão pericentromérica (LEE & PHILLIPS, 1987).

ARMSTRONG & PHILLIPS (1988) compararam a frequência de variação genética e citogenética em plantas regeneradas de culturas de tecidos de milho Tipo I e Tipo II. Os genótipos usados foram A188 e A188-BC6. Após 16 semanas em cultura, 33,3 e 20,8% das plantas regeneradas de culturas Tipo II e Tipo I, respectivamente, apresentaram pelo menos uma anormalidade (permuta entre cromossomos homólogos, trissonia, setores tetraplóides e irregularidades meióticas). Estes valores aumentaram para 37,2 (Tipo II) e 24,2% (Tipo I) após 36 semanas em cultura.

Através da análise de pedigree de linhagens celulares, iniciadas de embriões imaturos de linhagens e combinações

híbridas de milho, BENZION & PHILLIPS (1988) verificaram que, de modo geral, houve uma tendência de aumentar a frequência de plantas anormais com o aumento da idade da cultura. Entretanto, a frequência de cada aberração individual em cada cultura variou com o aumento da idade da cultura. Estes autores concluíram que o aumento na frequência de plantas anormais à medida que aumenta o tempo de cultura não implica necessariamente em um aumento na taxa de mutação devido ao ambiente de cultura, ou à ocorrência de novas de aberrações enquanto a cultura é mantida, mas pode ser parcialmente explicada pelo aumento na homogeneidade celular nestas culturas devido a proliferação e acúmulo de células com aberrações que ocorreram no início da cultura.

MOLINA *et al.* (1992) e MOLINA & GARCIA (1994) estudaram a ocorrência de aberrações cromossômicas e fenotípicas em plantas de milho regeneradas de calos após 17, 32, 50 e 60 meses de subcultura. Os calos foram obtidos a partir de um embrião imaturo da cultivar Colorado Klein. Análises meióticas de plantas regeneradas revelaram que 30%, 95%, 100% e 100% delas, respectivamente, eram citogeneticamente anormais. Análises citológicas das culturas com 60 meses de idade revelaram grande variabilidade no número de cromossomo ($2n=18$ a 23), além de aberrações cromossômicas estruturais. Algumas células apresentaram 2 a 4 cromossomos com satélite, pares heteromórficos e cromossomos circulares. Todas as plantas foram fenotipicamente anormais e completamente estéreis. Entretanto, a análise de microsporócitos das plantas regeneradas

demostrou que 90% das plantas apresentavam $2n=21$ e apenas 10% das plantas possuíam $2n=20$. Os tipos de alterações observadas nestas plantas foram deficiências, duplicações, elevado número de univalentes, um ou mais cromossomos extra, inversões, cromossomos com duas regiões organizadoras do nucléolo e translocações. Estes autores concluíram que, para o genótipo testado, a frequência de alterações cromossômicas aumenta com o tempo de cultura.

2.2.1.4. Genótipo do explante

Embora os aspectos da fase de cultura citados acima influenciem a frequência em que alterações ocorrem, diferenças na extensão da variação podem ocorrer quando diferentes genótipos são regenerados sob semelhantes condições de cultura. Isto sugere que alguns genomas podem ser mais propícios a variação que outros.

Segundo PESCHKE & PHILLIPS (1992), dentro de uma espécie o genótipo do explante pode ser um importante determinante da variação cromossômica devido a dois fatores principais: variação pré-existente e diferenças varietais.

Algumas variações citológicas podem pré-existir no explante, especialmente para espécies polissomáticas (onde células diplóides e poliplóides coexistem em um mesmo tecido): esta condição pode ser encontrada em cerca de 90% das espécies vegetais (D'AMATO, 1985). As variações cromossômicas pré-existentes no explante podem

perpetuar na cultura e ser detectadas em plantas regeneradas, o que não impede a ocorrência de variação *de novo*.

Diferenças varietais foram relatadas por diversos autores. Em grande parte destes estudos as análises citológicas foram realizadas em microsporócitos das plantas regeneradas.

McCOY *et al.* (1982) compararam a estabilidade citológica em plantas regeneradas de duas cultivares de aveia, Lodi e Tippecanoe. Os tipos de alterações cromossômicas mais frequentes foram quebras e perdas de segmentos cromossômicos levando à formação de pares heteromórficos. Em plantas regeneradas após 4 meses, 12% das plantas Tippecanoe tinham um ou mais variantes comparados a 49% de Lodi; estas frequências aumentaram em 8 meses para 40 e 89%, respectivamente. Neste caso foi observado tanto o efeito da idade da cultura quanto do genótipo. Apesar de ocorrer um aumento na frequência de variantes com o aumento do tempo de cultura para os dois genótipos testados, a cultivar Tippecanoe apresentou-se com menor frequência de variantes em relação à cultivar Lodi.

Em milho, diversos genótipos têm sido empregados na avaliação da frequência de variação cromossômica entre plantas regeneradas (GREEN *et al.*, 1977; EDALLO *et al.*, 1981; McCOY & PHILLIPS, 1982; LEE & PHILLIPS, 1987, 1988; BENZION & PHILLIPS, 1988). A maioria dos genótipos utilizados nestes estudos parecem ser instáveis a julgar pelas alterações no número e estrutura de cromossomos observadas em plantas regeneradas (revisão em PHILLIPS *et al.*, 1988).

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

FLUMINHAM Jr. (1992) analisou diversos linhagens relacionadas, mas com constituição de knobs diferentes. Embora pontes anafásicas tenham sido observadas na maioria dos genótipos estudados, alguns apresentaram maior frequência de pontes na anáfase que outros. Existem evidências de que pode haver interação entre genótipo, composição de knobs e meio de cultura utilizado.

2.2.2. Aberrações numéricas

Possivelmente centenas de estudos sobre variação e comportamento cromossômico têm sido realizados nos últimos 30 anos e têm sido descritos em uma série de revisões detalhadas (SUNDERLAND, 1977; BAYLISS, 1980; D'AMATO, 1985; LEE & PHILLIPS, 1988; PESCHKE & PHILLIPS, 1992). As observações iniciais focalizaram alterações na ploidia porque poderiam ser detectadas mesmo em células mitóticas com pequenos cromossomos e/ou grande número de cromossomos. As primeiras espécies cultivadas *in vitro* com sucesso (tabaco e cenoura), pertenciam geralmente a esta categoria.

A poliploidia em cultura de tecidos origina-se via mecanismos semelhantes àqueles vistos *in vivo* e tem sido geralmente

explicada como produto de endopoliploidização ou fusão nuclear (SUNDERLAND, 1977; BAYLISS, 1980).

As evidências citológicas indicam que aneuploidia pode ser causada por não disjunção, atraso cromossômico, aberração no fuso, e quebras cromossômicas produzindo cromossomos dicêntricos e acêntricos (SUNDERLAND, 1977).

BALSAN (1978) propôs que a aneuploidia pode ser devido à poliploidia seguida pela eliminação de cromossomos.

A aneuploidia é melhor tolerada em espécies que normalmente são poliplóides que em espécies diplóides. Regenerantes aneuplóides são comuns em poliplóides mas raramente ocorrem em diplóides (sumarizado em D'AMATO, 1985). Portanto, quando aneuploidia ocorre em espécies diplóides é muito menos provável que seja transmitido à progênie que no caso de espécies poliplóides.

Em milho a ocorrência de alterações no número de cromossomos é pouco frequente. LEE & PHILLIPS (1988) observaram que de 78 plantas regeneradas somente três apresentaram o número de cromossomos diferente do normal ($2n = 20$), sendo que duas destas plantas eram tetrapóides e a outra era trissômica para um cromossomo não identificado.

MOLINA & GARCIA (1994) observaram que apenas 10% das plantas regeneradas após 60 meses em cultura apresentavam número normal de cromossomos, enquanto que 90% das plantas regeneradas apresentavam $2n=21$. É interessante ressaltar que nestes dois estudos alterações estruturais também foram observadas.

2.2.3. Aberrações estruturais

Torna-se evidente em algumas pesquisas interessadas em variação somaclonal que uma grande parte da variação potencial não é detectada apenas pelo estudo do número de cromossomos. Em alguns estudos, a frequência de rearranjos cromossômicos em células cultivadas excedeu à de alterações na ploidia (ASHMORE & GOULD, 1981; MURATA & ORTON, 1983).

A análise de alterações estruturais pode ser feita utilizando cromossomos mitóticos facilmente distinguíveis, uma metodologia para marcar cromossomos mitóticos (como a metodologia de bandamento-C), ou análises meióticas, o que requer a regeneração de plantas.

SACRISTAN (1971), utilizando *Crepis capillaris*, uma espécie com um pequeno número de cromossomos mitóticos grandes e distintos, estudou a ocorrência de rearranjos cromossômicos em calos e mostrou que quebra cromossômica em cultura era um evento comum.

Quando plantas regeneradas são examinadas meioticamente, quebras cromossômicas e suas consequências (translocações, inversões, deleções e duplicações) constituem as aberrações mais comumente detectadas (ver LEE & PHILLIPS, 1988). Entretanto, a posição da quebra parece não ser ao acaso, mas frequentemente ocorre entre regiões heterocromáticas e o centrômero.

Por exemplo, McCOY *et al.* (1982) observaram, em aveia, uma alta frequência de quebras cromossômicas próximo ao

centrômero. Este trabalho será discutido mais detalhadamente no item seguinte.

MURATA & ORTON (1983, 1984) notaram em aipo uma alta frequência de fusões cromossômicas, que levaram à formação de cromossomos contendo translocações e constrições múltiplas em cultura de tecidos e plantas regeneradas. A origem destes eventos poderia ser atribuída à quebra na heterocromatina telomérica, ou próximo a ela, encontrada em todos os cromossomos de aipo.

Um estudo da variação citológica em triticales regenerado mostrou que 12 dos 13 pontos de quebra envolvidas em translocações e deleções estavam na heterocromatina (LAPITAN *et al.*, 1984). Foi observado também em triticales, que entre 51 plantas da cultivar 'Welsh' regeneradas de culturas com seis meses de idade, 29 continham cromossomos telo ou acrocêntricos (ARMSTRONG *et al.*, 1983). Novamente, os sítios de quebra produzindo cromossomos aberrantes parecem estar localizados dentro da heterocromatina ou adjacente a ela.

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

BENZION & PHILLIPS (1988) analisaram plantas regeneradas de três linhagens celulares que produziram translocações citologicamente idênticas entre o braço longo do cromossomo 7 e do cromossomo 8. Estas culturas foram derivadas de híbridos onde A188 era um dos parentais. As aberrações cromossômicas originaram-se aparentemente durante o ciclo de cultivo *in vitro*, haja visto que plantas normais e anormais foram regeneradas destas culturas. Além disso, sementes controle destes cruzamentos (isto é, sementes da mesma espiga em que os embriões foram cultivados) não apresentaram nenhuma aberração genética ou citogenética. A ocorrência da mesma aberração citológica em três linhagens celulares individuais, sugere que existem "hot spots", ou seja, pontos específicos de quebra cromossômica, que se manifestam durante o ciclo de cultura de tecidos.

2.2.3.1. Efeito da heterocromatina nas quebras cromossômicas

O tempo de replicação da eucromatina e da heterocromatina tem sido estudado em diversas espécies de plantas analisando-se a incorporação de timidina ^3H através de autorradiografia. A heterocromatina normalmente tem replicação mais tardia que eucromatina (LIMA-DE-FARIA, 1969).

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

O knob dos cromossomos de milho consiste de heterocromatina constitutiva a qual permanece condensada durante o ciclo mitótico. A composição de knobs pode ser determinada pela análise de paquíteno. Entretanto, a posição da heterocromatina pode ser detectada pela técnica de bandamento-C em cromossomos mitóticos (HADLACZKY & KALMAN, 1975; AGUIAR-PERECIN, 1985; AGUIAR-PERECIN & VOSA, 1985; TITO *et al.*, 1991). Os knobs são compostos de sequências de 185 pares de base, altamente repetitivas, arranjadas em tandem (PEACOCK *et al.*, 1981).

O potencial da replicação tardia do DNA como um mecanismo para induzir rearranjos cromossômicos em cultura de tecidos foi reconhecido por SACRISTAN (1971), através da análise de cultura de calos de *Crepis capillaris*, onde o cromossomo satélite (SAT) estava envolvido em 82% dos rearranjos, com os pontos de quebra correspondendo à região de síntese tardia do DNA.

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

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

Uma hipótese para o efeito da heterocromatina em causar quebras cromossômicas foi proposta por McCOY *et al.* (1982) e tem sido recentemente revisada (CARLSON, 1988; LEE & PHILLIPS, 1988; PESCHKE & PHILLIPS, 1992).

A frequência muito alta de telocêntricos entre as plantas de aveia regeneradas de cultura de tecidos, levou McCOY *et al.* (1982) a estabelecerem uma hipótese sobre o envolvimento da heterocromatina pericentromérica. Esta baseou-se na observação de que a heterocromatina comumente tem replicação tardia (LIMA-DE-FARIA, 1969) e que várias espécies tem regiões de heterocromatina ao redor de seus centrômeros. A hipótese é que se existe normalmente replicação tardia na região pericentromérica nos cromossomos de aveia, esta heterocromatina poderia ocasionalmente replicar mesmo mais tarde que o usual no ambiente de cultura de tecidos. As cromátides envolvidas permaneceriam unidas neste ponto de replicação tardia, formando uma ponte na anáfase. Isto produziria um estresse que poderia resultar em quebra (provavelmente localizada entre o centrômero e a região de replicação tardia). Alternativamente, este mecanismo poderia resultar em não disjunção e subsequente aneuploidia.

Quando foi lançada esta hipótese em 1982, não se sabia se aveia hexaplóide apresentava replicação tardia na região da heterocromatina pericentromérica. Posteriormente, a análise de paquíteno de plantas de aveia, que não eram derivadas de cultura de tecidos, mostrou que todos os cromossomos em aveia tinham grandes regiões de heterocromatina ao redor do centrômero (JOHNSON *et al.*, 1987). A caracterização detalhada de uma planta regenerada com um cromossomo satelitado mostrou que a quebra cromossômica tinha ocorrido na região da heterocromatina pericentromérica, resultando num par heteromórfico. Além disso, o padrão de incorporação de timidina-³H em cromossomos de células de ponta de raiz, analisada através de autorradiografia, indicou que havia replicação tardia de DNA em regiões heterocromáticas de cromossomos de aveia. Baseados nestas observações, JOHNSON e colaboradores (1987) concluíram que a replicação da heterocromatina no fim do período S permite que estas regiões sejam mais sensíveis a perturbações no ciclo celular que podem ocorrer durante a cultura de tecidos.

LEE & PHILLIPS (1987) e PHILLIPS *et al.* (1988) observaram, através de análises meióticas de plantas de milho regeneradas a partir de calos derivados de embriões imaturos, a ocorrência de quebras cromossômicas envolvendo frequentemente braços cromossômicos contendo knobs heterocromáticos e propuseram que a causa de alterações citogenéticas na cultura de tecidos de milho seria decorrente de distúrbios causados pela replicação tardia do knob. Segundo os autores, perturbações afetando o período de síntese de DNA

nos locais de replicação tardia (a nível dos knobs), poderia resultar na não separação das cromátides-irmãs, posterior formação de ponte na anáfase e quebra das cromátides envolvidas.

Com base nestes estudos, AGUIAR-PERECIN & FLUMINHAN Jr. (1992) e FLUMINHAN Jr. (1992), analisaram o envolvimento dos knobs na formação de pontes anafásicas em calos obtidos a partir de embriões imaturos. Neste estudo foram utilizadas linhagens endogâmicas de milho com diferentes conteúdos de knobs. Foram encontradas evidências de ocorrência de pontes decorrentes de atrasos na separação das cromátides, e de ocorrência de ciclo de quebra-fusão-ponte. Além disso, foi observado através de bandamento-C que em alguns casos braços cromossômicos que continham knobs heterocromáticos estavam envolvidos na formação de pontes anafásicas.

Uma consequência da ocorrência de um atraso maior na separação das cromátides ao nível do knob, conforme proposto por LEE & PHILLIPS (1987) e observado por AGUIAR-PERECIN & FLUMINHAN Jr. (1992), é a que as cromátides envolvidas podem se quebrar. O que ocorreria com os cromossomos contendo extremidades quebradas? Três caminhos são possíveis: a) poderiam não se replicar mais; b) poderiam se replicar dando origem a um dicêntrico, iniciando um ciclo de quebra-fusão-ponte; ou c) poderiam se estabilizar devido a um processo de cicatrização dos telômeros. Estas duas últimas possibilidades serão discutidas nos itens a seguir.

2.2.3.2. Ciclo de quebra-fusão-ponte

Estudos sobre a ocorrência de ciclos de quebra-fusão-ponte foram realizados por McCLINTOCK (1939, 1941, 1942). Foi observado que a introdução de um cromossomo quebrado na célula poderia iniciar um ciclo onde o cromossomo quebrado se replicaria, as extremidade das cromátides irmãs (no sítio de quebra) se fundiriam, e uma ponte anafásica seria formada pelo dicêntrico resultante. Esta ponte eventualmente poderia quebrar, permitindo que o processo começasse novamente, consequência do nome ciclo de quebra-fusão-ponte.

Esperava-se que o ciclo de quebra-fusão-ponte produzisse cromossomos deficientes e com duplicações como resultado de uma quebra ao acaso, mas isso não foi observado. McCLINTOCK (1941) notou que as pontes envolvidas em um ciclo tendiam a quebrar no mesmo lugar em sucessivas divisões, indicando que as fusões das cromátides irmãs após as quebras poderia ser frágil ou incompleta. Apesar disso, muitas quebras também ocorriam em outras posições.

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

O ciclo descrito acima refere-se ao ciclo da cromátide que envolve a junção entre as cromátides filhas de um mesmo cromossomo. Além do ciclo cromatídico, McCLINTOCK (1942, 1978) demonstrou a existência de um ciclo cromossômico. O ciclo cromossômico ocorreria se dois cromossomos quebrados fossem introduzidos no zigoto, um através do tubo polínico e outro através do saco embrionário, as extremidades quebradas frequentemente fundiam-se, formando um dicêntrico. A ponte dicêntrica resultante envolveria dois centrômeros diferentes. Na anáfase, duas pontes seriam produzidas se os centrômeros fossem arrastados para polos opostos. A quebra das pontes na anáfase enviaria dois cromossomos com extremidades quebradas para cada polo. Os cromossomos quebrados em cada célula filha se fundiriam com outros produzindo novamente um dicêntrico. A formação subsequente de pontes duplas pelo dicêntrico daria início a outro ciclo.

O ciclo cromatídico e o ciclo cromossômico são fenômenos distintos (McCLINTOCK, 1942, 1951). Entretanto, SCHWARTZ & MURRAY (1957), encontraram evidências que um ciclo da cromátide pode converter-se espontaneamente em um ciclo do cromossomo. Eles observaram o comportamento de cromossomos quebrados no desenvolvimento do endosperma. Em alguns setores do tecido, pontes simples (padrão do ciclo cromatídico) sofreram modificações para ocorrência de pontes duplas (padrão do ciclo cromossômico). As pontes simples ocasionalmente sofrem não disjunção ao invés de quebra na anáfase. A migração de ambos centrômeros para

um mesmo polo estabelece um ciclo de quebra-fusão-ponte do tipo cromossômico nas divisões sucessivas.

O ciclo de quebra-fusão-ponte pode ter efeitos diversos no genoma do milho. Evidências tem sugerido que transposons latentes podem ser ativados em células que sofreram ciclo do cromossomo ou da cromátide (McCLINTOCK, 1941, 1951, 1984; DOERSCHUG, 1973; RHOADES & DEMPSEY, 1982, 1983). Além disso, quebras e rearranjos cromossômicos podem ser induzidos em outros cromossomos não envolvidos originalmente no ciclo (McCLINTOCK, 1951, 1978).

Em conformidade com o descrito citologicamente e geneticamente por McCLINTOCK (1946, 1948), WEIL & WESSLER (1993) observaram que cromossomos podem se quebrar nos sítios contendo elementos Ds, as cromátides se fundir formando um cromossomos dicêntrico, e iniciar um ciclo de quebra-fusão-ponte. Além disso, estes autores caracterizaram dois alelos Ds em milho que frequentemente provocam a quebra do braço curto do cromossomo 9.

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

Segundo PHILLIPS (1989) atrasos na replicação da heterocromatina podem ser resultantes de perturbações no ciclo celular induzidas pelo cultivo *in vitro*. Estas alterações no ciclo celular por sua

vez podem alterar a metilação normal do DNA, levando à hipo ou hipermetilação. Além disso, em alguns sistemas vegetais a ativação de transposons também pode estar relacionada à alterações no DNA, incluindo alterações no padrão de metilação.

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

Quanto à ativação de transposons, PESCHKE *et al.* (1991) observaram que existe uma relação complexa entre atividade de elementos *Ac* e metilação em certos sítios de restrição. A análise de progênes de plantas de milho regeneradas que continham elementos *Ac* ativados em decorrência de cultivo *in vitro* mostrou que a maioria das plantas apresentaram algum grau de hipometilação no sítio PvuII. As plantas com elementos *Ac* ativos apresentaram hipometilação mais extensiva.

Portanto, ciclos de quebra-fusão-ponte submetem o genoma a estresse severo resultando em alterações genéticas e cromossômicas.

2.2.3.3. Cicatrização de telômeros

Os primeiros estudos sobre as extremidades dos cromossomos foram realizados há mais de 50 anos atrás por MÜLLER (1938) em *Drosophila*, e McCLINTOCK (1938) em milho.

MÜLLER (1938) propôs que os segmentos terminais eram necessários para a estabilidade linear do cromossomo e denominou estes segmentos de telômeros (do grego *telos* = fim, *meros* = parte).

Os estudos de McCLINTOCK (1938, 1939, 1941, 1942) ampliaram este conceito por apresentarem uma descrição das consequências da deleção dos telômeros. Seus experimentos revelaram que as extremidades quebradas resultantes da quebra de um dicêntrico, frequentemente se fundiam com outras extremidades quebradas, originando um novo dicêntrico dando continuidade ao ciclo de quebra-fusão-ponte, conforme mencionado no item anterior. Por outro lado, as extremidades cromossômicas que não haviam sofrido quebra eram estáveis e não se fundiam com as extremidades quebradas nem com outros telômeros.

Além disso, McCLINTOCK (1939, 1942) demonstrou que ocasionalmente, durante o ciclo de quebra-fusão-ponte os cromossomos que apresentavam as extremidades quebradas tornavam-se estáveis ou "cicatrizavam". Após a fertilização, o ciclo de quebra-fusão-ponte continuava no tecido do endosperma, enquanto que no tecido zigótico as extremidades quebradas cicatrizavam, cessando o

ciclo. O cromossomo cicatrizado era propagado no subsequente desenvolvimento da planta. Estas observações sugeriram que um processo que cicatrizava as extremidades quebradas estava presente no tecido zigótico mas ausente no endosperma. O processo de cicatrização foi assumido como adição de um novo telômero (McCLINTOCK, 1984), embora isto não tenha sido caracterizado molecularmente.

Nos últimos 15 anos têm sido relatada na literatura uma série de estudos que ampliaram a compreensão sobre a estrutura molecular e função dos telômeros. As investigações sobre o processo de cicatrização a nível molecular são muito recentes (revisão em ZAKIAN, 1989; BLACKBURN, 1991; GREIDER, 1990, 1991; RICHARDS *et al.*, 1993; GREIDER *et al.*, 1993; BEISSMANN & MASON, 1992 e 1994).

BLACKBURN & GALL (1978), citados por SCHWARZACHER & HESLOP-HARRISON (1990), foram os primeiros a sequenciar o DNA de um telômero. Em *Tetrahymena thermophila*, eles observaram muitas cópias idênticas da sequência de nucleotídeo (TTGGGG)_n e sua sequência complementar (CCCCAA)_n, na extremidade linear das moléculas de DNA ribossômico.

Desde então o DNA telomérico tem sido caracterizado em uma variedade de organismos eucariotos (RICHARDS *et al.*, 1993). Existem evidências de que os telômeros dos eucariotos são semelhantes entre as espécies e são constituídos de sequências com poucos pares de bases, repetidas em tandem. A orientação destas sequências em relação à extremidade do cromossomo é conservada, com a fita de DNA rica em

guanina na direção 5'-3' (veja ZAKIAN, 1989; BLACKBURN, 1991; BEISSMANN & MASON, 1992; RICHARDS *et al.*, 1993).

Uma característica interessante da estrutura do telômero é que na sua extremidade as guaninas na mesma fita de DNA se pareiam umas com as outras de forma incomum, "non-Watson-Crick", formando um quarteto de guaninas. Esta disposição pode estar relacionada com a função do telômero em manter a estabilidade do cromossomo (BLACKBURN, 1991; BALAGURUMOORTHY *et al.*, 1992).

Embora as evidências citológicas da existência dos telômeros e de suas possíveis funções tenham sido decritas por McCLINTOCK nas décadas de 30 e 40 em milho, caracterização molecular destas estruturas em plantas é relativamente recente.

RICHARDS & AUSUBEL (1988) clonaram sequências teloméricas de *Arabidopsis thaliana*, determinaram que a sequência do oligonucleotídeo telomérico era TTAGGG e observaram que estas sequências hibridizavam com os telômeros de milho.

Sequências teloméricas clonadas de *Arabidopsis thaliana* e oligonucleotídeos sintéticos com sequências correspondentes foram usados em estudos de hibridização *in situ* em cevada e arroz (SCHWARZACHER & HESLOP-HARRISON, 1990; HARRISON, 1991; WANG *et al.*, 1991, 1992; KARP *et alii*, 1992; RÖDER *et al.*, 1993), em *Pisum sativum* e *Vicia faba* (RAWLINS *et al.*, 1991), em trigo (WERNER *et al.*, 1992) e tomate (GANAL *et al.*, 1991; BROUN *et al.*, 1992). Nestes estudos observou-se que tais sequências hibridizavam com a extremidade dos cromossomos de todas estas espécies, sugerindo um

elevado grau de conservação das sequências teloméricas em vegetais superiores.

COX *et al.* (1993) observaram que probes de sequências teloméricas de *A. thaliana*, obtidos através de PCR, hibridizavam telômeros dos cromossomos de 11 espécies de plantas (5 monocotiledôneas e 6 dicotiledôneas), mostrando que os telômeros são altamente conservados entre as angiospermas. Além disso, estes autores sugeriram um conceito mais abrangente para o telômero refletindo suas características moleculares, estruturais e funcionais específicas: "Telômeros são regiões contendo sequências repetidas (TRS = telomere repeat sequence) posicionadas na extremidade do cromossomo, que apresentam pareamento de bases diferente do modelo Watson-Crick, e que protegem as extremidades cromossômicas da degradação".

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

A adição de novas sequências teloméricas também foi observada na cicatrização de cromossomos em *Schizoccharomyces pombe*, *Plasmodium* e humanos. Nestes dois últimos, os cromossomos

cicatrizados foram caracterizados a nível de sequência de DNA. Foi observado uma transição abrupta da sequência codificadora de um gene conhecido para sequências teloméricas, sugerindo que os telômeros foram adicionados nas extremidades quebradas (revisão em BLACKBURN, 1991).

Estudos recentes evidenciaram que a telomerase adiciona sequências teloméricas a sequências não teloméricas em *Thetraymena* (HARRINGTON & GREIDER, 1991) e humanos (MORIN, 1991). Estes estudos apresentaram evidências bioquímicas de que a telomerase é capaz de promover a cicatrização do cromossomo pela adição de sequências teloméricas em DNA não telomérico.

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

Resultados semelhantes foram obtidos por WANG *et al.* (1992) em *Hordeum vulgare*. Estes autores analisaram, através de hibridização *in situ* com sequências teloméricas de *A. thaliana*, a ocorrência de cicatrização em cromossomos de linhagens aneuplóides contendo cromossomos quebrados em diferentes partes. Os resultados

mostraram a presença de sequências teloméricas nas extremidades quebradas, indicando a ocorrência de cicatrização, o que explica a estabilidade desses cromossomos alterados através de muitas gerações.

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

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Genótipos utilizados

Foram utilizados dois materiais com constituição de knobs cromossômicos determinados através de metodologia de bandamento-C: a) uma linhagem, 13342/5 e b) um F2 derivado do cruzamento entre duas linhagens endogâmicas relacionadas, (1315/1 x 13213/1)¹. Os dois genótipos são derivados de linhagens endogâmicas obtidas a partir da variedade Jac-Duro, que têm sido utilizadas em estudos desenvolvidos no Departamento de Genética da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" da Universidade de São Paulo, com o objetivo principal de estudar os efeitos genéticos dos knobs heterocromáticos (AGUIAR-PERECIN & DECICO, 1988; DECICO, 1991).

Os materiais analisados pertencem à mesma família (300-13), mas a sub-famílias diferentes, e apresentam constituição de knobs distintas (Tabela 1). A constituição de knobs foi determinada em etapa anterior ao presente trabalho através de metodologia de bandamento-C (DECICO, 1991).

TABELA 1: Constituição de knobs heterocromáticos das linhagens endogâmicas originais

Família	Sub-família	Linhagem	Posição dos Knobs*							
			(= banda-C)							
			K3L	K6L ₂	K6L ₃	K7S	K7L	K8L ₁	K8L ₂	K9S
300-13	300-131	1315/1	00	++	++	++	++	++	++	++
	300-132	13213/1	00	++	++	++	++	++	++	++
	300-133	13342/5	+0	++	++	++	++	++	++	00

* K = knob

Número = número do cromossomo

L = braço longo

S = braço curto

00 = homozigótico para ausência de knob

++ = homozigótico para presença de knob

K6L₂ e K6L₃, bem como K8L₁ e K8L₂, formam uma só banda nos cromossomos metafásicos

3.2. Obtenção de calos e linhagens celulares

As culturas foram obtidas numa etapa anterior aos início do presente trabalho. Foram utilizados calos que vinham sendo mantidos no Laboratório de Citologia pelo funcionário Carlos Veríssimo e que foram utilizados em estudos desenvolvidos por FLUMINHAN Jr. (1992). As culturas foram obtidas a partir de embriões imaturos, segundo metodologia previamente estabelecida (AGUIAR-PERECIN & FLUMINHAN Jr., 1985, 1986).

Aproximadamente 12-14 dias após a polinização, espigas foram colhidas e lavadas em água corrente. Após esterilização superficial com solução de hipoclorito de sódio 1% por 30 minutos, o segmento central da espiga foi lavado por duas vezes em água destilada esterilizada, em câmara de fluxo contínuo. Os embriões de aproximadamente 1,0 a 2,0 mm de comprimento foram removidos das sementes, sob lupa, e inoculados em meio sólido, posicionados com a coleoptile/coleoriza em contato com o meio e o escutelo voltado para cima a fim de induzir calogênese. Foram removidos cerca de 120 embriões imaturos, de uma única espiga do F₂ do cruzamento (1315/1 x 13213/1)1 Planta 3 (Novembro/89), e da linhagem 13342/5 Planta 12 (Janeiro/90).

As culturas foram mantidas no escuro em caixas de madeira cobertas com tecido preto, a 25°C, sendo subcultivadas a cada 15-20 dias.

Através de avaliações periódicas dos calos induzidos, foram selecionados calos friáveis e embriogênicos (Tipo II), destacando-se dentre eles o calo F do genótipo 13342/5 Planta 12 (designado 12-F) e o calo 57 do genótipo (1315/1 x 13213/1)1 Planta 3 (designado 3-57), os quais foram utilizados no presente estudo.

Análises citológicas do calo 3-57 foram realizadas previamente por FLUMINHAN Jr. (1992), e foi constatada a ocorrência de um dos elementos do par número 7 com duas bandas em um dos braços, aparentemente o braço curto. Isto justificou a escolha deste material para uma maior investigação do ciclo de quebra-fusão-ponte.

3.3. Meios utilizados

Nas diversas fases do cultivo (indução, manutenção e regeneração) foram utilizados os meios MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) e N6 (CHU *et al.*, 1975), apresentados na Tabela 2 e 3.

O meio N6 difere do MS em relação a composição de sais inorgânicos, especialmente na fonte de nitrogênio. A relação N nitrato: N amoniacal é igual a 1 no meio MS, enquanto o meio N6 possui esta relação igual a 7. O aminoácido L-prolina (12 mM) foi adicionado ao meio N6. A inclusão de L-prolina neste meio é de especial interesse, uma vez que tem sido demonstrado que a prolina pode estimular significativamente a embriogênese somática em alguns genótipos (ARMSTRONG & GREEN, 1982, 1985; ARMSTRONG & PHILLIPS, 1988).

TABELA 2. Composição dos meios de cultura para o cultivo in vitro de calos de milho (em mg/l)

Componentes	Meio MS	Meio N6
NH ₄ NO ₃	1.650,0	
(NH ₄) ₂ SO ₄		463,0
KNO ₃	1.900,0	2.830,0
CaCl ₂ . 2H ₂ O	440,0	166,0
MgSO ₄ .7H ₂ O	370,0	185,0
KH ₂ PO ₄	170,0	400,0
FeEDTA	38,3	38,3
H ₃ BO ₃	6,2	1,6
MnSO ₄ .4H ₂ O	22,3	4,4
ZnSO ₄ .7H ₂ O	10,6	1,5
KI	0,83	0,8
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25	
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025	
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025	
Inositol	99,0	99,0
Cisteína	78,8	78,8
Vitaminas		
Tiamina-HCl	0,5	0,5
Piridoxina	1,0	1,0
Ácido Nicotínico	1,0	1,0
Pantotenato de Cálcio	1,0	1,0
L-prolina		1.381,56
Hidrolizado de caseína	20,00	20,0
Glicina	2,0	2,0
Sacarose	20.000,0	20.000,0
Auxina (2,4-D)	0,5 - 2,0	1,5

TABELA 3. Meios de cultura utilizados para indução e manutenção dos calos dos calos, e regeneração de plantas.

Meio de cultura	Composição
Meio de indução	
MS2	MS + 2,0 mg/l de 2,4-D
Meio de manutenção	
MS2	MS + 2,0 mg/l de 2,4-D
MS1	MS + 1,0 mg/l de 2,4-D
N6	MS + 1,5 mg/l de 2,4-D
Meio de regeneração	
Etapa I - MS 0,5	MS + 0,5 mg/l de 2,4-D
N6 0,5	N6 + 0,5 mg/l de 2,4-D
Etapa II - MS 0	MS sem 2,4-D
N6 0	N6 sem 2,4-D
Etapa III - MS 1/2	1/2 concentração de sais do MS sem 2,4-D

A auxina 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) foi utilizada para indução e manutenção dos calos e na primeira etapa de regeneração de plantas, em concentrações que variaram entre 0,5 e 2,0 mg/l. Os meios foram solidificados com agar (8,0 g/l) e tiveram o pH ajustado de forma que apresentassem pH 5,8 após a autoclavagem a 1 atmosfera por 20 minutos. As culturas foram mantidas em placas de Petri (100 mm x 20 mm) com um volume de meio de aproximadamente 50 ml.

Os calos foram induzidos em meio MS adicionado de 2,0 mg/l de 2,4-D (MS2), em novembro/89 (calo 3-57) e janeiro/90 (calo 12-F). Após algumas subculturas, fragmentos embriogênicos dos calos foram transferidos também para meio MS + 1,0 mg/l de 2,4-D (MS1), em outubro/91 e N6 + 1,5 mg/l de 2,4-D + 12mM L-prolina (calo 12-F - outubro/91; calo 3-57 - junho/92). As placas de cada meio foram numeradas, acompanhadas individualmente e consideradas como sublinhagens celulares ou subclones.

O termo subclone foi sugerido por BENZION & PHILLIPS (1988) para descrever um grupo de células da cultura de tecidos que se derivaram de um mesmo calo, ou seja, uma amostra do tecido subcultivado do qual uma ou mais plantas podem ser regeneradas. Isto não implica que todos os subclones de um determinado embrião apresentam a mesma identidade genética, mas que eles estão relacionados. Estes subclones relacionados formam a linhagem celular da cultura derivada de um determinado embrião.

No presente estudo o termo subclone, ou sublinhagem, foi usado para designar amostras do calo derivado de um mesmo embrião imaturo, que foram mantidas em placas distintas durante os subcultivos nos diferentes meios. Portanto, o calo 12-F e o calo 3-57 constituem duas linhagens celulares distintas (derivadas de embriões imaturos diferentes), cada uma delas apresentando seus respectivos subclones ou sublinhagens celulares.

O calo 12-F e o calo 3-57 foram divididos em nove subclones cada um. Um grupo de três foram mantidos em meio MS2 (subclones 1-MS2, 2-MS2, 3-MS2), outros três em MS1 (subclones 1-MS1, 2-MS1, 3-MS1), e ainda mais três em N6 (subclones 1-N6, 2-N6, 3-N6). Alguns subclones foram perdidos devido a contaminações com bactérias ou problemas de oxidação e, portanto, não foi possível analisar o comportamento cromossômico em todas as sublinhagens como desejado.

3.4. Regeneração de plantas e avaliação da fertilidade do pólen

3.4.1. Regeneração de plantas

A metodologia de regeneração de plantas foi desenvolvida a partir de uma adaptação da metodologia padronizada no laboratório e descrita por FULMINHAN Jr. (1992). Divide-se em três etapas:

Etapa I - Blocos de material embriogênico foram removidos para meio MS ou N6 com 0,5 mg/l de 2,4-D e mantidos sob fotoperíodo 16/8 horas (lâmpadas Gro-Lux^R com intensidade de 1.200 lux), para promover o amadurecimento mais uniforme dos pró-embriões.

Etapa II - Após 15 dias, os grupos de embriões foram transferidos para placa com meio MS ou N6 sem 2,4-D, posicionando os embriões somáticos no meio de forma a promover a sua germinação. A medida que os embriões germinaram (10 a 15 dias) foram transferidos para frascos médios (6,5 x 10,0 cm) contendo meio sem 2,4-D, onde permaneceram até atingirem o topo do frasco e/ou possuírem raízes bem desenvolvidas (aproximadamente uma a duas semanas), em ambiente com maior intensidade luminosa (lâmpadas Gro-Lux^R e Luz do Dia^R, com 3.200 lux).

Etapa III - As plântulas foram transferidas para frascos maiores (6,0 x 12,0 cm) contendo meio com a concentração de sais reduzida pela metade e sem 2,4-D, onde permaneceram por três a oito dias para promover o crescimento das raízes e aumentar o vigor das plântulas (ver Tabela 3).

A aclimação das plantas regeneradas envolveu alguns testes. As plântulas com sistema radicular bem desenvolvido foram removidas do meio de cultura, suas raízes lavadas e mergulhadas em solução fungicida (Benomil 30mg/100ml), por um a dois minutos, transplantadas para copos plásticos contendo uma mistura esterilizada de terra e vermiculite (2:1) e mantidas na sala de cultura de tecidos, com temperatura e fotoperíodos controlados, cobertas com sacos plásticos

para manutenção da umidade do ar, onde permaneceram por cinco a sete dias. Algumas plantas foram mantidas diretamente em casa-de-vegetação, em uma câmara úmida feita de madeira e coberta com plástico, contendo micro-aspersores para conservar uma alta umidade do ar.

Em seguida, as plantas foram transplantadas para vasos de cerâmica e realizou-se a aplicação de um adubo foliar (Ouro Verde - 20 g/l). Após três a sete dias as plantas em vasos de cerâmica foram transferidas para canteiro no fim do dia, para aclimação, e finalmente transplantadas para canteiro após um a três dias, realizando-se a segunda aplicação do adubo foliar. A cobertura com sulfato de amônio (granulado) foi realizada 15 e 30 dias após transferência da planta para canteiro.

As plantas em canteiro foram preferencialmente autofecundadas para obtenção de sementes R1, que serão utilizadas em estudos posteriores sobre alterações cromossômicas na progênie de plantas regeneradas.

3.4.2. Avaliação da fertilidade do pólen

Anteras de plantas regeneradas (RO) foram coletadas de diferentes pontos da inflorescência quando as primeiras anteras começaram a abrir, e imediatamente fixadas em Carnoy (3 álcool: 1 ácido acético).

Determinou-se a viabilidade do grão de pólen pela coloração de uma antera com solução de iodo (0,3% iodo + 1,0% iodeto de potássio) e, através de observação em microscópio, pela contagem dos grãos corados. Foram analisadas 3 anteras por planta, sendo contados um total de 200 grãos de pólen/antera.

A percentagem de pólen abortados é um indicador sensível do estado citológico da planta (LEE & PHILLIPS, 1987).

Também foram verificadas as possíveis alterações fenotípicas no tipo de inflorescência das plantas regeneradas (R_0), e sua relação com a fertilidade do pólen.

3.5. Análise citogenética dos calos estudados

A maioria dos estudos sobre alterações cromossômicas decorrentes do cultivo *in vitro* foram realizados em plantas regeneradas. Porém, as aberrações observadas em plantas regeneradas refletem uma fração das alterações que ocorreram durante os subcultivos ou no período de regeneração da planta. Daí a importância de se estudar o comportamento cromossômico em calos, visando uma melhor investigação dos mecanismos envolvidos na geração destas variações.

O método de preparação de lâminas com fragmentos de calos de milho, padronizado no laboratório (AGUIAR-PERECIN *et al.*, 1991; FLUMINHAN Jr., 1992; AGUIAR-PERECIN & FLUMINHAN Jr., 1992) consiste das etapas descritas a seguir.

3.5.1. Coleta de regiões meristemáticas de calos

Cinco dias após a transferência dos calos para meio novo, amostras de regiões do calo contendo pró-embriões foram coletadas e fixadas em Carnoy (3 partes de álcool etílico:1 parte de ácido acético glacial p.a.) para análise de anáfases.

Para análise de metáfases, os calos foram pré-tratados com 8-hidroxiquinolina 0,002M por 2-2,5 horas e posteriormente transferidos para o fixador, onde permaneceram por uma noite, em temperatura ambiente. Após esse período, uma parte da amostra foi transferida para álcool 70% para procedimento de coloração pelo método de Feulgen, e outra parte conservada no próprio fixador para ser corada através de Bandamento-C (AGUIAR-PERECIN, 1979 e 1985). Ambas foram mantidas em geladeira (0-5°C).

Amostras de todos os subclones foram coletadas periodicamente (entre 23 e 42 meses de cultivo), realizando-se simultaneamente a análise de anáfases e metáfases para cada subclone, na tentativa de relacionar anormalidades na anáfase com alterações no cariótipo.

3.5.2. Coloração pelo Método de Feulgen

O material fixado em Carnoy e transferido para álcool 70% foi retirado da geladeira, deixando-se atingir a temperatura ambiente, e lavado em água destilada por aproximadamente 3 minutos.

Em seguida foi feita a hidrólise em HCl 1N durante 7 minutos, a 60°C, lavagem em água destilada por 3 minutos e transferência para reativo de Schiff, permanecendo por 45 minutos. Após esse período o material foi lavado em água corrente por aproximadamente 5 minutos.

Fragmentos pequenos do material foram tratados em solução enzimática de pectinase (2,5 ou 5%) por 5-10 minutos a 37°C, sobre placa de aquecimento, lavados em água destilada (5 minutos) e macerados em ácido acético 45% (10 minutos). Os pró-embriões somáticos foram separados sob lupa e esmagados em carmim acético 1%, na preparação da lâmina.

3.5.3. Metodologia de Bandamento-C

A coloração através de metodologia de bandamento-C foi realizada segundo o procedimento estabelecido por AGUIAR-PERECIN (1985) e AGUIAR-PERECIN & VOSA (1985).

Os materiais fixados em Carnoy foram macerados em ácido acético por 10-15 minutos. Após a separação dos embriões somáticos, os fragmentos foram esmagados em ácido acético a 45% e as lâminas foram observadas em microscópio de contraste de fase. A seguir, as lamínulas foram removidas em ácido acético 45% e secas ao ar. As lâminas e lamínulas foram conservadas em álcool absoluto a 40°C até o procedimento de coloração (tempo mínimo - 12 horas). Os materiais foram retirados da geladeira, esperando-se atingir a temperatura ambiente.

Após secagem ao ar, as lâminas foram incubadas em solução saturada de hidróxido de bário (Ba(OH)_2) a 37°C por 25 minutos, lavadas em água desmineralizada, incubadas em solução salina 2x SSC à temperatura ambiente (cloreto de sódio 0,3M + citrato de sódio 0,03M) por cinco minutos e em seguida transferidas para cubas contendo 2x SSC a 60°C , onde permaneceram por 60 minutos. Após estes tratamentos, as lâminas foram lavadas em água desmineralizada, imersas em uma série de álcoois: 70%, 95% e absoluto, e secas ao ar. A coloração foi feita com solução Giemsa (Gurr s R 66 Giemsa) a 1% (em solução tampão pH 6,8) por um tempo variável de 2 a 3 minutos. Finalmente, as lâminas foram lavadas em água desmineralizada, secas ao ar e montadas em Bálsamo do Canadá.

3.5.4. Análise de metáfases de plantas controle da cultura de tecidos

Metáfases de ponta de raiz de plantas controle da cultura de tecido foram coradas pela metodologia de bandamento-C. Sementes das plantas controle da cultura de tecidos foram germinadas em *Sphagnum* em banho-maria a 28°C . Após dois dias, em média, as raízes apresentavam 2 a 3 cm de comprimento e foram coletadas em Hidroxiquinolina 0,03% (0,002M), onde permaneceram por duas horas e meia, sendo posteriormente transferidas para fixador Carnoy. Depois de 12 horas em temperatura ambiente, foram transferidas para geladeira. O

procedimento para coloração de bandas-C foi semelhante ao utilizado para fragmentos de calos, descrito anteriormente.

3.5.5. Análise de anáfases mitóticas dos calos

Para análise da frequência de pontes nas anáfases coradas foram coletadas periodicamente amostras de regiões diferentes de cada subclone e foram analisadas 50 anáfases iniciais e/ou típicas/subclone/meio, em três repetições, coradas pelo método de Feulgen.

Na determinação da frequência de pontes não se levou em consideração anáfases muito iniciais ou muito tardias, conforme será descrito mais adiante.

O envolvimento de regiões heterocromáticas na formação de pontes foi investigado através da observação de anáfases coradas pelo bandamento-C.

3.5.5. Análise morfométrica dos cromossomos

A fim de se verificarem alterações grosseiras no cariótipo, foram analisadas metáfases e prómetáfases coradas pelo bandamento-C. Para esta análise consideraram-se apenas as células aparentemente intactas.

As metáfases com cromossomos bem espalhados e apresentando coloração de banda-C nítida foram selecionadas e

fotografadas, com o uso do fotomicroscópio Zeiss, com aumento 100 x 1,25 x 3,2. O filme utilizado foi Agfa COPEXPAN A.H.U. TRI 13.

Os cromossomos das células dos calos foram comparados com os cromossomos de células de ponta de raiz das plantas controle da cultura de tecidos.

Os parâmetros avaliados para todos os cromossomos que aparentemente não sofreram alterações foram: relação de braços (RB) e comprimento relativo dos cromossomos (CR).

Os valores de relação de braços e comprimento relativo foram estimados de acordo com a metodologia descrita por AGUIAR-PERECIN & VOSA (1985) apresentada a seguir:

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

Para cada metáfase foi calculada a média da relação de braços dos dois cromossomos de cada par de homólogos.

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

$$\text{Comprimento Relativo} = \frac{\text{comprimento absoluto}}{\text{comp. absoluto do cr. 10}} \times 100$$

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

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

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

3.5.6. Análise estatística

Foi realizada uma análise de variância para comparação do comprimento relativo e relação de braços de todos os cromossomos dos calos 12-F e 3-57 e seus respectivos controles, exceto para os cromossomos 7 e 9 que sofreram alterações, conforme será descrito adiante. Esta análise foi realizada com o objetivo de avaliar possíveis alterações que pudessem ter ocorrido nos cromossomos e que não foram detectadas visualmente, através do bandamento-C.

Os cromossomos 7 e 9 que sofreram alterações foram avaliados separadamente.

Dada a estrutura dos dados, com número de repetições variável para cada combinação de fatores (o número de metáfases analisadas foi diferente para cada genótipo), e sob a orientação do colega Antonio Augusto F. Garcia, a análise de variância foi feita pelo método dos quadrados mínimos, mas sem uso das expressões tradicionais.

Os dados obtidos através dos índices acima citados foram analisados segundo delineamento inteiramente casualizado, pelo programa SAS (Statistical Analysis System), através de sua rotina GLM (General Linear Models Procedure) (SAS, 1988). Este programa fornece quatro tipos de análises de variância, de acordo com vários tipos de hipóteses testáveis estatisticamente. Como neste caso os tipos coincidem, foi utilizada a análise do Tipo I, que compara as médias dos níveis dos fatores, sem fazer a ponderação das médias (IEMMA, 1993).

Uma vez detectada significância da diferença entre os níveis pelo teste Tipo I, optou-se pela utilização do teste de Tukey, onde, embora haja apenas uma aproximação para o número de repetições pela média harmônica, esta é compensada pelo grande rigor do teste (SAS, 1988).

4. RESULTADOS

4.1. Aspectos morfológicos da cultura

Os calos dos dois genótipos testados apresentaram as características descritas na literatura correspondentes ao Tipo II (ARMSTRONG & GREEN, 1985). Mostraram-se friáveis e altamente embriogênicos, com numerosos embriões globulares em sua superfície, e com taxa de crescimento relativamente alta (Figuras 1 e 2).

Os calos foram de maneira geral semelhantes entre si, porém a taxa de embriogênese foi sensivelmente maior nos subclones mantidos em meio N6 com 12mM de L-prolina.

Foi observada uma variação na frequência de embriões somáticos, como se existisse um ciclo de embriogênese durante os subcultivos. Os calos formavam muitos embriões somáticos em sua superfície. Quando estes embriões eram transferidos para meio de regeneração (sem 2,4-D), germinavam dando origem a plântulas. Porém, quando permaneciam no meio de manutenção (com 2,4-D) os embriões "regrediam", formando uma massa celular que posteriormente voltava a apresentar embriões somáticos em sua superfície.

Após quatro anos em cultivo, a sublinhagem 1-MS1 do calo 3-57 apresentou setores não embriogênicos e brilhantes em determinados pontos da placa.

Figura 1. Subclones do calo 12-F mantidos em meio MS2 (a) e N6 (b), após 4 e 5 anos de cultivo *in vitro*, respectivamente.

Figura 2. Subclones do calo 3-57 mantidos em meio MS2 (a) e N6 (b), após cinco anos de cultivo *in vitro*.

4.2. Análise de aberrações cromossômicas em calos de milho

4.2.1. Alterações observadas em anáfases mitóticas

Através da análise de anáfases coradas pelo método de Feulgen foi feito um levantamento do tipo e frequência de anormalidades mitóticas nos diferentes subclones mantidos nos meios MS e N6, durante os subcultivos, por um período de 23 a 42 meses.

As anáfases analisadas foram classificadas arbitrariamente em três estágios:

a) Anáfases iniciais - quando as cromátides irmãs estavam começando a migrar para os polos opostos da célula;

b) Anáfases típicas - quando as cromátides irmãs estavam numa fase mais adiantada de convergência para os polos, formando a figura característica da fase; e

c) Anáfases finais - quando as cromátides atingiram os pólos da célula e começam a se descondensar.

Os tipos intermediários entre essas figuras podem ser confundidos com uma certa facilidade.

A análise de anáfases finais envolve alguns riscos, pois nesta etapa a frequência dos eventos como ponte e o que denominamos de atraso na separação das cromátides (ASC), podem não ser observados, devido a uma quebra das cromátides envolvidas, mascarando os resultados. Portanto, a frequência de anormalidades foi estimada considerando-se anáfases iniciais e típicas em virtude destas

permitirem uma melhor visualização dos cromossomos, embora em anáfases iniciais os resultados obtidos também possam ser super ou subestimados devido as cromátides ainda estarem no começo do processo de separação.

Os tipos de anormalidades observadas são apresentados na Figura 3, e correspondem às mesmas configurações apresentadas por FLUMINHAN (1992):

- Aderência entre cromátides sugerindo que a mesma corresponde a um atraso na separação das cromátides (Fig. 3a);
- Pontes típicas (uma ou duas, com ou sem fragmentos) provavelmente decorrentes de cromátides dicêntricas, resultantes de cromátides quebradas que iniciaram um em ciclo de quebra-fusão-ponte. O número de anáfases com duas pontes foi muito pequeno e portanto, não foi computado separadamente (Fig. 3b, c, d);
- Anáfases com fragmentos cromossômicos, que correspondem a fragmentos acêntricos resultantes de quebras cromossômicas (Fig. 3d, f);
- Pontes que aparentemente se quebraram (Fig. 3e).

O atraso na separação das cromátides deve corresponder ao evento inicial de formação de pontes. As cromátides envolvidas neste evento apresentam-se muito coesas e com grande resistência à separação normal, conforme se observa na Figura 4. As cromátides podem sofrer um estresse em decorrência da tensão formada em virtude de estarem sendo arrastadas para polos opostos, resultando

em quebra (figura 5). As cromátides quebradas poderiam se fundir, originando um dicêntrico e iniciar um ciclo de quebra-fusão-ponte.

Portanto, ponte quebrada é uma figura difícil de se identificar com precisão, podendo ter diferentes interpretações: a) pode ser resultante da quebra efetiva de uma ponte reta ou de um ASC, ou b) de um ASC em que as cromátides unidas em um determinado ponto sofreram tensão e se separaram sem que houvesse quebra (ver figura 6).

Os resultados da análise da frequência de pontes nas anáfases observadas para cada subclone dos calos 12-F e 3-57 estão apresentados na Tabela 4 e 5, e na Figura 7. Foram consideradas como pontes as figuras de pontes típicas (simples ou duplas) e os eventos de atraso na separação das cromátides.

A ocorrência de pontes em anáfases iniciais e típicas foi observada tanto no calo 12-F quanto no calo 3-57. Entretanto, de modo geral, o calo 12-F apresentou menor frequência de pontes e atraso na separação das cromátides em relação ao calo 3-57. O atraso na separação das cromátides praticamente não foi observado nas culturas 12-F, sendo que as duas únicas figuras deste evento foram observadas no subclone 1-MS2. Por outro lado, o calo 3-57 apresentou eventos de atraso na separação de cromátides em todos os meios de cultura utilizados (ver Figura 7).

Figura 3. Tipos de anormalidades observadas em anáfases mitóticas coradas pelo método de Feulgen. a) atraso na separação das cromátides; b) uma ponte; c) duas pontes; d) pontes + fragmento; e) ponte quebrada; f) fragmento.

Figura 4. Anáfase mitótica, corada pelo método de Feulgen, apresentando um atraso na separação das cromátides, onde as cromátides apresentam grande resistência à separação.

Figura 5. Anáfases mitóticas de calos de milho, coradas pelo método de Feulgen, apresentando a) atraso na separação das cromátides e b) ponte quebrada decorrente da quebra das cromátides envolvidas em um atraso na separação das cromátides.

Figura 6. Anáfases mitóticas, coradas pelo método de Feulgen, apresentando pontes quebradas.

Figura 7. Frequência de atrasos na separação das cromátides (ASC) e de pontes nos calos 12-F e 3-57, nos meios testados.

TABELA 4. Frequência de pontes em anáfases iniciais e típicas no calo 12-F, em diferentes períodos durante o cultivo (% entre parênteses).

SUBCLONE	IDADE (MESES)	TOTAL ANÁFASES	ATRASO SEPARAÇÃO CROMÁTIDE	PONTE	TOTAL PONTE
1-MS2	23	150	1 (0,7)	3 (2,0)	4 (2,7)
	34	150	1 (0,7)	0	1 (0,7)
	40	150	0	0	0
2-MS2	23	150	0	0	0
	34	150	0	0	0
	40	150	0	0	0
3-MS2	25	150	0	0	0
	34	43	0	0	0
	40	150	0	0	0
1-MS1	26	127	0	1 (0,8)	1 (0,8)
	34	150	0	0	0
	40	150	0	0	0
2-MS1	26	150	0	2 (1,3)	2 (1,3)
	28	150	0	0	0
	29	150	0	1 (0,7)	1 (0,7)
	34	150	0	0	0
	40	150	0	0	0
1-N6	29	150	0	1 (0,7)	1 (0,7)
	34	150	0	0	0
	40	150	0	0	0
2-N6	29	150	0	2 (1,3)	2 (1,3)
	34	150	0	3 (2,0)	3 (2,0)
	40	150	0	0	0

TABELA 5. Frequência de pontes em anáfases iniciais e típicas no calo 3-57, em diferentes períodos durante o cultivo (% entre parênteses).

SUBCLONE	IDADE (MESES)	TOTAL ANÁFASES	ATRASO SEPARAÇÃO CROMÁTIDE	PONTE	TOTAL PONTE
1-MS2	27	150	2 (1,3)	3 (2,0)	5 (3,3)
	36	122	0	2 (1,6)	2 (1,6)
	42	150	0	2 (1,3)	2 (1,3)
2-MS2	27	150	2 (1,3)	9 (6,0)	11 (7,3)
3-MS2	27	150	1 (0,7)	3 (2,0)	4 (2,7)
	36	150	0	2 (1,3)	2 (1,3)
	42	150	0	2 (1,3)	2 (1,3)
1-MS1	28	50	0	1 (2,0)	1 (2,0)
	30	100	0	1 (1,0)	1 (1,0)
	31	150	3 (2,0)	2 (1,3)	5 (3,3)
	32	150	0	3 (2,0)	3 (2,0)
	33	150	2 (1,3)	5 (3,3)	7 (4,6)
	36	150	1 (0,7)	1 (0,7)	2 (1,3)
	42	150	0	0	0
2-MS1	28	150	2 (1,3)	4 (2,7)	6 (4,0)
	36	150	1 (0,7)	1 (0,7)	2 (1,3)
	42	150	0	1 (0,7)	1 (0,7)
1-N6	33	50	0	2 (4,0)	2 (4,0)
	36	24	0	2 (8,3)	2 (8,3)
	42	150	0	0	0
2-N6	33	150	3 (2,0)	3 (2,0)	6 (4,0)
	36	73	0	1 (1,4)	1 (1,4)
	42	150	1 (0,7)	2 (1,3)	3 (2,0)

Os dados obtidos mostram ainda que a frequência de pontes tende a decrescer com o tempo de cultura, na maioria das amostras das sublinhagens celulares. Após 34 meses de cultivo do calo 12-F, pontes foram observadas apenas nos subclones 1-MS2 e 2-N6.

As amostras são relativamente pequenas mas, em princípio, não mostraram uma tendência dos calos mantidos no meio MS2 (MS + 2,0 mg/l de 2,4-D) apresentarem maior frequência de aberrações cromossômicas em relação aos mantidos no meio MS1 (MS + 1,0 mg/l de 2,4-D) ou no meio N6 (com 1,5 mg/l de 2,4-D).

Semelhante ao observado quanto à frequência de pontes, foi verificado uma tendência ao decréscimo na frequência de outras anormalidades com o decorrer do tempo (tais como anáfases com fragmentos e pontes quebradas), tanto no calo 12-F quanto no 3-57, conforme pode ser observado nas Tabelas 6 e 7.

Apesar da ausência de atraso na separação de cromátides e de menor frequência de pontes no calo 12-F, foram observadas pontes quebradas e anáfases com fragmentos.

Um fato interessante ocorreu no subclone 1-MS1 do calo 3-57, onde amostras foram analisadas com maior frequência (28 a 42 meses) dando uma visão da variabilidade de eventos de instabilidade mitótica e cromossômica, que podem ocorrer durante o cultivo do calo. A frequência total de anormalidades atingiu um pico aos 31-33 meses de cultivo (8,0 a 8,6%), um dos maiores valores observados, e em seguida houve um decréscimo. Análises paralelas de metáfases coradas pelo método de bandamento-C, demonstraram que

nesse período houve uma alteração no cariótipo envolvendo cromossomos contendo knobs, o que pode ser uma evidência de que essas aberrações são consequências de eventos de instabilidade cromossômica durante a mitose.

4.2.2. Análise de metáfases coradas pela metodologia de bandamento-C

As análises de metáfases foram realizadas em todos os subclones cujas anáfases foram avaliadas, com o objetivo de se investigar a presença de aberrações cromossômicas, bem como correlações entre estas e a presença de bandas.

A frequência de metáfases observada nos subclones analisados foi relativamente pequena, sendo necessário um grande número de lâminas para obtenção de um número razoável de metáfases de boa qualidade para análise.

O método de bandamento-C mostrou-se eficiente na detecção de alterações estruturais grosseiras em cromossomos com knobs heterocromáticos. A análise de metáfases mitóticas coradas através desta metodologia revelou que embora as culturas fossem fenotipicamente semelhantes, apresentavam diferenças marcantes quanto à estabilidade cariotípica.

TABELA 6. Frequência de anormalidades em anáfases iniciais e típicas no calo 12-F, em diferentes períodos durante o cultivo (% entre parênteses).

SUBCLONE	IDADE (MESES)	ANÁFASES AVALIADAS	TOTAL PONTE	PONTE QUEBRADA	FRAG- MENTO	TOTAL ANORMAL
1-MS2	23	150	4 (2,7)	7 (4,7)	3 (2,0)	14 (9,3)
	34	150	1 (0,7)	3 (2,0)	3 (2,0)	7 (4,7)
	40	150	0	0	0	0
2-MS2	23	150	0	3 (2,0)	3 (2,0)	6 (4,0)
	34	150	0	2 (1,3)	0	2 (1,3)
	40	150	0	0	1 (0,7)	1 (0,7)
3-MS2	25	150	0	5 (3,3)	0	5 (3,3)
	34	43	0	1 (2,3)	1 (2,3)	2 (4,6)
	40	150	0	0	0	0
1-MS1	26	127	1 (0,8)	3 (2,3)	1 (0,8)	5 (3,9)
	34	150	0	2 (1,3)	4 (2,7)	6 (4,0)
	40	150	0	0	0	0
2-MS1	26	150	2 (1,3)	0	0	2 (1,3)
	28	150	0	0	0	0
	29	150	1 (0,7)	0	1 (0,7)	2 (1,4)
	34	150	0	0	1 (0,7)	1 (0,7)
	40	150	0	0	0	0
1-N6	29	150	1 (0,7)	2 (1,3)	2 (1,3)	5 (3,3)
	34	150	0	2 (1,3)	1 (0,7)	3 (2,0)
	40	150	0	0	0	0
2-N6	29	150	2 (1,3)	2 (1,3)	0	4 (2,6)
	34	150	3 (2,0)	1 (0,7)	7 (4,7)	11 (7,4)
	40	150	0	1 (0,7)	2 (1,3)	3 (2,0)

TABELA 7. Frequência de anormalidades em anáfases iniciais e típicas no calo 3-57, em diferentes períodos durante o cultivo (% entre parênteses).

SUBCLONE	IDADE (MESES)	ANÁFASES AVALIADAS	TOTAL PONTE	PONTE QUEBRADA	FRAG- MENTO	TOTAL ANORMAL
1-MS2	27	150	5 (3,3)	5 (3,3)	0	10 (6,7)
	36	122	2 (1,6)	0	0	2 (1,6)
	42	150	2 (1,3)	3 (2,0)	3 (2,0)	8 (5,3)
2-MS2	27	150	11 (7,3)	4 (2,7)	0	15 (10,0)
3-MS2	27	150	4 (2,7)	4 (2,7)	0	8 (5,3)
	36	150	2 (1,3)	2 (1,3)	1 (0,7)	5 (3,3)
	42	150	2 (1,3)	0	0	02 (1,3)
1-MS1	28	50	1 (2,0)	1 (2,0)	0	2 (4,0)
	30	100	1 (1,0)	0	2 (2,0)	3 (3,0)
	31	150	5 (3,3)	5 (3,3)	3 (2,0)	13 (8,6)
	32	150	3 (2,0)	5 (3,3)	4 (2,7)	12 (8,0)
	33	150	7 (4,7)	2 (1,3)	3 (2,0)	12 (8,0)
	36	150	2 (1,3)	1 (0,7)	0	3 (2,0)
	42	150	0	0	2 (2,0)	2 (2,0)
2-MS1	28	150	6 (4,0)	2 (1,3)	1 (0,7)	9 (6,0)
	36	150	2 (1,3)	0	0	2 (1,3)
	42	150	1 (0,7)	0	0	1 (0,7)
1-N6	33	50	2 (4,0)	0	0	2 (4,0)
	36	24	2 (8,3)	0	0	2 (8,3)
	42	150	0	0	0	0
2-N6	33	150	6 (4,0)	3 (2,0)	6 (4,0)	15 (10,0)
	36	73	1 (1,4)	0	1 (1,4)	2 (2,7)
	42	150	3 (2,0)	1 (0,7)	0	4 (2,7)

O número de metáfases e prometáfases observadas nos subclones do calo 12-F e 3-57 bem como as alterações observadas no cariótipo são apresentados nas Tabelas 8 e 9, respectivamente.

O calo 12-F aparentemente não sofreu alterações em seu cariótipo que pudessem ser detectadas pelo método de bandamento-C. Todas as metáfases analisadas eram aparentemente normais, como mostra a análise morfométrica apresentada mais adiante. Algumas metáfases dos subclones mantidos no meio MS2 foram exceção, apresentando um dos cromossomos do par 7 com amplificação em K7L (knob do braço longo do cromossomo 7), ou a banda do braço curto em posição subterminal ao invés de telomérica (Tabela 8 e Figura 8).

Por outro lado, o calo 3-57 sofreu alterações grosseiras em seu cariótipo, isto é, alterações detectáveis em metáfases mitóticas coradas através de bandamento-C. Basicamente, estavam envolvidos nestas alterações os cromossomos 7 e 9, em estado heterozigótico. Além da sua forma normal com uma banda subterminal no braço longo (K7L) e uma banda telomérica no braço curto (K7S), outros quatro tipos de cromossomos 7 foram observados (Tabela 9 e Figura 9).

TABELA 8. Número de metáfases e prometáfases observadas no calo 12-F e alterações no cromossomo 7, sempre em estado heterozigoto.

SUBCLONE	IDADE (MESES)	NÚMERO OBSERVADO		CARIÓTIPO
		METÁFASES	PROMETÁFASES	
1-MS2	25	07	03	Amplificação em K7L
		02	04	Normal
	28	02	02	Normal
	34	03	01	Amplificação em K7L
		02	01	Normal
2-MS2	26	04	02	Normal
	28	10	03	Normal
	34	06	07	Normal
3-MS2	25	04	02	K7S subterminal
	28	20	07	Normal
1-MS1	26	01	01	Normal
	29	12	07	Normal
2-MS1	26	21	07	Normal
	28	64	17	Normal
	29	22	5	Normal
	34	01	03	Normal
1-N6	29	18	09	Normal
	34	32	14	Normal
2-N6	29	17	21	Normal
	31	58	30	Normal
	34	40	28	Normal
	40	9	6	Normal
		355	180

Figura 8. Métafases de subclones do calo 12-F, coradas através de bandamento-C, apresentando a) cromossomos 7 normais; b) um dos cromossomos do par 7 com uma amplificação no braço longo, e c) com 7KS subterminal.

TABELA 9. Número de metáfases (M) e prometáfases (PM) observadas no calo 3-57, e alterações dos cromossomos 7 e 9, sendo todas em estado heterozigoto (exceto algumas metáfases do subclone 1-MS1 com 42 meses de idade).

SUB-CLONE	IDADE (MESES)	N. OBSERVADO		ALTERRAÇÕES
		M	PM	
1-MS2	32	03	01	K7S subterminal e 9 normal
	36	02	-	K7S subterminal e 9 normal
2-MS2	27	04	-	7 três bandas e 9 normal
		02	-	7 três bandas + segmento eucromático terminal e 9 normal
3-MS2	31	06	-	7 três bandas e ausência de K9S
	32	02	-	7 três bandas e ausência de K9S
1-MS1	30	04	03	7 normal e 9 normal
	31	09	05	7 três bandas, ausência de K9S e micro
		05	06	7 três bandas, K9S subterminal e micro
	32	27	-	7 três bandas, K9S subterminal e micro
	33	-	01	7 três bandas, K9S subterminal e micro
	42	16	06	7 três bandas, K9S subterminal e micro
		16	02	7 três bandas, K7S amplificado K9S subterminal e micro
2-MS1	33	02	02	7 três bandas e ausência de K9S
1-N6	33	07	03	K7S subterminal e 9 normal
	42	04	-	K7S subterminal e 9 normal
2-N6	33	06	03	K7S subterminal e 9 normal
	36	04	01	K7S subterminal e 9 normal
				7 três bandas + segm. eucr. term. e 9 normal
	42	12	09	7 três bandas + segm. eucr. term. e 9 normal
		02	02	7 três bandas e 9 normal
TOTAL		133	44	

Figura 9. Metáfases de subclones do calo 3-57 apresentando alterações nos cromossomos 7 ($\longrightarrow$) e 9 ($\rightarrow$), e presença de microcromossomo ($\blacktriangleright$). a) 7 com três bandas e 9 normal (7A 9N); b,c) 7 com três bandas, K9S subterminal e micro (7A 9B + micro); d) 7 com três bandas + segmento eucromático terminal e 9 normal (7B 9N); e) K7S subterminal e 9 normal (7C 9N); f) 7 com três bandas, K7S amplificado K9S subterminal e micro (7A 7D 9B + micro).

Figura 9

O tipo mais frequente (designado 7A) foi o cromossomo 7 com três bandas, que corresponde a uma deficiência e duplicação no braço curto incluindo a banda, (Figura 9a, 9b, 9c e 9f). Esta aberração tinha o mesmo aspecto da aberração observada anteriormente neste calo (FLUMINHAN Jr., 1992). O segundo tipo (7B) consistia de um cromossomo semelhante ao anterior mas, sem a presença da banda terminal no braço curto (Figura 9e). O terceiro tipo de cromossomos 7 alterado observado (7C) apresentou duas bandas no braço curto e um segmento eucromático terminal no braço contendo a deficiência e duplicação (Figura 9d). Nestes três casos as alterações eram em estado heterozigótico, ou seja, apenas um dos cromossomos do par 7 sofreu alteração e o outro aparentemente permaneceu normal.

O quarto tipo (7D) ocorreu em algumas células do subclone 1-MS1 que já apresentavam um dos elementos do par 7 com alteração do tipo 7A, e consistia em um cromossomo com um braço menor sem banda e outro maior com uma banda amplificada subterminal (Figura 9f).

O cromossomo 9, que neste genótipo possuía uma banda-C grande no braço curto (K9S) apresentou deficiência terminal no braço curto e ausência de K9S (designado 9A), ou com 9KS subterminal e parcialmente deficiente (9B). Semelhante ao observado no cromossomo 7, apenas um dos cromossomos do par 9 sofreu alteração (veja Figura 9).

Os cromossomos 7 e 9 normais foram representados por 7N e 9N, respectivamente.

Foram elaboradas hipóteses dos possíveis mecanismos para explicar a ocorrência dos diversos tipos de cromossomos alterados, que serão discutidas mais adiante.

Os demais cromossomos eram aparentemente normais, com poucas exceções, como será comentado mais adiante, a respeito dos dados referentes à análise morfométrica.

A análise das amostras dos subclones coletadas periodicamente durante o subcultivo, permitiram a avaliação do comportamento cromossômico no decorrer do tempo de cultura, por um período de aproximadamente 2 a 4 anos. As Figuras 10 e 11 mostram o diagrama das alterações estruturais observadas em metáfases mitóticas, coradas através da metodologia de bandamento-C, das amostras coletadas em diferentes períodos durante o cultivo dos calos 12-F e 3-57, respectivamente. Devido à baixa frequência de metáfases nas lâminas analisadas, em algumas coletas foi impossível a obtenção de figuras metafásicas ou mesmo de prometáfases e prófases.

Conforme se observa na Figura 10, todos os subclones do calo 12-F apresentaram seu cariótipo inalterado, exceto os subclones 1-MS2 e 3-MS2. É interessante notar que mesmo após aproximadamente três anos de cultivo, este calo apresentava-se sem alterações visíveis no cariótipo, apesar da análise de anáfases coradas pelo método de Feulgen mostrar a ocorrência de pontes e outras anormalidades na anáfase nas amostras analisadas.

Figura 10. Pedigree do calo 12-F. Análise de metáfases mitóticas de amostras do calo 12-F coletadas periodicamente, coradas através da metodologia de bandamento-C. São apresentadas as alterações observadas no cromossomo 7. Os números (1, 2, 3 e 4) representam os subclones mantidos nos respectivos meios de cultura. Nos subclones 1-MS2 e 3-MS2 foram observadas alterações em um dos cromossomos do par 7, envolvendo amplificação do knob do braço longo e uma duplicação no braço curto, respectivamente (setas). Nos demais subclones não foram detectadas alterações cromossômicas.

Figura 10

Figura 11. Pedigree do calo 3-57. Análise de metáfases mitóticas de amostras do calo 3-57 coletadas 15-42 meses após o início da cultura, coradas através da metodologia de bandamento-C. São apresentados os cromossomos 7 e 9 que sofreram alterações durante o cultivo *in vitro*. Os números (1, 2, 3 e 4) representam os subclones mantidos nos respectivos meios de cultura. Em todos os subclones observou-se alterações no braço curto de um dos cromossomos do par 7 (exceto o subclone 1-MS1 aos 42 meses, onde os dois cromossomos 7 apresentaram alterações). O cromossomo 9 apresentou-se com alterações envolvendo o knob do braço curto (K9S) nos subclones 3-MS2, 1-MS1 e 2-MS1, sempre em estado heterozigótico. Nota-se presença de um micro-cromossomo no subclone 1-MS1 que se manteve estável na cultura.

meses

15-18

Figura 11

O subclone 1-MS2 apresentou a ocorrência simultânea de células com cariótipos normais e alterados (com uma duplicação no knob do braço longo) nas amostras analisadas (Figura 8 e 10).

Outra alteração no cromossomo 7 foi observada no subclone 3-MS2 do calo 12-F. Aos 25 meses após o início da cultura foi observada a presença de células com um dos cromossomos do par 7 apresentando a banda do braço curto em posição subterminal (Figura 8 e 10).

A análise prévia de 27 metáfases e prometáfases do calo 3-57 coradas através da metodologia de bandamento-C, realizada após 15 e 18 meses de cultura, quando este era mantido apenas no meio MS2, revelou a ocorrência de dois tipos de alterações no cromossomo 7: a) deficiência e duplicação no braço curto, envolvendo o knob e resultando num cromossomo com três bandas, alteração mais frequente (25 das 27 metáfases e prometáfases); b) perda da banda extra do braço curto. Todos os outros cromossomos do cariótipo aparentemente estavam inalterados. Apenas um dos cromossomos do par 7 sofreu alteração. Células com os dois cromossomos 7 normais não foram observadas (FLUMINHAN Jr., 1992; AGUIAR-PERECIN & FLUMINHAN Jr., 1992).

Após estas observações, os calos foram subdivididos em subclones e passaram a ser mantidos em três meios diferentes (MS2, MS1 e N6). Foram observadas diferenças no comportamento cromossômico entre os subclones, especialmente em relação aos cromossomos 7 e 9 (Figura 11).

Em alguns subclones do calo 3-57 analisados a alteração observada manteve-se em todos os subcultivos subsequentes. Isto foi observado nos subclones 1-MS2 e 1-N6 que apresentaram o cromossomo 7 com um segmento eucromático terminal no braço curto em todas as células analisadas; e no subclone 3-MS2 que apresentou o cromossomo 7 com três bandas e o cromossomo 9 com uma banda subterminal no braço curto. Isto sugere que os cromossomos que sofreram alterações aparentemente se estabilizaram na cultura (Figura 12 e 13).

Entretanto, alguns subclones apresentaram alternância entre os tipos de alterações nos cromossomos 7 e/ou 9 durante os subcultivos, ou mesmo parte da amostra apresentava um tipo de alteração e outra parte outro tipo, como se pode observar nos subclones 1-MS1, 2-MS2 e 2-N6 (Figuras 12, 13 e 14).

Nas amostras do subclone 1-MS1 detectou-se sempre a presença do cromossomo 7 com três bandas inalterado, mas o outro elemento do par 7 que não havia sofrido alterações apresentou-se, nas metáfases analisadas aos 42 meses de cultura, com um braço menor sem banda e um braço maior com uma banda amplificada (Figura 14).

Com relação ao cromossomo 9, aos 31 meses, dois tipos de alterações foram observadas: perda do knob 9S e presença de uma banda menor que o normal, em posição subterminal no braço curto. O outro cromossomo 9 permaneceu sem alterações que pudessem ser detectadas.

Análises de metáfases de amostras deste subclone, coletadas subsequentemente, mostrou que o cromossomo 9 com banda subterminal aparentemente predominou e não se observou mais o cromossomo sem a banda nas subculturas seguintes.

Além dessas alterações, aos 31 meses de cultura observou-se a presença de um micro-cromossomo, que se manteve presente em todas as células analisadas nas subculturas subsequentes, que deve ser resultante de ciclos de quebra-fusão-ponte envolvendo provavelmente o cromossomo 9, porque os demais cromossomos são aparentemente normais (Figura 9f e 14).

As análises citológicas de amostras dos subclones 2-MS2 e 2-N6 do calo 3-57 revelaram casos de ocorrência simultânea de células com diferentes alterações em um dos cromossomos do par 7, indicando a ocorrência de ciclos de quebra-fusão-ponte (Figuras 12 e 13). Em ambos os casos o cromossomo 9 permaneceu aparentemente inalterado.

Nos subclones 3-MS2 e 2-MS1, um dos cromossomos 9 apresentou deficiência no braço curto, perdendo o knob (Figuras 12 e 14).

4.2.3. Análise estatística dos cariótipos estudados

Os cromossomos dos calos de milho investigados foram medidos para melhor avaliação das aberrações descritas, bem como para investigação de possíveis alterações nos cromossomos sem banda ou com bandas pequenas aparentemente normais através de simples observação ao microscópio.

Figura 12. Detalhe do pedigree do calo 3-57 mostrando o comportamento cromossômico dos subclones mantidos no meio MS2.

Figura 13. Detalhe do pedigree do calo 3-57 mostrando o comportamento cromossômico dos subclones mantidos no meio N6.

Figura 14. Detalhe do pedigree do calo 3-57 mostrando o comportamento cromossômico dos subclones mantidos no meio MS1.

Foram realizadas análises dos cromossomos de células de ponta de raiz de plantas da linhagem de onde se derivaram as culturas, arbitrariamente designadas controle da cultura de tecidos (CCT).

As Tabelas 10 e 11 mostram as médias dos valores do comprimento relativo (em relação ao cromossomo 10) e da relação de braços, respectivamente, dos cromossomos do calo 12-F, 3-57 e dos controles da cultura de tecidos que não apresentaram alterações detectáveis visualmente, bem como os resultados do teste de Tukey. Nesta análise estão incluídos os cromossomos 7 e 9 com aparência normal.

Os resultados da análise de variância para cada um dos cromossomos são apresentados nas Tabelas 12 e 13. Os dados revelam que não houve diferenças entre os cromossomos das células em cultura e de células de pontas da raiz obtidas de sementes dos controles da cultura de tecidos com relação aos índices cromossômicos avaliados.

Apesar dos cromossomos 3, 6 e 8 apresentarem knobs não foram detectadas alterações nestes cromossomos em nenhum dos subclones analisados.

Os cromossomos 7 e 9 normais do calo 12-F, do calo 3-57 e seus respectivos controles da cultura de tecidos não diferiram estatisticamente entre si.

Foram medidos os cromossomos 7 e 9 alterados para melhor interpretação dos possíveis mecanismos que teriam causado estas aberrações, conforme será discutido adiante.

Tabela 10. Comprimento relativo dos cromossomos do calo 12F, do calo C57 e seus respectivos controles, expresso em percentagem do cromossomo 10. Entre parênteses número de metáfases analisadas.

CROMOSSOMO *											
	1	2	3	3K	4	5	6	7	8	9	10
12F	182,8 A (23)	153,4 A (23)	145,6 A (21)	157,9 A (23)	142,9 A (23)	133,1 A (24)	128,0 A (24)	161,3 A (24)	130,3 A (23)	110,0 A (23)	100,0 (24)
C57	177,7 A (35)	155,8 A (33)	148,7 A (36)	-	142,7 A (35)	133,3 A (36)	129,2 A (36)	158,8 A (25)	128,3 A (36)	-	136,2 A (34)
OCT-13342	181,3 A (12)	153,8 A (12)	146,2 A (12)	163,1 A (10)	140,4 A (12)	134,8 A (12)	127,8 A (12)	160,2 A (12)	133,7 A (12)	113,0 A (12)	100,0 (12)
OCT-1315	180,4 A (12)	152,0 A (12)	142,7 A (12)	-	137,4 A (12)	130,7 A (12)	126,0 A (12)	155,5 A (12)	129,6 A (12)	130,4 A (12)	100,0 (12)
DMS	9,25	7,91	7,79	6,84	6,89	7,30	8,54	23,84	6,97	9,25	9,25

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

DMS = Diferença mínima significativa.

Tabela 11. Relação de braços dos cromossomos do calo 12F, do calo C57 e seus respectivos controles.

CROMOSSOMO *												
	1	2	3	3K	4	5	6	7	8	9	9K	10
12F	1,23 A (23)	1,35 A (23)	1,54 A (21)	1,84 A (23)	1,32 A (23)	1,05 A (24)	1,68 A (24)	1,79 A (24)	2,34 A (23)	1,50 A (23)	-	1,62 A (24)
C57	1,24 A (35)	1,31 A (33)	1,61 A (36)	-	1,34 A (35)	1,04 A (36)	1,64 A (36)	1,75 A (25)	2,42 A (36)	-	0,94 A (34)	1,61 A (36)
OCT-13342	1,22 A (12)	1,36 A (12)	1,65 A (12)	1,94 A (12)	1,37 A (12)	1,03 A (12)	1,67 A (12)	1,76 A (12)	2,28 A (12)	1,54 A (12)	-	1,62 A (12)
OCT-1315	1,24 A (12)	1,39 A (12)	1,61 A (12)	-	1,34 A (12)	1,02 A (12)	1,65 A (12)	1,83 A (12)	2,37 A (12)	-	0,91 A (12)	1,57 A (12)
DMS	0,07	0,10	0,12	0,15	0,09	0,03	0,11	0,26	0,15	0,12	0,12	0,08

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

DMS = Diferença mínima significativa.

Tabela 12. Quadro geral da análise de variância do comprimento relativo dos cromossomos do calo 12F, do calo C57 e seus respectivos controles.

CROMOSSOMO																	
		1		2		3		3K		4		5		6		8	
FV	GL	QM	GL	QM	GL	QM	GL	QM	GL	QM	GL	QM	GL	QM	GL	QM	QM
TRAT.	3	130,94	3	55,46	3	120,62	1	190,67	3	100,43	3	35,22	3	32,90	3	88,42	
RESIDUO	78	103,91	76	75,39	77	72,64	31	78,31	78	57,67	80	65,61	80	89,77	79	59,21	

Tabela 13. Quadro geral da análise de variância da relação de braços dos cromossomos do calo 12F, do calo C57 e seus respectivos controles.

CROMOSSOMO																	
FV	1		2		3		3K		4		5		6		8		
	GL	QM	GL	QM	GL	QM	GL	QM	GL	QM	GL	QM	GL	QM	GL	QM	
TRAT.	3	0,0013	3	0,0194	3	0,0335	1	0,0623	3	0,0065	3	0,0017	3	0,0106	3	0,0731	
RESIDUO	78	0,0066	76	0,0194	77	0,0168	31	0,0376	78	0,0010	80	0,001	80	0,0141	79	0,0287	

Nesta análise foram comparados os valores de distância entre o centrômero e a banda do braço longo (DCBL), tamanho da banda do braço longo (TBL), distância centrômero-banda do braço curto (DCBSI), tamanho da banda do braço curto (TBSI), distância centrômero-banda extra do braço curto (DCBSII) e tamanho da banda extra do braço curto (TBSII), conforme o caso.

As médias dos valores correspondentes a cada um desses parâmetros relativos ao cromossomo 7 do calo 12-F juntamente com os resultados do teste de Tukey são apresentadas na Tabela 14. O quadro geral da análise de variância é apresentado na Tabela 15.

Os resultados obtidos mostraram que o tamanho da banda do cromossomo 7 que aparentemente sofreu amplificação no knob do braço longo foi maior que o tamanho normal mas não chegou a ser o dobro do tamanho, indicando uma duplicação parcial do knob. É interessante ressaltar que não houve diferenças significativas entre os cromossomos 7 normais e alterados com relação à distância entre o centrômero e a banda do braço longo.

Apenas uma metáfase que apresentou a banda do braço curto em posição subterminal (K7S subterminal) foi incluída nesta análise. O tamanho do braço curto deste cromossomo foi significativamente maior em relação aos outros tipos de cromossomos 7 do calo 12-F, contudo o tamanho da banda do braço curto foi um pouco maior que o normal mas não diferiu significativamente.

Tabela 14. Médias dos valores do comprimento relativo (CR), relação de braços (RB), braço longo (BL), braço curto (BC), distância centrômero-banda do braço longo (DCBL), tamanho da banda do braço longo (TBL), distância centrômero-banda do braço curto (DCBS) e tamanho da banda do braço curto (TBS) dos cromossomos 7 do calo 12F e seu respectivo controle. As letras à direita representam o teste de Tukey (5%). Médias com a mesma letra não diferem significativamente.

CROMOSSOMO	Nº METÁF.	CR	RB	BL	BC	DCBL	TBL	DCBS	TBS
7N - 12F	24	161,33 B	1,79 A	102,58 A	59,50 B	58,29 A	27,38 AB	39,50 A	19,08 A
K7L ALT - 12F	03	162,67 B	1,90 A	105,33 A	57,00 B	53,00 A	35,33 A	39,00 A	18,33 A
K7S ALT - 12F	01	189,00 A	1,10 B	103,00 A	86,00 A	59,00 A	27,00 AB	45,00 A	23,00 A
7N CCT-13342	12	160,17 B	1,75 A	102,83 A	59,75 B	59,50 A	25,75 B	40,42 A	17,92 A
DMS *		22,90	0,33	19,32	13,53	12,45	8,40	8,73	6,59

* DMS = diferença mínima significativa.

Tabela 15. Quadro geral da análise de variância do comprimento do braço longo (BL), comprimento do braço curto (BC), distância centrômero-banda do braço longo (DCBL), tamanho da banda do braço longo (TBL), distância centrômero-banda do braço curto (DCBS) e tamanho da banda do braço curto (TBS) dos cromossomos 7 do calo 12F (normal, K7L amplificado e K7S subterminal) e seu respectivo controle (CCT-13342).

FV	GL	QM					
		BL	BC	DCBL	TBL	DCBS	TBS
TRAT.	3	6,74	241,75	34,01	73,81**	11,82	9,85
RESIDUO	36	70,61	34,62	29,33	13,35	14,41	8,21

** significativo a 1% pelo teste F.

Estas medidas foram utilizadas para a obtenção do idiograma dos tipos de cromossomos 7 observados em amostras do calo 12-F apresentado na Figura 15.

Conforme descrito anteriormente, o calo 3-57 apresentou alterações diferentes nos cromossomos do par 7. As médias dos valores dos parâmetros utilizados nas análises de cromossomos alterados e os resultados do teste de Tukey são apresentadas na Tabela 16.

Os cromossomos dos tipos 7A e 7B observados em subclones diferentes (veja Tabela 9 e Figura 11) foram analisados assumindo-se que estes cromossomos tiveram a mesma origem nos vários subclones.

Estas médias foram utilizadas para a obtenção do idiograma dos tipos de cromossomos 7 observados no calo 3-57, apresentados na Figura 16.

Os cromossomos 7 alterados do calo 3-57 dos tipos 7A, 7B e 7C, não apresentaram diferenças significativas entre si para a distância centrômero-banda do braço longo (DCBL), o tamanho da banda do braço longo (TBL), a distância centrômero-banda do braço curto (DCBSI) e o tamanho da banda do braço curto (TBSI) (figura 16).

Entretanto, quando estes foram comparados aos cromossomos normais observados em amostras do calo 3-57 e em células de ponta de raiz do controle da cultura de tecidos (CCT-1315) foi observada uma diferença pequena, mas significativa, com relação ao tamanho da banda do braço curto do cromossomo tipo 7B, que apresentou a banda do braço curto em posição subterminal (Tabela 16 e 17).

Figura 15. Idiograma representando os tipos de cromossomos 7 observados no calo 12-F.

Tabela 16. Médias dos valores do comprimento relativo (CR), relação de braços (RB), braço longo (BL), braço longo (BL), braço curto (BC), distância centrômero-banda do braço longo (DCBL), tamanho da banda do braço longo (TBL), distância centrômero-banda do braço curto (DCBSI), tamanho da banda extra do braço curto (TBSI), distância centrômero-banda extra do braço curto (DCBSII) e tamanho da banda do braço curto (TBSII) dos cromossomos 7 do calo C57 e seu respectivo controle. As letras à direita representam o teste de Tukey (5%). Médias com a mesma letra não diferem significativamente.

CROMOSSOMO	Nº METÁF.	CR	RB	BL	BC	DCBL	TBL	DCBSI	TBSI	DCBSII	TBSII
7N	25	158,76 D	1,75 A	100,52 A	57,92 D	57,48 A	27,20 A	38,08 A	19,76 B	-	-
7A	25	205,60 B	0,93 D	98,16 A	108,20 B	58,88 A	25,92 A	36,56 A	17,36 BC	88,04 A	21,04 A
7B	04	185,75 C	1,20 C	100,00 A	87,25 C	55,00 A	29,25 A	41,75 A	13,75 C	-	-
7C	05	225,60 A	0,82 D	101,60 A	123,80 A	55,00 A	27,60 A	39,00 A	17,20 BC	95,60 A	16,40 A
7D	07	149,43 D	1,38 B	62,00 B	86,00 C	-	-	35,57 A	30,86 A	-	-
7N CCT-1315	12	155,50 D	1,83 A	133,00 A	55,00 D	55,58 A	26,17 A	38,00 A	17,25 BC	-	-
DMS *		17,07	0,16	8,98	11,95	7,72	6,62	6,63	4,53	8,54	19,16

* DMS = diferença mínima significativa.

Figura 16. Idiograma representando os tipos de cromossomos 7 observados no calo 3-57. 7N = cromossomo 7 normal; 7A = 7 com três bandas; 7B = K7S subterminal; 7C = 7 com três bandas mais um segmento eucromático terminal; 7D = K7S amplificado e ausência de K7L.

Um fato interessante é que os dois tipos de cromossomos 7 que apresentaram três bandas, 7A e 7C (veja Figura 16), diferiram quanto ao comprimento do braço curto porém não apresentaram diferenças significativas com relação à distância centrômero-banda extra do braço curto (DCBSII) e ao tamanho da banda extra do braço curto (TBSII), o que sugere que estes podem ter se originado de um mesmo ciclo de quebra-fusão-ponte.

Os dados da análise morfométrica relativos ao cromossomo 7 que aparentemente apresentava uma banda amplificada no braço maior e ausência da banda no braço menor (tipo 7D), revelaram que a distância centrômero-banda é semelhante à observada para distância centrômero banda do braço curto dos outros tipos de cromossomos alterados e que o tamanho da banda corresponde aproximadamente a duas vezes o tamanho da banda do braço curto observado nos outros tipos de cromossomos 7.

Portanto, é possível que o braço menor corresponda na realidade ao braço longo e o braço maior corresponda ao braço curto, que sofreram deficiência e duplicação, respectivamente. O esquema representativo do possível mecanismo para obtenção deste tipo de alteração é apresentado mais adiante (veja Figura 31).

Com relação ao cromossomo 9, o idiograma apresentando os tipos observados é apresentado na Figura 17. Os dados da Tabela 18 mostram que os cromossomos 9 normais do calo 3-57 não diferiram dos observados no controle da cultura de tecido (CCT-1315) pelo teste de Tukey a nível de 5%. Por outro lado, os dois tipos de

cromossomos 9 alterados diferiram entre si em todos os parâmetros testados. Entretanto, o cromossomo que apresentou K9S em posição subterminal (tipo 9B) não apresentou diferenças significativas em relação ao cromossomo normal das células do calo, exceto para o tamanho da banda que correspondeu aproximadamente à metade do tamanho da banda normal.

O quadro geral da análise de variância para a distância centrômero-banda do braço curto (DCBS) e o tamanho da banda do braço curto (TBS) dos cromossomos 9 (normal, 9B e CCT-1315) do calo 3-57 é apresentado na Tabela 19. Os resultados revelaram que as distâncias entre o centrômero e a banda do braço curto não diferiram significativamente pelo teste F. No entanto, o tamanho da banda apresentou diferenças significativas pelo teste F ao nível de 1%. Isto sugere que a quebra cromossômica ocorreu possivelmente no knob heterocromático, conforme será discutido.

Tabela 17. Quadro geral da análise de variância para os valores do braço longo (BL), braço curto (BC), distância centrômero-banda do braço longo (DCBL), tamanho da banda do braço longo (TBL), distância centrômero-banda do braço curto (DCBSI) e tamanho da banda do braço curto (TBSI) dos cromossomos 7 do calo 3-57 (7N, 7A, 7B e 7C) e seu respectivo controle (CCT-1315).

FV	GL	QM					
		BL	BC	DCBL	TBL	DCBSI	TBSI
TRAT.	4	24,83	12.306,98**	36,52	13,73	27,62	42,45**
RESIDUO	66	38,20	68,29	30,88	22,72	20,01	9,28

** significativo a 1% pelo Teste F.

Figura 17. Idiograma representando os tipos de cromossomos 9 observados no calo 3-57. 9N = 9 normal; 9A = ausência de K9S; 9B = K9S subterminal.

Tabela 18. Médias dos valores do comprimento relativo (CR), relação de braços (RB), relação de braços (BL), braço longo (BL), braço curto (BC), distância centrômero-banda do braço curto (DCBS) e tamanho da banda do braço curto (TBS) dos cromossomos 9 do calo C57 e seu respectivo controle. As letras à direita representam o teste de Tukey (5%). Médias com a mesma letra não diferem significativamente.

CROMOSSOMO	Nº METÁF.	CR	RB	BL	BC	DCBS	TBS
Normal C57 (9N)	34	136,00 A	0,94 BC	66,21 AB	70,68 A	40,88 A	30,62 A
Ausência de K9S (9A)	5	107,20 B	1,39 A	59,80 B	45,20 B	-	-
K9S subterminal (9B)	14	133,86 A	1,04 B	67,71 A	65,64 A	39,36 A	14,36 B
Normal CCT-1315	12	130,42 A	0,91 C	62,08 AB	68,42 A	39,92 A	31,67 A
DMS		10,33	0,11	6,98	6,71	4,96	3,41

DMS = diferença mínima significativa

Tabela 19. Quadro geral da análise de variância para os valores da distância centrômero-banda do braço curto (DCBS) e do tamanho da banda do braço curto (TBS) dos cromossomos 9 (normal, 9A e 9B) do calo 3-57 e seu respectivo controle.

FONTE DE VARIAÇÃO	GL	QM	
		DCBS	TBS
TRATAMENTO	3	71,04	1.472,01**
RESIDUO	61	34,56	16,38

** Significativo a 1% pelo Teste F.

4.2.4. Análise de anáfases coradas pelo método de bandamento-C.

A análise de anáfases coradas pela metodologia de bandamento-C teve dois objetivos. O primeiro foi investigar o envolvimento dos knobs heterocromáticos na formação de pontes cromossômicas em anáfases mitóticas, em células cultivadas *in vitro*, conforme proposto por McCOY & PHILLIPS (1982), BENZION *et al*, (1986) e LEE & PHILLIPS (1988) e comentado na revisão de literatura. FLUMINHAN Jr. (1992) e AGUIAR-PERECIN & FLUMINHAN Jr. (1992) analisaram linhagens de milho com diferentes conteúdos de knobs e encontraram evidências de ocorrência de ciclos de quebra-fusão-ponte envolvendo cromossomos com knobs.

Conforme relatado no item anterior as análises de metáfases mostraram ocorrência de aberrações principalmente envolvendo o cromossomo 7 que tem dois knobs, sugerindo que estas são decorrentes de pontes formadas na anáfase.

Entretanto, em algumas células foi observado que pontes anafásicas envolveram cromossomos que não possuíam banda-C. A Figura 18 mostra anáfase do subclone 1-MS1 do calo 3-57 apresentando pontes e atraso na separação de cromátides envolvendo cromossomos que não possuem bandas, enquanto cromossomos com bandas, inclusive um cromossomo 7 alterado (com três bandas), segregam normalmente. Além disso, a Figura 19 apresenta uma ponte quebrada, provavelmente resultante de um atraso na separação das

cromátides, em que as cromátides envolvidas aparentemente não apresentam bandas.

O segundo objetivo desta análise foi verificar a ocorrência de cicatrização das extremidades quebradas devido a ocorrência de ciclos de quebra-fusão-ponte, em cromossomos que apresentavam marcadores citológicos (bandas-C). Após a estabilização os cromossomos deveriam segregar normalmente na anáfase. Isto foi observado em algumas anáfases do calo 3-57.

As Figuras 20 e 21 apresentam anáfases em que o cromossomo 7 com alterações no padrão de bandas-C segregando normalmente (veja também as figuras 18 e 19). Além disso, verificou-se que o micro cromossomo que surgiu no subclone 1-MS1 do 3-57 e se manteve na cultura também segregava normalmente (Figura 22).

4.3. Regeneração de plantas

Um total de 101 e 369 plantas foram regeneradas dos calos 3-57 e 12-F, respectivamente, desde o estabelecimento da cultura. A Tabela 20 mostra o número de plantas regeneradas de cada linhagem celular que chegaram até a fase de canteiro e o número de plantas que atingiu a maturidade, produzindo sementes. Este processo de regeneração foi realizado com a colaboração do técnico Carlos Alberto Verissimo.

Figura 18. Anáfase inicial do subclone 1-MS1 do calo 3-57, corada pelo método de bandamento-C, mostrando pontes e atraso na separação de cromátides envolvendo cromossomos que não apresentavam knobs heterocromáticos. Todos os cromossomos com knobs (bandas-C) tiveram segregação normal.

Figura 19. Anáfase do calo 3-57, subclone 1-MS1, corada pelo bandamento-C, apresentando uma ponte quebrada envolvendo cromossomos que aparentemente não possuíam bandas.

Figura 20. Anáfase mitótica do calo 3-57, subclone 1-MS1, corada pelo método de bandamento-C, apresentando o cromossomo 7 com três bandas segregando normalmente.

Figura 21. Anáfase do calo 3-57, subclone 1-N6, corada pelo método de bandamento-C, apresentando segregação normal do cromossomo 7 com a banda do braço curto em posição subterminal.

Figura 22. Anáfase do calo 3-57, subclone 1-MS1, corada pelo método de bandamento-C, apresentando o micro-cromossomo segregando normalmente.

TABELA 20. Número de plantas regeneradas do calo 12-F e 3-57 desde o início da cultura e número de plantas que produziram sementes (% entre parênteses).

CALO	MEIO	IDADE (MESES)	PLANTAS REGENERADAS	PLANTAS C/ ESPIGAS
12-F	MS2	14	11	03 (27,3)
		18	28	15 (53,6)
		19	05	04 (80,0)
		20	10	08 (80,0)
		21	43	18 (41,9)
		22	18	0
	1-MS2	29	72	64 (88,9)
	3-MS2	29	06	04 (66,6)
	2-N6	33	128	103 (80,5)
	2-MS1	56	02	- *
	1-N6	56	22	-
	2-N6	56	24	-
	TOTAL		369	219
3-57	MS2	08	01	0
		10	20	6 (30,0)
		12	34	4 (11,8)
		15	27	0
		16	02	0
	1-N6	33	09	0
	2-N6	56	02	-
	1-N6	58	06	-
	TOTAL		101	10

* plantas ainda em canteiro

As alterações propostas no procedimento para regeneração foram positivas. Por exemplo, a transferência de blocos embriogênicos para meio com 0,5 mg/l de 2,4-D, sob a luz, promoveu uma maior uniformidade na germinação dos embriões somáticos. A câmara úmida na casa-de-vegetação reduziu a mortalidade das plantas durante o período de aclimação.

Entre as regenerações destacam-se duas derivadas dos subclones 1-MS2 e 1-N6 do calo 12-F, nas quais um grande número de plantas férteis foi obtido (Figura 23). De uma maneira geral, as plantas regeneradas do calo 12-F mostraram-se vigorosas e férteis, enquanto que a maioria das plantas obtidas a partir do calo 3-57, apresentaram-se frágeis, com crescimento lento e dificilmente atingiam a maturidade, sendo que a altura média das plantas variou entre 30 e 50 cm.

Foram verificadas alterações fenotípicas no tipo de inflorescência masculina nas plantas regeneradas do calo 12-F, subclones 1-MS2 e 2-N6, provavelmente decorrente de um estresse fisiológico. Sete tipos foram observados:

- 1 - Normal
- 2 - Com a base feminilizada
- 3 - Com o ápice feminilizado
- 4 - Com ápice e base feminilizados
- 5 - Totalmente feminilizada
- 6 - Flecha parcialmente seca
- 7 - Flecha totalmente seca ou macho-estéril

Figura 23. Vista geral do canteiro de plantas regeneradas dos subclones 1-MS2 e 2-N6 do calo 12-F (a), e amostra das espigas obtidas (b).

A Figura 24 apresenta uma inflorescência normal observada em plantas regeneradas do calo 12-F. Exemplos de algumas flechas anormais são apresentados na Figura 25. Apesar da ocorrência destas anormalidades na inflorescência masculina, foi possível obter espigas com sementes da maioria das plantas, através de autopolinização ou sib (Figura 23b).

As plantas regeneradas obtidas (R₀) foram analisadas quanto à fertilidade do pólen.

Os grãos de pólen viáveis coraram facilmente com a solução de iodo. Grãos de pólen defectivos e/ou inviáveis foram observados. Estes estavam vazios ou coraram fracamente, apresentando-se na coloração marrom-alaranjado. Pólenes de tamanho pequeno foram também observados (Figura 26).

Os resultados da análise fertilidade do pólen são apresentados na Tabela 21 e comparados com o tipos de inflorescência. A maioria das plantas apresentou fertilidade do pólen superior a 90%, mesmo para plantas com inflorescência anormal (Figura 27).

Figura 24. Inflorescência masculina normal de uma planta regenerada do calo 12-F, subclone 2-N6..

Figura 25. Inflorescências masculinas observadas em plantas regeneradas do calo 12-F, subclone 2-N6. a) Flecha com ápice feminilizado. b) Flecha totalmente feminilizada.

Figura 26. Grãos de pólen das plantas regeneradas do calo 12-F, coradas com solução de iodo. a) normal, b) vazio ou inviável, c) com coloração fraca, d) de tamanho pequeno.

Tabela 21. Tipos de inflorescências masculinas observados e fertilidade do pólen em plantas regeneradas do calo 12-F.

SUBCLONE	TIPO INFLO.	PLANTAS REGENERADAS	FREQUÊNCIA DE PÓLEN			
			NORMAL	PEQ.	COR FRACA	VAZIO
1-MS2	1	13 (26,0)	91,3	1,9	0,7	6,1
	2	1 (2,0)	95,5	0,3	0,7	3,5
	3	16 (32,0)	91,5	1,5	1,1	5,9
	4	14 (1,0)	95,4	0,1	0,7	3,8
	5	1 (2,0)	-	-	-	-
	6	3 (6,0)	94,6	0,4	0,6	4,4
	7	2 (4,0)	-	-	-	-
2-N6	1	47 (53,4)	90,7	1,4	0,3	7,6
	2	6 (6,8)	95,7	1,6	0,1	2,6
	3	13 (14,8)	88,9	0,3	1,7	9,1
	4	15 (17,1)	95,5	0,1	0,4	4,0
	5	3 (3,4)	-	-	-	-
	6	3 (3,4)	97,3	-	-	2,7
	7	1 (1,1)	-	-	-	-

Figura 27. Tipos de inflorescência masculina e fertilidade do pólen em plantas do calo 12-F regeneradas do subclone 1-MS2 e 2-N6 após aproximadamente 30 meses de cultivo.

5. DISCUSSÃO

5.1. Aspectos do cultivo *in vitro* de milho

As características fenotípicas das culturas de ambos os calos foram semelhantes (Figuras 1 e 2). Os calos apresentaram-se friáveis e embriogênicos, sendo classificados como Tipo II de acordo com as descrições na literatura.

No entanto, o meio N6 com L-prolina induziu maior embriogênese, em relação ao meio MS1 e MS2, confirmando as observações de ARMSTRONG & GREEN (1985), em que a L-prolina estimulou a formação de embriões somáticos em calos Tipo II obtidos a partir de embriões imaturos de milho (linhagem A188). A seleção periódica de regiões do calo que se multiplicavam mais rapidamente pode ter contribuído para que houvesse essa 'uniformidade' fenotípica.

Testes preliminares sobre a possibilidade de utilização destes genótipos para obtenção de suspensões celulares, realizados em agosto e outubro de 1993, evidenciaram que o calo 12-F forma uma suspensão finamente dispersa de células, em menor tempo (aproximadamente 45 dias) e que a taxa de multiplicação também foi maior em relação ao calo 3-57. Isto sugere que o calo 12-F pode ser utilizado para obtenção de suspensões celulares, as quais

posteriormente podem ser utilizadas em experimentos de transformação de plantas de milho.

5.2. Instabilidade cromossômica nas sublinhagens celulares

5.2.1. Anormalidades na anáfase mitótica

Os resultados da análise da frequência de alterações em anáfases dos calos 12-F e 3-57 demonstrou que os genótipos respondem diferentemente ao cultivo *in vitro* com relação à estabilidade cromossômica, apesar das duas culturas serem mantidas em cultura por um período semelhante. O calo 12-F apresentou menor frequência de pontes e outras anormalidades na anáfase em relação ao calo 3-57, sendo portanto mais estável.

Com o aumento da idade da cultura observou-se uma tendência à redução na frequência de anormalidades na anáfase (atraso na separação de cromátides, pontes, fragmentos e pontes quebradas) nos dois genótipos testados. Se a frequência de pontes na anáfase reflete a ocorrência de ciclos de quebra-fusão-ponte, a diminuição na frequência de pontes poderia ser verificada devido a ocorrência de estabilização de cromossomos que derivaram desses ciclos.

As análises citológicas de amostras dos subclones mantidos nos diferentes meios mostraram que anormalidades mitóticas ocorreram nos três meios utilizados (MS + 1,0 ou 2,0 mg/l de 2,4-D e N6 + 1,5 mg/l de 2,4-D + 12mM L-prolina), indicando não haver uma

influência direta destes meios em causar alterações cromossômicas nas amostras analisadas

A análise de anáfases coradas pelo bandamento-C mostrou que, em algumas anáfases os cromossomos 7 do calo 3-57 que sofreram alterações, como duplicação do braço curto gerando um cromossomo com duas bandas no braço curto (subclone 1-MS1) ou com K7S em posição subterminal (subclone 1-N6), segregavam normalmente (veja Figuras 18, 19, 20 e 21). Isto sugere que, nestes casos pode ter ocorrido a adição de um novo telômero na extremidade quebrada, levando à estabilização do cromossomo.

Foi observado em algumas anáfases que cromossomos que aparentemente não possuíam knob participavam na formação de pontes. Segundo LONGLEY (1939) e McCLINTOCK (1978), todos os braços dos cromossomos de milho, exceto 8S e 10S, possuem sítios de knob potencial.

BENZION & PHILLIPS (1988) observaram eventos de quebra em braços cromossômicos que não apresentavam knobs em análises meióticas de plantas regeneradas e sugeriram que a ausência de knob não significa que a sequência de DNA comum ao knob não esteja presente no sítio de knob. Se a sequência está presente mas não em quantidade que possa ser detectada citologicamente como um knob, o efeito da replicação tardia do DNA no sítio de knob poderia ainda influenciar a localização do evento de quebra.

5.2.2. Análise de metáfases mitóticas

5.2.2.1. Sublinhagens do calo 12-F

A análise periódica de amostras do calo 12-F mostrou que o cariótipo deste genótipo manteve-se inalterado na maioria dos subclones. Somente os subclones 1-MS2 e 3-MS2 apresentaram alterações em um dos cromossomos do par 7 em algumas células das amostras coletadas (Figuras 8 e 10, Tabela 8). Os cromossomos 7 com banda amplificada no braço longo ou com a banda do braço curto em posição subterminal podem ter surgido em consequência de ciclos de quebra-fusão-ponte.

A Figura 28 apresenta os esquemas do mecanismo para explicar o surgimento destas alterações, com base nos trabalhos de McCLINTOCK (1941) e JOHNSON *et al.* (1987). Segundo estes esquemas, um atraso na separação das cromátides (ASC) ao nível do knob provocaria uma tensão nas cromátides envolvidas, o que poderia levar à quebra da cromátide.

A análise morfométrica dos cromossomos que apresentaram amplificação em K7L mostrou que o tamanho da banda do braço longo (TBL) era maior que o normal, mas não chegava a representar o dobro do tamanho normal (Tabelas 14 e 15). Isto indica que neste caso a quebra deve ter ocorrido dentro do knob, dando origem a um cromossomo com um knob terminal no braço longo. Na próxima divisão as extremidades quebradas se fundiriam após a replicação do

DNA originando um cromossomo dicêntrico (com uma banda amplificada entre os dois centrômeros) que na anáfase formaria uma ponte simples. Esta ponte poderia se quebrar entre o centrômero e a banda dando origem ao cromossomo 7 com a banda do braço longo amplificada (Figura 28a).

O fato deste cromossomo ter sido observado em amostras do calo coletadas após 25 e 34 meses de cultivo (ver Tabela 8 e Figura 10) sugere que as extremidades destes cromossomos devem ter se estabilizado, provavelmente pela adição de um novo telômero.

Por outro lado, se o evento de atraso na separação das cromátides ocorresse ao nível do knob do braço curto, e a quebra acontecesse dentro do knob, após a replicação as extremidades quebradas se fundiriam dando origem a um cromossomo dicêntrico (com uma banda de tamanho semelhante ao normal) que formaria uma ponte na anáfase, a qual se quebraria originando o cromossomo 7 com uma banda intersticial no braço curto, observado no subclone 3-MS2 em amostras coletadas aos 25 meses de cultivo (Figura 28b).

Um fato interessante é que este tipo de alteração não foi mais observado nas amostras deste subclone coletadas três meses depois. Isto pode ter ocorrido devido às células com esta alteração no cromossomo 7 não se mantiveram na cultura ou então a problemas de amostragem.

Em ambos os casos as células que receberam os cromossomos que sofreram deleção provavelmente foram eliminadas.

Figura 28. Possível origem das alterações do cromossomo 7 do calo 12-F.

a) Cromossomo com amplificação em K7L. b) Cromossomo com K7S subterminal.

5.2.2.2. Sublinhagens do calo 3-57

O fato dos cariótipos alterados do calo 3-57 representarem 100% das metáfases da cultura indica que a alteração do normal para o anormal ocorreu muito rapidamente, e podemos sugerir que estas células anormais tenham sido selecionadas positivamente, possivelmente devido apresentarem melhor adaptação e maior taxa de crescimento nas condições de cultivo, com relação as células normais *in vitro*.

Segundo SACRISTAN (1971) em estudos com *Crepis capillares*, o estabelecimento de cariótipos aberrantes indica que uma cultura *in vitro* com seu crescimento desorganizado, ao contrário de um organismo como um todo, é mais indiferente à presença de complemento cromossômico desbalanceado, e que os cromossomos aberrantes tem um mecanismo de divisão tão eficiente quanto os cromossomos normais.

BAYLISS (1980) comentou que a constituição cromossômica final da cultura parece ser mais dependente da capacidade competitiva das células com diferentes cariótipos que da frequência de sua origem. Condições de seleção podem permitir a retenção de um determinado complemento cromossômico na maioria das células.

Uma interessante comparação pode ser feita entre o comportamento cromossômico de células de plantas e de animais em cultura. HAYFLICK & MOORHEAD (1961) e HSU & COOPER (1974), citados por BAYLISS (1980), em estudos com linhagens celulares diplóides de humanos e primatas, verificaram que quando as células

eram propagadas em série, cada subcultura invariavelmente atingia um estágio de crescimento reduzido e senescência celular. Algumas culturas que sobreviveram a esta fase apresentaram uma transição à anormalidade cromossômica, frequentemente acompanhada pela emergência de linhagens celulares dominantes com complementos cromossômicos modificados.

Em culturas de células vegetais um comportamento semelhante pode ser observado, em que após uma fase inicial de normalidade cromossômica ocorrem alterações no cariótipo que com os subcultivos consecutivos se estabelecem na cultura, predominando sobre as células normais chegam ao ponto de eliminá-las completamente (BAYLISS, 1980).

As alterações no cariótipo dos subclones do calo 3-57 envolveram basicamente os cromossomos 7 (K7L e K7S) e 9 (K9S). O cromossomo 8, apesar de possuir também dois knobs (K8L₁ e K8L₂), não apresentou alterações que pudessem ser detectadas através da metodologia de bandamento-C, e a análise das medidas dos parâmetros avaliados neste estudo também demonstraram não haver diferenças significativas entre os cromossomos 8 dos calos e das plantas controle da cultura de tecidos (Tabelas 11, 12 e 13). Isto sugere que os cromossomos 7 e 9 são mais propensos a alterações que o cromossomo 8, devido a algum fator ainda não esclarecido.

A presença de pontes e a ocorrência de cromossomos alterados sugerem que esses cromossomos podem ter se originado a partir de ciclos de quebra-fusão-ponte e que depois se estabilizaram.

Nas Figuras 29, 30 e 31 são apresentadas sugestões sobre a possível origem dos cromossomos 7 alterados.

A análise morfométrica do cromossomo 7 com três bandas, mostrou que o braço curto deste cromossomo é o dobro do tamanho normal e que a banda é do mesmo tamanho da banda do braço curto do cromossomo normal (Tabelas 17 e 18). Além disso, a distância entre o centrômero e a banda do braço curto e do tamanho da banda do braço curto mostrou que estes valores eram semelhantes entre os cromossomos 7 alterados (com ou sem a banda extra no braço curto) observados no calo 3-57. Isto sugere que estes podem ter uma origem comum. Além disso, como o tamanho da banda não se alterou pode-se supor a ocorrência de uma translocação, ou de um atraso na replicação do knob heterocromático ou mesmo a não ocorrência da replicação.

Suponhamos que o cromossomo 7 com três bandas seja decorrente de uma translocação. Neste caso, seria necessária a ocorrência de duas quebras: uma cromátide se quebraria adjacente ao centrômero e a outra cromátide na extremidade do knob, na região telomérica. O fragmento acêntrico deveria se fundir com a extremidade que apresentava o knob originando assim o cromossomo com a duplicação do braço curto, conforme esquema apresentado na Figura 29, mas a extremidade do braço curto seria estável devido apresentar o telômero intacto.

Uma segunda alternativa seria semelhante ao esquema para o calo 12-F. A ocorrência de um atraso na separação das cromátides ao nível do knob do braço curto causaria uma tensão que

poderia levar à quebra do cromossomo. Para que o tamanho da banda fosse mantido, a quebra deveria ocorrer aproximadamente no meio do knob, dando origem a um cromossomo com um knob menor na posição terminal (deficiência). Após a replicação, as cromátides com a extremidade quebrada se fundiriam dando origem a um cromossomo dicêntrico com uma banda de tamanho semelhante ao da banda normal do braço curto, entre os dois centrômeros. Na anáfase, o dicêntrico formaria uma ponte, ocorreria uma nova quebra dando origem a dois cromossomos com a extremidade quebrada, sendo que estes segregariam para células opostas.

Novamente, após a replicação, as extremidades quebradas se fundiriam dando origem a um novo dicêntrico, com duas bandas iguais entre os dois centrômeros (ciclo de quebra-fusão-ponte). A ponte formada na anáfase poderia se quebrar em três pontos, resultando em cromossomos com deficiência e duplicação no braço curto: 1) entre os dois centrômeros, originando dois cromossomos com um segmento eucromático após a banda, semelhantes aos gerados no ciclo anterior; 2) entre o centrômero e o knob, mas adjacente ao knob, dando origem ao cromossomo 7 com três bandas; e 3) entre o centrômero e o knob, gerando o cromossomo 7 com duas bandas mais um segmento terminal (Figura 30).

Um esquema para o surgimento de alterações no outro cromossomo do par 7, em células que já apresentavam um cromossomo 7 com três bandas é apresentado na Figura 31.

A princípio, pela análise do comprimento relativo e da relação de braços destes cromossomos foi proposto que o braço que não apresentava a banda era o braço curto e que o braço longo apresentava uma banda amplificada. Porém, através da análise da distância centrômero-banda e do tamanho da banda, verificou-se que a distância entre o centrômero e a banda do cromossomo alterado era semelhante à distância entre o centrômero e a banda do braço curto do cromossomo normal. Além disso, o tamanho da banda correspondia a aproximadamente duas vezes o tamanho da banda do braço curto do cromossomo normal.

Estas observações levaram a seguinte hipótese quanto à origem deste cromossomo alterado: ocorreriam atrasos simultâneos na separação das cromátides ao nível do knob do braço curto e do braço longo. Devido à tensão causada pelo fato dos cromossomos estarem sendo arrastados para polos opostos, ocorreriam duas quebras no mesmo cromossomo: uma no braço longo entre o centrômero e o knob; e outra no braço curto na extremidade final da banda, na região telomérica.

Após a replicação, as extremidades quebradas se fundiriam dando origem a um cromossomo que na anáfase forma uma ponte dupla. Esta ponte se quebraria em dois pontos dando origem a um cromossomo com um braço menor sem banda e outro maior com uma banda amplificada.

Alterações no cromossomo 9 envolveram o knob do braço curto. A Figura 32 apresenta o esquema da possível origem dos

tipos de cromossomos alterados que foram observados pela análise de metáfases coradas pelo bandamento-C.

De modo semelhante ao descrito nas alterações do cromossomo 7, ciclos de quebra-fusão-ponte também podem ter ocorrido em consequência de um atraso na separação das cromátides ao nível do knob.

O atraso na separação das cromátides poderia levar à quebra das cromátides envolvidas. Caso a quebra ocorresse dentro do knob, daria origem a um cromossomo com uma banda terminal de tamanho menor e outro normal.

Após a replicação, as extremidades quebradas se fundiriam dando origem a um cromossomo dicêntrico com uma banda entre os dois centrômeros. O tamanho desta banda dependeria do local onde ocorreu a quebra no knob. Este dicêntrico poderia sofrer não-disjunção, ou seja, os dois centrômeros ser arrastados para o mesmo polo.

Posteriormente, o dicêntrico se replicaria e na anáfase seguinte formaria duas pontes, as quais poderiam se quebrar em posições deferentes (segundo ciclo de quebra-fusão-ponte).

Se uma das pontes quebrasse adjacente ao knob daria origem a um cromossomo sem a banda do braço curto o qual, após sofrer deleções, poderia originar o micro-cromossomo observado no subclone 1-MS1 do calo 3-57.

Figura 29. Possível origem do cromossomo 7 com três bandas (tipo 7A) observado em subclones do calo 3-57, considerando-se a ocorrência de translocação.

Figura 30. Possível origem dos cromossomos 7 alterados observados no calo 3-57, considerando-se a ocorrência de atraso na replicação do knob heterocromático.

Figura 31. Possível origem do cromossomo 7 com um braço maior com banda amplificada e um braço menor sem banda (Tipo 7D).

Figura 32. Possível origem das alterações no cromossomo 9 e do microcromossomo, em subclones do calo 3-57.

Caso a outra ponte quebrasse dentro do knob daria origem a um cromossomo com knob terminal de tamanho reduzido o qual entraria num terceiro ciclo de quebra-fusão-ponte. A ponte formada poderia quebrar adjacente ao knob ou entre o knob e o centrômero, dando origem ao cromossomo sem banda ou com a banda do braço curto em posição subterminal, respectivamente (Figura 32). Isto explicaria a ocorrência de células com cromossomo 9 sem banda + micro e de cromossomo 9 com banda subterminal + micro observadas nas amostras do subclone 1-MS1 do calo 3-57.

Um fato interessante é que a maioria das alterações observadas envolveram cromossomos com bandas próximas a regiões teloméricas. Assim como os knobs, as regiões teloméricas são geralmente heterocromáticas e apresentam replicação mais tardia na fase S (BERENDS & MEYER, 1968; LIMA-DE-FARIA & JAVOSKA, 1968; CROSSEN *et al.*, 1975). Isto poderia contribuir também para um maior atraso na separação das cromátides nestes casos.

Apesar de ter sido observada uma certa frequência de pontes em anáfases coradas pelo método de Feulgen (0,7 a 8,3%), não se observou a presença de metáfases mitóticas com cromossomos dicêntricos em nenhuma das amostras de calos analisadas. Isto possivelmente pode ter ocorrido em virtude da baixa frequência com que estes cromossomos ocorreram ou então devido a amostragem.

LEE & PHILLIPS (1987) também não observaram cromossomos dicêntricos em análises meióticas de plantas de milho regeneradas, apesar de ter sido verificada a ocorrência de quebras

cromossômicas. Concluíram, portanto, que a aberração pode ter ocorrido no início da cultura e que a repetição do mesmo evento era menos provável.

Os dados obtidos da análise do pedigree (Tabela 9) sugerem que os cromossomos que se quebraram em etapas anteriores não mantiveram por muito tempo um ciclo de quebra-fusão-ponte. Em algumas culturas foi observado que o cromossomo alterado se manteve na cultura sem sofrer novas alterações, sugerindo que após um ou mais ciclos de quebra-fusão-ponte os cromossomos se estabilizaram, cessando o ciclo, conforme relatado por McCLINTOCK (1941). Daí a redução na frequência de pontes anafásicas com o aumento do tempo de cultura.

Evidências de estabilização de cromossomos alterados foram verificadas em anáfases coradas pelo método de bandamento-C. Amostras dos subclones 1-MS1 e 1-N6 apresentaram anáfases em que os cromossomos 7 alterados segregavam normalmente, ou seja, o ciclo de quebra-fusão-ponte havia cessado (Figuras 18, 19, 20 e 21).

Análises preliminares de metáfases de ponta de raiz de plantas regeneradas do calo 3-57, quando este era mantido apenas em meio MS2 (12-18 meses de idade), revelaram que o cromossomo 7 com três bandas foi transmitido às plantas R_1 . Isto sugere mais uma vez que o cromossomo 7 com três bandas estabilizou-se na cultura e além disso foi transmitido para as plantas regeneradas.

A cicatrização da extremidade cromossômica quebrada poderia explicar a estabilidade dos cromossomos alterados bem como do micro-cromossomo observados. Como relatado por McCLINTOCK (1941), a cicatrização da extremidade quebrada era permanente e os cromossomos permaneciam estáveis de geração a geração. Por outro lado, os cromossomos que sofreram quebra sem subsequente cicatrização eram suscetíveis a fusões e degradação (McCLINTOCK, 1941, 1942; HABER & THORBURN, 1984; BIESSMANN & MASON, 1988).

WANG *et al.* (1992) utilizando linhagens aneuplóides de *Hordeum vulgare* contendo cromossomos extra com quebras em diferentes partes, investigaram a ocorrência de cicatrização das extremidades quebradas. Os resultados obtidos através da hidridização *in situ* com o telômero de *Arabidopsis thaliana*, revelaram a presença de sequências teloméricas nas extremidades quebradas, indicando que os cromossomos cicatrizaram.

Futuros estudos são necessários para confirmar e determinar se a cicatrização dos cromossomos quebrados em calos de milho envolve a formação de novo telômero ou algum outro mecanismo. A utilização da hibridização *in situ* poderá trazer grandes avanços nesta área.

5.3. Capacidade de regeneração dos calos

Os resultados apresentados na Tabela 20 evidenciaram que a capacidade para regeneração nos genótipos testados

foi mais dependente do estado cromossômico da cultura do que da idade ou tempo de cultivo.

MURASHIGE & NAKANO (1967) observaram que existe uma correlação positiva entre a estabilidade cromossômica e a capacidade regenerativa da cultura de células. O acúmulo de cariótipos alterados *in vitro* pode ser responsável pela perda do potencial regenerativo em culturas com o decorrer do tempo de cultivo (REINERT & BACKS, 1967; SMITH & STREET, 1974).

O calo 12-F, que apresenta maior estabilidade cariotípica, produziu maior número de plantas férteis, tanto nas subculturas mais jovens quanto nas mais velhas (Tabela 20). Entretanto, o calo 3-57, que apresentou alterações no cariótipo em todas as amostras analisadas, praticamente perdeu a capacidade de regeneração com o tempo. As poucas plantas que se conseguiu regenerar após 15 meses em cultura não atingiram a maturidade, foram plantas fracas, com internódios curtos, que chegaram a medir em média menos de 50 cm de altura. Torna-se evidente portanto, que para alguns genótipos é possível a manutenção de calos em culturas de longa duração, com capacidade de regeneração de plantas.

WAN *et al.* (1992) identificaram, através da análise de RFLP, seis regiões cromossômicas envolvidas na resposta ao cultivo *in vitro*. ARMSTRONG *et al.* (1992) verificaram que a região cromossômica mais crítica para a formação de calos com capacidade para regeneração encontrava-se no cromossomo 9. Com base nestes estudos, podemos sugerir que a redução na capacidade para regeneração do calo 3-57

pode estar relacionada às alterações observadas no cromossomo 9. No entanto, esta possibilidade necessita ser melhor investigada.

Alterações fenotípicas observadas nas plantas regeneradas de subclones do calo 12-F, em relação a inflorescência masculina, podem ter ocorrido em consequência de um estresse fisiológico durante o período de regeneração e aclimação. Entretanto, as progênies das plantas regeneradas podem não apresentar estas alterações. Conforme evidenciado na Tabela 21, foi observado uma frequência relativamente elevada de grãos de pólen viáveis (cerca de 90%) mesmo em plantas que apresentaram inflorescências anormais.

A fertilidade do pólen é um indicativo do estado cromossômico da planta. LEE & PHILLIPS (1987) e LEE *et al.* (1988) observaram que a regularidade meiótica e a integridade da constituição cromossômica foram refletidas pela baixa percentagem de pólen abortados entre as plantas regeneradas (0 - 10 %).

No presente estudo, foram regeneradas plantas dos subclones 1-MS2 e 2-N6, que em cultura apresentaram estabilidade cromossômica, com raras exceções (Tabelas 8 e 20). A fertilidade do pólen destas plantas refletiu esta estabilidade, uma vez que a maioria das plantas apresentaram uma frequência de pólen inviáveis inferior a 10%, independente do tipo de alteração da inflorescência (Tabela 21).

A análise meiótica das plantas regeneradas e suas respectivas progênies poderá confirmar a estabilidade cromossômica destas plantas.

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste estudo permitiram as seguintes conclusões:

1. Ocorreram ciclos de quebra-fusão-ponte em células de calos de milho cultivadas *in vitro* que conduziram a alterações no cariótipo, envolvendo especialmente cromossomos com knob na região telomérica. Isto sugere que estes ciclos podem ter iniciado em decorrência de um atraso maior que o usual na replicação do knob heterocromático, que resultou em atraso na separação das cromátides, quebra no knob ou adjacente a ele, fusão das cromátides após a replicação e novas quebras, originando cromossomos com deficiência e duplicação.
2. Os cromossomos 7 e 9 que sofreram alterações em consequência de ciclo de quebra-ponte-fusão se estabilizaram, provavelmente devido a cicatrização do telômero nas extremidades quebradas.
3. À medida que aumenta a duração da cultura acumulam-se aberrações cromossômicas que ocorreram ao longo da cultura, observadas em metáfases coradas através da metodologia de bandamento-C, mas aparentemente não aumenta a frequência de pontes na anáfase.

4. As culturas de calos derivados de linhagens relacionadas podem responder diferentemente às condições de cultura com relação à instabilidade cromossômica. Além disso, os subclones derivados de um mesmo calo podem apresentar alterações cromossômicas diferentes.
5. Os cariótipos apresentando os cromossomos 7 com deficiência e duplicação, resultantes de ciclos de quebra-fusão-ponte, predominaram na cultura sobre os cariótipos normais, e podem ser transmitidos para as plantas regeneradas.
6. A capacidade para regeneração de plantas aparentemente está mais relacionada com a estabilidade cromossômica em cultura do que com a idade da cultura, nos genótipos utilizados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIAR-PERECIN, M.L.R. de. Estudo dos cromossomos somáticos de milho (*Zea mays* L.) e de suas regiões heterocromáticas. Piracicaba, 1979. 138p. (Livre-Docência - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).
- AGUIAR-PERECIN, M.L.R. de. C-banding in maize. I. Band patterns. **Caryologia**, Florence, **38**: 23-30, Jan./Mar. 1985.
- AGUIAR-PERECIN, M.L.R. de & DECICO, J.U. Preliminary results on the segregation of knobs (C-bands) in inbred lines derived from a flint variety. **Maize Genetics Cooperation Newsletter**, Columbia, **62**: 100, 1988.
- AGUIAR-PERECIN, M.L.R. de & FLUMINHAN JUNIOR, A. Embriogênese somática a partir de calos de diversos tipos de explantes de milho. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA PARA O PROGRESSO DA CIÊNCIA, 37., Belo Horizonte, 1985. **Resumos. Ciência e Cultura**. Suplemento, São Paulo, **37**(7): 719, 1985.
- AGUIAR-PERECIN, M.L.R. de & FLUMINHAN JUNIOR, A. Avaliação da regeneração de plantas *in vitro* de algumas linhagens e variedade de milho (*Zea mays* L.). In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA PARA O PROGRESSO DA CIÊNCIA, 38., Curitiba, 1986. **Resumos. Ciência e Cultura**, Suplemento, São Paulo, **38**(7): 929, 1986.

- AGUIAR-PERECIN, M.L.R. de & FLUMINHAN JUNIOR, A. Mitotic instability in callus cultures of inbred lines adapted to tropical regions. **Maize Genetics Cooperation Newsletter**, Columbia, **66**: 87-8, 1992.
- AGUIAR-PERECIN, M.L.R. de & VOSA, C.G. C-banding in maize. II. Identification of somatic chromosomes. **Heredity**, Essex, **54**(1): 37-42, Feb. 1985.
- AGUIAR-PERECIN, M.L.R. de; FLUMINHAN JUNIOR, A.; NITTO, C.N. Um método para análise da estabilidade mitótica em calos de milho. In: ANNUAL MEETING OF THE BRAZILIAN GENETICS SOCIETY, 37, Caxambu, 1991. **Program and abstracts. Revista Brasileira de Genética**. Supplement, **14**: 73, Sept. 1991.
- ARMSTRONG, C.L. & GREEN, C.E. Initiation of friable, embryogenic maize callus: the role of L-proline. In: ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN SOCIETY OF AGRONOMY, 74., Anaheim, 1982. **Abstracts. Agronomy Abstracts**, Madison, **74**: 89, 1982.
- ARMSTRONG, C.L. & GREEN, C.E. Establishment and maintenance of friable, embryogenic maize callus and the involvement of L-proline. **Planta**, New York, **164**(2): 207-14, 1985.
- ARMSTRONG, C.L. & PHILLIPS, R.L. Genetic and cytogenetic variation in plants regenerated from organogenic and friable, embriogenic tissue cultures of maize. **Crop Science**, Madison, **28**: 363-9, 1988.

- ARMSTRONG, C.L.; GREEN, C.E.; PHILLIPS, R.L. Development and availability of germplasm with high Type II culture formatin response. **Maize Genetics Cooperation Newsletter**, Columbia, **65**: 92-3, 1991.
- ARMSTRONG, K.C.; NAKAMURA, C.; KELLER, W.A. Karyotype instability in tissue regenerants of Triticale (x *Triticosecale* Wittmack) cv. 'Welsh' from 6-month-old callus cultures. **Zeitschrift für Pflanzenzuechtung**, Berling, **91**: 233-45, 1983.
- ARMSTRONG, C.L.; ROMERO-SEVERSON, J.; HODGES, T.K. Improved tissue culture response of an elite maize inbred through backcross breeding, and identification of chromosomal regions important for regeneration by RFLP analysis. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, **84**: 755-62, 1992.
- ASHMORE, S.E. & GOULD, A.R. Karyotype evolution in a tumour derived plant tissue culture analysed by Giemsa C-banding. **Protoplasma**, New York, **106**: 297-308, 1981.
- BALAGURUMOORTHY, P.; BRAHMACHARI, S.K.; MOHANTY, D.; BANSAL, M.; SASISEKHARAN, V. Hairpin and parallel quartet structures for telomeric. **Nucleic Acids Research**, Oxford, **20**(15): 4061-7, 1992.
- BAYLISS, M.W. Chromosomal variation in plant tissues in culture. **International Review of Cytology Suppl.**, New York, **11A**: 113-44, 1980.

- BENZION, G. & PHILLIPS, R.L. Cytogenetic stability of maize tissue cultures: a cell line pedigree analysis. **Genome**, Ottawa, **30**(3): 318-25, Jun. 1988.
- BENZION, G.; PHILLIPS, R.L.; RINES, H.W. Case histories of genetic variability *in vitro*: oats and maize. In: VASIL, I.K., ed. **Cell culture and somatic cell genetics of plants**. New York, Academic Press, 1986. v.3, p.435-48.
- BERENDS, H.D. & MEYER, G.F. A specific chromosome element, the telomere of *Drosophila* polytene chromosomes. **Chromosoma**, Berlin, **25**: 184-97, 1968.
- BHASKARAN, S. & SMITH, R.H. Regeneration in cereal tissue culture: A review. **Crop Science**, Madison, **30**: 1328-37, Nov./Dec. 1990.
- BIESSMANN, H. & MASON, J.M. Genetics and molecular biology of telomeres. **Advances in Genetics**, New York, **30**: 185-249, 1992.
- BIESSMANN, H. & MASON, J.M. Telomeric repeats sequences. **Chromosoma**, Berlin, **103**: 154-61, 1994.
- BLACKBURN, E.H. Structure and function of telomeres. **Nature**, London, **350**: 569-73, Apr. 1991.
- BOMMINENI, V.R. & BANASIKOWASKA, E. Mature plants from cultured shoot apical and tassel meristems. **Maize Genetics Cooperation Newsletter**, Columbia, **65**: 82-3, 1991.

- BROUN, P.; GANAL, M.W.; TANKSLEY, S.D. Telomeric display high levels of heritable polymorphism among closely related plant varieties. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, **89**: 1354-7, 1992.
- BROWN, P.T.H. DNA methylation in plants and its role in tissue culture. **Genome**, Ottawa, **31**(2): 717-29, 1989.
- BURR, B.; BURR, F.A.; MATZ, E.C.; ROMERO-SEVERSON, J. Pinning down loose ends: mapping telomeres and factors affecting their length. **The Plant Cell**, Baltimore, **4**: 953-60, Aug. 1992.
- CARLSON, W.R. The cytogenetics of corn. In: SPRANGUE, G.F. & DUDLEY, J.W., ed. **Corn and corn improvement**. 3.ed. Madison, ASA/CSSA/SSSA, 1988. p.259-343. (Agronomy Monographs, 18).
- CHANDLER, S.F. & VASIL, I.K. Optimization of plant regeneration from long term embryogenic callus cultures of *Pennisetum purpureum* Schum (Napier grass). **Plant Science Letters**, Amsterdam, **37**: 157-64, 1984.
- CHANG, Y.F. Plant regeneration in vitro from leaf tissues derived from cultured immature embryos of *Zea mays* L. **Plant Cell Reports**, New York, **2**: 183-5, 1983.
- CHASAN, R. Maize telomeres - the end of the line. **The Plant Cell**, Baltimore, **4**: 865-7, Aug. 1992

- CHU, C.C.; WANG, C.C.; SUN, C.S.; HSU, K.C.; YIN, C.Y.; CHU, C.Y.; BI, F.Y. Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. **Scientia Sinica**, Beijing, **16**: 659-88, 1975.
- CONGER, B.V.; NOVAK, F.J.; ERDESKY, K. Somatic embryogenesis from cultured leaf segments of *Zea mays*. **Plant Cell Reports**, New York, **6**: 345-7, 1987.
- COX, A.V.; BENNETT, S.T.; PAROKONNY, A.S.; KENTON, A.; CALLIMASSIA, M.A.; BENNETT, M.D. Comparison of plant telomere locations using a PCR-generated synthetic probe. **Annals of Botany**, Oxford, **72**(3): 239-47, Sept. 1993.
- CROSSEN, P.E.; PATHAK, S.; ARRIGHI, F.E. A high resolution study of DNA replication patterns of Chinese hamster chromosomes using sister chromatid differential staining technique. **Chromosoma**, Berlin, **52**: 339-47, 1975.
- D'AMATO, F. Cytogenetics of plant cell and tissue cultures and their regenerates. **CRC Critical Review Plant Science**, Boca Raton, **3**: 73-112, 1985.
- DECICO, J.U. Análise da segregação de knobs em progênies F₂ e de retrocruzamento derivadas de uma variedade de milho. Piracicaba, 1991, 134p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).

- DOERSCHUG, E.G. Studies of *Dotted*, a regulatory element in maize. I. Inductions of *Dotted* by chromatid breaks. II. Phase variation of *Dotted*. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, **43**(3/4): 182-9, 1973.
- DUCAN, D.R.; WILLIAMS, M.E.; ZEHR, B.E.; WIDHOLM, J.M. The production of callus capable of plant regeneration from immature embryos of numerous *Zea mays* genotypes. **Planta**, New York, **165**: 322-32, 1985.
- EDALLO, S.; ZUCCHINALI, C; PERENZIN, M.; SALAMINI, F. Chromosomal variation and frequency of spontaneous mutation associated with *in vitro* culture and plant regeneration in maize. **Maydica**, Bergamo, **26**(1): 39-56, 1981.
- EVANS, D.A.; SHARP, W.R.; MEDINA FILHO, H.P. Somacolon and gametoclonal variation. **American Journal of Botany**, Columbus, **71**(6): 759-74, Jul. 1984.
- FAHEY, J.M.; REED, J.N.; READDY, T.L.; PACE, G.M. Somatic embryogenesis from three commercially important inbreds of *Zea mays*. **Plant Cell Reports**, New York, **5**(1): 35-8, 1986.
- FLUMINHAN JUNIOR, A. Cultivo *in vitro* de milho (*Zea mays*) e análise de sua instabilidade mitótica. Piracicaba, 1992, 213p. (Mestrado-Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).

- FLUMINHAN JUNIOR, A. & AGUIAR PERECIN, M.L.R. de. Análise da estabilidade mitótica de calos de linhagens de milho com diferentes composições de knobs cromossômicos. In: ANNUAL MEETING OF THE BRAZILIAN GENETICS SOCIETY, 37. Caxambu, 1991. **Program and abstracts. Revista Brasileira de Genética**, Suplemento, **14**: 74, set. 1991.
- FROMM, M.E.; MORRISH, F.; ARMSTRONG, C.; WILLIAMS, R.; THOMAS, J.; KLEIN, T.M. Inheritance and expression of chimeric genes in the progeny of transgenic maize plants. **Bio-Technology**, New York, **8**: 833-9, 1990.
- GANAL, M.W., LAPITAN, N.L.V., TANKSLEY, S.D. Macrostructure of the tomato telomeres. **The Plant Cell**, Rockville, **3**: 87-94, 1991.
- GILL, B.S.; BURNHAM, C.R.; STRINGAM, G.R.; STOUT, J.T.; WEINHEIMER, W.W. Citological analysis of chromosomal translocations in the tomato: preferential breakage in heterochromatin. **Canadian Journal of Genetics and Cytology**, Ottawa, **22**: 333-41, 1980.
- GORDON-KAMM, W.J.; SPENCER, T.M.; MANGANO, M.L.; ADAMS, T.R.; DAINES, R.J.; START, W.G.; O'BRIEN, J.V.; CHAMBERS, S.A.; ADAMS JUNIOR, W.R.; WILLETTS, N.G.; RICE, T.B.; MACKEY, C.J.; KRUEGER, R.W.; KAUSCH, A.P.; LEMAUX, P.G. Transformation of maize cells and regeneration of fertile transgenic plants. **The Plant Cell**, Rockville, **2**: 603-18, Jul. 1990.

- GREEN, C.E. *In vitro* plant regeneration in cereals and grasses. In: THORPE, T.A., ed. **Frontiers of plant tissue culture**. Calgary, University of Calgary Press, 1978. p.411-8.
- GREEN, C.E. Somatic embryogenesis and plant regeneration from the friable callus of *Zea mays*. In: FUJIWARA, A., ed. **Plant tissue culture**. Tokyo, Maruzen., 1982. p.107-8.
- GREEN, C.E. & PHILLIPS, R.L. Plant regeneration from tissue cultures of maize. **Crop Science**, Madison, **15**: 417-21, 1975.
- GREEN, C.E.; ARMSTRONG, C.L.; ANDERSON, P.A. Somatic cell genetic systems in corn. In: DOWNEY, K.; VOELLMY, R.W.; AHMAD, F.; SCHULTZ, J., ed. **Advances in gene technology**: molecular genetics of plants and animals. New York, Academic Press, 1983. p.147-57 (Miami Winter Symposia, 20).
- GREEN, C.E.; PHILLIPS, R.L.; WANG, A.S. Cytological analysis of plants regenerated from maize tissue cultures. **Maize Genetics Cooperation Newsletter**, Columbia, **51**: 53-4, 1977.
- GREIDER, C.W. Telomeres, telomerase and senescence. **BioEssays**, **12**(8): 363-9, Aug., 1990.
- GREIDER, C.W. Chromosome first aid. **Cell**, Cambridge, **67**: 645-7, Nov. 1991.

- GREIDER, C.W.; AUTEXIER, C.; AVILION, A.A.; COLLINS, K.; HARRINGTON, L.A.; MANTELL, L.L.; PROWSE, K.R.; SMITH, S.K.; ALLSOPP, R.C.; COUNTER, C.M.; VAZIRI, H.; BACCHETTI, S.; HARLEY, C.B. Telomeres and telomerase: biochemistry and regulation in senescence and immortalization. In: HESLOP-HARRISON, J.S. & FLAVELL, R.B., ed. **The chromosome**. John Innes Centre, Colney Leane, Norwich NRA 7UH, UK, Bios Scientific Publishers, 1993. p.115-25.
- HABER, J.E. & THORBURN, P.C. Healing of broken linear dicentric chromosomes in yeast. **Genetics**, Chapel Hill, **106**: 207-26, Feb. 1984.
- HABER, J.E.; THORBURN, P.C.; ROGERS, D. Meiotic and mitotic behavior of dicentric chromosomes in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics**, Chapel Hill, **106**: 185-208, Feb. 1984.
- HADLACZKY, G.Y. & KALMAN, L. Discrimination of homologous chromosomes of maize with Giemsa staining. **Heredity**, Essex, **35**(2): 371-4, Dec. 1975.
- HALPERIN, W. Morphogenesis in cell cultures. **Annual Review Plant Physiology**, Stanford, **20**: 395-418, 1969.
- HARMS, C.T.; LORZ, H.; POTRYKUS, I. Regeneration of plantlets from callus cultures of *Zea mays* L. **Zeitschrift für Pflanzenzüchtung**, Berlin, **77**(4): 347-51, Dec. 1976.

HARRINGTON, L.A. & GREIDER, C.W. Telomerase primer specificity and chromosome healing. **Nature**, London, **353**: 451-4, Oct. 1991.

HODGES, T.K.; KAMO, K.K.; IMBRIE, C.; BECWAR, M.R. Genotype specificity of somatic embryogenesis and regeneration in maize. **Bio-Technology**, New York, **4**: 219-23, 1986.

IEMMA, A.S. Análisis de varianza com datos desbalanceados. Simposio de estadística, diseño de experimentos. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencia, Departamento de Matemáticas y estadística, 1993.

ILLG, R.D. & SIQUEIRA, W.J. Variabilidade induzida através da cultura de tecidos. In: AGUIAR-PERECIN, M.L.R. de.; MARTINS, P.S.; BANDEL, G., ed. Colóquio sobre citogenética e evolução de plantas. Ribeirão Preto, SBG, 1985. p. 125-35.

JOHNSON, S.S.; PHILLIPS, R.L.; RINES, H.W. Possible role of heterochromatin in chromosome breakage induced by tissue culture in oats (*Avena sativa* L.). **Genome**, Ottawa, **29**(3): 439-46, Jun. 1987.

KAMO, K.K. & HODGES, T.K. Establishment and characterization of long-term embryogenic maize callus and cell suspension cultures. **Plant science**, Limerick, **45**(2): 111-7, 1986.

KARP, A.; OWEN, P.G.; STEELE, S.H.; BEBELI, P.J.; KALTSIKES, P.J. Variation in telomeric heterochromatin in somaclones of rye. **Genome**, Ottawa, **35**: 590-3, 1992.

- KLEIN, T.M.; FROMM, M.; WEISSINGER, A.; TOMES, D; SCHAAF,S.; SLETTEN, M.; SANFORD, J.C. Transfer of foreign genes into intact maize cells with high-velocity microprojectiles. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, **85**: 4305-9, 1988.
- LA RUE, C.D. Growth and regeneration of the endosperm of maize in culture. **American Journal of Botany**, Columbus, **34**(10): 585-6, Dec. 1947.
- LA RUE, C.D. Cultures of the endosperm of maize. **American Journal of Botany**, Columbus, **36**(10): 798, Dec. 1949.
- LAPITAN, N.L.V.; SEARS, R.G.; GILL, B.S. Translocations and other karyotypic structural changes in wheat x rye hybrids regenerated from tissue culture. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, **68**: 547-54, 1984.
- LARKIN, P.J. & SCOWCROFT, W.R. Somaclonal variation - A novel source of variability from cell cultures for plant improvement. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, **60**: 197-214, 1981.
- LEE, M. & PHILLIPS, R.L. Genomic rearrangements in maize induced by tissue culture. **Genome**, Ottawa, **29**(1): 122-8, Feb. 1987.
- LEE, M. & PHILLIPS, R.L. The chromosomal basis of somaclonal variation. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, **39**: 413-37, 1988.

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

LIMA-DE-FARIA, A. & JAWORSKA, H. Late DNA synthesis in heterochromatin. **Nature**, London, **217**: 138-42, 1968.

LONGLEY, A.E. Knob positions on corn chromosomes. **Journal of Agricultural Research**, Islamabad, **59**(7): 475-90, Oct. 1939.

LOWE, K.; TAYLOR, D.B.; RYAN, P. PATERSON, K.E. Plant regeneration via organogenesis and embryogenesis in the maize inbred line B73. **Plant Science**, Limerick, **41**(2): 125-32, 1985.

LU, C.; VASIL, I.K.; OZIAS-AKINS, P. Somatic embryogenesis in *Zea mays* L. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, **62**(2): 109-12, 1982.

LU, C.; VASIL, V.; VASIL, I.K. Improved efficiency of somatic embryogenesis in tissue cultures of maize (*Zea mays* L.) **Theoretical and Applied Genetics**, New York, **66**(2): 285-9, 1983.

McCAIN, J.W. & HODGES, T.K. Anatomy of somatic embryos from maize embryo cuultures. **Botanical Gazette**, Chicago, **147**: 327, 1987.

McCLINTOCK, B. The fusion of broken ends of sister half-chromatids following chromatid breakage at meiotic anaphases. **Research Bulletin of Missouri Agricultural Experimental Station**, Columbia, **290**: 1-48, 1938.

McCLINTOCK, B. The behavior in successive nuclear divisions of a chromosome broken at meiosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, **25**: 405-16, 1939.

McCLINTOCK, B. The stability of broken ends of chromosomes in *Zea mays*. **Genetics**, Chapel Hill, **26**:234-82, 1941.

McCLINTOCK, B. The fusion of broken ends of chromosomes following nuclear fusion. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, **28**: 458-63, 1942.

McCLINTOCK, B. Maize genetics. **Carnegie Institution of Washington Year Book**, **45**: 176-86, Dec. 1946.

McCLINTOCK, B. Mutable loci in maize. **Carnegie Institution of Washington Year book**, **47**: 155-69, Dec. 1948.

McCLINTOCK, B. Chromosome organization and genic expression. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**, New York, **16**: 13-47, 1951.

McCLINTOCK, B. Mechanisms that rapidly reorganize the genome. In: STADLER GENETICS SYMPOSIUM, 10., Columbia, 1978. **Proceedings**. Columbia, University of Missouri, 1978. p.25-48.

McCLINTOCK, B. The significance of responses of the genome to challenge. **Science**, Washington, **226**(4676): 792-801, Nov., 1984.

- McCOY, T.J.& PHILLIPS, R.L. Chromosome stability in maize (*Zea mays*) tissue cultures and sectoring in some regenerated plants. **Canadian Journal of Genetics and Cytology**, Ottawa, **24**(5): 559-65, 1982.
- McCOY, T.J.; PHILLIPS, R.L.; RINES, H.W. Cytogenetic analysis of plants regenerated from oat (*Avena sativa*) tissue cultures; high frequency of partial chromosome loss. **Canadian Journal of Genetics and Cytology**, Ottawa, **24**(1): 37-50, 1982.
- MEINS JUNIOR, F. Heritable variation in plant cell culture. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, **34**: 327-46, 1983.
- MILES, J.H. Probable weak fusion of chromatids during a breakage-fusion-bridge cycle. **Maize Genetics Cooperation Newsletter**, Columbia, **45**: 136-9, 1971.
- MOLINA, M.C. & GARCIA, M.D. Citogenetic abnormalities in callus and plants derived from one maize embryo after 60 months in culture. **Maize Genetics Cooperation Newsletter**, Columbia, **68**: 54-5, 1994.
- MOLINA, M.C.; GARCIA, M.D.; CASO, O. Phenotypic and chromosomic aberrations in plants regenerated from callus. **Maize Genetics Cooperation Newsletter**, Columbia, **66**: 63-4, 1992.
- MORIN, G.B. Recognition of a chromosome truncation site associated with α -thalassaemia by human telomerase. **Nature**, London, **353**:454-6, Oct. 1991.

- MOROCZ, S; DONN, G; NÉMETH, J.; DUDITS, D. An improved system to obtain fertile regenerats via maize protoplasts isolated from a highly embiogenic suuspension cuulture. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, **80**(6): 721-6, 1990.
- MORRISH, F.; VASIL, V.; VASIL, I.K. Developmental morphogenesis and genetic manipulation in tissue and cell cultures of the gramineae. **Advances in Genetics**, New York, **24**: 431-99, 1987.
- MULLER, H.J. The remaking of chromosomes. **Collect. Net** , **8**:182-95, 1938.
- MURASHIGE, T. & NAKANO, R. Chromosome complement as a determinant of the morfogenic potential of tobacco cells. **American Journal of Botany**, Columbus, **54**(8): 963-70, Sep. 1967.
- MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, **15**(3): 473-97, 1962.
- MURATA, M. & ORTON, T.J. Chromosomal structural changes in cultured celery cells. **In vitro**, Gaithersburg, **19**: 83-9, 1983.
- MURATA, M. & ORTON, T.J. Chromosome fusions in cultured cells of celery. **Canadian Journal of Genetics and Cytology**, Ottawa, **26**: 395-400, 1984.
- NOVAK, F.J.; DOLEZELOVA, M.; NESTICKY, M.; PIOVARCI, A. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Zea mays* L. **Maydica**, Bergamo, **28**(4): 381-90, 1983.

- PARREDY, D.R. & PETOLINO, J.F. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature inflorescences of several elite inbreds of maize. **Plant Science**, Limerik, **67**: 211-9, 1990.
- PEACOCK, W.J.; DENNIS, T.S.; RHOADES, M.M.; PRYOR, A.J. Highly repeated DNA sequences limited to knobs heterochromatin in maize. **Proceedings of Natural Academic Science**, Washington, **78**(7): 4490-4, 1981.
- PESCHKE, V.M. & PHILLIPS, R.L. Genetic implications of somaclonal variation in plants. **Advances in Genetics**, New York, **30**: 41-75, 1992.
- PESCHKE, V.M.; PHILLIPS, R.L.; GENGENBACH, B.G. Genetic and molecular analysis of tissue-culture-derived Ac elements. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, **82**: 121-9, 1991.
- PHILLIPS, R.L. Somaclonal and gametoclonal variation. **Genome**, Ottawa, **31**(2): 1119-20, 1989.
- PHILLIPS, R.L.; SOMERS, D.A.; HIBBERD, K.A. Cell/tissue culture and *in vitro* manipulation, In: SPRAGUE, G.F. & DUDLEY, J.W., ed. **Corn and corn improvement**. 3ed. Madison, ASA/CSSA/SSSA, 1988. p.345-87. (Agronomy Monographs, 18).
- POTTER, R. & JONES, M.G.K. An assessment of genetic stability of potato *in vitro* by molecular and phenotypic analysis. **Plant Science**, **76**: 239-48, 1991.

- PRING, R. & JONES, M.G.K. Cytoplasmatic genome variability in tissue culture-derived plants. **Environ. Exp. Bot.**, **21**: 369-77, 1981.
- PRIOLI, L.M. & SILVA, W.J. Somatic embryogenesis and plant regeneration capacity in tropical maize inbreds. **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, **12**(3): 553-66, jul./set., 1989.
- PRIOLI, L.M. & SÖNDHAL, M.R. Plant regeneration and recovery of fertile plants from protoplasts of maize (*Zea mays* L.). **Bio-Technology**, New york, **7**: 589-94, Jun. 1989.
- PRYOR, A; FAULKNER, K.; RHOADES, M.M.; PEACOCK, W.J. Asynchronous replication of heterocromatin in maize. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washigton, **77**: 6705-9, 1980.
- RAPELA, M.A. Maize organogenesis and somatic embryogenesis: stage of the donor tissue. **Maize Genetics Cooperation Newsletter**, Columbia, **59**: 59, 1985.
- RAWLINS, D.J.; HIGHETT, M.I.; SHAW, P.J. Localization of telomeres in plant interphase nuclei by *in situ* hybridization and 3D confocal microscopy. **Chromosoma**, Berlin, **100**:424-31, 1991.
- RAY, D.S. & GHOSH, P.D. Somatic embryogenesis and plant regeneration from cultured leaf explants of *Zea mays*. **Annals of Botany**, Oxford, **66**: 497-500, 1990.

- REDDY, A.R. & PETERSON, P.A. Effect of age and genetic background on the in vitro maize endosperm callus initiation. **Maydica**, Bergamo, **31**(2):151-61, 1987.
- REINERT, J. & BACKS, D. Control of totipotency in plant cells growing *in vitro*. **Nature**, London, **220**: 1340-1, 1968.
- RHOADES, M.M. & DEMPSEY, E. The induction of mutable systems in plants with the high-loss mechanism. **Maize Genetics Cooperation Newsletter**, Columbia, **56**: 21-6, 1982.
- RHOADES, M.M. & DEMPSEY, E. Further studies on two-unit mutable systems found in our high-loss studies and on the specificity of interaction of responding and controlling elements. **Maize Genetics Cooperation Newsletter**, Columbia, **57**: 14-7, 1983.
- RHODES, C.A.; PHILLIPS, R.L.; GREEN, C.E. Cytogenetic stability of aneuploid maize tissue cultures. **Canadian Journal of Genetics and Cytology**, Ottawa, **28**(3): 374-84, Jun. 1986.
- RICHARDS, E.J. & AUSUBEL, F.M. Isolation of a higher eukaryotic telomere from *Arabidopsis thaliana*. **Cell**, Cambridge, **53**: 127-36, Apr. 1988.
- RICHARDS, E.J.; VONGS, A.; WALSH, M.; YANG, J.; CHAO, S. Substructure of telomere repeat arrays. In: HESLOP-HARRISON, J.S. & FLAVELL, R.B., ed. **The chromosome**. John Innes Centre, Colney Leane, Norwich NRA 7UH, UK, Bios Scientific Publishers, 1993. p.103-23.

- RÖDER, M.S.; LAPITAN, N.L.V.; SORRELLS, M.E.; TANKSLEY, S.D.
Genetic and physical mapping of barley telomeres. **Molecular General Genetics**, Berlin, **238**(1/2): 294-303, Apr. 1993.
- SACRISTÁN, M.D. Karyotypic changes in callus cultures from haploid and diploid plants of *Crepis capillaris* (L.) Wallr. **Chromosoma**, Berlin, **33**: 273-83, 1971.
- SAS Institute. The GLM procedure. In: SAS/STAT user's guide. Cary, N.C. 1988.
- SCHWARTZ, D. & MURRAY, C. A cytological study of breakage-fusion-bridge cycles in maize endosperm. In: INTERNATIONAL GENETICS SYMPOSIUM, 1, New York, 1956. **Proceedings**, New York, Academic Press, 1957. p.277-9.
- SCHWARZACHER, T. & HESLOP-HARRISON, J.S. *In situ* hybridization to plant telomeres using synthetic oligomers. **Genome**, Ottawa, **34**: 317-23, 1991.
- SHILLITO, R.D.; CARSWEL, G.R.; JONHSON, C.M.; DiMAIO, J.J.; HARMS, C.T. Regeneration of the plants from protoplasts of elite inbred maize. **Bio-Technology**, New York, **7**: 581-7, 1989.
- SINGH, B.D. & HARVEY, B.L. Does 2,4-D induce mitotic irregularidades in plant tissue cultures? **Experientia**, Basel, **31**:785-7, 1975.

- SMITH, S.M. & STREET, H.E. The decline of embryogenic potential as callus and suspension cultures of carrot (*Daucus carota* L.) are serially subcultured. **Annals Bototany**, **38**: 223-41, 1974.
- SONGSTAD, D.D.; PETERSEN, W.L.; ARMSTRONG, C.L. Establishment of friable embryogenic (Tipe II) callus from immature tassels of *Zea mays* (Poaceae). **American Journal of Botany**, Columbus, **79**(7): 761-4, Jul. 1992.
- SPRINGER, W.D.; GREEN, C.E.; KOHN, K.A. A histological examination of tissue culture initiation from immature embryos of maize. **Protoplasma**, New York, **101**: 269-81, 1979.
- SUNDERLAND, N. Nuclear cytology. In: STREET, H.E., ed. **Plant cell and tissue culture**. Berkeley, University of California Press, 1977. v.2, p.177-206.
- SUPRASANNA, P.; RAO, K.V.; REDDY, G.M. Plantlet regeneration from glume calli of maize (*Zea mays* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, New York, **72**(1): 120-2, 1986.
- SUPRASANNA, P.; RAO, K.V.; REDDY, G.M. Somatic embryogenesis and plant regeneration in maize. **Acta Horticulturae**, The Hangu, **289**: 265-6, 1991.
- TITO, C.M.; POGGIO, L.; NARANJO, C.A. Cytogenetic studies in the genus *Zea*. 3. DNA content and heterochromatin in species and hybrids. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, **83**: 58-64, 1991.

- TOMES, D.T. & SMITH, O.S. The effect of parental genotype on initiation of embryogenic callus from elite maize (*Zea mays* L.) germplasm. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, **70**(5): 505-9, 1985.
- TORNÉ, J.M.; SANTOS, M.A.; PONS, A.; BLANCO, M. Regeneration of plants from mesocotyl tissue cultures of immature embryos of *Zea mays* L. **Plant Science Letters**, Amsterdam, **17**(3): 339-44, 1980.
- VAN LAMMEREN, A.A.M. Observations on the structural development of immature maize embryos (*Zea mays* L.) during *in vitro* culture in the presence or absence of 2,4-D. **Acta Botanica Neerlandica**, Leiden, **37**(1): 49-61, March, 1988.
- VASIL, I.K. Somatic embryogenesis and its consequences in the Gramineae. In: HENKE, R.R.; HUGHES, K.W.; CONSTANTIN, M.P.; HOLLAENDER, K.W. **Tissue cultures in forestry and agriculture**. New York, Plenum, 1985. p.31-47.
- VASIL, V. & VASIL, I.K. Plant regeneration from friable embryogenic callus and cell suspension cultures of *Zea mays* L. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, **124**(5): 399-408, Jul. 1986.
- VASIL V.; LU, C.; VASIL, I.K. Histology of somatic embryogenesis in cultured immature embryos of maize (*Zea mays* L.). **Protoplasma**, New York, **127**: 1-8, 1985.

- VASIL, V.; VASIL, I.K.; LU, C. Somatic embryogenesis in long-term callus cultures of *Zea mays* L. (Gramineae). **American Journal of Botany**, Columbus, **71**(1): 158-61, Jan. 1984.
- WAN, Y.; ROCHEFORD, T.R.; WIDHOLM, J.M. RFLP analysis to identify putative chromosomal regions involved in the anther culture response and callus formation of maize. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, **85**: 360-5, 1992.
- WANG, A.S. Callus induction and plant regeneration from maize mature embryos. **Plant Cell Reports**, New York, **6**: 360-2, 1987.
- WANG, S.; LAPITAN, N.L.V.; TSUCHIYA, T. Characterization of telomeres in *Hordeum vulgare* chromosomes by *in situ* hybridization. I. Normal diploid barley. **Japanese Journal of Genetics**, Mashima, **86**: 313-6, 1991.
- WANG, S.; LAPITAN, N.L.V.; Roder, M.; TSUCHIYA, T. Characterization of telomeres in *hordeum vulgare* chromosomes by *in situ* hybridization. II. Healed broken chromosomes in telotrisomic 4L and acrotrisomic 4L^{4S} lines. **Genome**, Ottawa, **35**: 975-80, 1992.
- WEIL, C.F. & WESSLER, S.R. Molecular evidence that chromosome breakage by Ds elements is caused by aberrant transposition. **The Plant Cell**, Rockville, **5**: 515-22, May, 1993.

- WERNER, J.E.; KOTA, R.S.; GILL, B.S.; ENDO, T.R. Distribution of telomeric repeats and their role in the healing of broken chromosome ends in wheat. **Genome**, Ottawa, **35**: 844-8, 1992.
- ZAKIAN, V. Structure and function of telomers. **Annual Review Genetic**, Palo alto, **23**: 579-604, 1989.
- ZIAUDDIN, A. & KASHA, K.J. Long-term callus cultures of diploid barley (*Hordeum vulgare*): Effect of auxins on chromosomal status of cutures and regeneration of plants. **Euphytica**, Wageningen, **48**: 279-86, 1990.