

CULTIVO IN VITRO DE MILHO (*Zea mays* L.)
E ANÁLISE DA SUA INSTABILIDADE MITÓTICA

ANTONIO FLUMINHAN JÚNIOR

Engenheiro Agrônomo

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. 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
Março - 1992

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

Fluminhan Júnior, Antonio

F646c Cultivo in vitro de milho (Zea mays L.) e análise da
sua instabilidade mitótica. Piracicaba, 1992.
213p. ilus.

Diss.(Mestre) - ESALQ
Bibliografia.

1. Milho - Cultivo "in vitro" 2. Milho - Instabilidade
mitótica I. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz.
Piracicaba

CDD 633.15

CULTIVO IN VITRO DE MILHO (*Zea mays* L.)
E ANÁLISE DA SUA INSTABILIDADE MITÓTICA

ANTONIO FLUMINHAN JÚNIOR

Aprovada em: 24.04.1992

Comissão julgadora:

Prof ^ª Dr ^ª Margarida L.R. de Aguiar-Perecin	ESALQ/USP
Prof. Dr. José Branco de Miranda Filho	ESALQ/USP
Prof ^ª Dr ^ª Laudenor Maria Prioli	UNICAMP



Prof^ª. Dr^ª. MARGARIDA L.R. DE AGUIAR-PERECIN

Orientadora

AGRADECIMENTOS

- . Ao Governo do Estado de São Paulo, pela criação e manutenção de entidades voltadas à Educação, à Pesquisa e ao Desenvolvimento do nosso País;
- . À Universidade de São Paulo, pela oportunidade de realizar estudos em uma de suas mais conceituadas Unidades, a Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - ESALQ/USP, Campus de Piracicaba (SP);
- . Ao Diretor da ESALQ/USP, Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo;
- . Ao Chefe do Departamento e Instituto de Genética da ESALQ/USP, Prof. Dr. Geraldo Antônio Tosello;
- . À Prof^ª Dr^ª Margarida L.R. de Aguiar-Perecin, pela orientação durante o estágio de Iniciação Científica e no Curso de Mestrado no Depto. de Genética da ESALQ/USP;
- . Ao Prof. Dr. Décio Barbin, Presidente da Comissão de Pós-Graduação da ESALQ/USP;
- . Aos Profs. Dr. Roland Vencovsky, Dr. Natal A. Vello e Dr. Paulo S. Martins, Coordenadores do Curso de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, do Departamento de Genética da ESALQ/USP;
- . Ao Prof. Dr. José B. de Miranda Filho e Prof^ª Dr^ª Laudénir M. Prioli, membros titulares, e Prof. Dr. Gerhard Bandel e Prof. Dr. Paulo M. Ruas, membros suplentes, componentes da banca examinadora;
- . À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão de bolsa de estudos e pelo financiamento de projetos relacionados ao presente trabalho;
- . À Sementes Agroceres S/A., pela concessão de bolsa de estudos no período final de elaboração da Dissertação;
- . Aos Professores do Curso de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, em especial ao Prof. Dr. Akihiko Ando, pelos ensinamentos valiosos e pelo exemplo de dedicação e de valores científicos;

- . Ao Prof. Dr. José B. de Miranda Filho, pela orientação na análise dos dados obtidos com os experimentos realizados;
- . À Prof^a Dr^a Clarice G.B. Demétrio, do Depto. de Matemática e Estatística da ESALQ/USP, pela realização das análises estatísticas;
- . À Japan International Cooperation Agency (JICA), pela concessão de bolsa de estudos para a realização de treinamento em Biotecnologia no RIKEN (The Institute of Physical and Chemical Research), Saitama, Japão;
- . Ao Prof. Dr. Isamu Yamaguchi, orientador durante o treinamento no Microbial Toxicology Laboratory do RIKEN, e ao Dr. K. Yoneyama e Dr. T. Kamakura, pelos ensinamentos e estímulos;
- . Aos funcionários da Divisão de Biblioteca e Documentação (DIBD) da ESALQ/USP, pelo auxílio nas diversas fases do levantamento bibliográfico realizado em nosso trabalho;
- . Ao Centro de Informática na Agricultura (CIAGRI), da ESALQ/USP, pela permissão de utilização de suas instalações para a elaboração do trabalho final, e aos seus funcionários, monitores e estagiários, pelo contínuo auxílio com os equipamentos e recursos disponíveis;
- . Aos pesquisadores do Instituto Agronômico de Campinas (IAC) e da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), pelo aprendizado nas atividades de cultivo *in vitro*;
- . Aos funcionários do Departamento de Genética da ESALQ/USP, em especial ao Sr. Carlos A. Veríssimo e Sra. Silvia C.M. Molina, pelo auxílio em atividades relacionadas com os experimentos;
- . Aos colegas do Curso de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas pelo convívio durante o período de realização de nossos estudos;
- . Aos funcionários da Assistência Acadêmica da ESALQ/USP, em especial aos funcionários da Seção de Alunos de Pós-Graduação;
- . Às demais pessoas que colaboraram direta ou indiretamente para a realização do presente trabalho;

À memória de meu pai

À Sra. Ivone, minha mãe,
aos meus irmãos:
Francisco e Vânia,
Cláudia e Álvaro,
Daniela e Luis,
e aos meus sobrinhos:
Anthony e Vivian

DEDICO

SUMARIO

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE TABELAS.....	x
RESUMO.....	xi
SUMMARY.....	xiii
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	05
2.1. Utilização de técnicas de cultivo <i>in vitro</i> em milho.....	05
2.1.1. Histórico do cultivo <i>in vitro</i> de milho.....	05
2.1.2. Classificação dos tipos de calos.....	07
2.1.3. Fatores que influenciam a resposta ao cultivo.....	10
2.2. Seleção de linhagens celulares, cultivo em suspensões e isolamento de protoplastos de milho.....	20
2.2.1. Seleção de linhagens celulares.....	20
2.2.2. Estabelecimento de suspensões celulares e isolamento de protoplastos.....	22
2.3. Variabilidade genética e citogenética decorrente do cultivo <i>in vitro</i> e suas possíveis causas.....	28
2.3.1. Variação somaclonal e instabilidade genômica no cultivo <i>in vitro</i>	28
2.3.1.1. Variação somaclonal.....	29
2.3.1.2. Instabilidade genética e citogenética.....	30
2.3.2. Variabilidade no cultivo <i>in vitro</i> de milho.....	31
2.3.2.1. Variação somaclonal e melhoramento genético..	33
2.3.2.2. Instabilidade cromossômica.....	35
2.3.3. Análise da instabilidade cromossômica de células cultivadas <i>in vitro</i>	39
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	42
3.1. Genótipos utilizados.....	42
3.1.1. Experimento 1: Etapa preliminar de padronização da metodologia de cultivo <i>in vitro</i>	42

3.1.2. Experimento 2: Linhagens endogâmicas com diferentes composições de knobs cromossômicos.....	43
3.1.3. Experimento 3: Outros genótipos.....	46
3.2. Metodologia de cultivo <i>in vitro</i> de calos de milho.....	52
3.2.1. Obtenção de explantes e indução de calogênese.....	52
3.2.2. Meios de cultura utilizados.....	53
3.2.3. Observação de embriogênese somática.....	55
3.2.4. Regeneração e aclimatação de plantas R0.....	55
3.2.5. Produção de progênies das plantas regeneradas e observação de variabilidade genética.....	57
3.3. Análise da instabilidade cromossômica de materiais cultivados <i>in vitro</i>	58
3.3.1. Análise de anáfases mitóticas em calos.....	59
3.3.2. Análise de metáfases mitóticas em calos e em meristemas radiculares de progênies de plantas R0.....	62
3.4. Análise estatística.....	63
3.4.1. Parâmetros avaliados.....	63
3.4.1.1. Cultivo <i>in vitro</i> de linhagens endogâmicas do Experimento 2.....	63
3.4.1.2. Instabilidade mitótica em células de calos do Experimento 2.3.....	64
3.4.2. Análises de variância e testes estatísticos.....	65
3.4.2.1. Cultivo <i>in vitro</i> de linhagens endogâmicas do Experimento 2.....	66
3.4.2.2. Instabilidade mitótica em células de calos do Experimento 2.3.....	68
3.5. Estabelecimento de suspensões celulares.....	69
3.5.1. Genótipos e meios de cultura.....	69
3.5.2. Métodos de inoculação e subcultivos.....	70
4. RESULTADOS.....	72
4.1. Experimento 1: Implantação da metodologia.....	72
4.1.1. Caracterização dos tipos de calos induzidos e influência das condições de cultivo.....	75
4.1.2. Regeneração de plantas e observação de variações em alguns de seus caracteres.....	81
4.1.3. Avaliação do número de cromossomos em células de meristema radicular de progênies R1.....	90
4.2. Experimento 2: Linhagens com diferentes composições de knobs cromossômicos.....	93
4.2.1. Capacidade embriogênica dos genótipos testados.....	93

	Página
4.2.2. Produção de progênies da geração R1.....	115
4.3. Avaliação da instabilidade mitótica.....	117
4.3.1. Experimento preliminar de investigação de aberrações cromossômicas em culturas de calos.....	117
4.3.2. Análise de anáfases mitóticas em calos de linhagens com diferentes composições de knobs.....	132
4.3.3. Análise de metáfases mitóticas em calos de linhagens com diferentes composições de knobs.....	149
4.4. Experimento 3: Outros genótipos.....	152
4.5. Estabelecimento de suspensões celulares.....	155
4.5.1. Testes com meios de cultura.....	155
4.5.2. Teste de genótipos com diferentes tipos de calos.....	156
5. DISCUSSÃO.....	158
5.1. Cultivo <i>in vitro</i> de calos de milho.....	158
5.1.1. Implantação da metodologia de cultivo <i>in vitro</i>	158
5.1.2. Linhagens endogâmicas com diferentes composições de knobs cromossômicos heterocromáticos.....	162
5.1.3. Genótipos incluídos no Experimento 3.....	167
5.2. Avaliação da instabilidade mitótica.....	168
5.2.1. Análise de anáfases em células dos calos.....	168
5.2.1.1. Avaliação de linhagens com diferentes composições de knobs cromossômicos.....	169
5.2.1.2. Análise de pontes cromossômicas através da coloração pelo bandamento-C.....	173
5.2.2. Análise de metáfases mitóticas.....	179
5.2.2.1. Meristemas radiculares de progênies de plantas regeneradas.....	180
5.2.2.2. Regiões embriogênicas de calos.....	181
5.3. Cultivo de suspensões celulares.....	184
6. CONCLUSÕES.....	187
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	191

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 01.....	78
Figura 02.....	78
Figura 03.....	79
Figura 04.....	79
Figura 05.....	87
Figura 06.....	87
Figura 07.....	88
Figura 08.....	88
Figura 09.....	89
Figura 10.....	89
Figura 11.....	100
Figura 12.....	100
Figura 13.....	101
Figura 14.....	101
Figura 15.....	112
Figura 16.....	113
Figura 17.....	114
Figura 18.....	122
Figura 19.....	122
Figura 20.....	123
Figura 21.....	123
Figura 22.....	124
Figura 23.....	124
Figura 24.....	128
Figura 25.....	128
Figura 26.....	129
Figura 27.....	129
Figura 28.....	151
Figura 29.....	151
Figura 30.....	157

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 01.....	47
Tabela 02.....	48
Tabela 03.....	49
Tabela 04.....	50
Tabela 05.....	51
Tabela 06.....	54
Tabela 07.....	80
Tabela 08.....	84
Tabela 09.....	85
Tabela 10.....	86
Tabela 11.....	92
Tabela 12.....	102
Tabela 13.....	103
Tabela 14.....	104
Tabela 15.....	105
Tabela 16.....	106
Tabela 17.....	107
Tabela 18.....	108
Tabela 19.....	109
Tabela 20.....	110
Tabela 21.....	111
Tabela 22.....	116
Tabela 23.....	119
Tabela 24.....	125
Tabela 25.....	126
Tabela 26.....	127
Tabela 27.....	131
Tabela 28.....	135
Tabela 29.....	138
Tabela 30.....	141
Tabela 31.....	142
Tabela 32.....	143
Tabela 33.....	144
Tabela 34.....	145
Tabela 35.....	146
Tabela 36.....	147
Tabela 37.....	148
Tabela 38.....	154

CULTIVO IN VITRO DE MILHO (*Zea mays* L.) E ANÁLISE DA SUA INSTABILIDADE MITÓTICA

Autor: ANTONIO FLUMINHAN JÚNIOR

Orientadora: Prof^a. Dr^a. MARGARIDA L.R. DE AGUIAR-PERECIN

RESUMO

O cultivo de calos induzidos a partir do escutelo de embriões imaturos de milho mostrou que alguns genótipos adaptados ao clima tropical apresentam respostas favoráveis, com formação de calos embriogênicos e regeneração de plantas, tendo sido estudadas as variedades Piranão de Inverno e Jac-Duro. Progenies R1, R2 e R3 de plantas regeneradas destas variedades mostraram variações para: altura das plantas, morfologia de inflorescências, coloração e textura de sementes.

Após a implantação da metodologia, foram avaliadas as respostas ao cultivo in vitro de explantes obtidos de linhagens endogâmicas com diferentes composições de knobs cromossômicos heterocromáticos, pertencentes a quatro famílias distintas, obtidas a partir da variedade Jac-Duro. As linhagens pertencentes à família 300-1-3 apresentaram as melhores respostas, com alta taxa de indução de calos do Tipo II (friáveis, altamente embriogênicos), comprovadas por três diferentes experimentos. Algumas das linhagens desta família foram testadas para totipotência dos calos induzidos e regeneraram plantas férteis com elevada produção de sementes. Explantes removidos de linhagens pertencentes às famílias 301-2-1, 303-4-1 e 303-4-4 produziram, na maioria das vezes, calos não-embriogênicos. As linhagens 44114/1 e 44114/2, pertencentes à família 303-4-4 apresentaram a formação, a partir de calos

não-embriogênicos, de setores altamente friáveis, embriogênicos e com crescimento rápido. Estas linhagens celulares, juntamente com calos do Tipo II (da família 300-1-3) e calos não-embriogênicos (das famílias 301-2-1 e 303-4-1), foram utilizados em cultivo de suspensões celulares, produzindo culturas finamente dispersas em período de tempo relativamente curto (entre 1 e 4 meses).

As análises da ocorrência de aberrações cromossômicas foram realizadas em calos de 15 linhagens endogâmicas pertencentes às 4 famílias descritas. Foi avaliada a frequência de formação de pontes cromossômicas em anáfases mitóticas dos calos, com o objetivo de se verificar hipótese levantada na literatura (PHILLIPS et alii, 1988), sobre o possível envolvimento das regiões heterocromáticas dos knobs cromossômicos com a ocorrência deste evento em calos de milho. Um segundo aspecto avaliado foi a relação existente entre a capacidade embriogênica do genótipo e a estabilidade mitótica de suas células no cultivo *in vitro*. Foi observado que as pontes têm origem em braços cromossômicos contendo knobs heterocromáticos, comprovado através da metodologia de bandamento-C. Entretanto, genótipos com maiores conteúdos de knobs não apresentaram maiores frequências de formação de pontes. Foi observada a existência de um evento preliminar, caracterizado por um atraso na separação das cromátides irmãs, ao nível dos knobs, dando origem a uma ponte anafásica. Este atraso exerce grande tensão nas cromátides envolvidas e pode resultar em quebras. Diversas figuras mitóticas analisadas sugerem a ocorrência de ciclos de quebra-fusão-ponte em regiões embriogênicas dos calos. Aparentemente, não foi encontrada relação entre o tipo de calo e a maior ocorrência de aberrações cromossômicas. As linhagens celulares selecionadas a partir do material 44114/2 foram as que apresentaram menor ocorrência de aberrações mitóticas, embora este apresente o maior conteúdo de knobs entre os genótipos analisados.

IN VITRO CULTURE OF MAIZE (*Zea mays* L.)
AND ANALYSIS OF ITS MITOTIC INSTABILITY

Author: ANTONIO FLUMINHAN JÚNIOR

Adviser: Prof. Dr. MARGARIDA L.R. DE AGUIAR-PERECIN

SUMMARY

Maize embryogenic callus cultures initiated from immature embryos of several genotypes adapted to the tropics, were established and showed to be able to regenerate plants. The Piranão de Inverno (dent) and Jac-Duro (flint) varieties were used in this study. R1, R2 and R3 progenies from regenerated plants of these cultivars showed variation to the following characters: plant height, panicle morphology, seed color and texture.

The culture response of calli derived from four families of inbred lines with different knob compositions, originated from the Jac-Duro variety, was evaluated as well. Highly embryogenic callus cultures were obtained from inbred lines of the 300-1-3 family, confirmed by three different experiments. Some inbred lines belonging to this family were tested for their callus totipotency and showed high capacity of plant regeneration and seed production. Immature embryos from inbred lines of the 301-2-1, 303-4-1 and 303-4-4 families induced non-embryogenic callus cultures. However, non-embryogenic calli formed from the 44114/1 and 44114/2 inbred lines, belonging to the 303-4-4 family, produced friable and embryogenic sectors with high growth rate. Cell suspension cultures were induced using different materials: Type II calli (from 300-1-3 family), non-embryogenic calli (from 301-2-1 and 303-4-1 families) and the cell lines mentioned above (from 303-

4-4 family). All of them produced well-established cell suspensions in a relatively short period of time (1 to 4 months).

A cytological analysis of the callus cultures of 15 inbred lines belonging to the four families studied was carried out. The occurrence and frequency of mitotic anaphase bridges was evaluated, in order to investigate correlations between knobs and anaphase bridges, according to the hypothesis of PHILLIPS et alii (1988), that the chromosome aberrations observed in regenerants, usually involving knobbed chromosomes, are the result of chromosome breakage occurring in culture. The second point analysed was the possible relation between the morphogenetic potential of the genotypes and their degree of mitotic stability in cultures. In C-banded preparations, it was observed that the anaphase bridges are originated at the knob level. However, genotypes with higher heterochromatic knob contents did not present higher frequency of bridge formation. It has been identified a preliminary event, characterized by a delay in the sister-chromatid separation, originated at the knob level. This delay causes a strong tension on chromatids and might result in chromosome breakage. Several mitotic figures suggest the occurrence of breakage-fusion-bridge cycles initiated by broken chromosomes. Correlations between callus type and higher frequency of chromosome aberration were not observed. Cell lines selected from callus cultures from the 44114/2 inbred line showed lower frequency of mitotic aberrations, although its knob content is the highest among the genotypes analysed.

1. INTRODUÇÃO

Os recentes avanços de metodologias de cultivo de células e tecidos vegetais *in vitro* têm despertado a atenção de geneticistas e melhoristas para a utilização destas técnicas em numerosas áreas de pesquisa. O objetivo inicial foi o estabelecimento de sistemas simplificados de estudo dos complexos fenômenos biológicos que ocorrem nas plantas inteiras. Estas simplificações permitiriam a compreensão dos processos genéticos fundamentais ao nível celular ou bem próximo dele.

Os avanços na cultura de células e tecidos de milho (*Zea mays* L.) têm promovido investigações a respeito dos mecanismos metabólicos, fisiológicos e de desenvolvimento ao nível de células isoladas. Os resultados destes estudos e a disponibilidade de um sistema de cultivo *in vitro* eficiente, aliado aos já bem documentados conhecimentos nas áreas de Genética e Fisiologia, oferecem novas e importantes oportunidades de pesquisa em melhoramento genético do milho. No entanto, os benefícios máximos a serem alcançados com estas técnicas dependem da habilidade em se manipular uma grande população de células homogêneas e totipotentes.

O primeiro caso bem descrito de estabelecimento de culturas de tecidos totipotentes de milho foi relatado em 1975. Desde então, têm sido reconhecido que alguns fatores são de fundamental importância para a obtenção de respostas favoráveis, ou seja, indução de calos embriogênicos e com potencial de regeneração de plantas férteis, entre eles: a fonte de explante e o seu estágio de desenvolvimento, o genótipo utilizado, a composição dos meios de cultura e as condições físicas do ambiente de cultivo.

É reconhecido que ainda existem diversos pontos a serem melhor esclarecidos, principalmente no que se refere à indução dos diferentes tipos de calos de milho. Entretanto, a determinação da base genética do caráter mais favorável (formação de calos friáveis, altamente embriogênicos) para diversos genótipos testados e a verificação de que a frequência dos genes envolvidos é variável entre as populações têm permitido a identificação de materiais com comportamento superior e o estabelecimento de programas para a transferência deste caráter para genótipos recalcitrantes. Além disto, estudos verificando as necessidades nutricionais das células cultivadas *in vitro* têm relatado a grande influência que alguns compostos presentes nos meios exercem sobre a capacidade embriogênica, em determinados genótipos.

Por sua vez, a variabilidade genética induzida pelo cultivo *in vitro*, observada tanto nas células cultivadas como em plantas regeneradas (predominantemente surgida quando o tecido passa pela formação de calos), representa um paradoxo com relação às possibilidades de utilização das culturas para os mais diversos fins. Dependendo do tipo de manipulação desejada pelo pesquisador, esta variação pode ser um evento a ser maximizado ou a ser minimizado, se possível até mesmo evitado. A obtenção de variações novas ou inexistentes nas plantas da população original pode ser uma fonte a ser utilizada em programas de melhoramento, ou para experimentos de seleção ao nível celular. Por outro lado, manipulações como: micropropagação, preservação de germoplasma, hibridação somática e transformação genética, são prejudicadas pela ocorrência de variações durante a passagem pelo cultivo *in vitro*. O conhecimento dos mecanismos responsáveis por estas variações poderá permitir o controle dos seus níveis de ocorrência em plantas regeneradas. Como preconizado por diversos autores (McCOY & PHILLIPS, 1982; PHILLIPS, 1986; LEE & PHILLIPS, 1988; PHILLIPS et alii, 1988; SOMERS et alii, 1988

e PHILLIPS et alii, 1990), os braços cromossômicos contendo knobs seriam mais susceptíveis a quebras durante o cultivo in vitro. Os autores comentaram que isto poderia ser devido a distúrbios decorrentes da replicação tardia do DNA dos knobs, com uma conseqüente formação de pontes nas anáfases.

Os trabalhos apresentados nesta dissertação relacionam-se, principalmente, com a metodologia de cultivo in vitro de calos induzidos a partir do escutelo de embriões imaturos de milho. As análises tiveram como objetivos principais os seguintes aspectos:

. Avaliação da capacidade de produção de calos embriogênicos em diversos genótipos adaptados ao clima tropical. Foram testadas duas variedades e dois grupos de linhagens endogâmicas com as seguintes características: a) um grupo de linhagens com diferentes composições de marcadores citológicos (knobs cromossômicos heterocromáticos), e b) um grupo de linhagens com alta capacidade de combinação para a produção de grãos, utilizada em programa de melhoramento do Departamento de Genética da ESALQ/USP.

. Avaliação da instabilidade mitótica de células dos calos das linhagens com diferentes composições de knobs cromossômicos heterocromáticos. Foi também analisada uma amostra de progênies de plantas regeneradas de calos induzidos a partir das variedades testadas. Para o primeiro tipo de material, foi levantada a natureza e freqüência de anormalidades mitóticas durante o cultivo de calos e verificado o possível envolvimento dos knobs cromossômicos heterocromáticos sobre a ocorrência de tais anormalidades. O segundo material foi utilizado em um estudo preliminar da ocorrência de aberrações cromossômicas numéricas, em tecidos somáticos de progênies de plantas regeneradas.

. Testes para a capacidade de indução ao cultivo em suspensão de alguns calos selecionados durante o experimento de avaliação de genótipos. O objetivo foi de se padronizar os procedimentos para este tipo de cultivo, a utilização de meios de cultura adequados e o teste de genótipos que induzem tipos de calos com morfologia e capacidade embriogênica características.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Utilização de técnicas de cultivo in vitro em milho

2.1.1. Histórico do cultivo in vitro de milho

A história da cultura de tecidos de milho provavelmente começou com as tentativas de se cultivar endosperma de milho (LA RUE, 1947). Este autor conseguiu estabelecer culturas de endosperma a partir da cultivar Black Mexican Sweet (LA RUE, 1949), o que serviu de estímulo para diversos outros experimentos com: milhos doces (STRAUS, 1954; STRAUS & LA RUE, 1954 e STRAUS, 1958), milhos amiláceos (SHANNON & BATEY, 1973) e amiláceos com o gene *waxy* (REDDY & PETERSON, 1977). Os sucessivos estudos com diferentes materiais indicaram uma variação genética para a resposta ao cultivo in vitro de endosperma. A base genética deste caráter foi primeiro estudada por TABATA & MOTOYOSHI (1965).

Em adição a estes estudos verificando as respostas ao cultivo in vitro de endosperma de milho, MASCARENHAS et alii (1969) procuraram estabelecer protocolos alternativos, utilizando como explantes pedaços de primórdios foliares de plântulas, cultivadas em um grande número de meios com diferentes composições de nutrientes. Os resultados de tais estudos foram negativos, no que se refere à regeneração de plantas (MASCARENHAS et alii, 1975a; b e HENDRE et alii, 1975). Outras tentativas, relatadas por inúmeros trabalhos envolvendo

culturas estabelecidas a partir de tecidos diferenciados, alcançaram resultados semelhantes. Como exemplo de explantes testados podemos mencionar: meristemas de inflorescências masculinas imaturas (LINSMAIER-BEDNAR & BEDNAR, 1972), embriões maduros macerados (GRESSHOF & DOY, 1973), fragmentos de caule de plântulas (SHERIDAN, 1975), embriões maduros e ápices de caules (GREEN et alii, 1974).

Em meados da década de 70, duas publicações na literatura tiveram grande impacto na cultura de tecidos de milho. No primeiro, SHERIDAN (1975) estabeleceu uma cultura em suspensão finamente dispersa a partir de calos induzidos de fragmentos de caule de plântulas da cultivar Black Mexican Sweet. O cultivo foi eficiente na formação de calos a partir da suspensão celular e na obtenção de células isoladas em suspensão, embora os calos induzidos não fossem morfogênicos.

O segundo relato apresentou um método de cultivo de tecidos de milho a partir do qual plântulas poderiam ser regeneradas (GREEN & PHILLIPS, 1975). Os calos eram induzidos a partir do escutelo de embriões imaturos em uma idade específica e podiam ser subcultivados por muitos meses sem a perda de sua capacidade regenerativa. Uma vez mais foi demonstrada uma variação de respostas ao cultivo *in vitro*, onde somente alguns genótipos tiveram comportamento favorável entre os testados.

Desde então, a descrição e interpretação da formação de calos e regeneração de plantas tem utilizado uma terminologia algumas vezes ambígua. O termo "embriogênese somática" é utilizado amplamente na literatura de cultura de tecidos de cereais, inclusive de milho (WILLIAMS & MAHESWARAN, 1986), embora somente alguns trabalhos tragam evidências diretas confirmando histologicamente que a regeneração ocorre via embriogênese somática (como salientado por TOMES, 1985a). Em milho, o mecanismo de embriogênese somática foi comprovado pelos trabalhos de LU et alii (1982; 1983), GREEN (1982), GREEN

et alii (1983), NOVÁK et alii (1983), VASIL et alii (1984; 1985), KAMO et alii (1985) e LOWE et alii (1985). Diversos autores têm demonstrado a existência dos mecanismos de regeneração por embriogênese somática e por organogênese, e sugerido que aspectos genéticos e citogenéticos podem ser influenciados pela forma predominante de regeneração de um determinado genótipo (ARMSTRONG & PHILLIPS, 1988 e revisão em PHILLIPS et alii, 1988).

2.1.2. Classificação dos tipos de calos

A distinção entre os tipos de calos é, a princípio, uma característica essencial para o estabelecimento de culturas com capacidade de regeneração por longos períodos de tempo. A terminologia usualmente utilizada, segundo TOMES (1985a), caracteriza "calos embriogênicos" como sendo aqueles que possuem o potencial de regenerar plantas. Este termo inclui regeneração por organogênese (a partir de gemas, apicais ou radiculares, formadas na estrutura do calo) e embriogênese somática (quando são identificadas estruturas semelhantes a coleorrizas e coleóptilos, que se desenvolvem sincrônicamente, partilhando um sistema vascular comum). Ao nível celular, o referido autor comenta que os calos embriogênicos são compostos, em sua maioria, por células meristemáticas com elevada taxa de divisão celular, com dimensões relativamente pequenas e com citoplasma denso.

"Calos não-embriogênicos" é o termo que se refere aos calos que possuem pequena ou nenhuma probabilidade de regenerar plantas via organogênese, embriogênese ou germinação de meristemas pré-existentes. Ao nível celular, este tipo de calo é caracterizado freqüentemente por possuir células de tamanho avantajado, com grandes vacúolos e potencial de divisão celular inferior (NABORS et alii, 1983 e VASIL, 1983).

Esta abordagem pode ser bem ilustrada, do ponto de vista histológico, pelos resultados obtidos por MOTT & CURE (1978).

No caso específico do milho, há uma subdivisão de calos embriogênicos em calos do Tipo I e do Tipo II, mencionada por GREEN et alii (1983) e sugerida por ARMSTRONG & GREEN (1985). Calos embriogênicos do Tipo I são descritos como compactos, opacos, com crescimento relativamente lento e estruturalmente complexo, mas capazes de regenerar plantas por organogênese e embriogênese. A ocorrência, na sua superfície, de regiões meristemáticas que dão origem a coleótilos não associados estruturalmente a meristemas radiculares indicam que a organogênese é o modo primário de regeneração neste tipo de calo (FREELING et alii, 1976; HARMS et alii, 1976 e SPRINGER et alii, 1979). Estes primórdios foliares possuem estrutura semelhante ao meristema apical (LOWE et alii, 1985), e podem produzir uma planta completa se forem removidos deste meio e transferidos para outro com menor concentração de auxina (GREEN & PHILLIPS, 1975 e FREELING et alii, 1976). Há ocorrência de estruturas semelhantes a escutelos nestas culturas (FREELING et alii, 1976), e evidências de ocorrência de embriogênese somática (LU et alii, 1982; 1983; VASIL et alii, 1985).

Pelo fato destes calos compactos regeneráveis apresentarem uma alta tendência de germinação dos embriões somáticos, mesmo quando mantidos em meio de cultura contendo auxinas (SPRINGER et alii, 1979 e ARMSTRONG & GREEN, 1985), torna-se muito difícil a sua manutenção em cultivos por longo período de tempo. O elevado grau de organização dos tecidos dentro de calos do Tipo I, que resulta em uma diminuição na sua taxa de crescimento é outra razão adicional à dificuldade mencionada (LU et alii, 1982 e VASIL & VASIL, 1986).

Os calos do Tipo II são friáveis, com intenso crescimento, estruturalmente menos complexos, e formam embriões somáticos mais claramente, freqüentemente surgidos na extremidade de uma estrutura parecida com um suspensor, como

verificado nas linhagens A188 e B73. Em alguns casos essas estruturas são tão estreitas em suas bases que sugerem uma possível origem unicelular (GREEN, 1982 e 1983). Este tipo de calo permite fácil identificação pela observação, na sua superfície, de numerosos pró-embriões ou embriões somáticos em estágio globular. Tanto a sua morfologia como a sua capacidade de regenerar plantas não são alteradas mesmo em culturas de longa duração (GREEN & RHODES, 1982), em vários genótipos diferentes (GREEN, 1982; ARMSTRONG & GREEN, 1985; VASIL & VASIL, 1986; SHILLITO et alii, 1989; PRIOLI & SONDAHL, 1989 e MÓRO CZ et alii, 1990).

A ocorrência de calos friáveis, altamente embriogênicos é, portanto, muito desejada. No entanto, a literatura descreve que somente alguns genótipos são capazes de formar este tipo de calo (revisão em PHILLIPS et alii, 1988), tais como: linhagens A188 (GREEN, 1982), B73 (LOWE et alii, 1985), híbrido simples entre a linhagem W64A x Black Mexican Sweet (LUPOTTO, 1986) e híbrido comercial DeKalb XL82 (VASIL & VASIL, 1986). Dados obtidos por TOMES (1985b) dão evidências da existência de um controle genético para a produção deste tipo de calo. Além disto, já foi observado que modificações na composição do meio de cultura podem influenciar a sua produção (ARMSTRONG & GREEN, 1982 e 1985), como será abordado adiante.

Recentemente, foi descrito um outro tipo de calo, bastante adequado para o estabelecimento de culturas embriogênicas de células em suspensão, com o objetivo de se produzir protoplastos capazes de regenerar plantas férteis (SHILLITO et alii, 1989; PRIOLI & SONDAHL, 1989; PRIOLI et alii, 1990 e MÓRO CZ et alii, 1990). Embora não exista ainda uma denominação específica para esse tipo de calo (veja SHILLITO et alii, 1989 e PRIOLI et alii, 1990), ele é descrito como sendo altamente friável, altamente embriogênico, se as subculturas forem feitas regularmente a cada 10-15 dias, mas não apresenta pró-embriões somáticos visíveis ao estereomicroscópio.

2.1.3. Fatores que influenciam a resposta ao cultivo in vitro

O rápido reconhecimento dos calos capazes de regenerar plantas é de fundamental importância durante o processo de cultivo in vitro, principalmente quando os calos são originários de numerosas linhagens celulares diferentes.

Na maioria das vezes, o potencial embriogênico é identificado através de características morfológicas, visualmente. Entretanto, vários trabalhos têm relatado a possibilidade de se distinguírem calos embriogênicos dos não-embriogênicos através de métodos bioquímicos, tais como: análise de antígenos (KHAVKIN et alii, 1977), padrões de polipeptídeos (CHEN & LUTHE, 1987 e STIRN & JACOBSEN, 1987), presença de inibidor de tripsina (CARLBERG et alii, 1987) e padrões isoenzimáticos específicos para milho (FRANSZ et alii, 1989). Segundo os autores, esses métodos permitem uma identificação mais rápida e acurada dos diferentes tipos de calos. A identificação dos fenótipos dos calos tem contribuído de maneira acentuada para a determinação dos fatores que desempenham um papel importante no isolamento e manutenção de culturas com alto potencial de regeneração de plantas, tais como: explantes, condições ambientais de cultivo e genótipos (veja RAPELA, 1984 e 1985).

Com relação aos explantes, é mais apropriado iniciarem-se culturas regeneráveis de milho a partir do embrião imaturo em um estágio de desenvolvimento apropriado (usualmente com 1,0 a 2,0 mm de comprimento) (GREEN & PHILLIPS, 1975; GREEN, 1977; 1978 e BECKERT, 1980). Segundo estes autores, o comprimento do embrião imaturo parece ser o mais importante ponto crítico para o início da cultura, ao invés da idade do embrião após a polinização. A orientação do explante no meio de cultura também exerce grande influência na indução e crescimento de calos: quando o embrião é colocado com o eixo

embrionário em contato com o meio, ocorre a inibição de sua germinação e começa a proliferação do calo a partir das células do escutelo. Quando a orientação é a inversa, isto é, o escutelo fica em contato com o meio de cultura, ocorre a germinação do embrião, o que impede ou dificulta a formação do calo (GREEN & PHILLIPS, 1975; GREEN, 1978 e LU et alii, 1982).

Outros tipos de explantes de vários genótipos testados posteriormente apresentaram resultados positivos (indução de culturas regeneráveis), mas muito inferiores aos obtidos com embriões imaturos. Por exemplo: foi observada a formação de calos do Tipo I e regeneração de plantas a partir de mesocótilo (HARMS et alii, 1976), embriões maduros (TORNÉ et alii, 1980 e BECKERT, 1980), inflorescências femininas imaturas (MOLNAR et alii, 1980), tecidos foliares nodais (LOWE et alii, 1985), inflorescências masculinas imaturas (RHODES et alii, 1986) e glumas de flores masculinas imaturas (SUPRASANNA et alii, 1986). Existe relato sobre a ocorrência de embriogênese somática em culturas iniciadas a partir de segmentos de folhas de plântulas (CHANG, 1983). Uma revisão sobre as técnicas de isolamento de explantes e do cultivo para cada uma destas metodologias mencionadas foi feita por KING & SHIMAMOTO (1984).

Os calos embriogênicos podem ser induzidos diretamente a partir do escutelo, sendo que a diferenciação entre os dois tipos (I e II) é mais freqüentemente detectada com o decorrer dos subcultivos. Este procedimento foi adotado por LOWE et alii (1985), com a linhagem B73 e por LUPOTTO (1986), com embriões F1 do cruzamento entre a linhagem W64A e Black Mexican Sweet. De acordo com PHILLIPS et alii (1988), este fato sugere que ambos os tipos de calos podem ser produzidos das mesmas células iniciais do escutelo. Assim, os autores concluíram que as diferenças existentes entre os tipos de calos poderiam ser devido ao controle exercido pelos fatores envolvidos (genótipo do embrião inoculado, estágio de desenvolvimento deste embrião e meio de cultivo empregado)

sobre as regiões meristemáticas dentro do explante, suprimindo ou não o desenvolvimento de embriões somáticos.

Os fatores ambientais a que as plantas utilizadas para se iniciar o cultivo *in vitro* estão sujeitas exercem uma profunda influência sobre a formação de calos embriogênicos, embora TOMES (1985a) tenha comentado que este aspecto não estivesse recebendo a atenção devida. De acordo com o referido autor, os genótipos com melhores respostas às técnicas *in vitro* seriam aqueles que sofrem menores impactos com alterações ambientais. TOMES & SMITH (1985) justificaram esta afirmativa mostrando que a linhagem A188 apresenta flutuação na produção de calos Tipo I e Tipo II a partir de embriões imaturos quando as plantas doadoras de explantes são cultivadas em diferentes ambientes (casa de vegetação ou condições de campo), mas a sua performance é consistentemente superior à da linhagem 873.

Observações de efeitos diferenciais do ambiente sobre a capacidade do calo produzir regiões embriogênicas durante o cultivo *in vitro* de milho também foram relatadas por outros autores (BARTKOWIAK, 1982; LU et alii, 1983 e SANTOS & TORNÉ, 1986). Esta influência ambiental sobre plantas doadoras de explantes pode ser manifestada entre plantas cultivadas em diferentes ambientes, como também pode ser evidente em plantas cultivadas nos mesmos locais e tempo (TOMES, 1985b). Os dados obtidos pelo autor confirmaram a contribuição genotípica para a resposta da cultura, e também indicaram que as condições ambientais interagem com genótipos específicos, particularmente nas respostas para indução de calos do Tipo II. A conclusão foi de que o pré-requisito para uma resposta satisfatória ao cultivo *in vitro*, com produção de calos altamente embriogênicos, seria a utilização de material vegetal sadio, em estágio de crescimento acelerado. Entretanto, é interessante mencionar os resultados obtidos por PRIOLI & SILVA (1989), em

que algumas linhagens de milho responderam melhor para a produção de calos embriogênicos com capacidade de regeneração quando as plantas doadoras são cultivadas fora da época normal de cultivo e, portanto, não são muito saudáveis e vigorosas.

Um outro aspecto comentado por TOMES (1985a) é o fato de que a cultura de tecidos de cereais tem contribuído relativamente muito pouco para o desenvolvimento de composições de meios de cultura específicas para a indução do crescimento de calos embriogênicos e não-embriogênicos. Segundo o autor, a maioria das composições de meios comumente utilizadas são adaptações daquelas testadas com dicotiledônias, com o objetivo primário de se identificar os meios de cultura que promovam a formação dos tipos de calos desejados. O autor sugeriu a continuidade dos estudos com cultivo *in vitro* de milho, para a determinação de composições de meios mais específicas e apropriadas, segundo os tipos de cultivos desejados.

O número de auxinas que são capazes de induzir o crescimento de calos embriogênicos em milho e em outros cereais é relativamente pequeno, sendo o 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) destacadamente o preferido na maioria dos trabalhos. Outras auxinas fenoxiacéticas, tais como: ácido para-clorofenoxiacético (PCA) e ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético (2,4,5-T) têm sido usadas (BECKERT & QING, 1984). Uma composição descrita por DUNCAN et alii (1985), utilizando dicamba (ácido 3,6-dicloro-o-anisico) como regulador de crescimento elevou drasticamente o número de linhagens cultivadas com respostas positivas (formação de calos do Tipo I): de um total de 218 linhagens endogâmicas com diversas composições de germoplasma, 199 produziram calos com capacidade de regeneração. A utilização de dicamba para aumentar a resposta de calos induzidos a partir de embriões maduros de genótipos recalcitrantes foi comprovada posteriormente por DUNCAN et alii (1989). Outras auxinas que também induziram culturas com capacidade de regeneração foram relatadas por

McCORMICK (1980) e HODGES et alii (1985).

O uso de citocininas no meio de cultura deve ter maior influência sobre a manutenção do potencial regenerativo por longos períodos de tempo do que sobre a indução de calos no período inicial da cultura (GREEN, 1978). No entanto, o seu emprego é muito pequeno no cultivo *in vitro* de milho. Um dos poucos trabalhos relatando o uso de citocininas foi apresentado por DUNCAN & WIDHOLM (1988). Os autores obtiveram uma elevação no potencial de regeneração de plantas quando calos do Tipo I (linhagem Pa91) foram cultivados por alguns dias em meio contendo a citocinina 6BA (6-benzilaminopurina), antes de serem transferidos para meio de regeneração com ausência de qualquer regulador de crescimento. É interessante lembrar que o método mais utilizado para induzir a regeneração de plântulas de milho têm sido a redução na concentração ou completa remoção da auxina do meio de cultura (GREEN & PHILLIPS, 1975).

Como fonte de energia em meios de cultura de milho, é utilizada mais freqüentemente a sacarose, usualmente em níveis de 2% a 3%. Alguns autores têm observado que uma concentração elevada de sacarose no início causa um incremento na resposta inicial da cultura, mas que é inibitória para a manutenção de calos embriogênicos de milho em cultivos de longa duração (VASIL et alii, 1984 e TOMES, 1985b). A utilização de elevadas concentrações de sacarose aumentou a freqüência de indução de calos embriogênicos (LU et alii, 1983). Entretanto, os autores relataram que para a manutenção de culturas por um longo período de tempo, as melhores respostas foram obtidas quando eles reduziram a concentração de sacarose, suprimiram o leite de côco e adicionaram hidrolisado de caseína ao meio utilizado. Por sua vez, a inclusão de estabilizador osmótico causou bons resultados na indução de calos embriogênicos em algumas linhagens (FAHEY et alii, 1986).

Com relação à fonte de nitrogênio, tanto a sua forma quanto a quantidade empregada parecem desempenhar um

papel determinante na regeneração via embriogênese somática. Em sua revisão sobre o assunto, GREEN (1978) observou que a suplementação do meio de cultura com aminoácidos específicos ou outros metabólitos celulares estimulatórios seria uma promissora alternativa para a obtenção de calos de milho com taxas de crescimento elevadas e com maior capacidade de formação de regiões embriogênicas. GREEN & PHILLIPS (1975) incluíram o aminoácido L-asparagina em solução salina MS - Murashige-Skoog (veja detalhes em MURASHIGE & SKOOG, 1962) no meio de cultura utilizado para obter pela primeira vez culturas regeneráveis de longa duração, trabalhando com a linhagem A188. Por sua vez, o aminoácido L-prolina, particularmente em composições de meios contendo a solução salina N6 (CHU et alii, 1975), tem mostrado uma resposta positiva na elevação da frequência de formação de calos embriogênicos do Tipo II, iniciados de embriões imaturos da mesma linhagem (ARMSTRONG & GREEN, 1985). TOMES (1985a) observou que L-prolina (6 mM) e L-asparagina (1 mM) causaram um incremento no crescimento, enquanto glutamina inibiu o crescimento de calos embriogênicos. O papel metabólico destes aminoácidos na indução de calos friáveis, altamente embriogênicos ainda não era conhecido (TOMES, 1985a). O autor comentou que a relação existente (com relação à massa dos compostos presentes no meio) entre nitrogênio na forma de nitrato (NO_3) e amoniacal (NH_4) pareceu ser importante nesta resposta, em vista do resultado muito superior em N6 (relação $\text{NO}_3/\text{NH}_4 = 7$) em comparação com MS (relação $\text{NO}_3/\text{NH}_4 = 1$). Entretanto, estes meios não devem ser comparados diretamente para a quantidade relativa de nitrogênio, uma vez que as fontes de nitrogênio na forma de nitrato e na forma amoniacal são diferentes. As comparações feitas por TOMES (1985a) entre os meios de GREEN & PHILLIPS (1975) e GREEN et alii (1983) para outros genótipos diferentes da linhagem A188 mostraram interações específicas genótipos x ambiente, mas não permitiram tirar conclusões a respeito da

influência direta destas composições de meios sobre a capacidade de produção de calos do Tipo II nas culturas. Um outro dado controvertido é o fato de que a adição de L-prolina (5 mM) em meios de cultivo N6, nas culturas do híbrido comercial DeKalb XL82 não provocou os mesmos resultados favoráveis observados com a linhagem A188 (VASIL & VASIL, 1986).

A escolha do genótipo para os estudos de cultivos celulares tem exercido uma influência das mais marcantes sobre a probabilidade de sucesso na indução de calos embriogênicos e na capacidade de regenerar plantas. Uma análise genética do crescimento de calos induzidos a partir de tecidos do endosperma em quatro linhagens de milho, indicou que a habilidade dos calos em proliferar seria influenciada por outros fatores, independentes do tipo de endosperma (TABATA & MOTOYOSHI, 1965). Os autores observaram efeito maternal, assim como um pronunciado crescimento de calos induzidos em explantes oriundos de híbridos destes materiais. SUN & ULLSTRUP (1971) também notaram respostas diferentes em cruzamentos recíprocos entre um genótipo superior (P14) e a linhagem endogâmica W64A contendo diferentes tipos de endosperma. O controle genético da resposta ao cultivo de tecidos do endosperma foi descrito pelos pesquisadores como sendo complexo.

A análise do crescimento de calos a partir do cultivo de embriões maduros de seis linhagens endogâmicas mostrou uma elevada proporção de variância aditiva, em relação às variações não-aditiva e de dominância (NESTICKY et alii, 1983). Os autores propuseram que o crescimento de calos seria governado por dois sistemas genéticos: um nuclear e outro citoplasmático.

Utilizando metodologia de cultivo idêntica aos últimos autores, BECKERT & QING (1984) realizaram uma análise em dialelo e verificaram uma considerável variação genotípica

para crescimento de calos, capacidade de formação de brotos e raízes em oito linhagens diferentes de milho. A magnitude relativa da herdabilidade estimada variou com o meio de cultivo e com o caráter avaliado. Foi observado que os efeitos de capacidade geral de combinação (efeitos aditivos) foram relativamente mais pronunciados do que os efeitos de capacidade específica de combinação para o crescimento de calos e para a regeneração de brotos. Os autores também observaram efeitos recíprocos entre cruzamentos e concluíram que, em adição aos fatores nucleares mencionados previamente, deveriam existir fatores genéticos citoplasmáticos envolvidos na determinação da resposta ao cultivo *in vitro*.

Uma análise em dialelo parcial com cinco linhagens endogâmicas, para avaliar a capacidade de formação de calos embriogênicos após 14 e 28 dias indicou a existência de uma alta herdabilidade e com aproximadamente 70% da variação genética do tipo aditiva (TOMES & SMITH, 1985). Os resultados do mesmo trabalho mostraram que houve um efeito maternal negativo significativo em duas linhagens amostradas a partir do Iowa Stiff Stalk Synthetic, particularmente na linhagem B73. Os autores relataram dados de uma análise de efeitos recíprocos, em cruzamentos de B73 com outra linhagem responsiva (G35), e demonstraram que as respostas dos calos eram devido à segregação de fatores nucleares e fonte de explantes, ao invés de fatores genéticos citoplasmáticos, como havia sido considerado nos estudos anteriores de TABATA & MOTOYOSHI (1965), SUN & ULLSTRUP (1971), NESTICKY et alii (1983) e BECKERT & QING (1984).

Em outros trabalhos que relatam informações sobre o controle genético para a capacidade de formação de calos embriogênicos a partir do escutelo de embriões imaturos de milho, HODGES et alii (1985 e 1986) estudaram linhagens endogâmicas norte-americanas, e sugeriram a existência de dois genes dominantes com interação para o controle de regeneração

de plantas a partir destes calos. Resultados semelhantes foram obtidos por BRUNEAU (1985). Análises em dialelo para avaliação da capacidade de indução de calos do Tipo II mostraram que a significância da variação genotípica foi, principalmente, devido à capacidade específica de combinação, indicando que, em cruzamentos específicos, a amostragem de linhagens não revela o potencial de um genótipo na produção deste tipo de calo (TOMES & SMITH, 1985; TOMES, 1985a e b).

Além dos estudos básicos de determinação da base genética do caráter (indução de calos altamente embriogênicos e com capacidade de regeneração de plantas), muitos autores vêm realizando experimentos exploratórios com um grande número de materiais, das mais diversas constituições de germoplasma. Tal procedimento permitiu que fossem identificadas dezenas de genótipos (número superior a 70) que apresentam respostas favoráveis ao cultivo *in vitro*, com formação de calos do Tipo I, listados por PHILLIPS et alii (1988). Um grande número de materiais (199 genótipos diferentes) com comprovada capacidade de indução de calos do Tipo I foi relatado por DUNCAN et alii (1985). Ainda podem ser citados os resultados obtidos por HODGES et alii (1986), testando 25 linhagens e 11 híbridos, pertencentes a vários grupos de milho norte-americano. Estes trabalhos evidenciam que a capacidade de regeneração de plantas a partir de calos induzidos é muito variável entre os genótipos testados, e que o caráter mais favorável (produção de calos do Tipo II) é apresentado por um número restrito de materiais.

Vários autores observaram que a característica (indução de calos friáveis, altamente embriogênicos) possui uma alta herdabilidade e, portanto, pode-se desenvolver programas de melhoramento com dois enfoques: o cruzamento de genótipos recalcitrantes com materiais altamente responsivos, seguido do cultivo dos embriões híbridos, ou então, selecionando-se para a indução do calo desejado na progênie segregante de um cruzamento (HODGES et alii, 1985; TOMES, 1985a, b; e TOMES &

SMITH, 1985).

Com relação ao germoplasma adaptado ao clima tropical, no Brasil, os primeiros testes de genótipos com vistas à regeneração de plantas a partir de tecidos somáticos de milho foram iniciados em 1983, no Departamento de Genética e Evolução da UNICAMP (Universidade Estadual de Campinas) e no Departamento de Genética da ESALQ/USP (Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/ Universidade de São Paulo) (MÔRO, 1987a). Os relatos que se seguiram mostraram que materiais com diferentes bases genéticas foram testados: linhagens endogâmicas (PRIOLI et alii, 1985a), sintéticos de vários grupos de linhagens elite (MORO & GUERREIRO, 1984) e variedades (AGUIAR-PERECIN & FLUMINHAN Jr, 1985). Todos estes trabalhos utilizaram a metodologia descrita por GREEN & PHILLIPS (1975), com o cultivo de calos induzidos a partir do escutelo de embriões imaturos. Desde então, outros aspectos decorrentes do cultivo *in vitro* de calos de milho têm sido estudados, tais como: identificação de genótipos com alta frequência de embriogênese somática (PRIOLI et alii, 1985b; PRIOLI, 1987; MÔRO, 1987b), observação de variação somaclonal em plantas regeneradas e em suas progênes (PRIOLI et alii, 1986; PRIOLI, 1987), testes de linhagens endogâmicas derivadas de variedade (AGUIAR-PERECIN & FLUMINHAN Jr, 1986) e análise citológica de progênes de plantas regeneradas (FLUMINHAN Jr & AGUIAR-PERECIN, 1987).

Apesar do início relativamente recente no Brasil, esta linha de pesquisa já desenvolveu diversos trabalhos com enfoques básico e aplicado. Como exemplo destes trabalhos, pode-se incluir o desenvolvido por PRIOLI (1987) e PRIOLI & SILVA (1989), onde a análise de 34 linhagens endogâmicas de germoplasmas de milho com alta capacidade de combinação para produção de grãos, adaptados às condições de cultivo existentes em nosso clima, apresentou 20 genótipos com respostas favoráveis ao cultivo *in vitro* (formação de calos do

Tipo I). Destas, cinco linhagens apresentaram formação de calos do Tipo II, friáveis, altamente embriogênicos, mantendo a capacidade de regeneração de plantas mesmo após dois anos de cultivo *in vitro*. Estes trabalhos mostraram que o controle genético para a indução de calos embriogênicos a partir de embriões imaturos de milho, adaptado ao clima tropical, parece ser muito simples, o que sugere ser possível a transferência desse caráter para genótipos recalcitrantes. Em um estudo sobre alguns fatores que afetam o desempenho das culturas, PRIOLI & SILVA (1989) demonstraram que as linhagens analisadas apresentaram diferenças genéticas significativas para a indução de embriogênese somática e para a regeneração de plantas. Análises de cruzamentos controlados sugeriram um sistema genético de controle e, além disto, foi observado que a expressividade dos genes que governam estes caracteres pode ser modificada pelo estado fisiológico dos embriões imaturos inoculados, pelas variações sazonais das estações de cultivo e pelas interações entre genótipos e condições de crescimento dos calos (meios de cultivo). É interessante mencionar que foi com uma linhagem de respostas positivas nestes trabalhos (linhagem Cat-100-1), de germoplasma Cateto, que PRIOLI & SONDAHL (1989) obtiveram com sucesso a regeneração de plantas férteis a partir de protoplastos isolados de suspensões celulares. Maiores detalhes sobre este trabalho serão mencionados adiante.

2.2. Seleção de linhagens celulares, cultivo em suspensões e isolamento de protoplastos de milho

2.2.1. Seleção de linhagens celulares

A seleção de linhagens celulares *in vitro* tem o reconhecido potencial de concentrar variantes de uma maneira

direta (veja revisões em THOMAS et alii, 1979 e JACOBS et alii, 1987). A disponibilidade de culturas de células em suspensão de milho, com capacidade de regeneração de plantas mesmo sob pressão de seleção, tem aumentado marcadamente. Em adição a este fato, é crescente a utilização de calos embriogênicos friáveis de milho para a seleção de mutantes para as mais diversas características. Por exemplo, pode-se citar a seleção de linhagens celulares com maior produção ou tolerantes e/ou resistentes ao acúmulo de análogos de aminoácidos ou combinações de aminoácidos (HIBBERD et alii, 1980; HIBBERD & GREEN, 1982; HIBBERD, 1984; FRISCH & GENGENBACH, 1986 e DIEDRICK et alii, 1990), mutantes tolerantes e/ou resistentes a patotoxinas (GENGENBACH & GREEN, 1975 e GENGENBACH et alii, 1977), a herbicidas (ANDERSON et alii, 1984) e a antibióticos (SHIMAMOTO & NELSON, 1981; UMBECK & GENGENBACH, 1983 e TUBEROSA & PHILLIPS, 1986).

Existem dois métodos básicos utilizados para a seleção de milho em cultivos celulares: seleção conduzida em meio de cultura contendo uma concentração do agente de seleção situada logo acima do nível inibitório (onde os mutantes são prontamente reconhecidos pelo fato de sobreviverem às condições de cultivo), e seleção com concentrações sub-letais do inibidor, seguido de elevação gradativa dos níveis de seleção nos subcultivos seguidos. Embora a literatura exiba exemplos em que ambos os métodos produziram resultados similares (SHIMAMOTO & NELSON, 1981), é interessante lembrar que em culturas regeneráveis o segundo método apresenta a vantagem, como mencionado por PHILLIPS et alii (1988), de se avaliar a sensibilidade da cultura pela sua capacidade de regenerar plantas. Assim, a redução na capacidade de regeneração pode ser utilizada como indicador da concentração mais adequada do agente inibidor.

A crescente lista de germoplasmas utilizados em experimentos de cultura *in vitro* na atualidade, mais a

disponibilidade de fenótipos de cultivo que permitem a seleção mesmo em pequenos agregados celulares, aumentam a probabilidade de se determinar estratégias de seleção mais eficientes. Estas seleções são conduzidas com uma grande variedade de cultivos celulares, incluindo-se calos friáveis embriogênicos, calos compactos regeneráveis e suspensões celulares. No presente, as mais sérias limitações para esta aplicação prática do cultivo *in vitro* parecem ser, como mencionado por TOMES (1985a), o necessário acúmulo de conhecimentos sobre a bioquímica e a fisiologia dos mecanismos que controlam os caracteres fenotípicos de interesse para os melhoristas de plantas.

2.2.2. Estabelecimento de suspensões celulares e isolamento de protoplastos

É reconhecido que o trabalho com órgãos isolados pode simplificar o estudo de sistemas vegetais complexos (STRAUS, 1960). Por sua vez, os cultivos de células em suspensão apresentam diversas outras vantagens que auxiliam no estudo das plantas em aspectos fisiológicos, bioquímicos, citológicos, genéticos e de melhoramento para fins agrônômicos. Suspensões celulares são mantidas com ausência de microrganismos contaminantes, possuem habilidade para crescimento em meios de cultura de composição definida e sob condições de cultivo padronizadas (STREET, 1973), e representam um significativo passo em direção ao nível de estudo de populações de células uniformes (em competência genética e em estado fisiológico). Uma revisão sobre o relacionamento existente entre as células isoladas e o organismo vegetal completo (em plantas vasculares) foi apresentada por KAPLAN & HAGEMANN (1991).

A regeneração de plantas após a seleção *in vitro* ou a transformação genética pressupõe que as culturas de

suspensões celulares retenham a sua capacidade embriogênica por um período de tempo relativamente longo, ao redor de 6 meses a mais de um ano, durante o qual são produzidas as linhagens celulares desejadas. Uma parte integral da manutenção de calos com capacidade embriogênica por longos períodos de tempo é a perfeita identificação do fenótipo dos calos. Em milho, o tipo de calo com maior potencial para manutenção a longo prazo vem a ser o calo Tipo II, altamente friável, com grande taxa de crescimento (GREEN et alii, 1983) e que permite, desta forma, a sua seleção a partir de calos não embriogênicos e embriogênicos do Tipo I através de subcultivos mais freqüentes (ARMSTRONG & GREEN, 1985; LOWE et alii, 1985 e VASIL & VASIL, 1986).

O estabelecimento e manutenção de cultivo de suspensões de células embriogênicas depende, segundo TOMES (1985a), de diversos fatores, tais como: a fonte do calo cultivado, a freqüência de subcultivos e a taxa de diluição com meio de cultura novo a cada subcultivo. GREEN (1982) relatou que, a partir de calos do Tipo II altamente friáveis da linhagem A188, obtiveram culturas em suspensão finamente dispersas com relativamente pequena manipulação do meio de cultura. Esta suspensão apresentou capacidade de formar calos embriogênicos e regenerar plantas (GREEN et alii, 1983 e KAMO & HODGES, 1986). Resultados semelhantes foram obtidos por VASIL & VASIL (1986) a partir de suspensões induzidas a partir de calos do híbrido DeKalb XL82. Suspensões celulares embriogênicas com intenso crescimento também têm sido estabelecidas a partir de calos do Tipo II da linhagem 873 (POTRYKUS et alii, 1979). Na linhagem A188, a obtenção de suspensões celulares de calos do Tipo II foi otimizada com a adição de 25 mM de L-prolina, enquanto a sua manutenção por longos períodos de tempo foi incrementada pelo emprego de menor quantidade de L-prolina (6 mM), mas com adição de hidrolisado de caseína (GREEN et alii, 1983 e ARMSTRONG & GREEN, 1985).

Suspensões estabelecidas a partir de calos deste genótipo podem alcançar uma taxa de crescimento de até 10 vezes, no período de 7 dias, mantendo a capacidade de regeneração de plantas por mais de um ano de cultura (SOMERS et alii, 1988).

A utilização direta de suspensões celulares em experimentos de transformação genética via bombardeamento de microcalos por microprojéteis é um outro sistema que tem apresentado crescente aplicação. Em relatos sobre este método, FROMM et alii (1990) e GORDON-KAMM et alii (1990) relataram a regeneração de plantas de milho transgênicas e férteis, a expressão do gene inserido em progênies de plantas regeneradas, assim como descreveram experimentos de co-transformação de suspensões estabelecidas a partir de calos transgênicos.

A utilidade potencial de células isoladas para a engenharia genética é significativa, assim como o são as presentes limitações técnicas que têm dificultado a introdução de DNA, integração dos genes e sua expressão em células de cereais. No entanto, como bem relata TOMES (1985a), a proliferação celular a partir de protoplastos isolados já seria suficiente, para prover de valiosas informações sobre a transformação genética de células de milho. Como exemplo pode ser citado o trabalho apresentado por PLANCKAERT & WALBOT (1989), onde foi analisada a expressão gênica em protoplastos de milho isolados a partir de calos embriogênicos, após a transferência de DNA via eletroporação.

Suspensões celulares de milho representam um tipo de material ideal para experimentos de isolamento de protoplastos, conforme diversos autores vêm reportando na literatura (OSWALD et alii, 1977; SHANNON & LIU, 1977; SHERIDAN, 1977; BRAR et alii, 1979; POLIKARPOCHKINA et alii, 1979; POTRYKUS et alii, 1979; McCORMICK, 1980; CHOUREY & ZURAWSKI, 1981; KUANG et alii, 1983; LUDWIG et alii, 1985; IMBRIE-MILLIGAN et alii, 1987 e SOMERS et alii, 1987). Os protoplastos isolados pelos autores mencionados, no entanto,

não apresentaram totipotência, isto é, não regeneraram plantas. Resultados semelhantes foram obtidos com protoplastos isolados a partir de tecidos diferenciados, tais como: endosperma (MOTOYOSHI, 1971), parênquima foliar (IVANTSOV & AKHMETOV, 1978), fragmentos de caule (POTRYKUS et alii, 1977), fragmentos de folhas (TAYLOR & HALL, 1976) e a partir de calos embriogênicos (IMBRIE-MILLIGAN & HODGES, 1986).

O estabelecimento de métodos de cultivo de protoplastos (e dos calos induzidos a partir deles) foi auxiliado pela observação das respostas que as respectivas suspensões celulares apresentavam, sob determinadas condições, tais como: emprego de células nutrízes e adequada densidade de cultivo. Diversos trabalhos relatam estas experiências (SMITH et alii, 1984 e KAMO & HODGES, 1986) e ilustram bem a importância de se testar continuamente a capacidade embriogênica das culturas.

VASIL & VASIL (1986) mostraram que suspensões celulares obtidas para calos do Tipo II do híbrido DeKalb XL82 foram capazes de produzir calos embriogênicos e regenerar plantas. Estas suspensões também permitiram o isolamento de protoplastos e o cultivo destes até a obtenção de calos. Outros autores (CARSWELL et alii, 1989) observaram que algumas substâncias (ácido O-acetil-salicílico), podem incrementar a taxa de formação de colônias em protoplastos isolados a partir de suspensões embriogênicas de um genótipo derivado da linhagem comercial B73.

A observação de ocorrência de embriogênese somática em calos derivados de protoplastos isolados de suspensões celulares de milho foi relatada por VASIL & VASIL (1987) e KAMO et alii (1987), embora sem capacidade de regenerar plantas. Os primeiros autores utilizaram como fonte de explantes o híbrido comercial DeKalb XL82 enquanto o segundo trabalho empregou embriões F1 do cruzamento da linhagem A188 x Black Mexican Sweet. A regeneração de plântulas a partir de

calos derivados de protoplastos foi conseguida por CAI et alii (1987) e por MITCHELL & PETOLINO (1990), trabalhando com cultivo de protoplastos isolados a partir de suspensões celulares derivadas de microsporócitos. No entanto, em ambos os trabalhos, as plântulas regeneradas não atingiram a maturidade. RHODES et alii (1988a e b), regeneraram plantas capazes de crescer em solo, porém não férteis, a partir de protoplastos isolados de suspensões celulares derivadas de calos embriogênicos da linhagem A188 e de progênies derivadas da linhagem B73, denominadas pelos autores de B73-1 e B73-2. Um resultado importante obtido por estes últimos autores foi o desenvolvimento de um sistema que assegurou uma elevada freqüência de colônias de calos a partir dos protoplastos. Tal sistema consistiu na utilização de uma camada de células nutrizas de suspensão celular de Black Mexican Sweet, sobre a qual os protoplastos foram cultivados. No entanto, as plantas regeneradas da linhagem A188 não atingiram a maturidade, e as plantas regeneradas a partir do genótipo B73-1 apresentaram infertilidade. Conforme os autores comentaram, as respostas podem ter sido conseqüências de características pré-existentes das culturas doadoras. Isto poderia ser a razão para o fato de que mesmo os controles dos experimentos não regeneraram plantas férteis.

Em um trabalho mais recente, a respeito de transformação genética estável de protoplastos e calos de milho, LYZNIK et alii (1989) notaram uma grande influência da camada de células nutrizas sobre o crescimento dos microcalos a partir de protoplastos isolados e sobre a eficiência de transformação nos experimentos.

A regeneração de plantas férteis a partir do cultivo de calos induzidos de protoplastos isolados de suspensões celulares embriogênicas de milho foi relatada simultaneamente por SHILLITO et alii (1989) e por PRIOLI & SONDAHL (1989). Os autores utilizaram, respectivamente, uma

linhagem elite derivada da linhagem B73 (do germoplasma Iowa Stiff Stalk Synthetic) e uma linhagem adaptada ao clima tropical (Cat-100-1), com germoplasma da raça Cateto. Estes trabalhos apresentaram os fatores de importância para o sucesso de experimentos de cultivo de protoplastos: seleção de suspensões celulares com capacidade de regenerar plantas férteis, checagem periódica das características das células em suspensão, composição da solução enzimática empregada, método de tratamento enzimático, filtragem e lavagem da solução enzimática, composição dos meios e métodos para o cultivo dos protoplastos isolados, regeneração de plantas, aclimação e cultivo destas até a maturidade. Além disto, SHILLITO et alii (1989) descreveram também um método de criopreservação das culturas em suspensão, que permitiu o isolamento de protoplastos totipotentes mesmo após certo tempo de armazenagem, com resultados semelhantes aos obtidos com suspensões celulares embriogênicas (REECE & MADDOX, 1987). Posteriormente, PRIOLI et alii (1990) relataram que as plantas regeneradas a partir de protoplastos isolados do genótipo Cat100-1 apresentaram diversas anormalidades fenotípicas, também observadas em plantas regeneradas de suspensões finamente dispersas do mesmo genótipo.

Em um outro relato sobre a regeneração de plantas a partir de calos induzidos de protoplastos isolados, SUN et alii (1989) utilizaram, como fonte de protoplastos, suspensões celulares embriogênicas estabelecidas a partir de calos friáveis induzidos de microsporócitos de um híbrido comercial super-doce (sh2sh2). Este trabalho demonstrou que, a partir de cultura de células haplóides, foi possível a regeneração de plantas haplóides e dihaplóides capazes de crescer em solo. Como mencionado pelos autores, o cultivo de células haplóides pode ser útil para a seleção de mutantes, e para a obtenção de dihaplóides através de tratamentos com colchicina.

Com o objetivo de estabelecer um sistema aprimorado para a regeneração de plantas férteis a partir de protoplastos isolados de suspensões. MÓRO CZ et alii (1990) sintetizaram um genótipo (HE/89) com capacidade de manutenção de sua totipotência em cultivos de longa duração. O genótipo foi produzido pelo cruzamento de plantas regeneradas de culturas de células haplóides (genótipo H229, com 30 meses de cultivo *in vitro*) com pólen de plantas regeneradas de culturas de células diplóides (genótipo OK281, com 10 meses de cultivo). Apesar da idade avançada dos genótipos parentais, os autores verificaram que cerca de 60% a 70% das mais 500 plantas regeneradas de protoplastos de HE/89 produziram sementes por autofecundação ou por cruzamentos.

2.3. Variabilidade genética e citogenética decorrente do cultivo *in vitro* e suas possíveis causas

2.3.1. Variação somaclonal e instabilidade genômica no cultivo *in vitro*

A variabilidade surgida durante a cultura de tecidos tem sido descrita em todos os níveis do processo de cultivo e para um grande número de espécies vegetais.

Para maior clareza a respeito deste fato, trata-se separadamente a variabilidade observada em calos e culturas de células em suspensão, e aquela observada em plantas regeneradas de cultura de tecidos. Usualmente a primeira categoria é referida como instabilidade da cultura enquanto a segunda é denominada variação somaclonal (LARKIN & SCOWCROFT, 1981).

2.3.1.1. Variação somaclonal

É um fato já completamente estabelecido que freqüentes modificações genéticas podem ocorrer durante o processo de cultivo *in vitro* de células e tecidos vegetais. Muitas destas modificações são manifestadas como mutações herdáveis na progênie de plantas regeneradas (HEINZ & MEE, 1969) e por essa razão diversos autores têm proposto a utilização de tais culturas como geradoras de variabilidade para caracteres agronômicos em plantas de propagação vegetativa (HEINZ et alii, 1977 e SHEPARD et alii, 1980) e em plantas de propagação sexual (EVANS & SHARP, 1983 e EVANS et alii, 1984).

Esta variabilidade genética gerada durante a cultura de tecidos foi denominada de variação somaclonal por LARKIN & SCOWCROFT (1981). Entre os possíveis mecanismos relacionados com a origem desta variabilidade, estariam: alterações cariotípicas e rearranjos cromossômicos, ativação de elementos de transposição, rearranjos gênicos somáticos, amplificação e depleção de seqüências de DNA, "crossing-over" somático e permutas entre cromátides-irmãs e eliminação de vírus crípticos. Mais recentemente, PHILLIPS et alii (1990) comentaram as possíveis modificações no DNA de células cultivadas *in vitro* (tais como: metilação e desmetilação) com a ocorrência de alterações ao nível de bases específicas, e ao nível da estrutura da cromatina.

O grande potencial de aplicação de métodos de seleção *in vitro* de células vegetais variantes despertou diversos autores no sentido de estabelecerem quais os procedimentos básicos para a sua utilização, incluindo a descrição dos diferentes métodos de seleção, o estabelecimento de procedimentos de análise da herdabilidade do caráter modificado e a caracterização de relações de dominância-recessividade dos genes envolvidos (veja revisão em MALIGA, 1984).

Em contraste com a euforia criada em torno da variação somaclonal, MEINS (1983) salientou que, quando usada para propagação de genótipos superiores, banco de germoplasma ou como um sistema para manipulação genética, esta variação passa a ser indesejável. Portanto, de acordo com o referido autor, ambas as aplicações da cultura de tecidos dependem do conhecimento sobre a ocorrência desta variação celular hereditária e do aprendizado em como exercer o seu controle, o que inclui a necessidade de avanços em outras áreas da pesquisa vegetal (como já havia sido comentado anteriormente por CARLSON & POLACCO, 1975).

O crescente interesse na análise genética de plantas obtidas de cultura de tecidos tem exigido uma denominação clara e universal para caracterizar plantas regeneradas (convencionalmente denominadas "somaclones") e suas progênies subsequentes. CHALEFF (1981) propôs o uso de geração "R" para representar plantas regenerantes (comunicada como R0 por outros pesquisadores) e R1, R2, etc. para suas sucessivas progênies autofecundadas.

2.3.1.2. Instabilidade genética e citogenética

Desde o relato pioneiro de MURASHIGE & NAKANO (1967), têm surgido um grande número de trabalhos que documentam a existência de instabilidade inerente ao cultivo *in vitro* de linhagens celulares. Esta instabilidade tem sido discernida aos níveis cariotípico, bioquímico e molecular, tanto em DNA nuclear como ao nível do DNA de organelas.

Com relação especificamente à instabilidade cromossômica, D AMATO (1978) e BAYLISS (1980) fizeram uma revisão a respeito de todos os aspectos da sua ocorrência em culturas de tecidos. As classes de células variantes incluíram: poliplóides e aneuplóides, alterações na estrutura dos

cromossomos (deleções de diversos graus, perda de satélites, translocações, fusões cêntricas e pontes nas anáfases), e outras aberrações mitóticas (fusos multipolares, cromossomos atrasados, fragmentos e separação assimétrica das cromátides).

Inúmeros trabalhos relataram a ocorrência de uma alta incidência de aberrações cromossômicas estruturais e numéricas nas diversas espécies vegetais (SUNDERLAND, 1977 e D AMATO, 1978). Foi observado que o comportamento das diferentes espécies vegetais é bastante heterogêneo. Algumas vezes predominam alterações no número de cromossomos (BAYLISS, 1980) e em outros casos, mesmo quando este número permanece constante, pode ocorrer uma alta frequência de rearranjos estruturais (MURATA & ORTON, 1983).

Os fatores que podem influenciar o tipo e a severidade das variações cromossômicas nas culturas são numerosos: genótipo do material (para referências, veja BALZAN, 1978), estado epigenético do explante (veja D AMATO, 1977): segundo o autor, tecidos com alto grau de organização, tais como meristemas, usualmente dão origem a plantas com número normal de cromossomos, enquanto cultivos de calos da mesma planta podem ter comportamento inverso; tipo de cultivo: suspensão celular, calos, propagação de gemas (caracterizados por YEOMAN & FORCHE, 1980), entre outros.

2.3.2. Variabilidade no cultivo in vitro de milho

Conforme PHILLIPS et alii (1990) comentaram, provavelmente todas as formas de eventos mutacionais que podem ocorrer naturalmente, também podem ocorrer em células cultivadas in vitro. Entretanto, os autores mostraram que determinados eventos causadores de mutações parecem ocorrer em elevadas frequências em cultivos de células vegetais, entre eles: mutações envolvendo um único gene, ativação de elementos

de transposição, variação em caracteres quantitativos, e quebras de cromossomos.

As vantagens da utilização do milho para estes estudos vêm do fato dela ser uma espécie diplóide, o que permite uma pronta identificação de mutações recessivas (em caracteres monogênicos marcadores) na progênie de plantas regeneradas (SOMERS et alii, 1988). Ela também é uma planta monoica e as células que dão origem à panícula e à espiga estão separadas já no embrião de sementes maduras (JOHRI & COE, 1983). A separação espacial das células que formam os estames e os pistilos durante o desenvolvimento do embrião pode resultar em não-concordância (setoriamento) genética entre panícula e espiga de plantas da geração R₀. Durante a formação de meristemas apicais em culturas organogênicas, células com diferentes mutações podem aparecer nas diferentes inflorescências (BENZION et alii, 1986 e PHILLIPS et alii, 1988). Eventos similares podem ocorrer em embriões somáticos de origem multicelular (GREEN et alii, 1977 e EDALLO et alii, 1981), ou então podem ocorrer nas células de inflorescências masculinas e femininas após a formação do embrião somático, como resultado da instabilidade genética causada pela passagem por cultura de tecidos (McCOY & PHILLIPS, 1982 e BECKERT et alii, 1983). Plantas quiméricas com mutações recessivas na espiga ou na panícula podem ser detectadas pela observação de segregação do caráter na geração R₂, se não segregarem em R₁. Em auxílio a todas estas vantagens, os autores comentam que o extensivo conhecimento sobre a genética e citogética da espécie torna o milho um instrumento elegante para estudos genéticos básicos nesta área de pesquisa.

Especificamente com o milho já foram detectadas alterações de diversas ordens e nos vários tipos de materiais:

a) aberrações cromossômicas em células de calos induzidos a partir de tecidos do endosperma (STRAUS, 1958 e BOYER & SHANNON, 1974), tecidos meristemáticos (EDALLO et alii,

1981), escutelo de embriões imaturos (McCOY & PHILLIPS, 1982) e a partir de outros tecidos diferenciados (BALZAN, 1978 e MOHANTY et alii, 1986);

b) mutações gênicas afetando plantas regeneradas a partir de calos induzidos de embriões imaturos e em suas progênes (LEE & PHILLIPS, 1987a, e com revisão em PHILLIPS et alii, 1988);

c) aberrações cromossômicas estruturais em células de meristemas radiculares e de inflorescências masculinas de plantas regeneradas e suas progênes (LEE & PHILLIPS, 1984; 1987a e b, e observação da ocorrência de regenerantes quiméricos para aberrações cromossômicas (GREEN et alii, 1977; McCOY & PHILLIPS, 1982; BENZION et alii, 1986 e RHODES et alii, 1986);

d) aberrações cromossômicas numéricas e estruturais em células de cultivo em suspensão (BRAR et alii, 1979; MEADOWS, 1982/1983 e WANG et alii, 1986);

e) diploidização e poliploidização de células haplóides cultivadas *in vitro* (BOCK & GREENBLATT, 1965; DHALIWAL & KING, 1979 e GU & TING, 1985);

f) variações no DNA mitocondrial em plantas regeneradas (GENGENBACH et alii, 1981; BRETTEL et alii, 1982; KEMBLE et alii, 1982 e McNAY et alii, 1984), entre outras.

2.3.2.1. Variação somaclonal e melhoramento genético

O acúmulo de informações a respeito da variação somaclonal tem levado diversos pesquisadores a estudos de avaliação do potencial de utilização desta fonte de variabilidade para estudos genéticos e para aplicação prática no melhoramento do milho (EARLE & GRACEN, 1985 e LEE et alii, 1988). Em sua revisão sobre o assunto, PHILLIPS et alii (1988) relataram que já haviam sido observados, em progênes de

plantas regeneradas, cerca de 50 diferentes fenótipos controlados por mutações de ponto, muito embora os mesmos autores reconheçam que a frequência de mutações observadas possa ser uma subestimativa do total de variação induzida na cultura de tecidos (veja também PHILLIPS, 1989).

Variações em caracteres quantitativos também têm sido documentadas. LEE et alii (1988) relataram que este tipo de variação, particularmente na precocidade das plantas, poderia ser útil, embora o método exija um trabalho com grandes populações devido à tendência de se produzir uma grande proporção de linhagens inferiores.

Análise de mutantes ao nível bioquímico foi realizada por BRETTEL et alii (1986), que relataram a ocorrência de mutantes para genes de álcool-dehidrogenases (Adh-1 e Adh-2) em somaclones da linhagem A188. Também já foram realizadas análises de mutantes ao nível de DNA mitocondrial (McNAY et alii, 1984), assim como de DNA nuclear: análises moleculares de plantas da geração R0 (com relato em PHILLIPS, 1989) e da geração R2 (BROWN, 1985) mostraram diferenças significativas no grau de metilação do DNA.

Alguns trabalhos sobre a variabilidade na cultura de tecidos de milho indicaram que a frequência de variação aumenta com a idade da cultura, e que a frequência de plantas quiméricas que são regeneradas por culturas organogênicas e embriogênicas decresce com o tempo em cultivo (BENZION et alii, 1986; LEE & PHILLIPS, 1987b e ARMSTRONG & PHILLIPS, 1988). Estas duas observações podem parecer contraditórias, mas análises genealógicas de subcultivos clonais (BENZION & PHILLIPS, 1988) comprovaram estas afirmativas. Os autores detectaram que o número de variantes nas progênies de plantas R0 cresceu com o aumento da idade de cultivo, com indicações de que a taxa de mutação havia sido constante.

Em um estudo a respeito de variações induzidas por cultura de tecidos em espécies de monocotiledôneas regeneradas por embriogênese somática, VASIL (1987) observou uma baixa frequência relativa de anormalidades genéticas e citogenéticas. Em contraste com esta observação, SOMERS et alii (1988) relataram que, em milho, a frequência de variantes e anormalidades citogenéticas em plantas regeneradas por embriogênese somática foi aproximadamente igual, ou superior à variação observada em plantas regeneradas de culturas organogênicas. Os autores sugeriram que a elevada taxa de crescimento de calos do Tipo II, comparada com os calos do Tipo I, estaria relacionada com a maior instabilidade das culturas (veja ARMSTRONG & PHILLIPS, 1988 e PHILLIPS et alii, 1988).

2.3.2.2. Instabilidade cromossômica

Análises meióticas de plantas regeneradas e de suas progêneses têm revelado um predomínio de aberrações estruturais em comparação com alterações no número de cromossomos. O pareamento cromossômico durante a meiose permite uma pronta identificação de heterozigosidade para aberrações estruturais como translocações, duplicações e deficiências, surgidas em consequência de quebras cromossômicas (revisão em PHILLIPS et alii, 1988).

Análises de plantas regeneradas em aveia (*Avena sativa* L.) (McCOY et alii, 1982; JOHNSON et alii, 1987a e b) e em milho (McCOY & PHILLIPS, 1982) forneceram resultados similares: em ambas as espécies houve o aparente envolvimento das regiões heterocromáticas com a ocorrência das mais frequentes alterações cromossômicas observadas. Especificamente no caso do milho os locais de quebras estavam situados, de acordo com os referidos autores, entre o centrômero e os knobs cromossômicos heterocromáticos.

BENZION & PHILLIPS (1988) realizaram análises meióticas em 370 plantas regeneradas de calos induzidos a partir de 22 embriões imaturos de 9 genótipos diferentes de milho, e observaram que cerca de 12% dos regenerantes apresentavam alterações citológicas. A maioria das aberrações eram resultado de quebras cromossômicas (65% de translocações e 35% de deficiências) e geralmente envolviam braços cromossômicos contendo knob heterocromático. Em um outro estudo, RHODES et alii (1986) analisaram meioses de 257 plantas regeneradas de culturas induzidas a partir de inflorescências masculinas imaturas do híbrido resultante do cruzamento das linhagens endogâmicas W22 Rr-x1 X A188, e encontraram cerca de 40% de indivíduos citologicamente anormais. Cerca de 26% dos regenerantes eram heterozigóticos para aberrações cromossômicas estruturais e cerca de 19% apresentavam aberrações numéricas. No total, cerca de 12% dos regenerantes apresentavam translocações, 14% possuíam pares heteromórficos (heterozigóticos para deficiências e/ou duplicações), 14% apresentavam duplicações genômicas e 5% possuíam adições ou perdas de cromossomos.

Em um outro trabalho, foram identificados soma clones heterozigóticos para uma inversão paracêntrica e a ocorrência de sete plantas com translocações envolvendo três cromossomos, resultando em uma formação de anel (ou cadeia) de seis cromossomos na diacinese (LEE & PHILLIPS, 1987b). É interessante notar que as plantas regeneradas podem também possuir mais do que uma aberração. Como apresentado pelos últimos autores, 9% dos soma clones regenerados após 32 ou 36 semanas do início da cultura possuíam duas ou três aberrações cromossômicas. Os autores observaram que as aberrações estruturais eram originadas de quebras que ocorriam predominantemente nos braços cromossômicos que possuem knobs heterocromáticos. É importante mencionar que todos os estudos citados envolveram plantas regeneradas de calos induzidos a

partir de explantes da linhagem A188, que apresenta knobs heterocromáticos nas posições K5L, K7L, K8L e K9S, ou de explantes de progênies F2 de Oh43/A188 (a linhagem Oh43 possui um pequeno knob na posição K6L assim como em K4L, K7L e K9S (veja descrição em PHILLIPS et alii, 1988).

A alta frequência relativa de quebras cromossômicas (causando a predominância de aberrações estruturais) e a implicação direta ou indireta dos knobs cromossômicos heterocromáticos, conduziu PHILLIPS (1986), LEE & PHILLIPS (1988) e SOMERS et alii (1988), na Universidade de Minnesota (EUA), a evocarem a hipótese de que a causa principal de alterações citogenéticas no cultivo *in vitro* de milho seria decorrente de distúrbios causados pela replicação tardia do DNA heterocromático. De acordo com os autores, perturbações afetando o período de síntese de DNA em locais de replicação tardia (ao nível dos knobs) poderiam resultar na não separação de cromátides-irmãs. Conseqüentemente, ocorreria a formação de pontes anafásicas, que resultariam na quebra do cromossomo. Esta sugestão havia sido abordada previamente por McCOY et alii (1982), no mesmo laboratório, relacionando a replicação tardia da heterocromatina pericentromérica como sendo o evento responsável pelas quebras cromossômicas observadas em plantas de aveia regeneradas *in vitro*.

RHOADES & DEMPSEY (1972 e 1973) relataram um comportamento similar nos pontos de quebra de cromossomos A com knobs em presença de dois ou mais cromossomos B em milho. Eles propuseram que a replicação do DNA dos knobs heterocromáticos dos cromossomos A foi retardada pela presença dos cromossomos B, impedindo assim a separação das cromátides e causando a formação de pontes na anáfase. Por sua vez, PRYOR et alii (1980) mostraram que a heterocromatina dos knobs *in vivo* possui o último DNA cromossômico a ser replicado. Em sua discussão sobre o assunto, PHILLIPS (1986) mencionou que determinadas regiões hoje conceituadas "sítio de knobs"

poderiam desempenhar um papel importante na reorganização do genoma após um ciclo de quebra-fusão-ponte, mesmo na ausência do knob em questão. De acordo com RIVIN et alii (1983), uma seqüência de DNA repetitivo, presente no knob proeminente, poderia também estar presente em um número menor de cópias na ausência do knob visível citologicamente. Estas regiões heterocromáticas (sítios de knobs) poderiam participar de rearranjos cromossômicos, mesmo quando presentes em cromossomos não envolvidos na formação de pontes. Assim, PHILLIPS (1986) concluiu que poderia não ser esperada uma correlação absoluta entre quebras e regiões heterocromáticas citologicamente visíveis, embora o mesmo autor tenha comentado que determinadas raças de milho que possuem altos níveis de heterocromatina na forma de knobs, tais como Zapalote Chico (para referência veja AGUIAR-PERECIN, 1985; AGUIAR-PERECIN & VOSA, 1985 e BROWN, 1985) poderiam ser especialmente susceptíveis à variabilidade causadas pelo cultivo *in vitro*.

É importante lembrar, entretanto, que elevadas freqüências de quebras cromossômicas não conduzem necessariamente à uma alta freqüência de mutações de ponto, fato este evidente nas progênies de plantas regeneradas. Uma possível explicação seria o fato de que as variações induzidas pelo cultivo *in vitro* ativariam elementos de transposição, que por sua vez poderiam causar as mutações gênicas. Esta hipótese está baseada nas observações de McCLINTOCK (1978) de que o choque no genoma representado pela quebra de cromossomos ativaria elementos de transposição (McCLINTOCK, 1950; 1951; BIANCHI et alii, 1969; NEUFFER, 1966 e DOERSCHUG, 1973).

BURR & BURR (1981) e McCLINTOCK (1984) previram a atividade de elementos de transposição em plantas de milho regeneradas, baseados na idéia de que o cultivo *in vitro per se* poderia representar um choque genômico. Uma revisão sobre os elementos de transposição e as seqüências de inserção em plantas foi apresentada por FREELING (1984).

Alguns trabalhos têm relatado uma ocorrência freqüente de elementos de transposição em plantas regeneradas e suas progênies. A ativação de transposon *Ac* na progênie de plantas regeneradas foi demonstrada por PESCHKE et alii (1985; 1987) e PHILLIPS & PESCHKE (1988). Em um estudo mais recente, PESCHKE & PHILLIPS (1991) observaram a ativação do elemento de transposição *Spm* em materiais oriundos de cultivo *in vitro*. Elementos *Ac* ativados durante o cultivo de tecidos de milho foram analisados, sob os pontos de vista genético e molecular, por PESCHKE et alii (1991).

2.3.3. Análise da inetabilidade cromossômica de células cultivadas *in vitro*

As observações pioneiras de McCLINTOCK (1930; 1931 e 1933), demonstraram que a fase de paquíteno é a mais adequada para a identificação de detalhes da morfologia dos cromossomos de milho. Os cromossomos paquítenicos foram descritos por LONGLEY (1938 e 1939) e RHOADES (1950 e 1955), que distinguíram cada um deles com base nos seguintes critérios morfológicos: a) comprimento total, b) posição do centrômero (relação de braços), c) presença de heterocromatina centromérica, d) cromômeros característicos, e e) presença de knobs em sítios específicos.

Os detalhes morfológicos dos cromossomos mitóticos são consideravelmente reduzidos em relação aos encontrados no paquíteno. Na prófase mitótica, cuja coloração diferencial de eucromatina e heterocromatina é semelhante ao observado na meiose, a distinção entre elas é dificultada pela natureza mais condensada dos cromossomos (CARLSON, 1977). Na metáfase mitótica a perda de detalhes da morfologia é ainda maior, uma vez que os cromossomos estão completamente condensados, o que, segundo este último autor, aumenta a

dificuldade em se determinar de maneira acurada o comprimento total e posição do centrômero, em relação aos cromossomos paquitênicos. Apesar disto, CHEN (1969) identificou todos os cromossomos do milho na metáfase mitótica, através dos critérios mencionados e da presença de constrição secundária.

Em sua revisão sobre a assunto, CARLSON (1988) mencionou que as vantagens de se estudar cromossomos mitóticos seriam: facilidade de se obter o material, simplicidade de preparação e na contagem de cromossomos. As recentes técnicas citológicas estão auxiliando a suplantar as desvantagens. Como exemplo o autor menciona o método de bandamento-C, onde as células mitóticas coradas com Giemsa produzem coloração diferencial dos cromossomos (veja VOSA, 1975), com regiões específicas coradas mais intensamente, o que permite uma análise detalhada da estrutura dos cromossomos, embora dentro dos limites da análise de pró-metáfases ou metáfases mitóticas. WARD (1980) utilizou bandamento-C em variedades diferentes de milho com constituição de knobs conhecida e mostrou haver correspondência entre o número de knobs e o número de bandas. Resultados similares foram obtidos por AGUIAR-PERECIN (1985). Além disto, os padrões de coloração reportados pelos autores mostraram que bandas-C podem ser utilizadas para diferenciar classes de heterocromatina. Estudos com bandamento-C em milho foram relatados por HADLACZKY & KALMAN (1975), CHOW & LARTER (1981), MASTENBROEK & WET (1983) e RAYBURN et alii (1985). AGUIAR-PERECIN & VOSA (1985) relataram que análise biométrica de metáfases coradas através da metodologia de bandamento-C, comprovou que a presença de bandas-C correspondentes a knobs de tamanhos grande e médio alteram o comprimento dos braços cromossômicos nas metáfases mitóticas.

Com relação ao desenvolvimento de técnicas de coloração de tecidos específicos ou tipos celulares, PHILLIPS & WANG (1984) discutiram métodos de análise da variação cromossômica em células cultivadas *in vitro* e em plantas

regeneradas a partir delas. Uma revisão sobre as técnicas citogenéticas para culturas *in vitro* foi apresentada por EVANS & REED (1981), incluindo metodologias de coleta de materiais e de coloração para a determinação de aberrações cromossômicas numéricas.

O índice mitótico verificado em algumas culturas de calos ou de suspensões celulares pareceu ser normalmente baixo. WANG et alii (1986) observaram que culturas em suspensão de Black Mexican Sweet possuíam um índice mitótico de cerca de 4%. Devido a este fato, PHILLIPS et alii (1988) comentaram que há uma grande dificuldade em se estudar as variações cromossômicas diretamente nestas culturas.

Um outro aspecto do estudo de variações induzidas pelo cultivo *in vitro* de calos ou suspensões celulares de milho é que as alterações na estrutura dos cromossomos, em oposição a alterações no seu número, têm sido relatado com bem menor frequência (McCOY & PHILLIPS, 1982 e MOHANTY et alii, 1986). Com base no número de variantes com aberrações estruturais encontrados em progênies de plantas regeneradas, PHILLIPS et alii (1988) mencionaram que não seria de se duvidar que tais eventos ocorressem, ao menos em culturas de calos regeneráveis, e que não haviam sido detectados até então devido a limitações nas metodologias de análise mitótica destes materiais.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Genótipos utilizados

O presente trabalho foi realizado em etapas, que consistiram de 3 experimentos distintos entre si quanto aos tipos de materiais utilizados. Cada um dos experimentos teve os objetivos mencionados a seguir:

3.1.1. Experimento 1: Etapa preliminar de padronização da metodologia de cultivo in vitro

Em uma fase anterior aos experimentos principais do presente trabalho, foram realizados testes de cultivo in vitro através de experimentos preliminares nos anos de 1984, 1985 e 1986. Estes tiveram como objetivo a implantação da técnica de cultura de tecidos de milho no Laboratório de Citologia do Departamento de Genética - ESALQ/USP. Foram utilizados, para esse fim, embriões imaturos removidos de espigas autofecundadas de plantas das variedades Piranão - Seleção de Inverno, desenvolvida no referido Departamento, e com referências em PATERNIANI (1973) e FREIRE & PATERNIANI (1986); e Jac-Duro, desenvolvida em programa da firma Sementes Agroceres S/A.. As composições de germoplasmas destas variedades são listados na Tabela 01.

As plantas doadoras de explantes foram cultivadas em condições de campo, na área experimental do

Departamento de Genética - ESALQ/USP (solo Terra Roxa Estruturada), e as inoculações foram iniciadas nos meses de Setembro/1984, Janeiro/1985 e Dezembro/1985 (para a variedade Piranão de Inverno), e Janeiro/1985 (para a variedade Jac-Duro). Foram inoculados cerca de 140 explantes de cada material e os procedimentos padronizados envolveram: verificação do estágio de desenvolvimento mais adequado dos embriões imaturos para a indução de calogênese, composições dos meios de cultura empregados, métodos de subcultivos, regeneração de plantas, aclimação às condições de cultivo normais e produção de progênes destas.

3.1.2. Experimento 2: Linhagens endogâmicas com diferentes composições de knobs cromossômicos

Após a referida etapa preliminar do programa de pesquisa, foram iniciados experimentos utilizando linhagens endogâmicas obtidas a partir da variedade Jac-Duro, e com constituição de knobs cromossômicos determinada através de metodologia de bandamento-C (AGUIAR-PERECIN, 1979 e 1985). Estas linhagens vinham sendo utilizadas em outros trabalhos desenvolvidos no Setor de Citologia do Departamento de Genética da ESALQ/USP, com o objetivo de se estudar os possíveis efeitos genéticos dos knobs cromossômicos heterocromáticos do milho no desenvolvimento da planta.

Este experimento foi realizado em três diferentes anos, e foram denominados: Experimento 2.1. (iniciado em Janeiro/1987); Experimento 2.2. (iniciado em Janeiro/1988); e Experimento 2.3. (iniciado em Maio/1990). Em cada um destes experimentos foram analisadas linhagens pertencentes a quatro famílias distintas entre si na genealogia e na composição de bandas-C (correspondentes aos knobs heterocromáticos). As quatro famílias são originárias de um

ancestral comum e têm as seguintes características gerais: são homocigóticas para bandas-C correspondentes a K6L₂ e K6L₃ (fundidas numa banda), K7L e K8L (L₁ ou L₂, não identificado) e com presença (++) ou ausência (oo) de bandas correspondentes a K2L, K3L, K7S e K9S. Para referências veja em AGUIAR-PERECIN & DECICCO (1988). As linhagens avaliadas nos Experimentos 2.1., 2.2. e 2.3. são apresentadas respectivamente nas Tabelas 02, 03 e 04, juntamente com suas composições de bandas-C e a constituição de famílias e sub-famílias. Os Experimentos 2.1. e 2.2. incluíram algumas linhagens que apresentavam segregação para a presença de bandas-C em algumas posições nos cromossomos, enquanto que o Experimento 2.3. incluiu somente linhagens homocigóticas para a presença (++) e ausência (oo) de bandas-C correspondentes a K2L, K3L, K7S e K9S. As linhagens incluídas nesse último experimento apresentavam diversos graus de endogamia. As famílias podem ser caracterizadas como se segue:

Família 300-1-3: as linhagens apresentam bandas-C no braço curto dos cromossomos 7 e com diferenças entre as suas sub-famílias: linhagens pertencentes às sub-famílias 300-131 e 300-132 apresentam banda-C no braço curto dos cromossomos 9, enquanto a sub-família 300-133 possui linhagens com presença de knob no braço longo dos cromossomos 3 e também linhagens com ausência da referida banda. No Experimento 2.1. ainda ocorria segregação para esse locus na linhagem utilizada.

Família 301-2-1: as linhagens apresentam bandas-C no braço longo dos cromossomos 3 e no braço curto dos cromossomos 9, sendo que foram avaliadas linhagens homocigóticas para esses locos em todos os experimentos.

Na família 303-4-1 podem também ocorrer ou não knobs em K2L, K3L e K9S, sendo que todas as linhagens eram homocigóticas para ausência de K7S em todos os experimentos.

Na família 303-4-4 podem ocorrer ou não knobs em K2L, K3L, K7S e K9S, sendo que nos Experimentos 2.1. e 2.2.

ainda ocorria segregação para diversos locos.

Cada uma das linhagens foi representada por 3 a 5 plantas por experimento, cultivadas no campo experimental já descrito, e sendo inoculados de 30 a 40 explantes de cada espiga em um ou dois meios de cultura com diferentes composições, descritos adiante.

Os objetivos destas avaliações foram:

. comparações entre as quatro famílias de linhagens, de modo a se comprovar qual(is) subgrupo(s) apresenta(m) respostas mais favoráveis ao cultivo *in vitro*, com o objetivo de seleção de melhores genótipos para estudos futuros, tais como: experimentos de isolamento e cultivo de protoplastos;

. seleção de genótipos com melhores respostas ao cultivo *in vitro* (formação de calos embriogênicos e regeneração de plantas), e classificação dos tipos de calos induzidos, segundo critérios relatados na literatura;

. para o Experimento 2.3, foi realizada uma análise citogenética de células somáticas dos calos induzidos a partir de alguns dos materiais envolvidos, verificando-se a estabilidade ou instabilidade das culturas, através da observação de possíveis anormalidades cromossômicas decorrentes do cultivo *in vitro*. Os materiais analisados são apresentados na Tabela 05, juntamente com a constituição de famílias e sub-famílias;

. seleção dos materiais superiores em relação ao cultivo *in vitro* para a utilização em experimentos de obtenção e cultivo de suspensões celulares.

3.1.3. Experimento 3: Outros genótipos

Paralelamente aos experimentos descritos, foram realizados testes com outros materiais de procedências diversas, com o objetivo de se identificarem possíveis genótipos com comportamentos superiores ao cultivo *in vitro*. Para esta avaliação, foram utilizadas linhagens endogâmicas com alta capacidade de combinação para a produção de grãos, pertencentes a dois grupos distintos: um do tipo "flint" e outro do tipo "dentado", cujas sementes foram fornecidas pelo Prof. Dr. Jose B. de Miranda Filho, do Departamento de Genética da ESALQ/USP. Estes materiais foram obtidos a partir de duas populações de base genética ampla: Composto Dentado - Planta Baixa e Composto Flint - Planta Baixa, produzidas a partir do inter cruzamento dos Compostos Dentado e Flint com sete variedades que apresentam porte reduzido da planta como característica poligênica, listadas na Tabela 01. As origens das populações Composto Dentado e Composto Flint estão detalhadas no trabalho de QUEIROZ (1969). As populações de porte baixo são descritas por MIRANDA FILHO (1974). A obtenção de linhagens endogâmicas que são utilizadas neste trabalho, a partir daqueles dois Compostos, pode ser encontrada com maiores detalhes no trabalho de MIRANDA FILHO (1979). Tais materiais também foram incluídos em outro estudo desenvolvido no Setor de Citologia do Departamento de Genética da ESALQ/USP, para análise da frequência de quismas (PAGLIARINI, 1989). As designações das linhagens analisadas são mencionadas na Tabela 38, na parte de Resultados.

TABELA 01: Genótipos de milho utilizados nos experimentos de cultivo in vitro e respectivas composições de germoplasma das populações originais

Material	População original	Germoplasmas da população
Linhagens com knobs cromossômicos determinados	Variedade Jac-Duro	<ul style="list-style-type: none"> . Cateto Minas Gerais II . Cateto São Simão . WP5 (originado de Cuba 11J) . WP8 (originado de Cuba G.1) . M-17 (híbrido de linhagens derivadas da var. Cateto)
Linhagens com alta capacidade de combinação	Composto Dentado (Planta Baixa) Composto Flint (Planta Baixa)	<ul style="list-style-type: none"> . Composto Dentado . Composto Flint . Piracar - I . M E B . Mezcla Amarilla . Eto Branco . Antigua . Cateto Argentina-Uruguai . Tuxpeno Crema - 1
Variedade Piranão de Inverno	Variedade Piranão	<ul style="list-style-type: none"> . ESALQ-VD2 x Piranão-VD1 . Piramex . Tuxpeno br-2 . WP2, WP6, WP9, WP10, . WP27, WP29, WP32, WP37 . America Central . Azteca . Maia
	Linhagem com genes (A_B_P1_)	

Observações: Composições de germoplasma dos materiais:

- . Variedade Jac-Duro: comunicação pessoal do Dr. Urbano Ribeiral à Prof^a. Dr^a. Margarida L.R. de Aguiar-Perecin (1984).
- . Composto Dentado e Composto Flint: QUEIROZ (1969).
- . Populações de porte baixo: MIRANDA FILHO (1974).
- . Linhagens com alta capacidade de combinação: MIRANDA FILHO (1979).
- . Variedade Piranão: PATERNIANI (1973)
- . Variedade Piranão - Seleção de Inverno: FREIRE & PATERNIANI (1986).

TABELA 02: Linhagens endogâmicas com diferentes conteúdos de knobs cromossômicos utilizadas no Experimento 2.1. e respectivas composições de bandas-C correspondentes aos knobs nos cromossomos 2, 3, 7 e 9.

Familia	Sub-família	Linhagem	(*)	Posição das bandas-C			
				K2L	K3L	K7S	K9S
300-1-3	300-131	131/5	S6	oo	oo	++	++
		132/1	S6	oo	oo	++	++
	300-132	132/7	S6	oo	oo	++	++
		300-133	133/4	S6	oo	++,+o,oo	++
301-2-1	301-21N	211/8	S6	oo	++	oo	++
		211/9	S6	oo	++	oo	++
		212/2	S6	oo	++	oo	++
		213/3	S6	oo	++	oo	++
303-4-1	303-412	412/3	S5	++,+o	++	oo	++,+o,oo
303-4-4	303-44N	443/4	S5	++	oo	++,+o,oo	oo
		445/1	S5 (**)				

Legenda:

oo = ausência de knobs

++ = presença de knobs

+o = heterozigótico para presença de knobs

(*) = grau de endogamia

(**) = composição de bandas-C não determinada

K2L = knob localizado no braço longo do cromossomo 2

K3L = knob localizado no braço longo do cromossomo 3

K7S = knob localizado no braço curto do cromossomo 7

K9S = knob localizado no braço curto do cromossomo 9

Obs: Todas as linhagens são homozigóticas para a presença de bandas nas posições K6L₂ e K6L₃ (visualizadas como uma única banda), K7L e K8L (correspondência com K8L₁ ou K8L₂ ainda não determinada).

TABELA 03: Linhagens endogâmicas com diferentes conteúdos de knobs cromossômicos utilizadas no Experimento 2.2. e respectivas composições de bandas-C correspondentes aos knobs nos cromossomos 2, 3, 7 e 9.

Familia	Sub-familia	Linhagem	(*)	Posição das bandas-C			
				K2L	K3L	K7S	K9S
300-1-3	300-131	131/5	S6	oo	oo	++	++
		132/1	S6	oo	oo	++	++
	132/7	S6	oo	oo	++	++	
	300-133	133/7	S6	oo	++	++	oo
301-2-1	301-211	211/8	S6	oo	++	oo	++
		211/9	S6	oo	++	oo	++
	301-212	212/2	S6	oo	++	oo	++
	301-213	213/3	S6	oo	++	oo	++
303-4-1	303-411	4113/1	S6	++	++	oo	++,+o,oo
		4121/2	S6 (**)				
	4123/2	S6	++	++,+o,oo	oo	++	
303-4-4	303-441	4413/3	S6	++	++	oo	++
		4421/4	S6	++	++,+o,oo	++	++
	4422/4	S6	++,+o,oo	++,+o,oo	oo	++	
	303-443	4433/3	S6 (**)				
	303-445	4451/2	S6 (**)				
	303-446	4462/1	S6 (**)				

Legenda: oo = ausência de knobs ++ = presença de knobs
 +o = heterozigótico para presença de knobs
 (*) = grau de endogamia (**) = composição não determinada
 K2L = knob localizado no braço longo do cromossomo 2
 K3L = knob localizado no braço longo do cromossomo 3
 K7S = knob localizado no braço curto do cromossomo 7
 K9S = knob localizado no braço curto do cromossomo 9

Obs: Todas as linhagens são homozigóticas para a presença de bandas nas posições K6L₂ e K6L₃ (visualizadas como uma única banda), K7L e K8L.

TABELA 04: Linhagens endogâmicas com diferentes conteúdos de knobs cromossômicos cultivadas no Experimento 2.3. e respectivas composições de bandas-C correspondentes aos knobs nos cromossomos 2, 3, 7 e 9.

Familia	Sub-familia	Linhagem	(*)	Posição das bandas-C				
				K2L	K3L	K7S	K9S	
300-1-3	300-131	131311/1	S9	oo	oo	++	++	
		131312/1	S9	oo	oo	++	++	
		13151/1	S8	oo	oo	++	++	
		13153/1	S8	oo	oo	++	++	
	300-132	132331/1	S9	oo	oo	++	++	
	300-133	13332/1	S8	oo	(**)	++	oo	
		13333/1	S8	oo	++	++	oo	
		13351/2	S8	oo	oo	++	oo	
		133112/2	S9	oo	oo	++	oo	
		133112/3	S9	oo	oo	++	oo	
		133131/3	S9	oo	++	++	oo	
		133512/2	S9	oo	oo	++	oo	
	301-2-1	301-211	21113/1	S8	oo	++	oo	++
			21241/1	S8	oo	++	oo	++
21311/2			S8	oo	++	oo	++	
303-4-1	303-411	41121/1	S7	++	++	oo	++	
		41123/2	S7	++	++	oo	++	
	303-412	41242/1	S7	++	oo	oo	++	
		41242/2	S7	++	oo	oo	++	
	303-4-4	303-441	44114/1	S7	++	++	++	++
			44114/2	S7	++	++	++	++
44133/2			S7	++	++	oo	++	

Legenda:

- oo = ausência de knobs
- ++ = presença de knobs
- (*) = grau de endogamia
- (**) = composição de bandas-C não determinada
- K2L = knob localizado no braço longo do cromossomo 2
- K3L = knob localizado no braço longo do cromossomo 3
- K7S = knob localizado no braço curto do cromossomo 7
- K9S = knob localizado no braço curto do cromossomo 9

Obs: Todas as linhagens são homocigóticas para a presença de bandas nas posições K6L₂ e K6L₃ (visualizadas como uma única banda), K7L e K8L.

TABELA 05: Classificação de famílias, sub-famílias e linhagens envolvidas no experimento de avaliação da instabilidade mitótica em células de calos cultivados *in vitro*.

Família	Sub-família	Linhagem	Grau de endogamia
300-1-3	300-131	131311/1	S9
		131312/1	S9
		13151/1	S9
		13153/1	S9
	300-132	132331/1	S9
	300-133 (a)	13333/1	S8
		133131/3	S9
	300-133 (b)	13351/2	S8
		133112/2	S9
			133512/2
301-2-1	301-212	21241/1	S8
303-4-1	303-411	41123/2	S7
	303-412	41242/2	S7
303-4-4	303-441	44114/2	S7
		44133/2	S7

(a), (b) = Classificação segundo composição de bandas-C para a posição K3L

3.2. Metodologia de cultivo in vitro de calos de milho

3.2.1. Obtenção de explantes e indução de calogênese

A metodologia foi estabelecida de acordo com o trabalho pioneiro de GREEN & PHILLIPS (1975). Espigas autofecundadas foram coletadas das plantas no campo com cerca de 12 a 18 dias após a polinização, e lavadas em água corrente dentro do laboratório. Cada espiga foi cortada em três segmentos transversais e o segmento central escolhido para a remoção dos explantes. Após serem esterilizados superficialmente com solução de hipoclorito de Sódio a 1% por 30 minutos, eles foram enxaguados por duas vezes em água destilada esterilizada, dentro de câmara de fluxo contínuo. Os embriões imaturos (com 1,0 mm a 2,0 mm de comprimento) foram removidos das sementes com o auxílio de pinças e espátulas, sob lupa, e inoculados em meio de cultura sólido, com a orientação adequada para a indução de calogênese (coleóptilo/coleorriza em contato com o meio e o escutelo voltado para cima). Foram removidos de 30 a 40 embriões imaturos de cada espiga, sendo inoculados metade deste número em cada um dos meios de cultura utilizados, para indução e manutenção dos calos. As culturas foram mantidas no escuro em estufa incubadora para B.O.D. ou dentro de caixas de madeira cobertas com tecido negro. A temperatura da sala climatizada foi mantida a 25°C e os calos induzidos foram subcultivados a cada 15-20 dias, transferindo-se as regiões com maior crescimento dos calos para meio de cultura novo.

Os calos foram avaliados individualmente a cada subcultivo, quanto à sua capacidade embriogênica, anotando-se em fichas de avaliação as seguintes características: número e tipo de calos induzidos, classificação dos mesmos segundo denominações padronizadas na literatura, verificação da

ocorrência de regiões embriogênicas, observação do crescimento e viabilidade dos calos para cultivos de longa duração.

3.2.2. Meios de cultura utilizados

Em todos os experimentos foi utilizada solução salina do meio de cultura MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), enquanto nos Experimentos 2.2. e 2.3. foi utilizada também a solução salina do meio N6 (CHU et alii, 1975). As composições destes meios são apresentadas na Tabela 06, onde se pode observar que eles se diferenciam em relação a macro e micronutrientes, notadamente para a fonte de Nitrogênio. É observado que o meio MS possui relação N nitrato: N amoniacal igual a 1, enquanto o meio N6 possui esta relação igual a 7. O primeiro apresenta maior número e variedade de fontes de micronutrientes do que o meio N6. Os componentes orgânicos utilizados foram de igual composição e concentração para ambos os meios: sacarose (20 g/l), inositol (99,0 mg/l), cisteína (39,4 mg/l), e vitaminas de acordo com PRIOLI (1987): piridoxina (7,5 µM), ácido nicotínico (7,5 µM), pantotenato de Cálcio (2,5 mg/l), tiamina-HCl (15 µM). No meio N6 também foi adicionada glicina (2 mg/l). Em ambos os meios foi utilizado hidrolisado de caseína (20 mg/l), a auxina 2,4-D (ácido 2,4 diclorofenoxiacético) (2,0 mg/l), para indução e manutenção de calogênese, e solidificados com agar (8,0 g/l). Os meios tiveram o seu potencial hidrogeniônico ajustado para que resultassem em 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) e, para um volume de 50 ml de meio, foram inoculados de 15 a 20 explantes. Os meios foram preparados no máximo 4 dias antes de cada subcultivo e armazenados em sala climatizada com temperatura de 25°C, protegidos da luz.

TABELA 06: Composição dos meios de cultura para o cultivo in vitro de calos e suspensões celulares de milho (em mg/l)

Componentes	Meios originais		Meios modificados	
	Meio MS	Meio N6	MS modif.	N6 modif.
NH ₄ NO ₃	1.650,0		1.650,0	
(NH ₄) ₂ SO ₄		463,0		463,0
KNO ₃	1.900,0	2.830,0	1.900,0	2.830,0
CaCl ₂ .2H ₂ O	440,0	166,0	440,0	166,0
MgSO ₄ .7H ₂ O	370,0	185,0	370,0	185,0
KH ₂ PO ₄	170,0	400,0	170,0	400,0
FeEDTA	38,3	38,3	38,3	38,3
H ₃ BO ₃	6,2	1,6	6,2	1,6
MnSO ₄ .4H ₂ O	22,3	4,4	22,3	4,4
ZnSO ₄ .7H ₂ O	10,6	1,5	10,6	1,5
KI	0,83	0,8	0,83	0,8
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25		0,25	
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025		0,025	
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025		0,025	
Inositol	99,0	99,0	99,0	99,0
Cisteína	39,4	39,4	39,4	39,4
Vitaminas				
Tiamina-HCl	5,06	5,06	5,06	5,06
Piridoxina	3,84	3,84	3,84	3,84
ácido Nicotínico	0,92	0,92	0,92	0,92
Pantotenato de Cálcio	2,50	2,50	2,50	2,50
Aminoácidos				
L-prolina			1.381,56	1.381,56
L-asparagina			132,12	792,72
Hidrolisado de Caseína	20,00	20,00	20,00	20,00
Glicina		2,00		2,00
Sacarose	20.000,00	20.000,00	20.000,00	20.000,00
Auxina (2,4-D)	2,00	2,00	2,00	2,00

Legenda: MS = Solução salina de MURASHIGE & SKOOG (1962)

N6 = Solução salina de CHU et alii (1975)

Meios modificados = utilizados para suspensões celulares

3.2.3. Observação de embriogênese somática

A capacidade de formação de calos embriogênicos foi verificada através de avaliações a cada subcultivo. Os calos foram mantidos individualizados por todo o período de cultivo, desde a sua indução a partir dos explantes. Tal procedimento permitiu a elaboração, no Experimento 2.3. (linhagens homozigóticas para diferentes composições de knobs cromossômicos), de fichas de avaliação para o acompanhamento das culturas.

Os tipos de calos observados foram classificados segundo convenção estabelecida (mencionada anteriormente). Foram observados, entre os materiais analisados, calos embriogênicos semelhantes aos descritos na literatura como sendo do Tipo I e do Tipo II, e calos não-embriogênicos. Os calos embriogênicos do Tipo II foram identificados pela ocorrência de regiões pró-embriogênicas (com grande número de embriões em estágio globular) na sua superfície. A ocorrência de formações mais compactas, de coloração branca e opaca, com os embriões somáticos se formando de maneira justaposta, e com grande ocorrência de formações aparentemente organogênicas, caracterizaram os calos do Tipo I. Foram considerados calos não-embriogênicos aqueles que não apresentaram nenhum tipo de diferenciação de tecidos que indicasse a possibilidade de se regenerar plantas, por organogênese ou por embriogênese somática.

3.2.4. Regeneração e aclimatação de plantas regeneradas (geração R0)

Os genótipos avaliados no Experimento 1 e algumas linhagens dos Experimentos 2.1. e 2.2. foram testados em sua capacidade de regeneração de plantas férteis. Nos

experimentos preliminares com as variedades Piranão de Inverno e Jac-Duro foram testadas diversas condições de cultivo que permitem a recuperação de um maior número de plantas a partir dos calos embriogênicos induzidos.

Os fatores testados nesta etapa preliminar foram: meios de cultura com composições salinas de MS e N6, concentrações de sacarose (30 g/l, 60 g/l e 100 g/l), adição de hidrolisado de caseína (20 mg/l e 40 mg/l), condições de cultivo dos embriões somáticos (ambiente escuro/iluminado e manipulação dos grupos embriogênicos), meios de cultura para o enraizamento das plântulas regeneradas, adição da auxina NAA (ácido naftaleno-acético) para induzir este enraizamento (adição de 1,0 ml de solução de NAA a 0,01% sobre o meio sólido, ou meio sólido contendo 0,5 mg NAA/l).

A metodologia padronizada no laboratório, e utilizada com os demais materiais cultivados *in vitro*, envolve os seguintes aspectos: as regiões pró-embriogênicas surgidas na superfície dos calos são separadas dos calos por ocasião dos subcultivos e mantidas na mesma placa por 4 a 5 dias, sob fotoperíodo 16/8 horas (lâmpadas Gro-Lux[®] com intensidade de 1.200 lux), para o completo desenvolvimento dos pró-embriões. Os grupos de embriões somáticos formados nestas regiões são transferidos para meio de cultura com solução salina de MS com a mesma composição daquele utilizado para manutenção dos calos, mas com ausência da auxina (2,4-D), em placas de Petri de 100 mm de diâmetro, mantidas no mesmo ambiente iluminado. As plântulas que começam a germinar devem ser transferidas para frascos com 10 cm de altura contendo meio de cultura com idêntica composição ao anterior, em ambiente com maior intensidade luminosa (lâmpadas Gro-Lux[®] e Luz do Dia[®], com intensidade luminosa de 3.200 lux), por 10 a 15 dias. Em seguida, elas devem ser transferidas para frascos com meio de cultura cujas concentrações de macro, micronutrientes e sacarose foram reduzidas pela metade, para promover o

crescimento do sistema radicular e aumentar o vigor das plântulas. As plantas com sistema radicular bem desenvolvido são removidas dos frascos, lavadas em água corrente para remoção completa do meio de cultura, e tratadas com solução de fungicida (Benlate a 0,03%) por 3 a 5 minutos. Em seguida, elas são transferidas para vasos com mistura solo/vermiculita numa relação 3:1 e mantidas no laboratório por mais 5 a 7 dias, protegidas para manter elevada umidade relativa do ar, sob fotoperíodo 16/8 horas e intensidade luminosa de 3.200 lux. Após este período, elas são transferidas para casa de vegetação, transplantadas para solo em vasos de cerâmica e mantidas por mais 5 a 7 dias. As plantas que responderam favoravelmente a esta fase de aclimação são transplantadas para canteiros, onde completam o seu ciclo e procura-se obter espigas autofecundadas das mesmas.

3.2.5. Produção de progênie das plantas regeneradas e observação de variabilidade genética

Esta etapa foi realizada também apenas com as variedades do Experimento 1 e com algumas linhagens dos Experimentos 2.1. e 2.2.. As plantas regeneradas são cultivadas de modo a tornar possível a autofecundação de suas espigas. É adotado um espaçamento de 0,2 m² por planta, fazem-se adubações de cobertura com sulfato de amônio aos 30 e 60 dias, assim como tratamento fitossanitário durante todo o cultivo, entre outros.

As progênie de plantas da geração R1 das variedades Piranão de Inverno e Jac-Duro, apresentaram diversos tipos de variações em relação ao genótipo original (uma descrição geral das variações fenotípicas observadas na geração R1 destes materiais são apresentadas nas Tabelas 08 e 09). Estes materiais foram cultivados em condições de campo, para a produção de progênie R2, R3 e R4, através de sucessivas

autofecundações. Alguns variantes fenotípicos que se mantiveram durante estas gerações foram intercrozados (plantas R3 x R3) com o objetivo de se produzir materiais para análises da expressão dos caracteres envolvidos e para verificação de possíveis causas citogenéticas destas anormalidades. Uma breve descrição dos materiais da geração R4 produzidos são apresentados na Tabela 10 (na parte de Resultados).

3.3. Análise da instabilidade cromossômica de materiais cultivados in vitro

O objetivo deste estudo foi a análise de anomalias mitóticas que poderiam dar origem a aberrações cromossômicas. Conforme exposto anteriormente, foram avaliadas anáfases e telófases. Entre as linhagens homocigóticas para diferentes conteúdos de knobs cromossômicos do Experimento 2.3., foram selecionados 15 materiais para esse estudo, listados na Tabela 05.

Neste sentido, foi analisada a tese levantada por pesquisadores da Universidade de Minnesota, comentada em vários artigos (McCOY & PHILLIPS, 1982; PHILLIPS, 1986; LEE & PHILLIPS, 1988 e SOMERS et alii 1988), segundo a qual os braços cromossômicos contendo knobs heterocromáticos seriam mais susceptíveis a quebras durante o cultivo in vitro de células de milho. Os autores sugeriram que possíveis perturbações afetando a sincronia entre o período de síntese de DNA (período S) e a mitose poderiam provocar a formação de pontes na anáfase, em locais de replicação tardia, ou seja, ao nível dos knobs. Os autores formularam esta hipótese baseados em observações da ocorrência predominante de aberrações estruturais em cromossomos contendo knobs, através da análise meiótica de plantas regeneradas, em genótipos de milho adaptados ao clima temperado.

As linhagens envolvidas no presente trabalho, por sua vez, foram utilizadas para a análise de anáfases mitóticas em células de calos, para a observação da ocorrência ou não de pontes cromossômicas. A análise da frequência de aberrações em anáfases e telófases de fragmentos de calos foi realizada em preparações coradas pelo método de Feulgen. Foi empregada a metodologia de coloração pelo bandamento-C, para a detecção de possíveis aberrações estruturais observáveis em metáfases dos mesmos materiais. Esta técnica também foi empregada para a verificação do envolvimento dos knobs com a ocorrência de pontes nas anáfases mitóticas dos calos.

Adicionalmente, foram analisadas algumas progênies de plantas regeneradas das variedades Piranão de Inverno e Jac-Duro, que apresentaram variações na geração R1, com o objetivo de se detectar possíveis causas citogenéticas para tais modificações. Para isto, foram analisadas células dos meristemas radiculares de sementes R1 dos materiais envolvidos (assinalados na Tabela 11) e feitas contagens do número de cromossomos, para a identificação de possíveis aberrações numéricas nestes materiais. Os métodos utilizados para a análise citológica de calos e de raízes de regenerantes são descritos a seguir.

3.3.1. Análise de anáfases mitóticas em calos

Para a análise da instabilidade mitótica de células cultivadas *in vitro*, foram escolhidos cinco calos de cada linhagem selecionada, separando-se fragmentos deles para cultivo independente, por ocasião do 10º subcultivo (culturas com aproximadamente 5 meses a partir da calogênese). Os calos foram mantidos em frascos individuais, com o meio de cultura idêntico ao utilizado para a sua indução e manutenção, mantidos em caixas de madeira com tampa de tecido negro, em sala

climatizada com temperatura de 25°C. As coletas foram realizadas após o segundo subcultivo nestes frascos (cerca de 1 mês após o isolamento dos calos).

O método de coleta foi padronizado no laboratório e consiste dos seguintes procedimentos: são coletados fragmentos da superfície dos calos 5 dias após o subcultivo, quando estes apresentam um pronunciado crescimento. Para as linhagens que apresentaram a formação de calos friáveis, altamente embriogênicos, foram coletadas regiões da superfície, contendo embriões somáticos em estágio globular de desenvolvimento. Nos materiais em que ocorreu a formação de calos não-embriogênicos, foram coletadas regiões meristemáticas, ou seja, regiões que apresentavam maior taxa de crescimento em sua superfície.

Os materiais coletados foram colocados imediatamente em fixador Carnoy (álcool etílico 3:1 ácido acético glacial - v/v) e mantidos por uma noite. No dia seguinte, eles foram transferidos para etanol a 70% e conservados em geladeira a 4°C, quando utilizados para análise pelo método do Feulgen, ou então conservados no próprio fixador a 4°C, quando utilizados para o bandamento-C (veja AGUIAR-PERECIN et alii, 1991).

. Método de coloração pelo Feulgen

O método de preparação de lâminas com fragmentos de calos de milho, padronizado no laboratório e com referências em AGUIAR-PERECIN et alii (1991), envolve os seguintes pontos:

Após serem retirados da geladeira e terem atingido a temperatura ambiente, os materiais são imersos em água destilada por 3 minutos, para remoção do etanol, seguidos de hidrólise em ácido clorídrico 1 N por 7 minutos a 60°C. Eles são novamente imersos em água destilada por 3 minutos, para

remoção do excesso de ácido clorídrico, e colocados em reativo de Schiff (Fuccina leuco-básica). Os materiais são mantidos por 45 minutos, no escuro e em temperatura ambiente. Após este período, o material é lavado em água corrente de torneira por 5 minutos e seguir com um tratamento enzimático com solução de pectinase a 5% por 5 a 10 minutos, a temperatura de 37°C. Após uma nova lavagem em água destilada por 5 minutos, os materiais já podem ser macerados em solução de ácido acético a 45% por 10 minutos, seguido de imersão dos calos em água destilada até o momento da preparação das lâminas. É recomendável fazer a separação dos embriões somáticos ou das regiões meristemáticas sob lupa (aumento 25x) antes de se fazer o esmagamento em solução de Carmin acético a 1%. A remoção das lamínulas é feita em solução de ácido acético a 45% e, após secarem ao ar livre, é feita a montagem em bálsamo do Canadá.

. Método de bandamento-O

Alguns materiais foram selecionados para análise de anáfases e metáfases com a metodologia de bandamento-O, estabelecida no laboratório e com maiores referências em AGUIAR-PERECIN (1979; 1985) e AGUIAR-PERECIN & VOSA (1985). Os procedimentos foram os seguintes:

Os materiais devem ser retirados da geladeira previamente para atingirem a temperatura ambiente, seguido de imersão em água destilada por 3 minutos. Faz-se o tratamento enzimático com solução de pectinase a 5% por 3 minutos, a temperatura de 37°C, e uma nova imersão em água destilada por 3 minutos. Após a separação dos embriões somáticos ou das regiões meristemáticas sob lupa (aumento 25x), os fragmentos devem ser macerados em ácido acético a 45% por 10 minutos. O esmagamento é feito na própria solução de ácido acético, seguido de observação ao microscópio de contraste de fase. A

remoção das laminulas é feita em ácido acético a 45%, secando-as ao ar livre. Deve-se conservar as lâminas e laminulas em álcool etílico absoluto, em geladeira a 4°C até o momento do procedimento de bandamento-C. Para a desnaturação e posterior renaturação seletiva do DNA cromossômico, deve-se esperar os materiais atingirem a temperatura ambiente e secá-los ao ar livre. Faz-se tratamento com solução saturada de hidróxido de Bário a temperatura de 37°C por 25 minutos, seguido de banho em água destilada para completa remoção do excesso de hidróxido de Bário. Em seguida, é feito o tratamento com solução salina 2xSSC (solução 0,3M de cloreto de Sódio e 0,03M de citrato de Sódio) a 60°C por 1 hora, seguido de lavagem em água destilada para remoção do excesso de sais. Após passagem em uma série de álcoois (etanol a 70%, 95% e absoluto), as lâminas e laminulas devem ser secas ao ar livre. A coloração em solução de Giemsa (Gurr s R 66 Giemsa) a 1% (tamponada a pH 6,8 com tabletes de tampão Gurr) deve ser testada por tempo variável entre 1 e 2 minutos, seguido de banho em água destilada. Após secarem ao ar livre, é feita a montagem com bálsamo do Canadá.

3.3.2. Análise de metáfases mitóticas em calos e em meristemas radiculares de progênies de plantas regeneradas

Esta análise teve por objetivo a avaliação da instabilidade mitótica através da identificação de possíveis aberrações numéricas e estruturais nos cromossomos das metáfases observadas. Para o primeiro tipo de observação (aberrações numéricas), foram analisados meristemas radiculares de sementes da geração R1 obtidas do cultivo das variedades Piranão de Inverno e Jac-Duro (Experimento 1), apresentadas na Tabela 11. As sementes R1 foram armazenadas por dois anos em câmara seca (temperatura ambiente e umidade relativa do ar em torno de 45%) do Departamento de Genética - ESALQ/USP. Para a

coleta de raízes, elas foram germinadas em Sphagnum umidecido, a temperatura constante de 25°C, e os ápices radiculares foram coletados quando apresentavam aproximadamente 1 cm de comprimento. Empregou-se coloração pelo método de Feulgen, já descrito, e coloração do citoplasma pelo Fast-Green (imersão de lâminas e lamínulas por 1 a 2 minutos em solução do corante a 1%, imediatamente antes da montagem final), de modo a se certificar da integridade das células avaliadas.

Para a avaliação de alterações cromossômicas estruturais em células cultivadas *in vitro*, foram analisadas regiões pró-embriogênicas de alguns materiais que produziram calos do Tipo II, apresentadas na Tabela 23 (na parte de Resultados). Para tanto, foi empregada a metodologia de bandamento-C, também descrita no item anterior. Os materiais coletados foram pré-tratados com o inibidor de formação do fuso mitótico 8-hidroxiquinolina (solução a 0,03%). O tempo de pré-tratamento foi de 2:30 horas para as pontas de raízes e de 3:00 horas para regiões pró-embriogênicas de calos friáveis. Imediatamente após o pré-tratamento, os materiais coletados foram transferidos para fixador Carnoy, seguindo-se os procedimentos já descritos.

3.4. Análise Estatística

3.4.1. Parâmetros avaliados

3.4.1.1. Cultivo *in vitro* de linhagens endogâmicas do Experimento 2.

Os experimentos para a verificação da capacidade de formação de calos embriogênicos, neste grupo de materiais,

foram delineados segundo observações obtidas nos experimentos preliminares com as variedades Piranão de Inverno e Jac-Duro e com linhagens com menor grau de endogamia, selecionadas a partir da variedade Jac-Duro (dados não apresentados no presente trabalho).

As quatro famílias de linhagens analisadas foram testadas em 3 experimentos independentes, nos anos de 1987, 1988 e 1990, conforme descrito anteriormente. Foram considerados calos embriogênicos todos aqueles que apresentaram qualquer evento de reorganização dos tecidos que representasse um mecanismo de regeneração de plantas, seja por embriogênese somática ou organogênese.

Para os materiais mais favoráveis, foi possível identificar regiões pró-embriogênicas na superfície dos calos já no segundo subcultivo. No entanto, para uniformidade de avaliação, foram consideradas duas fases: a obtenção do número de calos induzidos, correspondente aos valores máximos alcançados pelas culturas (ao redor do terceiro subcultivo no Experimento 2.3.) e a obtenção do número máximo de calos com formações embriogênicas (correspondente ao 11º subcultivo no Experimento 2.3.). A taxa de calos embriogênicos foi calculada como sendo o percentual do segundo valor sobre o primeiro.

3.4.1.2. Inestabilidade mitótica em células de calos do Experimento 2.3.

Foram analisados 5 calos de cada uma das linhagens envolvidas neste estudo, sendo considerados repetições de um mesmo material. As linhagens foram agrupadas em sub-famílias e famílias distintas, baseado na sua genealogia e respectivas composições de bandas-C, como já apresentado. Foram elaboradas fichas de avaliação, para registro da ocorrência de anormalidades cromossômicas em fases

características de divisão mitótica, a serem descritas na parte de Resultados. A classificação dos diversos tipos de anormalidades observadas permitiu que fossem selecionados quatro grupos de dados para as análises de variância:

a) Frequência de ocorrência de pontes cromossômicas em anáfases iniciais e típicas;

b) Frequência de ocorrência de pontes cromossômicas em anáfases consideradas na sua totalidade, isto é: anáfases iniciais, típicas e finais;

c) Frequência de ocorrência de pontes e "fragmentos" de cromossomos em anáfases iniciais e típicas; e

d) Frequência de ocorrência de pontes e "fragmentos" de cromossomos em anáfases consideradas na sua totalidade (iniciais, típicas e finais).

Maiores detalhes sobre esta classificação também serão apresentados adiante.

3.4.2. Análises de variância e testes estatísticos

Devido às características dos materiais utilizados neste trabalho (genealogia e presença de marcadores citológicos em cada grupo de linhagens), e com orientação do Prof. Dr. José B. de Miranda Filho, do Departamento de Genética da ESALQ/USP, a análise de variância foi estruturada de maneira a se verificar os efeitos devidos aos diversos componentes segundo os modelos empregados em cada análise, descritos a seguir.

As análises estatísticas foram realizadas pela Prof^a. Dr^a. Clarice G.B. Demétrio do Departamento de Matemática e Estatística da ESALQ/USP. Para tanto, foi utilizado o programa de computação GLIM (Generalized Linear Interactive Modelling) versão 3.77, da Royal Statistical Society, London (com referências em BAKER & NELDER, 1978).

3.4.2.1. Cultivo in vitro de linhagens endogâmicas do Experimento 2

Inicialmente considerou-se todas as linhagens segundo um delineamento inteiramente casualizado, conforme o modelo:

$$Y_{ij} = u + l_i + e_{ij}$$

onde:

- u = média geral apresentada pelas linhagens
- l_i = efeito da linhagem de ordem i
- e_{ij} = efeito do erro experimental

Os efeitos de linhagens foram decompostos, segundo um modelo hierárquico, com base nos efeitos de famílias (f_i), de sub-famílias dentro de famílias (s_k) e de linhagens dentro de sub-famílias dentro de famílias (l_t), ou:

$$Y_{ijkl} = u + f_i + s_{k(i)} + l_{t(ik)} + e_{ijkl}$$

Para os Experimentos 2.2. e 2.3., onde foram utilizados dois meios de cultura diferentes, as linhagens foram analisadas segundo um esquema fatorial em delineamento inteiramente casualizado, conforme o modelo:

$$Y_{ijk} = u + l_i + m_j + (lm)_{ij} + e_{ijk}$$

onde:

- u = média geral apresentada pelas linhagens
- l_i = efeito da linhagem de ordem i
- m_j = efeito do meio de cultura de ordem j
- $(lm)_{ij}$ = efeito da interação entre a linhagem de ordem i e o meio de cultura de ordem j
- e_{ijk} = efeito do erro experimental

Os efeitos de linhagens foram decompostos, segundo um modelo hierárquico, com base nos efeitos dos diversos componentes mencionados acima (famílias, sub-famílias dentro de famílias e linhagens dentro de sub-famílias dentro de famílias). Os efeitos das interações desses componentes com meios de cultura também foram avaliados.

Foram consideradas como possuindo efeitos fixos: meios de cultura, famílias e sub-famílias dentro de famílias. O efeito de linhagens dentro de sub-famílias dentro de famílias foi considerada como sendo de natureza aleatória. A maneira como foram consideradas as sub-famílias se encontra nas Tabelas 02, 03 e 04. Para a análise de variância, foi empregado um método de transformação dos dados por cálculo da raiz quadrada de $(P\% + 0,5)$, onde $P\%$ = porcentagem de ocorrência do evento analisado (no caso, representa a taxa de indução de calos embriogênicos). Este procedimento foi adotado de modo a se evitar os possíveis desvios causados pela existência de diversos dados nulos entre os resultados obtidos. Foram feitas duas análises de variância para cada grupo de resultados: uma com dados transformados e a outra com dados não transformados. Foi realizado o teste F para se avaliar a influência causada por linhagens (segundo o modelo inteiramente casualizado) e por linhagens dentro de sub-famílias dentro de famílias (segundo o modelo hierárquico). Quando o valor de F da primeira análise foi significativo ao nível de 1% de probabilidade, foi realizado o teste de Tukey, para a comparação de contrastes entre médias dos materiais (GOMES, 1960). Foi realizado teste F também para se avaliar o efeito de meios de cultura (nos Experimentos 2.2. e 2.3.) e as interações meios x linhagens e meios x linhagens dentro de sub-famílias dentro de famílias (também nos Experimentos 2.2. e 2.3.). Maiores detalhes sobre análises em modelos mistos podem ser encontradas em SNEDECOR & COCHRAN (1980). Não foram desenvolvidas as esperanças matemáticas dos quadrados médios de diversas causas de variação

(famílias, sub-famílias dentro de famílias e as interações destas com meios de cultura, quando existentes), devido ao desbalanceamento da estrutura dos experimentos. Devido a isto, não foi realizado o teste F para alguns dos fatores mencionados. Como medida de dispersão dos dados, foram calculados os coeficientes de variação (C.V.) para a frequência de indução de calos embriogênicos em cada um dos três experimentos realizados.

3.4.2.2. Inestabilidade mitótica em células de calos do Experimento 2.3.

Segundo idêntico raciocínio ao comentado no item anterior, a análise preliminar considerou todas as linhagens segundo um delineamento inteiramente casualizado, conforme o modelo linear já apresentado. Depois, o efeito de linhagens foi decomposto, segundo um modelo hierárquico, com base nos efeitos de famílias, de sub-famílias dentro de famílias, e de linhagens dentro de sub-famílias dentro de famílias, também mencionados anteriormente. A maneira como foram consideradas as sub-famílias se encontra na Tabela 05.

Para a análise de variância, foi empregado um método de transformação dos dados por cálculo da raiz quadrada de $(P\% + 0.5)$. Foi realizado o teste F, para avaliar a influência causada por linhagens (modelo inteiramente casualizado) e por linhagens dentro de sub-famílias dentro de famílias (modelo hierárquico). Quando o valor de F da análise de linhagens (modelo inteiramente casualizado) foi significativo ao nível de 1% de probabilidade, foi realizado o teste de Tukey (GOMES, 1960). Como medida de dispersão dos dados, foram calculados os coeficientes de variação (C.V.) para a frequência de cada um dos grupos de dados analisados.

3.5. Estabelecimento de suspensões celulares

3.5.1. Genótipos e meios de cultura utilizados

A partir do experimento de avaliação da capacidade embriogênica das linhagens endogâmicas com diferentes composições de knobs cromossômicos, realizado no ano de 1990 (Experimento 2.3.), foram selecionados alguns materiais para testes de cultivos em suspensão. Os procedimentos para o estabelecimento e cultivo de suspensões celulares foram padronizados de acordo com um grande número experimentos relatados na literatura. O material utilizado em uma etapa inicial deste experimento foi um calo friável, altamente embriogênico, selecionado a partir do cultivo de embriões imaturos F2 derivados do cruzamento de duas linhagens com elevadas taxas de indução de calos friáveis, altamente embriogênicos, testadas nos Experimentos 2.1. e 2.2. (obtido da Planta 03, mencionada na Tabela 23). Este material (denominado "calo 57") apresentava, por ocasião da inoculação em meio líquido, uma elevada taxa de crescimento e um grande potencial de regeneração, características estas mantidas por mais de 12 meses de cultivo *in vitro*. Foram utilizadas quatro combinações de meios de cultura, a saber: meios de cultura líquidos com solução salina de MS e N6, de idêntica composição à dos utilizados para a indução e cultivo de calos, inclusive compostos orgânicos e regulador de crescimento. Os outros dois meios possuíam idênticas composições, mas com modificações para a presença dos aminoácidos L-prolina (12 mM) e L-asparagina (6 mM), como apresentado na Tabela 06. Estas modificações foram efetuadas de modo a se considerar os efeitos benéficos que a adição de tais componentes traz à cultura, como apresentado e comentado por diversos autores na literatura (ARMSTRONG & GREEN, 1982 e 1985).

A inoculação em meios de cultura líquidos foi precedida por ao menos dois ciclos de subcultivos em meios sólidos de idêntica composição, de modo a se "aclimatar" os calos que seriam inoculados, evitando assim a mudança brusca de ambiente de cultivo. A inoculação foi feita após a seleção dos agregados celulares dos calos que apresentavam maior taxa de crescimento e, no caso dos calos embriogênicos, apresentavam a ocorrência de pro-embriões ou embriões somáticos em estágio globular e com desenvolvimento acelerado na sua superfície.

Posteriormente à padronização do método de cultivo e identificação do meio de cultura mais adequado ao estabelecimento de suspensões celulares (meio N6 modificado), foram realizados experimentos com cinco genótipos que formaram tipos diferentes de calos durante o cultivo *in vitro*, a saber:

- . 131311/1 - calos friáveis e embriogênicos
- . 132331/1 - calos friáveis e embriogênicos
- . 21241/1 - calos não-embriogênicos e mucilaginosos
- . 41242/2 - calos não-embriogênicos e mucilaginosos
- . 44114/2 - calos altamente friáveis, embriogênicos e organogênicos.

3.5.2. Métodos de inoculação e subcultivos

Foi empregado o método comumente citado na literatura, para o estabelecimento de suspensões celulares a partir de calos altamente friáveis (Tipo II) e calos não-embriogênicos, que consiste na inoculação de aproximadamente 1,0 grama de peso vivo de calos em cerca de 100 ml de meio de cultura líquido. Foram utilizados frascos erlenmeyers de 250 ml de capacidade, mantidos em agitador orbital a aproximadamente 120 rpm. Foram inoculados calos que apresentavam maior taxa de crescimento em cerca de quatro frascos por genótipo analisado.

As subculturas foram semanais, por meio da substituição de metade do volume de meio de cultura por igual volume de meio novo, sendo que este procedimento é característico para cada fase, descritas a seguir:

. Nas primeiras semanas após as inoculações, as subculturas são feitas através da remoção de metade do volume de meio sobrenadante, após a decantação dos agregados celulares (microcolônias em formação) nos frascos erlenmeyers. Com o auxílio de pipetas, seleciona-se os fragmentos com maior viabilidade e com menores dimensões, que são mantidos dentro do mesmo frasco, e adiciona-se metade do volume de meio de cultura novo.

. Após o estabelecimento das suspensões, deve ser transferido metade do volume de meio com os menores agregados celulares existentes, que já estão em suspensão, para um novo frasco erlenmeyer de igual capacidade, dentro do qual é adicionado metade do volume de meio de cultura novo.

4. RESULTADOS

4.1. Experimento 1 - Implantação da metodologia

Os experimentos de cultivo de embriões imaturos mostraram que houve calogênese em todos os materiais avaliados. Em geral, o crescimento dos calos teve início na porção periférica do escutelo dos embriões inoculados nos meios de cultura com presença de auxina (2,4-D). Cerca de 3 a 5 dias após a data de inoculação, os explantes mostraram-se com tamanho pronunciado e a partir da primeira semana já era possível distinguir a massa celular com grande crescimento na região do escutelo. A indução dos calos foi muito influenciada pelo tamanho dos embriões imaturos inoculados: as melhores respostas foram obtidas com explantes de 1,0 a 2,0 mm de comprimento, sendo que explantes menores que isto eram muito susceptíveis à oxidação e os maiores apresentaram um crescimento sensivelmente inferior. Os explantes que apresentaram uma germinação rudimentar (com o desenvolvimento do coleóptilo nos primeiros dias após a inoculação) tiveram, entretanto, uma formação de calos idêntica aos demais. Logo nos primeiros subcultivos estes coleóptilos foram removidos. Os calos foram subcultivados a cada 15-20 dias, transferindo-se para meio de cultura novo as regiões que apresentavam maior vitalidade, maior taxa de crescimento e características morfológicas superiores (friabilidade). Foram feitas avaliações periódicas (a cada subcultivo) para a perfeita caracterização e avaliação da capacidade embriogênica de cada genótipo. Quando não foi observada a formação de calos, os embriões imaturos

apresentaram-se com tamanho invariável, coloração com tendência ao escurecimento, indicando oxidação do tecido inoculado, sendo descartados já nos primeiros subcultivos. Para a avaliação da capacidade de formação de calos embriogênicos foram considerados apenas os calos induzidos e estabelecidos por ocasião do 3º subcultivo.

Os testes preliminares com calos induzidos a partir de explantes das variedades Piranão de Inverno e Jac-Duro permitiram que diversos aspectos relativos ao protocolo experimental fossem determinados e padronizados no laboratório. Além da já comentada importância do tamanho do explante, foi notada a influência exercida pelo estado fisiológico e nutricional das plantas doadoras de explantes. Foi estabelecido que as plantas deveriam ser autofecundadas ou então cruzadas com plantas-irmãs (de mesmo genótipo = "sib"), desde que estas apresentassem estado fisiológico e desenvolvimento semelhante.

Com relação aos meios de cultura, além da utilização de meios com diferentes composições de macro e micronutrientes: MS (Murashige-Skoog) e N6, foram realizados testes para a verificação dos efeitos causados pela adição de determinados compostos orgânicos sobre o crescimento dos calos e sua capacidade embriogênica. Foram testadas inicialmente composições com elevadas concentrações de sacarose, em ambos os meios empregados: MS com 8,0% e N6 com 6,0% e 10,0%. Os resultados obtidos com o cultivo de um total de 60 explantes em cada meio foram de um pronunciado crescimento dos calos, logo após a inoculação. Entretanto, estas composições mostraram-se muito desfavoráveis para a manutenção de culturas por longos períodos de tempo. Optou-se, então, pela redução na concentração de sacarose para 3,0 % e depois para 2,0 % (mantida nos demais experimentos), de acordo com relatos na literatura (VASIL et alii, 1984 e ARMSTRONG & GREEN, 1985). Foram testadas também fontes de aminoácidos: a adição de hidrolisado de caseína mostrou respostas favoráveis ao

crescimento de calos friáveis e embriogênicos, em relação a testemunhas sem a presença do composto (testes realizados com a variedade Jac Duro). Em testes utilizando meio MS com 3,0% de sacarose, empregou-se hidrolisado de caseína a uma concentração de 20 mg/l. As respostas foram positivas (são apresentadas na Tabela 07) e justificaram a manutenção desta concentração nos demais experimentos. A auxina 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) teve sua concentração mais variável: inicialmente testou-se 2,5 mg/l, nos meios de indução de calogênese. Devido a dificuldades em se regenerar plantas, optou-se pela redução para 2,0 mg/l. Depois, como as culturas formaram calos do Tipo I e com freqüente formação de regiões organogênicas (notadamente a variedade Piranão de Inverno), foi testada a utilização da auxina NAA (ácido naftaleno-acético) nos meios de crescimento das plântulas regeneradas, de modo a induzir a formação do sistema radicular. Foram empregadas duas formas: adição de 1,0 ml de solução de NAA a 0,01% sobre o meio de regeneração sólido, e preparo de meio sólido com 0,5 mg de NAA por litro de meio. Os demais experimentos não exigiram a adição de NAA por apresentarem, em sua maioria, formação de calos do Tipo II, com regeneração de plantas via embriogênese somática, onde o sistema radicular se desenvolve diretamente a partir do embrião somático e permanece intercomunicante com os vasos condutores da correspondente parte aérea da planta.

A fase de aclimação das plantas regeneradas às condições de cultivo em canteiros experimentais também exigiu a determinação de alguns procedimentos padrões. As plantas se desenvolveram melhor quando foram lavadas em água corrente após serem retiradas dos frascos, para completa remoção do meio de cultura, e o sistema radicular banhado em solução de fungicida (Benlate) a 0,03% por 3 a 5 minutos. Como substrato de cultivo foi utilizada mistura de solo + vermiculita em proporção de 3:1, esterilizada por autoclavagem a 1 atmosfera por 20 minutos. Após a transferência das plântulas para vasos

plásticos com aquela mistura, regava-se semanalmente com solução nutritiva comercial (Ouro Verde[®]) a 0,3%. Procurou-se reduzir o período de tempo para a completa aclimação das plantas regeneradas ao mínimo possível. Em geral, este tempo foi de uma semana dentro do laboratório, e uma semana em casa de vegetação. As plantas transferidas para canteiro eram cultivadas sob cuidados para que fosse possível a autofecundação das mesmas, como descrito anteriormente.

4.1.1. Caracterização dos tipos de calos induzidos e influência das condições de cultivo in vitro

As variedades cultivadas no Experimento 1 apresentaram a formação de calos com características embriogênicas do Tipo I e do Tipo II. Para o primeiro caso, há o crescimento de massas de coloração branca, compactas, rígidas, com crescimento relativamente lento, constituindo-se de formações embriogênicas complexas, onde os embriões somáticos são formados justapostos e que acabam por tomar praticamente toda a estrutura do calo. A regeneração de plantas por organogênese (diretamente a partir da massa do calo, sem a organização do embrião somático) foi mais freqüente nos calos da variedade Piranão de Inverno. Apesar disto, foi possível a identificação, seleção e cultivo de setores friáveis, altamente embriogênicos em calos derivados de explantes de progênies de ambas as variedades (notadamente para a variedade Jac Duro), características de calos do Tipo II (veja as Figuras 01, 02, 03 e 04).

Procurou-se determinar as melhores condições físicas de cultivo, composições de meios de cultura mais adequados, manipulações dos calos e regiões embriogênicas, e produziram os seguintes resultados:

. Ambiente de cultivo: a avaliação do desempenho das culturas em ambientes contrastantes escuro/iluminado mostrou que os calos deveriam ser cultivados em locais com pouca ou nenhuma iluminação. Quando cultivados no escuro, os calos induzidos destas duas variedades mostraram menor taxa de formação organogênica, o que pode ser considerado uma vantagem, uma vez que este tipo de morfogênese passa a ser indesejável em cultivos de longa duração. Aliado a este fato, os calos cultivados no escuro apresentaram maior crescimento e friabilidade, propiciando que fossem selecionadas linhagens celulares com características de calos do Tipo II. Além disto, os calos cultivados sob fotoperíodo 16/8 horas (3.200 lux) tiveram desempenho inicial superior, mas com uma forte tendência para a formação de embriões somáticos grandes, justapostos e compactos, que logo acabavam por tomar toda a estrutura do calo, características de calos do Tipo I. Pelo fato de apresentarem organogênese, mesmo em meios de cultura contendo auxina, os calos mantidos sob fotoperíodo mostraram freqüente formação de parte aérea e/ou sistema radicular, que não se desenvolviam em plantas completas. As qualidades superiores dos calos do Tipo II produzidos em ambiente escuro mostraram que este último ambiente seria o mais adequado para a indução e manutenção das culturas.

. Composição dos meios de cultura: Conforme já mencionado anteriormente, foram avaliados os efeitos causados pelas diferentes concentrações dos componentes orgânicos dos meios de cultura utilizados. No entanto, os experimentos realizados com explantes oriundos destas variedades foram importantes mais para a determinação de uma composição básica dos meios de cultura do que para se investigar a influência que tais substâncias causariam sobre a taxa de formação de um tipo ou outro de calos. A única exceção seria para a presença de hidrolisado de caseína, que produziu um efeito benéfico para a

indução de calos friáveis, embriogênicos em experimentos com a variedade Jac-Duro. Em um total de 138 explantes inoculados para esta variedade (veja Tabela 07), metade em meio MS com 20 mg/l de hidrolisado de caseína e a outra metade no mesmo meio com ausência da substância, observaram-se taxas de formação de calos embriogênicos muito discrepantes. Além disto, os calos induzidos em meio com a presença de hidrolisado de caseína apresentaram morfologia mais friável, maior formação de setores altamente embriogênicos (calos Tipo II) e as plântulas regeneradas tiveram maior vigor, taxa de crescimento e fertilidade.

Com relação à utilização da auxina NAA, foi notado um efeito benéfico na indução de formação de sistema radicular em regiões organogênicas de alguns calos testados das variedades. As plantas regeneradas com emprego desta auxina foram aclimatadas às condições de cultivo normais, autofecundadas e suas sementes foram utilizadas em experimentos de análise da estabilidade mitótica em progênies R1. Os resultados são apresentados na Tabela 11 e tornam-se ilustrativos da possível instabilidade cromossômica induzida pelo meio utilizado na cultura de tecidos.

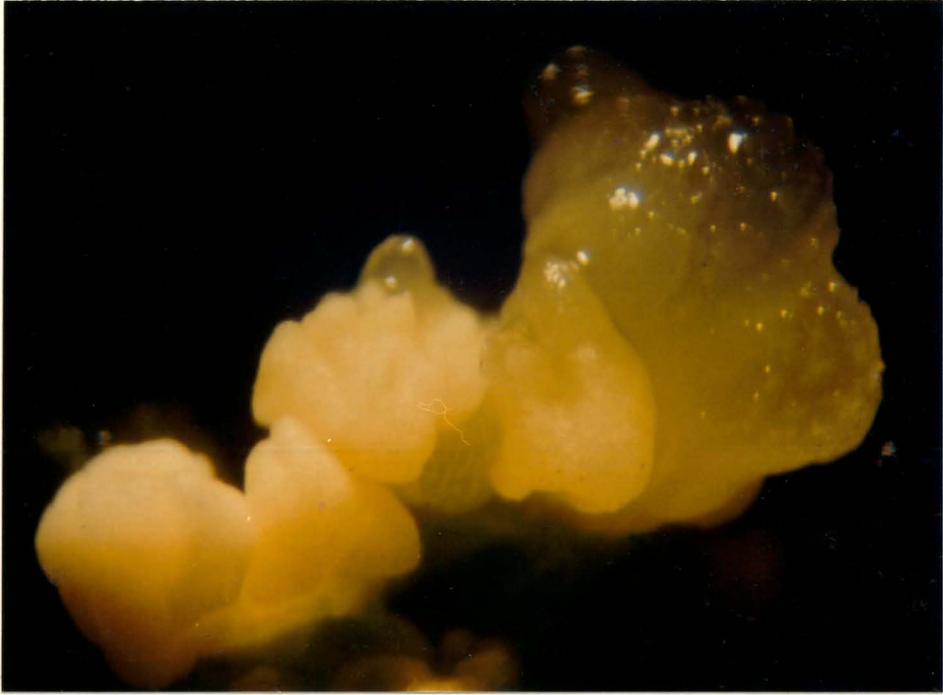


Figura 01



Figura 02



Figura 03



Figura 04

Figura 01: Calo induzido a partir do escutelo de embriões imaturos de progênie autofecundadas da variedade Piranão de Inverno, apresentando o desenvolvimento de um grande número de embriões somáticos (com morfologia compacta e coloração opaca). Aumento aproximado: 15 X.

Figura 02: Embriões somáticos formados na superfície de calos da variedade Piranão de Inverno, germinando após transferência para meio de cultura com ausência da auxina (2,4-D). Notar a presença de escutelo (coloração branca) e coleóptilos em crescimento (coloração verde) - Aumento aproximado: 15 X.

Figura 03: Embriões somáticos formados na superfície de calos da variedade Piranão de Inverno, após transferência para meio de cultura com ausência de auxina (2,4-D). Notar a germinação de coleóptilos e grande crescimento de raízes. Aumento aproximado: 15 X.

Figura 04: Frasco contendo plântulas (geração R0) regeneradas por embriogênese somática em calos derivados de explantes da linhagem 132/1, derivada da variedade Jac-Duro. Meio de cultura com redução na concentração de macro e micro-nutrientes e sacarose e ausência de auxina (2,4-D) induz o crescimento de sistema radicular e formação da planta completa - Aumento aproximado: 1 X.

Tabela 07: Frequência de formação de calos embriogênicos em explantes oriundos das variedades Piranão de Inverno e Jac-Duro, com testes para ambientes de cultivo e composições dos meios de cultura.

Material	Ambiente de cultivo (*)		Composição do meio de cultura	
	Piranão de Inverno	% de embriogênese		Solução salina M.S.
	Escuro	Iluminado	Sacarose	Hidr. Caseína
Experimento 1.1	33,3	86,7	3,0%	20,0 mg/l
Experimento 1.2	—	84,2	3,0%	20,0 mg/l
	—	80,0	3,0%	40,0 mg/l
Experimento 1.3	—	50,0	8,0%	20,0 mg/l
	—	70,0	8,0%	20,0 mg/l
	—	62,5	8,0%	20,0 mg/l
Jac-Duro	% de embriogênese		Solução salina N6	
	Escuro	Iluminado	Sacarose	Hidr. Caseína
Experimento 1.4	—	2,0	10,0%	—
Experimento 1.5	—	61,1	10,0%	20,0 mg/l
Experimento 1.6	16,7	—	6,0%	—
Experimento 1.7	64,3	—	6,0%	20,0 mg/l

Observações:

- . (*) = Dados em % de formação de calos embriogênicos.
- . Número de explantes inoculados em cada experimento:
Piranão de Inverno: 10 a 66, Jac-Duro: 18 a 50.

4.1.2. Regeneração de plantas e observação de variações em alguns de seus caracteres

As plântulas aclimatadas ao ambiente de cultivo normal (condições de canteiros experimentais - ilustrado pela Figura 05) foram em um total de 80, sendo 55 derivadas de calos induzidos a partir de explantes de progênies da variedade Piranão de Inverno e 25 de progênies da variedade Jac-Duro. Elas foram avaliadas continuamente em todos os estágios de desenvolvimento com o objetivo de se verificarem quaisquer anormalidades em relação aos genótipos originais. Foram observadas variações fenotípicas em intensidades mais ou menos acentuadas, que poderiam ser causadas pelos seguintes fatores: estresse fisiológico decorrente do cultivo *in vitro*, estresse fisiológico decorrente da fase de aclimação ao ambiente externo ou desarranjos do genoma e mutações genéticas, causados pela passagem por cultura de tecidos. É interessante mencionar que os caracteres alterados observados em progênies de plantas regeneradas nunca haviam sido detectados em progênies de plantas autofecundadas normalmente, para ambas as variedades (Piranão - seleção de Inverno e Jac-Duro), segundo relatos de diversos pesquisadores do Depto. de Genética da ESALQ/USP.

A maioria das anormalidades diziam respeito a características morfológicas, tais como: altura das plantas, formação de perfilhos basais e presença de segmentos contendo flores femininas nas panículas (inflorescências masculinas). Foram observadas também uma gradação de resposta em relação a outros caracteres de importância agrônômica, como: macho-esterilidade, número de espigas por planta, tamanho da panícula, altura de plantas e espigas, entre outros.

Diversas plantas, independente das alterações mencionadas acima, produziram também sementes (geração R1) com variações que se mantiveram nas progênies por vários ciclos de

autofecundação. Entre as variações observadas destacam-se: a) para a variedade Piranão: variações para altura de plantas (ilustrado pela Figura 06) e morfologia de inflorescência masculina (Figura 07), mutantes para sementes defectivas e volumosas (desenvolvimento anormal do endosperma, ilustrado pela Figura 08), e mutantes para a coloração das sementes (Figura 09); b) para a variedade Jac-Duro: mutantes para a coloração (Figura 10) e tamanho de sementes e ocorrência de macho-esterilidade. As progênes R0 que apresentaram variações em relação ao padrão da variedade original e suas respectivas características na geração R1 são apresentadas nas Tabelas 08 e 09.

Não foi realizado um estudo sistemático para a avaliação da herança genética dos caracteres modificados. Entretanto, as sementes R1 foram multiplicadas por três ciclos sucessivos de autofecundação (produzindo sementes das gerações R2, R3 e R4). Para a maioria das progênes dos somaclones foi observado que a autofecundação acentuou a manifestação do caráter modificado, principalmente para caracteres morfológicos das plantas e das sementes (na Tabela 10 estão destacadas algumas das variações observadas), tais como:

a) as sementes com coloração avermelhada em alguns somaclones de Piranão de Inverno (Figura 08) mostraram uma gradação de resposta nas progênes R3, encontrando-se sementes com diversas tonalidades de coloração vermelha;

b) sementes com endosperma defectivo produziram progênes com manifestação tão pronunciada que até mesmo impediu a germinação de algumas progênes R3;

c) as plantas com inflorescência masculina (panícula) hipertrofiada (Figura 06) apresentaram duas características distintas: ou tornaram-se grande produtoras de

pólen, reduzindo a produção de sementes nas espigas ou produziram uma grande quantidade de flôres masculinas estéreis, mantendo a prolificidade feminina;

d) progênies com elevado número de espigas por planta apresentaram esterilidade masculina e feminina em R3;

e) sementes volumosas, com crescimento pronunciado do endosperma (Figura 08), produziram plantas R2 e R3 com espigas apresentando menor número de fileiras de grãos, menor diâmetro de espiga e menor número de sementes por espiga.

É interessante notar que plantas diferentes, regeneradas a partir do mesmo calo cultivado *in vitro* mostraram variações em caracteres distintos entre si na geração R0.

TABELA 08: Progenies R0 regeneradas a partir do cultivo de explantes da variedade Piranão de Inverno e respectivos fenótipos em R0 e R1

Material	Fenótipo em R0	Fenótipo em R1
R1-(PI) 362	Planta normal	Cerosidade nas sementes
R1-(PI) 365	Espiga apical	Espigas rudimentares
R1-(PI) 366	Planta normal	Espigas rudimentares
R1-(PI) 369B12 G1	Planta normal	Pltas. anãs, panículas gdes e sementes volumosas
R1-(PI) 369B12 G2	Planta normal	Plantas anãs e sementes volumosas e defectivas
R1-(PI) 369B12 G3	Espiga apical	Plantas anãs e sementes volumosas
R1-(PI) 369B3 G1	Planta normal	Paniculas grandes e sementes normais
R1-(PI) 369B3 G2	Panícula rudimentar	Plantas anãs e sementes volumosas
R1-(PI) 369B3 G3	Planta normal	Plantas e sementes normais
R1-(PI) 370	Planta normal	Plantas normais e sementes defectivas
R1-(PI) 371011	Panícula rudimentar	Paniculas rudimentares e sementes manchadas
R1-(PI) 371021	Planta normal	Plantas normais e sementes volumosas
R1-(PI) 371022 G2	Planta normal	Paniculas hipertrof. e sementes manchadas
R1-(PI) 372	Planta normal	Espigas rudimentares
R1-(PI) 3730211	Planta normal	Aparente macho-esteril. e sementes manchadas
R1-(PI) 373022	Planta normal	Paniculas rudimentares e sementes defectivas
R1-(PI) 3730312 G1	Planta normal	Espigas rudimentares e e sementes pequenas
R1-(PI) 375A2 G1	Espiga apical e panícula rudimentar	Plantas e sementes normais
R1-(PI) 375A2 G2	Perfilhamento	Plantas e sementes normais
R1-(PI) 376	Planta normal	Sementes amarelas e panículas pequenas
R1-(PI) 22B	Planta normal	Sementes com coloração vermelha

Observação:

. Números iniciais iguais designam plantas regeneradas do mesmo calo

TABELA 09: Progenies R0 regeneradas a partir do cultivo de explantes da variedade Jac-Duro e respectivos fenótipos em R0 e R1

Material	Fenótipo em R0	Fenótipo em R1
R1-(JD) 378	Planta normal	Espigas rudimentares e sementes pequenas
R1-(JD) 379B12	Planta normal	Plantas e espigas normais sementes manchadas
R1-(JD) 379B21	Planta altas	Espigas rudimentares e sementes normais
R1-(JD) 380A1	Panicula rudimentar	Aparente macho-esterilidade e sementes rugosas
R1-(JD) 380A2 G1	Planta normal	Espigas rudimentares, sementes rugosas e com color. amarela
R1-(JD) 380A2 G21	Planta normal	Plantas normais e sementes grandes e rugosas
R1-(JD) 380A2 G22	Planta normal e prolífica	Plantas e sementes grandes, e sementes amarelas
R1-(JD) 380A2 G23	Planta normal	Plantas normais e sementes grandes
R1-(JD) 381	Perfilhamento	Espigas rudimentares e sementes normais
R1-(JD) 382A1 G1	Espiga apical e perfilhamento	Macho-esterilidade e sementes grandes e color. amarela
R1-(JD) 382A1 G4	Planta normal	Macho-esterilidade e sementes com coloração vermelha
R1-(JD) 383	Planta normal	Plantas normais e algumas sementes defectivas
R1-(JD) 384	Planta normal	Plantas normais e algumas sementes malformadas
R1-(JD) 385A11	Planta normal	Espigas rudimentares e sementes volumosas

Observações:

. Números iniciais iguais designam plantas regeneradas do mesmo calo

TABELA 10: Progenies R4 obtidas a partir do cultivo de plantas regeneradas com o cultivo de explantes das variedades Piranão de Inverno (PI) e Jac-Duro (JD) e seus respectivos fenótipos nas gerações R3 e R4.

Material	Fenótipo em R3 (plantas)	Fenótipo em R4 (sementes)
R4-(PI) 369B12 G1	normais	volumosas e algumas defectivas, grandes
R4-(PI) 369B12 G2	algumas anãs	defectivas e tamanho médio
R4-(PI) 369B12 G3	normais	normais e espigas bem desenvolvidas
R4-(PI) 369B3 G1	normais	volumosas e algumas defectivas, grandes
R4-(PI) 369B3 G2	normais	volumosas e grandes
R4-(PI) 369B3 G3	normais	defectivas e pequenas
R4-(PI) 371C22 G2	panículas hipertrofiadas	normais e algumas defectivas
R4-(PI) 373C22	altas, panículas rudimentares	aparentemente normais
R4-(PI) 375A2 G1	normais	normais, algumas volumosas
R4-(PI) 376	altura pronunciada	segreg. p/ color. amarela e grandes
R4-(PI) 22B	normais	segreg. p/ coloração vermelha e grandes
R4-(JD) 379B12	normais	normais, algumas com variabilid. p/ tamanho
R4-(JD) 380A2 G21	normais	normais e com segregação p/ color. vermelha
R4-(JD) 380A2 G22	normais	normais, tamanho médio
R4-(JD) 380A2 G23	normais	pequenas, espigas pouco desenvolvidas
R4-(JD) 382A1 G1	macho-estéreis e paníc. rudimentares	segreg. p/ color. amarela e grandes
R4-(JD) 382A1 G4	macho-estéreis e paníc. rudimentares	segreg. p/ col. vermelha e grandes

Observações:

- . Números iguais designam plantas regeneradas do mesmo calo
- . (PI) = somaclones originados de Piranão de Inverno
- . (JD) = somaclones originados de Jac-Duro



Figura 05



Figura 06



Figura 07



Figura 08



Figura 09



Figura 10

- Figura 05: Plantas da geração R0 regeneradas a partir de calos derivados de explantes da variedade Piranão de Inverno. Plantas à direita estão protegidas para serem autofecundadas. Notar a ocorrência de variações fenotípicas: a planta à esquerda apresenta inflorescência masculina sem ramificação. Altura média das plantas: 80 cm.
- Figura 06: Progenies da geração R2 derivadas de plantas regeneradas da variedade Piranão de Inverno, cultivadas em condições de campo. A primeira planta da linha em primeiro plano apresenta baixa estatura (planta anã - altura média: 40 cm), mas com fertilidade e produção de sementes por autofecundação. Material: R2-(PI) 369 B3G3.
- Figura 07: Progenies da geração R2 derivadas de plantas regeneradas da variedade Piranão de Inverno, cultivadas em condições de campo. Ocorrência de variação fenotípica: plantas apresentando inflorescência masculina hipertrofiada. Tamanho aproximado das panículas: 50 cm. Material: R2-(PI) 371 C22G2.
- Figura 08: Espigas autofecundadas da geração R3 derivadas de plantas regeneradas da variedade Piranão de Inverno, apresentando variação fenotípica: as sementes à esquerda (material: R3-(PI) 369 B3G1) apresentam acentuado volume do endosperma (sementes arredondadas, volumosas) e sementes à direita são aparentemente normais (tipo dentado).
- Figura 09: Espigas autofecundadas da geração R3 derivadas de plantas regeneradas da variedade Piranão de Inverno, apresentando variação para coloração de sementes. Material: R2-(PI) 22 B. A espiga à direita apresenta sementes com coloração típica da cultivar.
- Figura 10: Espigas autofecundadas da geração R3 derivadas de plantas regeneradas da variedade Jac-Duro, apresentando variação para coloração de sementes. Material: R4-(JD) 80 A2G1. A espiga à esquerda apresenta sementes com coloração típica da cultivar.

4.1.3. Avaliação do número de cromossomos em células de meristema radicular de progênie R1

Foram selecionadas algumas progênie de plantas regeneradas a partir de calos induzidos de explantes das variedades Piranão de Inverno e Jac-Duro, para avaliação de possíveis anormalidades mitóticas decorrentes do cultivo *in vitro*. Foram analisadas metáfases mitóticas dos meristemas radiculares após coloração convencional pelo Feulgen. Os resultados são apresentados na Tabela 11, onde podemos notar a distribuição em três grupos: células diplóides, células com o número de cromossomos maior que o normal ($2n = 20$) e menor que este número. Foi observada uma predominância de células com número diplóide normal, com uma frequência variando de 69% a 100% entre os materiais. As células com número menor que 20 cromossomos foram encontradas em taxas de 0% a 31%, com predominância para células com 18 e 19 cromossomos. Células com mais que 20 cromossomos ocorreram em uma taxa entre 0% e 3%, com evidências de mixoploidia.

Com o objetivo de se evitar possíveis desvios devido ao esmagamento excessivo das células, que causaria seu rompimento e assim, a perda de cromossomos durante o preparo de lâminas, foram realizadas novas análises com extremidades de raízes de progênie da geração R1 derivadas de plantas regeneradas a partir de calos induzidos de explantes oriundos da variedade Piranão de Inverno. Para isto, foi estabelecida uma metodologia que resulta em um mínimo de danos às células, baseada no tratamento enzimático das pontas de raízes com solução de pectinase a 2,5% por 3 a 5 minutos, a temperatura 37°C, imediatamente antes do esmagamento.

Foi empregada a coloração de citoplasma com Fast-Green para a verificação da integridade celular. Analisou-se os materiais R1-(PI)-369 B12 G1, G2 e G3 e R1-(PI)-369 B3 G1, G2 e G3, com amostras de 5 sementes por genótipo e

observação de 5 a 10 metáfases por semente. Os resultados mostraram uma predominância de células com número diplóide normal de cromossomos ($2n=20$), mas os materiais R1-(PI)-369 B12 G2 e R1-(PI)-369 B3 G3 apresentaram alterações no número de cromossomos por células, sempre na forma de mixoploidia. O primeiro apresentou, em uma das progênies analisadas, células com diversas características anômalas: células meristemáticas com dimensões desproporcionalmente grandes, assim como outras com tamanho intermediário, porém maiores que as normalmente observadas em preparações com pontas de raízes de sementes de milho. Algumas metáfases permitiram a identificação de células poliplóides, com ploidia variando de $4n$ a possivelmente $8n$ ou $16n$. Estas células apresentaram núcleo com dimensões relativamente grandes em relação ao volume citoplasmático, indicando que a sua origem não deve ter ocorrido por fusão celular. O mesmo material também apresentou células multinucleadas, grande freqüência de micronúcleos e, apesar do pré-tratamento com inibidor de fuso mitótico, foram observadas anáfases com ocorrência de pontes cromossômicas. Estas pontes ocorriam entre núcleos com dimensões semelhantes e também entre núcleos e micronúcleos. É interessante notar que este mesmo material apresentou a ocorrência de sementes volumosas em progênies das gerações R1 e R2, como apresentado na Tabela 08 e ilustrado pela Figura 08.

Com relação ao material R1-(PI)-369 B3 G3, foi observada uma alta freqüência de células tetraplóides ($4n$) com os cromossomos dispostos aos pares, sendo considerados cromossomos com sucessivos ciclos de replicação e sem separação das cromátides. Algumas das células apresentaram apenas dois ou três de seus cromossomos duplicados, dispostos aos pares, enquanto os demais permaneceram com o número diplóide normal, sugerindo duas possíveis origens: ou devido à perda de cromossomos de células originalmente tetraplóide ou ocorrência de aneuploidia.

TABELA 11: Materiais da geração R1 derivados do cultivo *in vitro* das variedades Piranão de Inverno e Jac-Duro, e verificação de ocorrência de aberrações cromossômicas numéricas em células dos meristemas radiculares.

Material	número de cromossomos por célula					% de células não 2n
	menor que 2n		2n	maior que 2n		
	18	19	(20)	21	40	
Variedade Piranão de Inverno						
R1-(PI) 360	01	05	33	01	-	17,5
R1-(PI) 361	-	02	30	-	-	6,3
R1-(PI) 369 B12G3	01	04	48	01	-	11,1
R1-(PI) 369 B3G2	02	01	56	02	-	8,2
R1-(PI) 371 C11	02	01	94	01	-	5,1
R1-(PI) 371 C21G1	-	-	20	-	-	-
R1-(PI) 375 A2G1	07	11	59	03	-	26,3
R1-(PI) 375 A2G2	09	10	44	-	01	31,3
R1-(PI) 377	01	07	66	-	-	10,8
Variedade Jac-Duro						
R1-(JD) 378	06	09	81	01	-	16,5
R1-(JD) 380 A2G1	-	-	16	-	-	-
R1-(JD) 381	-	02	16	-	-	11,1
R1-(JD) 382 A1G1	01	05	18	01	-	28,0
R1-(JD) 382 A1G4	02	02	43	01	-	10,4
R1-(JD) 383	01	01	36	01	-	7,7

Observação: Números iniciais iguais designam plantas regeneradas a partir do mesmo calo.

4.2. Experimento 2: Linhagens endogâmicas com diferentes composições de knobs cromossômicos heterocromáticos

4.2.1. Capacidade embriogênica dos genótipos testados

A avaliação da capacidade embriogênica foi baseada na classificação dos diversos tipos de calos produzidos pelo cultivo *in vitro* de escutelo de embriões imaturos, segundo critérios relatados na literatura. Este procedimento justifica-se pelas evidências da relação existente entre o tipo de calo induzido por um determinado genótipo e a adequação da sua utilização no cultivo *in vitro*.

A premissa básica de que os melhores genótipos seriam aqueles com maior capacidade de regeneração foi respeitada, embora outras idéias possam ser consideradas. Normalmente, esta capacidade é avaliada pela frequência de formação de calos embriogênicos. Neste trabalho, foram considerados embriogênicos todos os calos que apresentaram qualquer evento de reorganização dos tecidos que representasse um mecanismo de regeneração de plantas, seja através de embriogênese somática ou mesmo organogênese.

Em relação à classificação dos tipos de calos, foram considerados embriogênicos tanto os calos do Tipo I (relatados na literatura como sendo embriogênicos, mas que podem regenerar plantas através de organogênese) como os calos do Tipo II (friáveis, altamente embriogênicos).

Os experimentos para a verificação da frequência de formação de calos embriogênicos, neste grupo de linhagens, foram delineados segundo observações obtidas nos experimentos preliminares com as variedades Piranão de Inverno e Jac-Duro (Experimento 1) e com linhagens com menor grau de endogamia, obtidas a partir da variedade Jac-Duro (dados não apresentados no presente trabalho).

As freqüências de indução de calos embriogênicos obtidas com o Experimento 2.1. (realizado de Janeiro a Outubro/1987) são apresentadas na Tabela 12. Pode-se observar que os materiais da família 300-1-3 (131/5, 132/1, 132/7 e 133/4) foram os que apresentaram os resultados mais favoráveis, inclusive com predomínio de indução de calos do Tipo II. As duas primeiras linhagens (131/5 e 132/1) apresentaram taxas de formação de calos embriogênicos ao redor de 70% dos calos induzidos. A linhagem 132/7 mostrou resposta inferior, com formação de cerca de 25% de calos embriogênicos. Por sua vez, a linhagem 133/4 teve 55% dos calos induzidos com formações embriogênicas. Os calos induzidos a partir de explantes destas linhagens superiores apresentaram um comportamento muito favorável ao cultivo de longa duração e para a regeneração de plantas, como será comentado mais adiante. A família 301-2-1 teve um comportamento oposto. Todas as linhagens analisadas desta família apresentaram a formação de calos não-embriogênicos, de morfologia mucilaginosa e crescimento relativamente mais lento. Eventualmente ocorreu a formação de regiões meristemáticas com maior taxa de crescimento, coloração mais clara e indícios de diferenciação em raízes e parte aérea (organogênese). Este tipo de formação ocorreu em cerca de 10% dos calos das linhagens 212/2 e 213/3. A linhagem 211/8 teve a maior taxa de ocorrência, com cerca de 17% dos calos induzidos. Resultados semelhantes foram apresentados por calos das linhagens pertencentes às famílias 303-4-1 e 303-4-4. A linhagem 412/3 apresentou 5% dos calos com formação organogênica enquanto as linhagens 443/4 e 445/1 não apresentaram esta formação organogênica em nenhum momento da cultura. Os tipos de calos induzidos a partir de explantes de materiais destas duas famílias foram muito semelhantes entre si, com morfologia mucilaginosa, grande taxa de crescimento e classificados como não-embriogênicos.

O Experimento 2.2., realizado no período de Janeiro a Outubro/1988, possibilitou uma análise mais detalhada de alguns aspectos referentes ao cultivo *in vitro* de materiais pertencentes às quatro famílias de linhagens. Foram empregados dois meios de cultura (MS e N6) e, além das linhagens anteriormente testadas, foi feita uma amostragem maior dentro das famílias 303-4-1 e 303-4-4. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 13, onde são confirmadas as observações do Experimento 2.1.. As linhagens pertencentes à família 300-1-3 apresentaram as melhores respostas, com formação de calos do Tipo II em cerca de 50% a 60% dos explantes inoculados. As linhagens 131/5 e 132/1 foram novamente as que melhor responderam, com indução de cerca de 60% de calos friáveis, embriogênicos e com elevada taxa de crescimento. Estes calos se mantiveram por mais de 10 meses de cultivo, com manutenção das suas características morfológicas e de sua capacidade embriogênica, como comprovado por experimentos de regeneração de plantas. A família de linhagens 301-2-1 apresentou resposta inferior, com formação de calos não-embriogênicos, com menor taxa de crescimento e eventuais ocorrências de regiões organogênicas. As linhagens com maior freqüência deste tipo de formação foram novamente 211/8 e 212/2, com cerca de 30% cada uma e 213/3, com ocorrência em 20% dos calos induzidos. As linhagens pertencentes às famílias 303-4-1 e 303-4-4 mostraram uma predominância de indução de calos não-embriogênicos, com crescimento variável e morfologia mucilaginosa. Em vários dos materiais analisados foi observada a ocorrência de regiões organogênicas, como descrito no Experimento 2.1.. No entanto, a maior amostragem realizada dentro destas famílias permitiu que fossem identificadas duas linhagens com comportamento superior, denominadas 4121/2 e 4421/4. Tais materiais apresentaram a formação de calos não-embriogênicos, como as demais, mas a partir de regiões meristemáticas da superfície de alguns calos, foi possível a identificação de regiões altamente

embriogênicas, de morfologia friável e crescimento mais intenso. Para a linhagem pertencente à família 303-4-1, houve a formação de setores com estas características em cerca de 20% dos calos induzidos e, para a linhagem da família 303-4-4, em cerca de 27%. As demais linhagens apresentaram comportamento inferior, com formação de calos do tipo não-embriogênicos, com morfologia mucilaginosa e ocorrência de regiões meristemáticas organogênicas em cerca de 5% a 20% dos calos induzidos.

Por sua vez, os dados obtidos com o Experimento 2.3., realizado de Maio a Dezembro/1990, consolidaram as observações anteriores. Os resultados são apresentados nas Tabelas 14 e 15 e mostram que as linhagens pertencentes à família 300-1-3 foram as que apresentaram melhores respostas ao cultivo *in vitro*, sendo que os genótipos mais favoráveis (13151/1, 13153/1, 132331/1 e 131311/1) apresentaram taxas de formação de calos do Tipo II de cerca de, respectivamente, 75%, 55%, 55% e 55%, no meio de Murashige-Skoog e de 80%, 60%, 55% e 50% para o meio N6. Os calos altamente embriogênicos de linhagens desta família apresentaram características muito favoráveis ao cultivo, sendo selecionadas linhagens celulares que se mantém há mais de 18 meses, sem aparente redução na capacidade de regeneração de plantas (para ilustração, são apresentadas as Figuras 11 e 12). Foram observados, para a maioria dos calos do Tipo II das linhagens desta família, embriões somáticos se desenvolvendo a partir de uma estrutura semelhante a um suspensor, como descrito em inúmeros trabalhos mencionados na literatura. As linhagens pertencentes à sub-família 300-133 apresentaram um comportamento intermediário na formação de calos do Tipo II, com taxas variando de 27% a 52%, nos dois meios de cultura testados. As linhagens pertencentes à família 301-2-1 mostraram desempenho semelhante ao obtido nos dois experimentos anteriores, com formação de calos não-embriogênicos, com crescimento relativamente inferior,

morfologia mucilagínosa e com coloração translúcida, como apresentado na Figura 13. Somente a linhagem 21241/1 apresentou a formação de regiões meristemáticas organogênicas na superfície de alguns de seus calos, numa freqüência de cerca de 10%. Resultados semelhantes a esta última família de linhagens também foram apresentados por linhagens pertencentes às famílias 303-4-1 e 303-4-4, onde a maioria delas induziu calos não-embriogênicos, de morfologia mucilagínosa, e com baixa freqüência de formações organogênicas. As linhagens que tiveram maiores taxas de ocorrência de morfogênese foram: 41123/2 e 41242/1, ambas pertencentes à família 303-4-1 e para, respectivamente, 20% e 10% dos calos induzidos.

Um resultado muito importante obtido com o cultivo *in vitro* neste último experimento foi o comportamento apresentado pelos explantes das linhagens 44114/1 e 44114/2, que produziram inicialmente calos não-embriogênicos, de morfologia mucilagínosa, coloração branca, mais ou menos translúcidos e com crescimento relativamente lento, mas que deram origem a setores com características bem diferentes. A partir do 7º subcultivo, algumas regiões meristemáticas existentes na superfície de calos destes genótipos começaram a crescer de maneira acentuada, exibindo maior friabilidade, coloração aparentando maior vitalidade e passando a predominar em relação à população de células existentes anteriormente (veja a Figura 14). A freqüência de obtenção de tais linhagens celulares foi de cerca de 40% para a linhagem 44114/2 e de 15% para a linhagem 44114/1. A planta 04 da linhagem 44114/2 permitiu a manutenção de linhagens celulares com características superiores ao cultivo *in vitro*, selecionados a partir de oito calos diferentes. Estes calos foram mantidos em cultivos independentes e utilizados em outros experimentos, para a análise da estabilidade mitótica de suas células e para cultivos em suspensão. Mais recentemente, tem sido observado que estas linhagens celulares apresentam maior ocorrência de

embriogênese somática na superfície dos calos, assim como possibilitado a regeneração de plantas completas.

As análises de variância dos dados obtidos com os três experimentos comprovou a existência de diferenças nas respostas ao cultivo *in vitro* das linhagens utilizadas dentro de cada experimento. Estão apresentadas nas Tabelas 16, 17 e 18 os resultados das análises para os Experimentos 2.1., 2.2. e 2.3., respectivamente. Devido ao fato de que ambos os grupos de dados (transformados e não-transformados) produziram resultados bastante semelhantes, são apresentadas apenas as análises com os dados transformados. Segundo o modelo misto adotado, os valores de F calculados para a avaliação do efeito de linhagens (segundo o modelo inteiramente casualizado) e do efeito de linhagens dentro de sub-famílias dentro de famílias (segundo o modelo hierárquico) foram significativos ao nível de 1% de probabilidade em todos os experimentos. Embora não tenham sido desenvolvidos os cálculos de esperança dos quadrados médios, pode-se notar que o efeito de famílias é bastante pronunciado. Uma análise da magnitude relativa dos valores dos quadrados médios de famílias, em todos os três experimentos, mostra que o efeito deste componente é bastante pronunciado. Realmente, os valores médios obtidos para a capacidade de formação de calos embriogênicos entre as linhagens analisadas distinguem os grupos de materiais já ao nível de famílias, como pode ser observado nas Figuras 15, 16 e 17, apresentadas mais adiante. As Tabelas 19, 20 e 21 apresentam os resultados do teste de Tukey para as médias de frequências de indução de calos embriogênicos das linhagens utilizadas, respectivamente, nos Experimentos 2.1., 2.2. e 2.3. A própria distribuição dos materiais nas referidas tabelas também é ilustrativa das diferenças existentes entre as quatro famílias de linhagens avaliadas.

Com relação aos diferentes meios de cultura utilizados, as análises estatísticas mostraram não ter ocorrido diferenças significativas entre eles (nos Experimentos 2.2. e 2.3.). Como observado nas Tabelas 17 e 18, os valores de F calculados para a avaliação das interações existentes: linhagens dentro de sub-famílias dentro de famílias x meios (segundo o modelo hierárquico) e linhagens x meios (segundo o modelo inteiramente casualizado) foram inferiores a 1,0 nos dois experimentos, mostrando serem não-significativos. Segundo o mesmo raciocínio adotado anteriormente, a magnitude dos valores dos quadrados médios para os efeitos das interações: famílias x meios e sub-famílias dentro de famílias x meios é pequena, o que pode indicar que a influência destas interações também sejam não-significativas para o teste F.



Figura 11

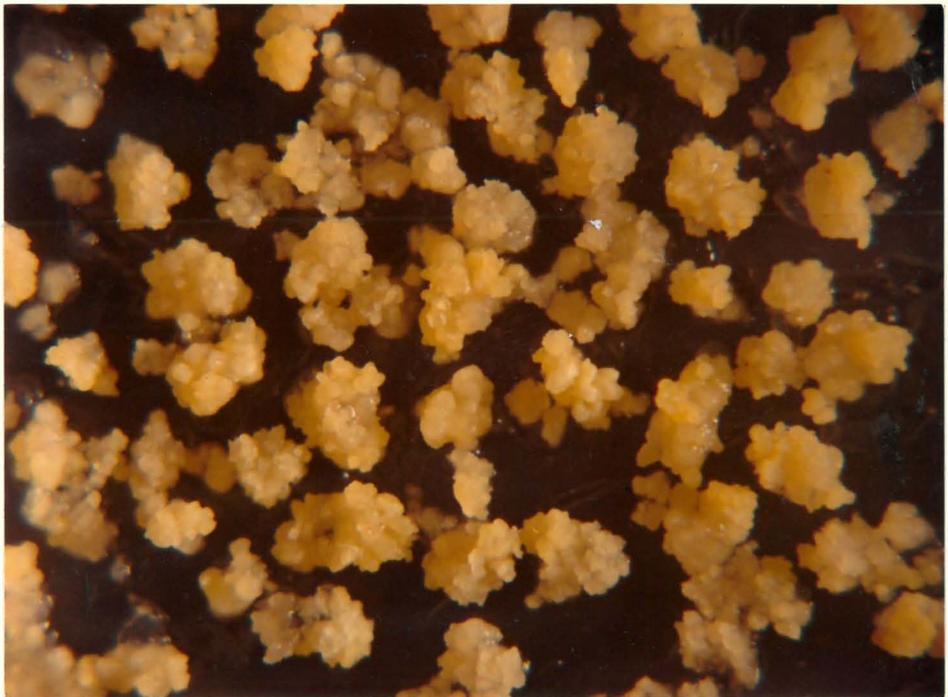


Figura 12





Figura 13



Figura 14

Figura 11: Calos induzidos a partir de explantes da linhagem endogâmica 131311/1, apresentando grande número de pró-embriões em estágio globular na sua superfície. São classificados como calos do Tipo II, friáveis, altamente embriogênicos. Aumento aproximado: 8 X.

Figura 12: Calos induzidos a partir de explantes da linhagem endogâmica 132331/1, apresentando grande número de pró-embriões em estágio globular na sua superfície. São classificados como calos do Tipo II, friáveis, altamente embriogênicos. Aumento aproximado: 5 X.

Figura 13: Calos induzidos a partir de explantes da linhagem endogâmica 21241/1, apresentando morfologia mucilaginosa. São classificados como calos não-embriogênicos. Notar a ocorrência de setôres de coloração mais clara, onde são encontradas regiões meristemáticas - Aumento aproximado: 5 X.

Figura 14: Calos induzidos a partir de explantes da linhagem endogâmica 44114/2. São classificados como calos do Tipo II, friáveis, altamente embriogênicos. Estas linhagens celulares apresentam pronunciada taxa de crescimento e responderam positivamente ao cultivo de suspensões celulares - Aumento aproximado: 5 X.

TABELA 12: Freqüência de formação de calos embriogênicos nas linhagens endogâmicas com diferentes composições de knobs cromossômicos cultivadas em 1987 (Experimento 2.1.).

Família	Linhagem	Meio de cultura M.S.				
		Planta 01	Planta 02	Planta 03	Planta 04	Planta 05
300-1-3	131/5		18/26 (69,23)	17/26 (65,38)	17/28 (60,71)	
	132/1		18/25 (72,00)		20/26 (76,92)	13/23 (56,52)
	132/7	06/29 (20,69)	09/31 (29,03)	06/28 (21,43)		
	133/4	12/26 (46,15)	25/26 (96,15)		09/23 (39,13)	09/26 (34,62)
301-2-1	211/8	04/26 (15,39)	00/26 (0,00)	00/27 (0,00)	07/28 (25,00)	08/28 (28,57)
	211/9	00/28 (0,00)	00/29 (0,00)	00/28 (0,00)	00/29 (0,00)	00/28 (0,00)
	212/2	03/27 (11,11)	04/27 (14,81)	02/26 (7,69)	01/26 (3,85)	
	213/3	01/28 (3,57)	08/31 (25,81)	03/29 (10,34)	00/31 (0,00)	
303-4-1	412/3	04/29 (13,79)	02/27 (7,41)	01/28 (3,57)	00/28 (0,00)	00/13 (0,00)
303-4-4	443/4	00/25 (0,00)	00/26 (0,00)	00/29 (0,00)		
	445/1	00/28 (0,00)	00/20 (0,00)	00/28 (0,00)	00/29 (0,00)	

Observações:

- . As frações referem-se ao número total de calos embriogênicos sobre o total de calos induzidos.
- . Cultivo realizado no período de Janeiro a Outubro de 1987.
- . Dados em parênteses = porcentagem de calos embriogênicos induzidos.

TABELA 13: Freqüência de formação de calos embriogênicos nas linhagens endogâmicas com diferentes composições de knobs cromossômicos cultivadas em 1988 (Experimento 2.2.).

Família linhagem	Meio M.5.			Meio N 6			
	Planta 01	Pl.02	Pl.03	Planta 01	Pl.02	Pl.03	
300-1-3	131/5	12/19 (63,15)	07/18 (38,88)	15/20 (75,00)	14/19 (73,68)	08/19 (42,10)	11/20 (55,00)
	132/1	13/19 (68,42)	11/20 (55,00)	07/17 (41,17)	15/20 (75,00)	09/18 (50,00)	10/19 (52,63)
	133/4	10/20 (50,00)	08/18 (44,44)	12/20 (60,00)	08/19 (42,11)	06/19 (31,58)	13/20 (65,00)
	133/7	08/19 (42,10)	12/20 (60,00)	14/20 (70,00)	07/19 (36,84)	07/18 (38,89)	16/20 (80,00)
301-2-1	211/8	09/19 (47,37)	01/18 (5,56)	07/20 (35,00)	07/20 (35,00)	02/17 (11,76)	10/19 (52,63)
	211/9	00/18 (0,00)	00/16 (0,00)	02/20 (10,00)	00/18 (0,00)	00/16 (0,00)	03/19 (15,79)
	212/2	06/20 (30,00)	06/20 (30,00)	05/20 (25,00)	07/20 (35,00)	08/20 (40,00)	06/20 (30,00)
	213/3	03/18 (16,67)	06/20 (30,00)	04/18 (22,22)	00/16 (0,00)	05/20 (25,00)	06/20 (30,00)
303-4-1	4113/1	06/20 (30,00)	03/19 (15,79)	05/20 (25,00)	03/18 (16,67)	00/20 (0,00)	05/18 (27,78)
	4121/2	07/20 (35,00)	00/16 (0,00)	05/20 (25,00)	08/20 (40,00)	00/18 (0,00)	04/20 (20,00)
	4123/2	05/20 (25,00)	00/18 (0,00)	00/16 (0,00)	04/20 (20,00)	00/16 (0,00)	00/18 (0,00)
303-4-4	4413/3	04/20 (20,00)	00/18 (0,00)	03/18 (16,67)	04/19 (21,05)	00/17 (0,00)	07/20 (35,00)
	4421/4	05/20 (25,00)	03/20 (15,00)	08/20 (40,00)	06/20 (30,00)	00/18 (0,00)	10/20 (50,00)
	4422/4	08/20 (40,00)	02/17 (11,76)	00/18 (0,00)	09/20 (45,00)	00/16 (0,00)	00/18 (0,00)
	4443/3	03/17 (17,64)	06/20 (30,00)	03/20 (15,00)	04/20 (20,00)	05/20 (25,00)	03/19 (15,79)
	4451/2	02/19 (10,52)	00/18 (0,00)	01/20 (5,00)	02/20 (10,00)	01/18 (5,56)	00/19 (0,00)
	4462/1	03/20 (15,00)	01/19 (5,26)	01/18 (5,56)	03/18 (16,67)	02/19 (10,52)	00/18 (0,00)

Observações:

- . As frações referem-se ao número de calos embriogênicos sobre o total de calos induzidos.
- . Cultivo realizado no período de Janeiro a Outubro de 1988.
- . Dados em parênteses = porcentagem de calos embriogênicos induzidos.
- . Pl. = número da planta doadora de explantes.

TABELA 14: Freqüência de formação de calos embriogênicos nas linhagens endogâmicas com diferentes composições de knobs cromossômicos (Experimento 2.3. - Meio de cultura com solução salina de MS).

Família	linhagem	Meio de Murashige-Skoog				
		Planta 01	Planta 02	Planta 03	Planta 04	Planta 05
300-1-3	131311/1	08/20 (40,00)		12/18 (66,67)	12/20 (60,00)	
	131312/1	05/18 (27,78)		06/20 (30,00)		
	13151/1			15/20 (75,00)		
	13153/1	11/18 (61,11)	09/19 (47,37)	11/20 (55,00)		
	132331/1	08/15 (53,33)	11/15 (73,33)	08/15 (53,33)	09/17 (52,94)	06/16 (37,50)
	133112/2		06/20 (30,00)	09/20 (45,00)		
	133112/3	06/11 (54,55)			08/19 (42,11)	10/16 (62,50)
	133131/3	06/16 (37,50)			04/20 (20,00)	
	13332/1	05/17 (29,41)	06/19 (31,58)	11/16 (68,75)		
	13333/1	09/20 (45,00)	06/11 (54,55)			
	13351/2	07/20 (35,00)			06/17 (35,29)	
	133512/2	06/18 (33,33)	07/18 (38,89)	06/20 (30,00)		
301-2-1	21113/1	00/17 (0,00)	00/19 (0,00)	00/19 (0,00)	00/20 (0,00)	00/17 (0,00)
	21241/1		02/17 (11,76)	02/20 (10,00)	02/15 (13,33)	
	21311/2	00/15 (0,00)	00/16 (0,00)	00/18 (0,00)	00/19 (0,00)	
303-4-1	41121/1	01/19 (5,26)	01/18 (5,55)	01/19 (5,26)	02/19 (10,52)	
	41123/2	02/20 (10,00)	06/20 (30,00)			
	41242/1	02/19 (10,52)	02/20 (10,00)	02/16 (12,50)	01/14 (7,14)	02/20 (10,00)
	41242/2	02/20 (10,00)		00/20 (0,00)	02/20 (10,00)	02/20 (10,00)
303-4-4	44114/1	03/14 (21,43)	02/20 (10,00)	03/20 (15,00)		
	44114/2	06/13 (46,15)		07/20 (35,00)	09/20 (45,00)	
	44133/2	00/16 (0,00)	01/20 (5,00)	00/20 (0,00)		

Observações:

. As frações referem-se ao número total de calos embriogênicos sobre o total de calos induzidos.

. Cultivo realizado no período de Maio a Dezembro de 1990.

. Dados entre parênteses: porcentagens de calos embriogênicos induzidos.

TABELA 15: Frequência de formação de calos embriogênicos nas linhagens endogâmicas com diferentes composições de knobs cromossômicos (Experimento 2.3. - Meio de cultura com solução salina de N6).

Família	linhagem	Meio de cultura N 6					
		Planta 01	Planta 02	Planta 03	Planta 04	Planta 05	
300-1-3	131311/1	09/20 (45,00)		12/20 (60,00)	09/20 (45,00)		
	131312/1	06/20 (30,00)	03/18 (16,67)	07/20 (35,00)			
	13151/1			15/19 (78,95)			
	13153/1	10/15 (66,67)	09/20 (45,00)	13/20 (65,00)			
	132331/1	08/20 (40,00)	12/19 (63,16)	12/18 (66,67)	11/19 (57,89)	09/18 (50,00)	
	133112/3	07/18 (38,89)			08/17 (47,06)		
	133131/3	08/20 (40,00)		04/17 (23,53)	05/20 (25,00)	04/20 (20,00)	
	13332/1	05/18 (27,78)	06/16 (37,50)	10/15 (66,67)			
	13333/1	06/18 (33,33)	08/13 (61,54)				
	13351/2	07/18 (38,89)		07/20 (35,00)			
	133512/2	06/16 (37,50)		05/20 (25,00)			
	301-2-1	21113/1	00/19 (0,00)	00/14 (0,00)	00/15 (0,00)	00/18 (0,00)	00/20 (0,00)
		21241/1	00/20 (0,00)	05/20 (25,00)	03/20 (15,00)	00/20 (0,00)	
21311/2		00/16 (0,00)	00/20 (0,00)	00/16 (0,00)	00/16 (0,00)		
303-4-1	41121/1		00/17 (0,00)	01/20 (5,00)	02/20 (10,00)		
	41123/2	04/20 (20,00)	04/20 (20,00)				
	41242/1					02/20 (10,00)	
	41242/2	01/20 (5,00)			03/20 (15,00)	02/20 (10,00)	
303-4-4	44114/1	01/20 (5,00)	03/18 (16,67)				
	44114/2	08/15 (53,33)		06/20 (30,00)			
	44133/2	00/20 (0,00)	01/20 (5,00)	01/20 (5,00)			

Observações:

. As frações referem-se ao número total de calos embriogênicos sobre o total de calos induzidos.

. Cultivo realizado no período de Maio a Dezembro de 1990.

. Dados entre parênteses: porcentagem de calos embriogênicos induzidos.

TABELA 16: Análise de variância do Experimento 2.1. (1987) para avaliação da frequência de indução de calos embriogênicos em linhagens endogâmicas com diferentes composições de knobs cromossômicos

Dados transformados por raiz quadrada de $(P\% + 0,5)$

Fonte de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Famílias	3	2,2190	0,7397	
Sub-Fam/Famílias	5	0,0709	0,0142	
Linh/Sub-Fam/Fam.	2	0,2886	0,1443	11,2010 **
Linhagens	10	2,5790	0,2579	20,0217 **
Resíduo	32	0,4122	0,0129	
Total	42	2,9912		

Média Geral = 0,3862

C.V. = 29,3870 %

(Média = 14,4150% de indução de calos embriogênicos)

C.V. = Coeficiente de Variação

** = valores de F significativos ao nível de 1% de probabilidade

TABELA 17: Análise de variância do Experimento 2.2. (1988) para avaliação da frequência de indução de calos embriogênicos em linhagens endogâmicas com diferentes composições de knobs cromossômicos

Dados transformados por raiz quadrada de $(P\% + 0,5)$

Fonte de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Meios	1	0,0042	0,0042	F < 1,0
Famílias	3	2,1960	0,7320	
Sub-Fam/Famílias	9	0,3646	0,0405	
Linh/Sub-Fam/Famílias	4	0,4246	0,1062	4,1553 **
Linhagens	16	2,9846	0,1866	7,3031 **
Famílias × Meios	3	0,0098	0,0033	
Sub-Fam/Fam. × Meios	9	0,0479	0,0053	
Linh/Sub-F/Fam. × M.	4	0,0004	0,0001	F < 1,0
Linhagens × Meios	16	0,0581	0,0036	F < 1,0
Resíduo	68	1,7371	0,0255	
Total	101	4,7840		

Média Geral = 0,4919

(Média = 23,6965% de indução de calos embriogênicos)

Coefficiente de Variação = 32,4930 %

** = Valores de F significativos ao nível de 1% de probabilidade

TABELA 18: Análise de variância do Experimento 2.3. (1990) para avaliação da frequência de indução de calos embriogênicos em linhagens endogâmicas com diferentes composições de knobs cromossômicos

Dados transformados por raiz quadrada de $(P\% + 0,5)$

Fonte de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Meios	1	0,0006	0,0006	F < 1,0
Famílias	3	4,7050	1,5683	
Sub-Fam/Famílias	5	0,2885	0,0577	
Linh/Sub-Fam/Famílias	13	0,9735	0,0749	11,4942 **
Linhagens	21	5,9670	0,2841	43,6137 **
Famílias × Meios	3	0,0012	0,0004	
Sub-Fam/Fam. × Meios	5	0,0105	0,0021	
Linh/Sub-F/Fam. × M.	12	0,0189	0,0016	F < 1,0
Linhagens × Meios	20	0,0305	0,0015	F < 1,0
Resíduo	83	0,5407	0,0065	
Total	125	6,5392		

Média Geral = 0,4924

(Média = 23,7458% de indução de calos embriogênicos)

Coefficiente de Variação = 16,3900 %

** = Valores de F significativos ao nível de 1% de probabilidade

TABELA 19: Teste de Tukey para médias de freqüências de indução de calos embriogênicos das linhagens utilizadas no Experimento 2.1. Delineamento experimental: Inteiramente casualizado.

Linhagem	Médias Ajustadas(*)	Médias Originais(**)	Níveis	
			5%	1%
132/1	8,3055	68,4816	a	A
131/5	8,0999	65,1094	ab	A
133/4	7,3833	54,0130	ab	A
132/7	4,9211	23,7170	bc	AB
211/8	3,7804	13,7912	cd	BC
213/3	3,2296	9,9305	cd	BC
212/2	3,1410	9,3660	cd	BC
412/3	2,3354	4,9542	cd	BC
443/4	0,7071	0,0000	d	C
445/1	0,7071	0,0000	d	C
211/9	0,7071	0,0000	d	C

Observações:

- . Médias abrangidas pela mesma letra não diferem, aos respectivos níveis de probabilidade, pelo teste de Tukey.
- . (*) = Médias de dados transformados por raiz quadrada de $(P\% + 0,5)$
- . (**) = Médias originais em porcentagem de indução de calos embriogênicos

TABELA 20: Teste de Tukey para médias de freqüências de indução de calos embriogênicos das linhagens utilizadas no Experimento 2.2. Delineamento experimental: Inteiramente casualizado.

Linhagem	Médias Ajustadas(*)	Médias Originais(**)	Níveis	
			5%	1%
131/5	7,6467	57,9726	a	A
132/1	7,5854	57,0381	a	A
133/7	7,3850	54,6393	ab	AB
133/4	7,0253	48,8546	abc	AB
212/2	5,6716	31,6666	abcd	ABC
211/8	5,6321	31,2201	abcde	ABC
4421/4	5,2122	26,6666	abcde	ABC
213/3	4,5987	20,6481	abcde	ABC
4443/3	4,5905	20,5726	abcde	ABC
4121/2	4,5277	20,0000	abcde	ABC
4113/1	4,4391	19,2056	bcde	ABC
4422/4	4,0777	16,1275	cde	ABC
4413/3	3,9942	15,4533	de	BC
4462/1	3,0554	8,8353	de	C
4123/2	2,8347	7,5000	de	C
4451/2	2,3833	5,1803	de	C
211/9	2,1905	4,2981	e	C

Observações:

. Médias abrangidas pela mesma letra não diferem, aos respectivos níveis de probabilidade, pelo teste de Tukey

(*) = Médias de dados transformados por raiz quadrada de $(P\% + 0,5)$

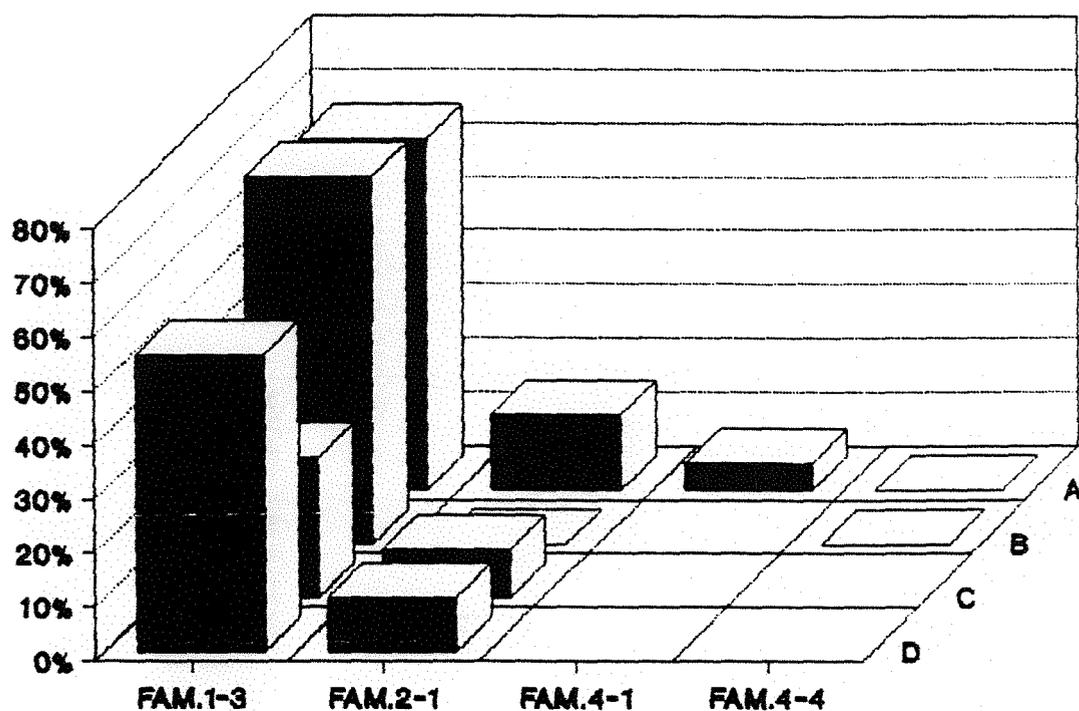
(**) = Médias originais em porcentagem de indução de calos embriogênicos

TABELA 21: Teste de Tukey para médias de frequências de indução de calos embriogênicos das linhagens utilizadas no Experimento 2.3. Delineamento: Inteiramente casualizado.

Linhagem	Médias Ajustadas(*)	Médias Originais(**)	Níveis	
			5%	1%
13151/1	8,8036	77,0032	a	A
13153/1	7,5683	56,7787	ab	AB
132331/1	7,4454	54,9342	ab	AB
133112/3	7,0211	48,7949	abc	ABC
13333/1	7,0034	48,5486	abcd	ABC
131311/1	6,7520	45,0895	bcd	ABC
13332/1	6,6289	43,4300	bcd	ABCD
44114/2	6,5530	41,5470	bcd	ABCD
133112/2	6,0623	36,2515	bcde	ABCDE
13351/2	6,0447	36,0380	bcde	BCDE
133512/2	5,7558	32,6256	cde	BCDE
131312/1	5,3245	27,8449	cde	CDE
133131/3	5,3085	27,6748	de	CDE
41123/2	4,4703	19,4844	ef	DEF
44114/1	3,6589	12,8806	efg	EFG
41242/1	3,1658	9,5217	fgh	EFG
21241/1	2,8774	7,7767	fgh	FG
41242/2	2,7713	7,1797	fgh	FG
41121/1	2,3302	4,9294	gh	FG
44133/2	1,3293	1,2660	h	G
21113/1	0,7071	0,0000	h	G
21311/2	0,7071	0,0000	h	G

Observações:

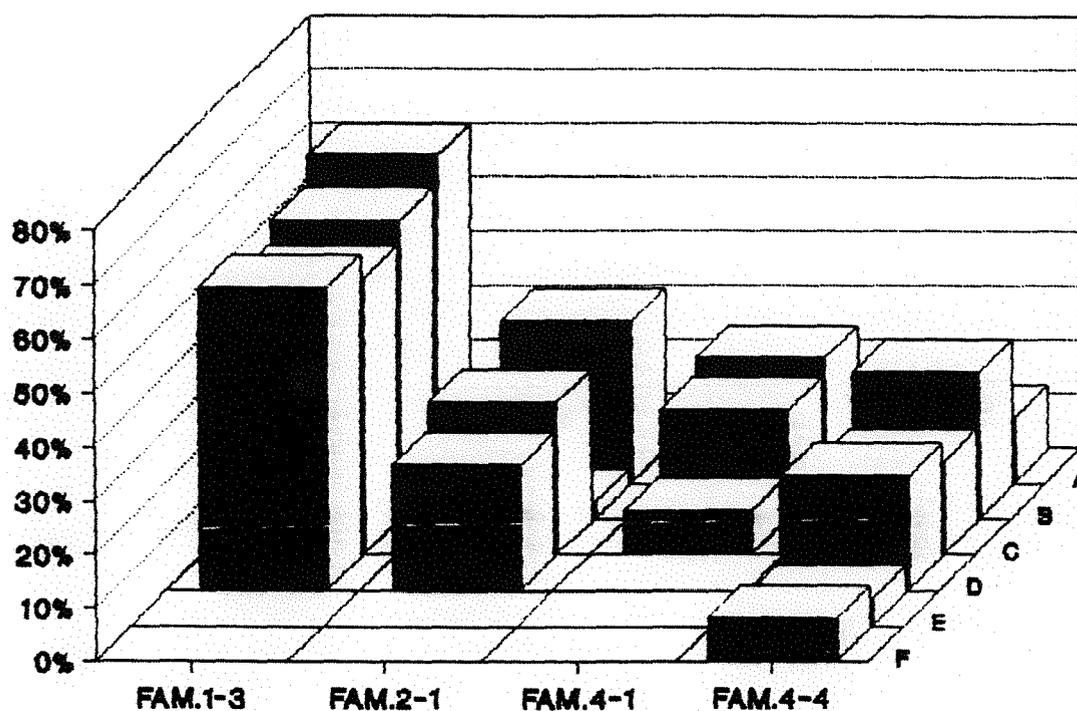
- . Médias abrangidas pela mesma letra não diferem, aos respectivos níveis de probabilidade, pelo teste de Tukey.
- . (*) = Médias de dados transformados por raiz quadrada de $(P\% + 0,5)$
- . (**) = Médias originais em porcentagem de indução de calos embriogênicos



Legenda:

	fam. 300-1-3	fam. 301-2-1	fam. 303-4-1	fam. 305-4-4
Linha A:	1-3-1/5/86	2-1-1/8/86	4-1-2/3/86	4-4-3/4/86
Linha B:	1-3-2/1/86	2-1-1/9/86		4-4-5/1/86
Linha C:	1-3-2/7/86	2-1-2/2/86		
Linha D:	1-3-3/4/86	2-1-3/3/86		

Figura 15: Frequência de indução de calos embriogênicos nas linhagens endogâmicas testadas no Experimento 2.1. (1987).



Legenda:

	fam. 300-1-3	fam. 301-2-1	fam. 303-4-1	fam. 303-4-4
Linha A:	1-3-1/5/86	2-1-1/8/86	4-1-1-3/1/87	4-4-1-3/3/87
Linha B:	1-3-2/1/86	2-1-1/9/86	4-1-2-1/2/87	4-4-2-1/4/87
Linha C:	1-3-3/4/86	2-1-2/2/86	4-1-2-3/2/87	4-4-2-2/4/87
Linha D:	1-3-3/7/86	2-1-3/3/86		4-4-4-3/3/87
Linha E:				4-4-5-1/2/87
Linha F:				4-4-6-2/1/87

Figura 16: Freqüência de indução de calos embriogênicos nas linhagens endogâmicas testadas no Experimento 2.2. (1988).



Legenda:

	fam. 300-1-3	fam. 301-2-1	fam. 303-4-1	fam. 303-4-4
Linha A:	131311/1 e 1331112/3	21113/1	41121/1	44114/1
B:	131312/1 e 133131/3	21241/1	41123/2	44114/2
C:	13151/1 e 13332/1	21311/2	41242/1	44133/2
D:	13153/1 e 13333/1		41242/2	
E:	132331/1 e 13351/2			
F:	133112/2 e 133512/2			

Figura 17: Frequência de indução de calos embriogênicos nas linhagens endogâmicas testadas no Experimento 2.3. (1990).

4.2.2. Produção de progênies da geração R1

Os Experimentos 2.1. e 2.2. foram utilizados também para se testar a totipotência de alguns genótipos pertencentes à família com comportamento superior (300-1-3), avaliando-se a capacidade de regenerarem plantas férteis. As plantas da geração R0 aclimatadas e cultivadas em canteiro experimental foram em número de 43, sendo 25 derivadas de calos da linhagem 131/5, 10 da linhagem 132/1 e 08 da linhagem 133/4. A maioria das plantas foi regenerada no mês de Março/1987, sendo completada a fase de aclimação em meados de Maio/1987. Embora a época do ano tenha sido desfavorável, o seu desenvolvimento foi normal, e a ocorrência de distúrbios causados pelo estresse fisiológico decorrente do cultivo *in vitro* (por exemplo: perfilhamento, baixa estatura e produção de espigas rudimentares na inflorescência masculina) não impediram a autofecundação de suas espigas. Foram produzidas sementes R1 de 26 plantas regeneradas, sendo possível a autofecundação de até duas espigas em algumas delas, como apresentado na Tabela 22. Não foram detectadas anormalidades nestas plantas R0, assim como em suas sementes. As espigas produzidas podem ser consideradas grandes (comprimento entre 20 e 25 cm) e o total de sementes R1 produzidas situou-se entre 90 e 340 sementes na maioria das espigas autofecundadas.

TABELA 22: Plantas regeneradas do cultivo de calos das linhagens com knobs cromossômicos determinados (Experimentos 2.1. e 2.2.) que produziram sementes R1 por autofecundação.

Material R1 (número do calo)	Planta original	Número de espigas autofecundadas	Número de sementes R1
R1-131/5			
(4A11)	#1	01	25
(4A21)	#1	01	30
(4A22)	#1	01	1
(7A1)	#1	01	10
(7A2)	#1	01	90
(15A1)	#1	01	90
(17A1)	#1	02	140
(17B2)	#1	01	100
(19A1)	#1	01	90
(24A1)	#1	02	320
(1A2)	#2	01	150
(18A1)	#3	01	70
R1-132/1			
(2A1)	#2	01	100
(2A2)	#2	02	180
(3A1)	#2	01	10
(10A1)	#2	02	260
(18A2)	#2	01	90
(4A1)	#4	01	20
(15A2)	#4	01	120
R1-133/4			
(2)	#2	01	70
(5A2)	#2	01	140
(18A3)	#2	02	190
(16A2)	#4	01	150
(8)	#5	02	260
(11)	#5	02	340
(12)	#5	02	90

Observação:

- Números iguais dentro de cada material referem-se a plantas regeneradas a partir de um mesmo calo.

4.3. Avaliação da instabilidade mitótica

4.3.1. Experimento preliminar de investigação de aberrações cromossômicas em culturas de calos de milho

Para a análise do comportamento mitótico de células de calos de milho cultivados *in vitro* e de tecidos de progênies de plantas regeneradas, foram desenvolvidas metodologias de preparações citológicas específicas para cada tipo de material. A avaliação da ocorrência de anormalidades mitóticas em calos foi feita após experimentos preliminares com materiais de diversas procedências, listadas na Tabela 23. Os referidos materiais consistiam de calos induzidos a partir de embriões imaturos F2 derivados do cruzamento de linhagens com comportamento superior ao cultivo *in vitro* (linhagens 131/5 e 132/1). Estas culturas foram iniciadas no laboratório de Citologia do Depto. de Genética - ESALQ/USP em Novembro/1989, pelo técnico Carlos A. Veríssimo, e os fragmentos de calos foram coletados a partir do 3º mês após a indução de calogênese. Foram feitas preparações citológicas de 01 a 05 calos de cada material, utilizando-se o método de coloração pelo Feulgen. Alguns dos materiais foram coletados pela T.E.S. Salete A. Gazirole. Os materiais mais intensivamente analisados foram utilizados para a padronização da técnica de coloração pela metodologia de bandamento-C.

Para os materiais corados pelo método de Feulgen, foi realizado um levantamento do tipo e frequência de anormalidades mitóticas observáveis em anáfases e telófases, tais como: ocorrência de pontes cromossômicas, presença de fragmentos de cromossomos e verificação da ocorrência de outros eventos anormais na separação das cromátides. Além disto, foi realizado um levantamento preliminar sobre a estabilidade da ploidia das células dos calos, analisando-se o número de

cromossomos em metáfases e pró-metáfases dos materiais.

A adaptação da metodologia de bandamento-C para este tipo de material teve por objetivo a comprovação do relacionamento das regiões dos knobs heterocromáticos com a ocorrência de pontes cromossômicas durante anáfases mitóticas, em células cultivadas *in vitro*, como preconizado por McCOY & PHILLIPS (1982); PHILLIPS (1986), LEE & PHILLIPS (1988) e SOMERS et alii (1988).

Foi verificada a freqüência de mitoses para avaliação da viabilidade desta análise. De uma maneira geral, o método mostrou um bom rendimento de anáfases. Foi analisada a freqüência de ocorrência total dos referidos tipos de anormalidades cromossômicas em células de calos:

- . figuras anafásicas em que as cromátides pareciam atrasadas em sua separação, aderidas por regiões que, em princípio, poderiam corresponder a regiões de knobs, como ilustrado pelas Figuras 18 e 19,

- . pontes aparentemente derivadas de cromátides dicêntricas, resultantes da fusão das extremidades quebradas, após a duplicação cromossômica (veja as Figuras 21, 24 e 26),

- . pontes em que parte das cromátides pareciam estar descondensadas, devido à tensão existente no local, e que pareciam representar uma fase adiantada das pontes típicas (veja Figura 20). Em alguns casos foi observado que esta descondensação ocorria em vários locais ao longo da ponte cromossômica,

- . anáfases com presença de duas pontes (como apresentado nas Figuras 22 e 27), ou até três pontes (com ocorrência de ambos: pontes típicas e atraso na separação de cromátides, como apresentado na Figura 21).

TABELA 23: Relação dos materiais utilizados na análise preliminar para verificação da instabilidade mitótica em células de calos de milho cultivados *in vitro*(*)

Designação dos materiais	Composição dos genótipos	Calos analisados
Planta 01	(1315/1 × 13213/1)1	A e B
Planta 02	(1315/1 × 13213/1)1	A (**)
Planta 03	(1315/1 × 13213/1)1	H, J e 57
Planta 04	(1315/6 × 1315/4)2	14 (**)
Planta 05	(1315/6 × 1315/4)2	B, D e E
Planta 09	(1315/1 × 13213/1)3	D, P, Q e R
Planta 10	(1315/1 × 13213/3)3	D (**)
Planta 13	(13342/7)	B (**)

Observações:

(*) = Culturas iniciadas a partir de Novembro/1989, no Laboratório de Citologia do Depto. de Genética-ESALQ/USP, pelo técnico Carlos A. Verissimo

(**) = Calos coletados pela T.E.S. Salete A. Gazirole, segundo metodologia estabelecida no referido laboratório (AGUIAR-PERECIN et alii, 1991).

Embora os materiais analisados tivessem sido coletados em diferentes subculturas, como apresentado nas Tabelas 24 e 25, foi constatada a ocorrência de diversas anormalidades semelhantes nas anáfases de diferentes calos. Para maior facilidade de explanação, os materiais serão designados pelos números das plantas doadoras de explantes, como apresentado na Tabela 23. A freqüência de formação de pontes simples variou de 0,47% no calo 14 da Planta 04 até 5,52% no calo B da Planta 01. Foi observada também a ocorrência de duas pontes por anáfases (denominado "pontes duplas") nos seguintes materiais: calos A, B, H e 57 do material (1315/1 x 13213/1)1, calos D e E da Planta 05 e calos D, P e Q da Planta 09, em freqüências variando de 0,52% a 4,72%.

A freqüente ocorrência de anáfases onde determinados cromossomos possuíam cromátides-irmãs aderidas pelas extremidades, que em princípio poderia corresponder a regiões de knobs, como mencionado anteriormente, conduziu a uma classificação inicial separada em relação à ocorrência de pontes típicas. Este evento foi denominado de "atraso na separação de cromátides irmãs", e foi observado em quase todos os calos analisados, numa freqüência variando de 0,32% a 7,40%, como apresentado na Tabela 24.

Com relação ao estudo de telófases, foram analisados os seguintes tipos de anormalidades:

- . ocorrência de pontes cromossômicas,
- . evidências de quebras de cromátides, e
- . presença de fragmentos de cromossomos.

Como é mostrado na Tabela 25, a taxa de ocorrência de pontes variou de 0,42% no calo D da Planta 05 a 2,80% das telófases analisadas no calo H da Planta 03. Já a ocorrência de estruturas semelhantes a fragmentos de

cromossomos (ilustrado pela Figura 23), foi observada numa taxa de 0,42% das telófases no calo D da Planta 09 e 0,44% no calo P do mesmo material.

O estudo do grau de ploidia das células permitiu a constatação de uma estabilidade no número de cromossomos em todos os materiais aqui analisados. Como podemos observar nos resultados apresentados na Tabela 26, a ocorrência de células poliplóides ($4n$), figura predominante nas anormalidades observadas, ocorreu em baixa freqüência. Convém lembrar que mixoploidia aparece normalmente em meristemas radiculares da milho.

Em outras figuras observadas nas preparações citológicas acima descritas, embora tenham ocorrido com uma reduzida freqüência entre as células dos calos analisados, a severidade da anormalidade parece ser muito acentuada. Foram observadas células haplóides com pontes anafásicas (calo R da Planta 09), evidências de perdas de cromossomos em telófases (calo D da Planta 05) e presença de fragmentos cromossômicos em anáfases e telófases (nas Plantas 01, 03, 04, 05 e 09).

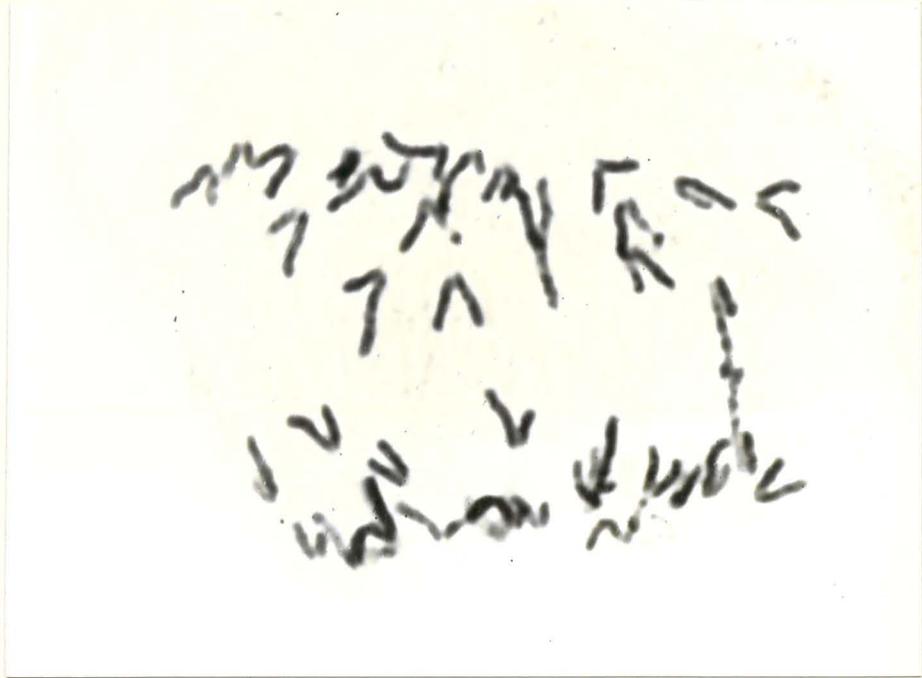


Figura 18



Figura 19



Figura 20



Figura 21



Figura 22



Figura 23

Figura 18: Anáfase inicial de região pró-embriogênica de calo, corada pelo método do Feulgen e mostrando o evento considerado preliminar, de atraso na separação de cromátides-irmãs. Material original: Planta 05, calo E (para detalhes, veja Tabelas 23 e 24).

Figura 19: Anáfase típica de região pró-embriogênica de calo, corada pelo método do Feulgen, mostrando atraso na separação de cromátides irmãs. Notar que as cromátides envolvidas no evento apresentam uma protuberância em suas extremidades. Material original: Planta 03, calo H (veja Tabelas 23 e 24).

Figura 20: Anáfase típica de região pró-embriogênica de calo, corada pelo método do Feulgen, mostrando atraso na separação de cromátides irmãs e evidências de grande tensão exercida nas cromátides envolvidas. Notar a descondensação em regiões próximas ao local de aderência. Material original: Planta 05, calo E.

Figura 21: Anáfase inicial de região pró-embriogênica de calo, corada pelo método do Feulgen e mostrando a ocorrência de ponte cromossômica simples (possivelmente decorrente da fusão de extremidades quebradas de cromátides envolvidas em um ciclo anterior de quebra-fusão-ponte). Material original: Planta 09, calo R (veja Tabelas 23 e 24).

Figuras 22 e 23: Planos focais de uma mesma figura mitótica (anáfase final de região pró-embriogênica de calo, corada pelo método do Feulgen). Material: Planta 05, calo B.

Figura 22: Ocorrência de duas pontes cromossômicas, possivelmente decorrentes de eventos preliminares de ciclos de quebra-fusão-ponte.

Figura 23: Ocorrência de extremidades de cromátides com acentuada descondensação, e ocorrência de dois "fragmentos" possivelmente aderidos às extremidades tensionadas das cromátides.

TABELA 24: Freqüência de pontes e fragmentos cromossômicos em anáfases mitóticas em pró-embriões de milho

Materiais Calo subcult.	Anáfases						
	Normais	1 ponte	2 pontes	(i%)	(*)	(ii%)	outros
Planta 01							
A 8º	73	03	01	(5,1)	-	-	-
B 10º	71	03	01	(5,2)	01	(1,3)	-
B 11º	151	09	02	(6,7)	01	(0,6)	-
B 13º	185	05	02	(3,5)	03	(1,5)	03
B 14º	35	02	-	(5,4)	-	-	-
Planta 02							
A -	07	-	-	-	-	-	-
Planta 03							
J 9º	103	03	-	(2,8)	01	(0,9)	-
H 9º	25	-	-	-	-	-	-
H 16º	20	-	01	(4,7)	-	-	-
H 18º	140	04	01	(3,3)	02	(1,4)	02
57 21º	141	01	03	(2,6)	03	(2,0)	04
Planta 04							
14 -	203	01	-	(0,4)	03	(1,4)	04
Planta 05							
B 9º	18	-	-	-	-	-	-
E 9º	54	01	02	(5,2)	-	-	-
D 9º	15	-	-	-	-	-	-
D 11º	305	04	02	(1,9)	01	(0,3)	02
D 15º	247	04	04	(3,1)	02	(0,8)	-
Planta 09							
R 11º	44	02	-	(4,0)	02	(4,2)	01
Q 13º	19	-	01	(4,7)	01	(4,7)	-
D 15º	235	07	02	(3,6)	03	(1,2)	03
P 16º	180	05	01	(3,1)	03	(1,6)	03
Planta 10							
D 5º	21	-	01	(4,5)	-	-	-
Planta 13							
B 11º	47	01	-	(2,0)	-	-	-

Observações:

- (*) = Atraso na separação de cromátides irmãs
(i%) = Porcentagem de anáfases com ocorrência de pontes cromossômicas
(ii%) = Porcentagem de ocorrência de atraso na separação de cromátides
outros = Formação de pontes triplas, células haplóides com pontes cromossômicas, fragmentos cromossômicos, poliplóides.

TABELA 25: Freqüência de pontes e fragmentos cromossômicos em telófases mitóticas em pró-embriões de milho

Materiais Calo subcult.	Telófases				
	Normais	1 ponte	2 pontes	(%)	Fragmentos
Planta 01					
A 8º	54	-	-	-	-
B 10º	85	-	-	-	-
B 11º	74	-	-	-	-
B 13º	214	01	01	(0,9)	-
B 14º	53	01	-	(1,8)	-
Planta 02					
A -	02	-	-	-	-
Planta 03					
J 9º	-	-	-	-	-
H 9º	07	-	-	-	-
H 16º	20	-	-	-	-
H 18º	103	03	01	(3,7)	-
57 21º	111	-	-	-	-
Planta 04					
14 -	125	-	-	-	-
Planta 05					
B 9º	39	-	-	-	-
E 9º	19	-	-	-	-
D 9º	03	-	-	-	-
D 11º	260	02	-	(0,7)	-
D 15º	238	01	-	(0,4)	-
Planta 09					
R 11º	10	-	-	-	-
Q 13º	08	-	-	-	-
D 15º	225	01	-	(0,4)	01
P 16º	236	01	-	(0,4)	01
Planta 10					
D 5º	10	-	-	-	-
Planta 13					
B 11º	18	-	-	-	-

Observações:

(%) = Porcentagem de telófases com ocorrência de pontes cromossômicas

TABELA 26: Análise da estabilidade na ploidia em metáfases e pró-metáfases de regiões embriogênicas de calos de milho

Materiais Calo subcult.	Metáfases				Pró-metáfases			
	n	2n=20	4n	(%)	n	2n=20	4n	(%)
Planta 01								
A 8º	-	53	05	(8,6)	-	80	04	(4,7)
B 10º	-	73	02	(2,6)	-	65	02	(2,9)
B 11º	-	20	-	-	-	34	-	-
B 13º	01	154	03	(2,5)	-	254	03	(1,1)
B 14º	-	55	01	(1,7)	-	107	01	(0,9)
Planta 02								
A -	-	03	-	-	-	02	-	-
Planta 03								
J 9º	-	89	03	(3,2)	-	69	02	(2,8)
H 9º	-	15	01	(6,2)	-	19	03	(13,6)
H 16º	-	33	01	(2,9)	-	59	01	(1,6)
H 18º	02	123	01	(2,3)	01	195	03	(2,0)
57 21º	-	91	01	(1,0)	-	72	01	(1,3)
Planta 04								
14 -	-	208	01	(0,4)	-	247	02	(0,8)
Planta 05								
B 9º	-	36	02	(5,2)	-	44	03	(6,3)
E 9º	-	46	01	(2,1)	-	44	-	-
D 9º	-	121	03	(2,4)	-	229	06	(2,5)
D 11º	-	179	03	(1,6)	-	367	07	(1,8)
D 15º	-	188	04	(2,0)	-	264	05	(1,8)
Planta 09								
R 11º	01	93	03	(4,1)	-	63	-	-
Q 13º	-	10	-	-	-	14	-	-
D 15º	-	146	02	(1,3)	-	256	02	(0,7)
P 16º	01	139	04	(3,4)	-	141	04	(2,7)
Planta 10								
D 5º	-	22	-	-	-	29	-	-
Planta 13								
B 11º	-	27	-	-	-	32	-	-

Observações:

(%) = Porcentagem de células com número de cromossomos diferente do diplóide normal

n = número haplóide de cromossomos de milho (n = 10)

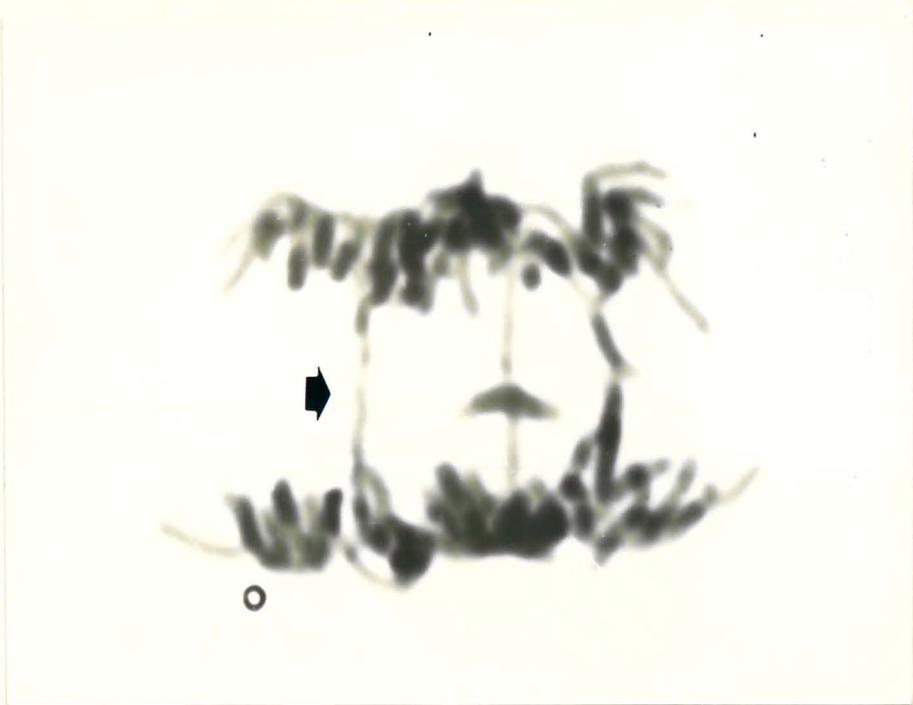


Figura 24



Figura 25

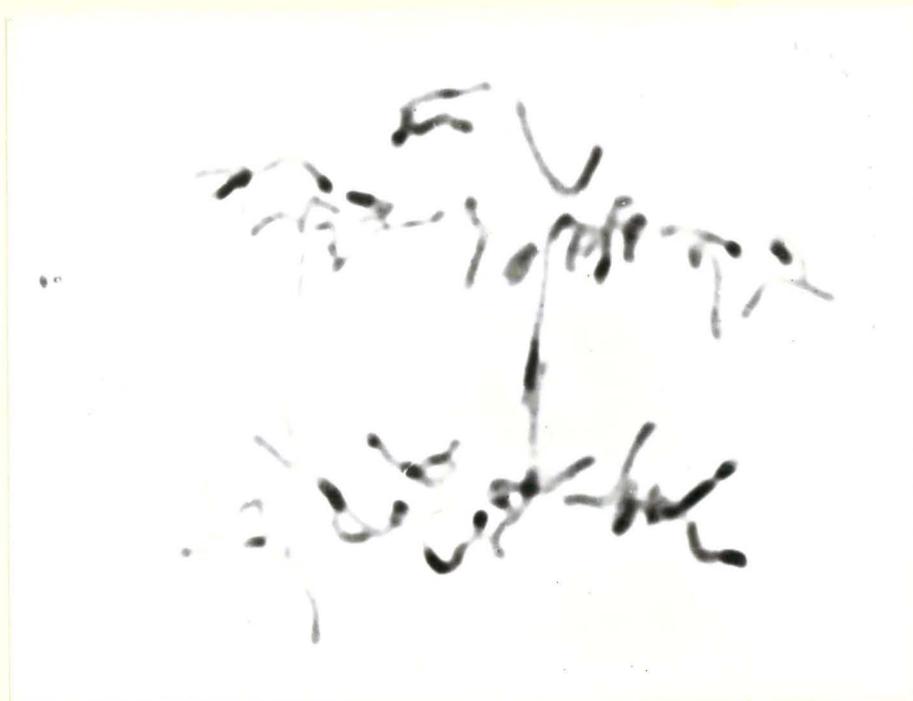


Figura 26



Figura 27

Figura 24: Anáfase típica de região pró-embriogênica de calo, mostrando atraso na separação de cromátides-irmãs (ao centro) e formação de duas pontes cromossômicas. A seta indica a ocorrência de ponte simples, possivelmente originada a partir da fusão de extremidades quebradas das cromátides. Material original: Planta 09, calo D (veja Tabelas 23 e 24).

Figura 25: Anáfase final de região pró-embriogênica de calo, corada através de bandamento-C e mostrando a presença de uma banda com dimensão bastante reduzida, ao nível da ponte cromossômica. Material original: Planta 01, calo B (veja Tabelas 23 e 24).

Figura 26: Anáfase inicial de região pró-embriogênica de calo, corada através de bandamento-C e com presença de banda (correspondente aos knobs cromossômicos heterocromáticos) ao nível da ponte cromossômica. Material original: Planta 09, calo P1 (veja Tabelas 23 e 24).

Figura 27: Anáfase inicial de região pró-embriogênica de calo, corada através de bandamento-C. Observa-se a ocorrência de duas pontes e a presença de uma banda em cada ponte cromossômica. Material original: Planta 09, calo D (veja Tabelas 23 e 24).

Para a confirmação do envolvimento dos knobs heterocromáticos com a ocorrência das pontes anafásicas, foi verificada a presença de bandas-C (correspondentes aos knobs) nos braços cromossômicos em configurações de pontes. Os calos utilizados nas preparações citológicas com a metodologia de bandamento-C foram os mais intensivamente estudados nas análises anteriores: Plantas 01, 03, 05 e 09. São apresentados na Tabela 27 alguns tipos de anormalidades observadas. Foram observadas diversas anáfases com uma visível participação dos knobs nos locais de ocorrência de pontes (Figuras 26 e 27), além de algumas outras onde se notava a presença de bandas-C de tamanho reduzido (Figura 25) ou mesmo inexistentes, sugerindo que estes locais já haviam sofrido eventos anteriores de formação de pontes cromossômicas. Estas observações sugerem a ocorrência de ciclo de quebra-fusão-ponte, de modo que as sucessivas quebras ocorridas provocaram a perda gradual das referidas regiões.

Um outro dado importante refere-se ao fato de que em um dos materiais pré-tratados com inibidor de fuso mitótico, foram observadas metáfases onde o cromossomo 7 apresentava as duas bandas características para o material em questão, mas o braço curto revelava um posicionamento completamente anormal para a sua banda. Ao invés de uma posição telomérica, tal banda foi encontrada ocupando uma posição intersticial. Esta figura evidencia que os rearranjos em células de milho cultivadas *in vitro* podem ocorrer em diversos graus e envolver grandes extensões dos cromossomos.

TABELA 27: Análise de figuras mitóticas de pró-embriões de milho através da metodologia de bandamento-C - Relação de eventos observados no experimento preliminar do segundo semestre de 1990, em amostras de calos do experimento preliminar.

Materiais		Características observadas
Calo	data de coleta	
Planta 01		
B	08/08/90	<ul style="list-style-type: none"> . atraso na separação de cromátides irmãs . anáfase com pontes mostrando bandas . anáfase com duas pontes sem bandas
	20/08/90	<ul style="list-style-type: none"> . metáfase com cromossomo 7 anormal . telófase com ponte sem bandas . telófase com duas pontes sem bandas . anáfase com ponte mostrando bandas . anáfase com ponte sem bandas . anáfase com ponte e fragmentos com bandas
	02/09/90	<ul style="list-style-type: none"> . anáfase com ponte mostrando pequena banda . anáfase com ponte sem bandas . anáfase com ponte e fragmentos com bandas
Planta 03		
H	19/09/90	<ul style="list-style-type: none"> . anáfase com ponte sem bandas
Planta 05		
D	02/09/90	<ul style="list-style-type: none"> . anáfase com ponte mostrando pequena banda
Planta 09		
D	20/08/90	<ul style="list-style-type: none"> . anáfase com ponte com bandas e fragmento . anáfase com ponte dupla mostrando bandas . anáfase com ponte e fragmentos sem bandas . anáfase com atraso na separação de cromátides mostrando bandas nas extremidades . anáfase com duas pontes sem bandas
P	29/08/90	<ul style="list-style-type: none"> . anáfase com ponte mostrando bandas . anáfase com ponte sem bandas

4.3.2. Análise de anáfases mitóticas em calos de linhagens com diferentes composições de knobs cromossômicos

Este estudo foi realizado com fragmentos de calos induzidos a partir do cultivo *in vitro* de explantes das linhagens avaliadas no Experimento 2.3. Com base nos experimentos preliminares citados anteriormente, foi determinado que cada linhagem seria representada por cinco calos diferentes e seriam analisadas ao redor de 50 anáfases por calo coletado. Para uma análise mais acurada, entretanto, as anáfases observadas foram classificadas em três grupos:

a) anáfases iniciais, quando as cromátides-irmãs estão em início de separação e começam a migrar para os pólos opostos da célula, (como apresentado nas Figuras 18 e 21),

b) anáfases típicas, quando as cromátides-irmãs estão em adiantado estado de convergência para os pólos, formando a figura característica da fase, (Figura 19) e

c) anáfases finais, quando as cromátides já estão localizadas em pólos opostos da célula e começam a se descondensar (ilustrado pelas Figuras 22 e 23).

É interessante notar que as características de cada fase podem prejudicar a identificação de anormalidades cromossômicas, com uma conseqüente subestimativa da freqüência de aberrações, principalmente no estágio final, porque as cromátides envolvidas na formação de pontes já podem ter se quebrado.

Em adição, foram avaliadas as freqüências de aberrações cromossômicas observáveis na telófase, quando então as cromátides já estão em adiantado grau de descondensação.

Foram computados os seguintes eventos, para cada um dos estágios das anáfases estudadas:

. anáfases iniciais e típicas: ocorrência de eventos considerados preliminares, onde as cromátides irmãs permanecem aderidas por regiões aparentemente correspondentes aos knobs, mesmo quando a anáfase apresenta a maioria das demais cromátides já separadas e encaminhando-se para os pólos (evento denominado preliminarmente de "atraso na separação de cromátides-irmãs"); ocorrência de pontes típicas (simples ou duplas); ocorrência de descondensação de regiões das cromátides envolvidas nos eventos descritos acima (partindo-se de evidências da literatura de que pontes levam a quebras cromossômicas); ocorrência de fragmentos (possivelmente produzidos por eventos de quebras em ciclos anteriores).

. anáfases finais: ocorrência de pontes típicas; fragmentos cromossômicos e/ou descondensação de regiões das cromátides envolvidas em pontes ou em "atraso na separação de cromátides-irmãs" (devido à tensão decorrente da migração das mesmas aos pólos).

Eventos considerados de difícil interpretação, principalmente relacionados com eventos de atraso na separação de cromátides-irmãs em anáfases iniciais ou com cromátides suportando grande tensão, em anáfases finais, foram checados em microscópio ótico de contraste de fase.

Os resultados obtidos mostraram a ocorrência de anormalidades em todos os materiais analisados, como apresentado nas Tabelas 28 e 29. Os dados coletados permitiram a classificação dos diversos tipos de anormalidades observadas, e a elaboração de fichas de avaliação (já descritas).

Para a análise de variância, foram selecionados quatro grupos de resultados distintos, a saber:

a) Porcentagem de ocorrência de pontes cromossômicas em anáfases iniciais e típicas. Foram consideradas pontes todas as figuras onde um ou mais pares de cromátides irmãs permaneceram unidos pelas extremidades (inclusive eventos de atraso na separação de cromátides).

b) Porcentagem de ocorrência de pontes cromossômicas (segundo os critérios anteriores) em anáfases consideradas na sua totalidade, incluindo iniciais, típicas e finais.

c) Porcentagem de ocorrência de anormalidades totais em anáfases iniciais e típicas. Foram consideradas neste item todas as figuras que representaram características anormais em relação às anáfases mitóticas de milho, tais como: ocorrência de pontes, presença de fragmentos cromossômicos e descondensação em regiões das cromátides tensionadas pelas pontes ou por atraso na separação de cromátides-irmãs, entre outras.

d) Porcentagem de ocorrência de anormalidades totais em anáfases consideradas em sua totalidade, incluindo-se iniciais, típicas e finais.

A análise estatística dos dados obtidos revelou que as linhagens apresentam diferenças entre si com relação a todos os grupos de dados mencionados. Os valores de F calculados em todas as análises de variância para a avaliação dos efeitos de linhagens (no modelo inteiramente casualizado) e de linhagens dentro de sub-famílias dentro de famílias (segundo o modelo hierárquico) foram significativos ao nível de 1% de probabilidade, como apresentado nas Tabelas 30, 31, 32 e 33. Devido ao fato dos resultados das análises de ambos os tipos de dados (transformados e não-transformados) terem sido muito semelhantes, são apresentados apenas os testes de Tukey realizados com as médias de dados transformados (Tabelas 34, 35, 36 e 37).

TABELA 28: Avaliação da freqüência de anormalidades mitóticas em anáfases iniciais + típicas de células de calos induzidos a partir de explantes de linhagens de milho com diferentes conteúdos de knobs cromossômicos.

Linhagem	calo	Anáfases Iniciais + Típicas				
		Normais	Pontes		Total anormais	
					(%)	
13333/1	I	23	01	4,00	02	8,00
	II	18	01	5,26	01	5,26
	III	32	02	5,88	02	5,88
	IV	15	01	6,25	01	6,25
	V	33	01	2,86	02	5,71
	Total	121	06	4,65	08	6,20
13351/2	I	16	01	5,88	01	5,88
	II	23	01	4,17	01	4,17
	III	16	—	0,00	01	5,88
	IV	27	01	3,57	01	3,57
	V	39	01	2,50	01	2,50
	Total	121	04	3,17	05	3,97
131311/1	I	15	01	6,25	01	6,25
	II	27	02	6,45	04	12,90
	III	18	01	5,26	01	5,26
	IV	65	02	2,94	03	4,41
	V	39	01	2,50	01	2,50
	Total	164	07	4,02	10	5,75
131312/1	I	21	01	4,35	02	8,70
	II	18	02	10,00	02	10,00
	III	09	01	10,00	01	10,00
	IV	20	02	8,33	04	16,67
	V	17	02	10,53	02	10,53
	Total	85	08	8,33	11	11,46
13151/1	I	20	—	0,00	—	0,00
	II	28	01	3,45	01	3,45
	III	58	05	7,94	05	7,94
	IV	45	03	6,25	03	6,25
	V	19	01	5,00	01	5,00
	Total	170	10	5,56	10	5,56

TABELA 28 (Continuação): Avaliação da frequência de anormalidades em anáfases iniciais + típicas de calos induzidos a partir de explantes de linhagens de milho com diferentes conteúdos de knobs cromossômicos.

Linhagem	calo	Anáfases Iniciais + Típicas				
		Normais	Pontes		Total anormais	
					(%)	
13153/1	I	20	01	4,76	01	4,76
	II	31	01	2,94	03	8,82
	III	40	03	6,82	04	9,09
	IV	16	01	5,88	01	5,88
	V	32	02	5,88	02	5,88
	Total	139	08	5,33	11	7,33
132331/1	I	24	02	7,41	03	11,11
	II	41	03	6,67	04	8,89
	III	17	03	13,64	05	22,73
	IV	18	01	5,00	02	10,00
	V	19	02	9,09	03	13,64
	Total	119	11	8,09	17	12,50
133112/2	I	44	03	6,25	04	8,33
	II	31	02	6,06	02	6,06
	III	20	01	4,76	01	4,76
	IV	32	02	5,88	02	5,88
	V	73	04	5,00	07	8,75
	Total	200	12	5,56	16	7,41
133131/3	I	22	—	0,00	01	4,35
	II	41	—	0,00	01	2,38
	III	35	03	7,89	03	7,89
	IV	20	—	0,00	01	4,76
	V	15	01	6,25	01	6,25
	Total	133	04	2,86	07	5,00
133512/2	I	38	01	2,50	02	5,00
	II	35	—	0,00	01	2,78
	III	65	01	1,49	02	2,99
	IV	19	—	0,00	01	5,00
	V	32	02	5,88	02	5,88
	Total	189	04	2,03	08	4,00

TABELA 28 (Continuação): Avaliação da frequência de anormalidades em anáfases iniciais + típicas de calos induzidos a partir de explantes de linhagens de milho com diferentes conteúdos de knobs cromossômicos.

Linhagem	calo	Anáfases Iniciais + Típicas				
		Normais	Pontes		Total anormais	
					(%)	
21241/1	I	35	01	2,78	01	2,78
	II	45	02	4,26	02	4,26
	III	46	01	2,08	02	4,17
	IV	37	—	0,00	01	2,63
	V	54	04	6,90	04	6,90
	Total	217	08	3,52	10	4,41
41123/2	I	28	01	3,33	02	6,67
	II	39	02	4,88	02	4,88
	III	34	02	5,41	03	8,11
	IV	27	01	3,45	02	6,90
	V	50	02	3,77	03	5,66
	Total	178	08	4,21	12	6,32
41242/2	I	33	03	8,33	03	8,33
	II	17	—	0,00	01	5,56
	III	28	03	9,38	04	12,50
	IV	20	02	9,09	02	9,09
	V	30	02	6,25	02	6,25
	Total	128	10	7,14	12	8,57
44114/2	I	84	01	1,18	01	1,18
	II	25	—	0,00	01	3,85
	III	57	01	1,72	01	1,72
	IV	41	01	2,38	01	2,38
	V	36	01	2,70	01	2,70
	Total	243	04	1,61	05	2,02
44133/2	I	27	01	3,57	01	3,57
	II	24	02	7,69	02	7,69
	III	66	03	4,35	03	4,35
	IV	42	02	4,55	02	4,55
	V	62	02	3,13	02	3,13
	Total	221	10	4,33	10	4,33

TABELA 29: Avaliação da freqüência de anormalidades mitóticas em anáfases iniciais + típicas + finais de calos induzidos a partir de explantes de linhagens de milho com diferentes conteúdos de knobs cromossômicos.

Linhagem	calo	Anáfases Iniciais + Típicas + Finais				
		Normais	Pontes		Total anormais	
					(%)	
13333/1	I	49	01	1,96	02	3,92
	II	49	01	2,00	01	2,00
	III	66	02	2,90	03	4,35
	IV	33	01	2,94	01	2,94
	V	62	01	1,56	02	3,13
	Total	259	06	2,24	09	3,36
13351/2	I	55	01	1,79	01	1,79
	II	49	02	3,92	02	3,92
	III	41	—	0,00	02	4,65
	IV	54	02	3,57	02	3,57
	V	74	03	3,85	04	5,13
	Total	273	08	2,82	11	3,87
131311/1	I	53	02	3,57	03	5,36
	II	57	03	4,84	05	8,06
	III	46	01	2,04	03	6,12
	IV	121	03	2,40	04	3,20
	V	70	01	1,39	02	2,78
	Total	347	10	2,75	17	4,67
131312/1	I	46	02	3,92	05	9,80
	II	46	03	6,00	04	8,00
	III	36	01	2,63	02	5,26
	IV	48	04	6,90	10	17,24
	V	55	03	5,17	03	5,17
	Total	231	13	5,10	24	9,41
13151/1	I	33	—	0,00	—	0,00
	II	60	01	1,64	01	1,64
	III	125	05	3,85	05	3,85
	IV	83	03	3,45	04	4,60
	V	40	01	2,38	02	4,76
	Total	341	10	2,83	12	3,40

TABELA 29 (Continuação): Avaliação da frequência de anormalidades em anáfases iniciais + típicas + finais de calos induzidos de explantes de linhagens de milho com diferentes conteúdos de knobs cromossômicos.

Linhagem	calo	Anáfases Iniciais + Típicas + Finais				
		Normais	Pontes		Total anormais	
				(%)		(%)
13153/1	I	33	01	2,86	02	5,71
	II	65	01	1,45	04	5,80
	III	87	03	3,23	06	6,45
	IV	48	02	4,00	02	4,00
	V	76	02	2,56	02	2,56
	Total	309	09	2,77	16	4,92
132331/1	I	53	03	5,26	04	7,02
	II	89	03	3,19	05	5,32
	III	45	04	7,69	07	13,46
	IV	38	01	2,44	03	7,32
	V	54	03	5,17	04	6,90
	Total	279	14	4,64	23	7,62
133112/2	I	66	03	4,29	04	5,71
	II	62	02	3,13	02	3,13
	III	29	02	6,25	03	9,38
	IV	58	02	3,33	02	3,33
	V	137	05	3,42	09	6,16
	Total	352	14	3,76	20	5,38
133131/3	I	64	—	0,00	01	1,54
	II	97	—	0,00	01	1,02
	III	71	04	5,26	05	6,58
	IV	49	—	0,00	01	2,00
	V	43	01	2,27	01	2,27
	Total	324	05	1,50	09	2,70
133512/2	I	50	01	1,92	02	3,85
	II	71	—	0,00	01	1,39
	III	119	01	0,83	02	1,65
	IV	32	—	0,00	01	3,03
	V	69	02	2,82	02	2,82
	Total	341	04	1,15	08	2,29

TABELA 29 (Continuação): Avaliação da frequência de anormalidades em anáfases iniciais + típicas + finais de calos induzidos de explantes de linhagens de milho com diferentes conteúdos de knobs cromossômicos.

Linhagem	calo	Anáfases Iniciais + Típicas + Finais				
		Normais	Pontes		Total anormais	
					(%)	
21241/1	I	63	01	1,56	01	1,56
	II	77	03	3,75	03	3,75
	III	85	01	1,15	02	2,30
	IV	66	—	0,00	01	1,49
	V	92	04	4,17	04	4,17
	Total	383	09	2,28	11	2,79
41123/2	I	41	01	2,33	02	4,65
	II	66	02	2,94	02	2,94
	III	58	02	3,28	03	4,92
	IV	39	01	2,44	02	4,88
	V	80	04	4,71	05	5,88
	Total	284	10	3,36	14	4,70
41242/2	I	55	03	5,17	03	5,17
	II	39	—	0,00	01	2,50
	III	59	04	6,25	05	7,81
	IV	34	03	8,11	03	8,11
	V	60	02	3,23	02	3,23
	Total	247	12	4,60	14	5,36
44114/2	I	115	01	0,86	01	0,86
	II	39	—	0,00	01	2,50
	III	81	01	1,22	01	1,22
	IV	59	01	1,67	01	1,67
	V	54	01	1,79	02	3,57
	Total	348	04	1,13	06	1,69
44133/2	I	41	02	4,65	02	4,65
	II	33	03	8,11	04	10,81
	III	92	04	4,17	04	4,17
	IV	68	02	2,86	02	2,86
	V	108	02	1,80	02	2,70
	Total	342	13	3,64	15	4,20

TABELA 30: Análise de variância do experimento de avaliação da ocorrência de pontes cromossômicas em anáfases mitóticas iniciais + típicas de calos das linhagens endogâmicas com diferentes conteúdos de knobs cromossômicos. Delineamentos experimentais: hierárquico e inteiramente casualizado

Dados transformados por raiz quadrada de $(P\% + 0,5)$

Fonte de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Famílias	3	0,0354	0,0118	
Sub-Fam./Famílias	4	0,0537	0,0134	
Linh./Sub-Fam./Fam.	7	0,0681	0,0097	3,6410 **
Linhagens	14	0,1572	0,0112	4,1999 **
Resíduo	60	0,1604	0,0027	
Total	74	0,3176		

Média = 0,2453

C.V. = 0,2108

(Média = 5,52% de pontes cromossômicas em anáfases mitóticas iniciais + típicas)

C.V. = Coeficiente de Variação

** = Valores de F significativos ao nível de 1% de probabilidade

TABELA 31: Análise de variância do experimento de avaliação da ocorrência de anormalidades cromossômicas totais em anáfases mitóticas iniciais + típicas de calos das linhagens endogâmicas com diferentes conteúdos de knobs cromossômicos. Delineamentos experimentais: hierárquico e inteiramente casualizado

Dados transformados por raiz quadrada de $(P\% + 0,5)$

Fonte de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Famílias	3	0,0674	0,0225	
Sub-Fam./Famílias	4	0,0671	0,0168	
Linh./Sub-Fam./Fam.	7	0,0594	0,0085	4,4690 **
Linhagens	14	0,1938	0,0138	7,2984 **
Resíduo	60	0,1138	0,0019	
Total	74	0,3076		

Média = 0,2772

C.V. = 0,1571

(Média = 7,18% de ocorrência de anormalidades cromossômicas em anáfases mitóticas iniciais + típicas)

C.V. = Coeficiente de Variação

** = Valores de F significativos ao nível de 1% de probabilidade

TABELA 32: Análise de variância do experimento de avaliação da ocorrência de pontes cromossômicas em anáfases mitóticas iniciais, típicas e finais de calos das linhagens com diferentes conteúdos de knobs cromossômicos. Delineamentos experimentais: hierárquico e inteiramente casualizado.

Dados transformados por raiz quadrada de $(P\% + 0,5)$

Fonte de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Famílias	3	0,0114	0,0038	
Sub-Fam./Famílias	4	0,0244	0,0061	
Linh./Sub-Fam./Fam.	7	0,0534	0,0076	3,7530 **
Linhagens	14	0,0892	0,0064	3,1357 **
Resíduo	60	0,1220	0,0020	
Total	74	0,2112		

Média = 0,1885

C.V. = 0,2392

(Média = 3,0532% de ocorrência de pontes cromossômicas em anáfases mitóticas iniciais + típicas + finais)

C.V. = Coeficiente de Variação

** = Valores de F significativos ao nível de 1% de probabilidade

TABELA 33: Análise de variância do experimento de avaliação da ocorrência de anormalidades cromossômicas totais em anáfases mitóticas iniciais, típicas e finais de calos das linhagens com diferentes conteúdos de knobs cromossômicos. Delineamentos experimentais: hierárquico e inteiramente casualizado.

Dados transformados por raiz quadrada de $(P\% + 0,5)$

Fonte de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Famílias	3	0,0215	0,0072	
Sub-Fam./Famílias	4	0,0427	0,0107	
Linh./Sub-Fam./Fam.	7	0,0624	0,0089	4,0170 **
Linhagens	14	0,1266	0,0090	4,0715 **
Resíduo	60	0,1333	0,0022	
Total	74	0,2599		

Média = 0,2243

C.V. = 0,2101

(Média = 4,53% de ocorrência de anormalidades cromossômicas em anáfases mitóticas iniciais + típicas + finais)

C.V. = Coeficiente de Variação

** = Valores de F significativos ao nível de 1% de probabilidade

TABELA 34: Teste de Tukey para médias de freqüências de pontes cromossômicas em anáfases iniciais + típicas de calos induzidos de explantes das linhagens endogâmicas com diferentes conteúdos de knobs cromossômicos

Linhagem	Posição das bandas-C							Médias Ajustadas (*)	Níveis	
	K2L	K3L	K6L	K7S	K7L	K8L	K9S		5%	1%
44114/2	++	++	++	++	++	++	++	1,4526	a	A
133512/2	oo	oo	++	++	++	++	oo	1,5906	ab	A
133131/3	oo	++	++	++	++	++	oo	1,8330	ab	AB
13351/2	oo	oo	++	++	++	++	oo	1,9157	abc	ABC
21241/1	oo	++	++	oo	++	++	++	2,0050	abcd	ABC
131311/1	oo	oo	++	++	++	++	++	2,1260	abcd	ABC
41123/2	++	++	++	oo	++	++	++	2,1702	abcd	ABC
44133/2	++	++	++	oo	++	++	++	2,1977	abcd	ABC
13333/1	oo	++	++	++	++	++	oo	2,2697	abcd	ABC
13153/1	oo	oo	++	++	++	++	++	2,4145	abcd	ABC
13151/1	oo	oo	++	++	++	++	++	2,4617	abcd	ABC
133112/2	oo	oo	++	++	++	++	oo	2,4617	abcd	ABC
41242/2	++	oo	++	oo	++	++	++	2,7640	bcd	ABC
132331/1	oo	oo	++	++	++	++	++	2,9309	cd	BC
131312/1	oo	oo	++	++	++	++	++	2,9715	d	C

Observações:

- . Médias abrangidas pela mesma letra não diferem, aos respectivos níveis de probabilidade, pelo teste de Tukey.
- . (*) = Médias de dados transformados por raiz quadrada de $(P\% + 0.5)$

TABELA 35: Teste de Tukey para médias de freqüências de anormalidades cromossômicas totais em anáfases iniciais + típicas de calos induzidos de explantes das linhagens endogâmicas com diferentes conteúdos de knobs

Linhagem	Posição das bandas-C							Médias Ajustadas (*)	Níveis	
	K2L	K3L	K6L	K7S	K7L	K8L	K9S		5%	1%
44114/2	++	++	++	++	++	++	++	1,5874	a	A
13351/2	oo	oo	++	++	++	++	oo	2,1142	ab	AB
133512/2	oo	oo	++	++	++	++	oo	2,1213	ab	AB
44133/2	++	++	++	oo	++	++	++	2,1977	ab	AB
21241/1	oo	++	++	oo	++	++	++	2,2158	ab	AB
133131/3	oo	++	++	++	++	++	oo	2,3452	ab	AB
13151/1	oo	oo	++	++	++	++	++	2,4617	ab	ABC
131311/1	oo	oo	++	++	++	++	++	2,5000	abc	ABCD
13333/1	oo	++	++	++	++	++	oo	2,5884	abc	ABCD
41123/2	++	++	++	oo	++	++	++	2,6115	bc	ABCD
13153/1	oo	oo	++	++	++	++	++	2,7982	bcd	ABCD
133112/2	oo	oo	++	++	++	++	oo	2,8125	bcd	ABCD
41242/2	++	oo	++	oo	++	++	++	3,0116	bcd	BCD
131312/1	oo	oo	++	++	++	++	++	3,4583	cd	CD
132331/1	oo	oo	++	++	++	++	++	3,6056	d	D

Observações:

- . Médias abrangidas pela mesma letra não diferem, aos respectivos níveis de probabilidade, pelo teste de Tukey.
- . (*) = Médias de dados transformados por raiz quadrada de $(P\% + 0,5)$

TABELA 36: Teste de Tukey para médias de frequências de pontes cromossômicas em anáfases iniciais + típicas + finais de calos de explantes das linhagens endogâmicas com diferentes conteúdos de knobs cromossômicos

Linhagem	Posição das bandas-C							Médias Ajustadas (*)	Níveis	
	K2L	K3L	K6L	K7S	K7L	K8L	K9S		5%	1%
44114/2	++	++	++	++	++	++	++	1,2767	a	A
133512/2	oo	oo	++	++	++	++	oo	1,2845	a	A
133131/3	oo	++	++	++	++	++	oo	1,4142	a	A
13333/1	oo	++	++	++	++	++	oo	1,6553	ab	A
21241/1	oo	++	++	oo	++	++	++	1,6673	ab	A
131311/1	oo	oo	++	++	++	++	++	1,8028	ab	A
13153/1	oo	oo	++	++	++	++	++	1,8083	ab	A
13351/2	oo	oo	++	++	++	++	oo	1,8221	ab	A
13151/1	oo	oo	++	++	++	++	++	1,8248	ab	A
41123/2	++	++	++	oo	++	++	++	1,9647	ab	A
44133/2	++	++	++	oo	++	++	++	2,0347	ab	A
133112/2	oo	oo	++	++	++	++	oo	2,0640	ab	A
41242/2	++	oo	++	oo	++	++	++	2,2583	ab	A
132331/1	oo	oo	++	++	++	++	++	2,2671	ab	A
131312/1	oo	oo	++	++	++	++	++	2,3664	b	A

Observações:

. Médias abrangidas pela mesma letra não diferem, aos respectivos níveis de probabilidade, pelo teste de Tukey.

. (*) = Médias de dados transformados por raiz quadrada de $(P\% + 0.5)$

TABELA 37: Teste de Tukey para médias de frequências de anormalidades cromossômicas totais em anáfases iniciais + típicas + finais de calos das linhagens endogâmicas com diferentes conteúdos de knobs cromossômicos

Linhagem	Posição das bandas-C							Médias Ajustadas (*)	Níveis	
	K2L	K3L	K6L	K7S	K7L	K8L	K9S		5%	1%
44114/2	++	++	++	++	++	++	++	1,4798	a	A
133512/2	oo	oo	++	++	++	++	oo	1,6703	a	AB
133131/3	oo	++	++	++	++	++	oo	1,7888	a	AB
21241/1	oo	++	++	oo	++	++	++	1,8138	a	AB
13333/1	oo	++	++	++	++	++	oo	1,9647	ab	ABC
13151/1	oo	oo	++	++	++	++	++	1,9748	ab	ABC
13351/2	oo	oo	++	++	++	++	oo	2,0904	abc	ABC
44133/2	++	++	++	oo	++	++	++	2,1679	abc	ABC
131311/1	oo	oo	++	++	++	++	++	2,2737	abc	ABC
41123/2	++	++	++	oo	++	++	++	2,2803	abc	ABC
13153/1	oo	oo	++	++	++	++	++	2,3281	abc	ABC
41242/2	++	oo	++	oo	++	++	++	2,4207	abc	ABC
133112/2	oo	oo	++	++	++	++	oo	2,4248	abc	ABC
132331/1	oo	oo	++	++	++	++	++	2,8496	bc	BC
131312/1	oo	oo	++	++	++	++	++	3,1480	c	C

Observações:

- . Médias abrangidas pela mesma letra não diferem, aos respectivos níveis de probabilidade, pelo teste de Tukey.
- . (*) = Médias de dados transformados por raiz quadrada de $(P\% + 0,5)$

4.3.3. Análise de metáfases mitóticas em calos de linhagens com diferentes composições de knobs cromossômicos

Os materiais cultivados *in vitro* no Experimento 2.3. (realizado em 1990) e analisados sob o ponto de vista de avaliação da instabilidade cromossômica em anáfases mitóticas, também foram utilizados para a investigação de aberrações estruturais em metáfases mitóticas. Para esta análise, foram selecionados alguns materiais que produziram calos do Tipo II, a saber: 131311/1, 132331/1 e 44114/2, além de um calo muito favorável, selecionado a partir do cultivo de explantes F2 derivados do cruzamento de duas linhagens com comprovadas respostas favoráveis ao cultivo *in vitro*, denominado "calo 57", induzido de explante da Planta 03, mencionada na Tabela 23. Empregou-se a metodologia de coloração de bandamento-C em preparações citológicas feitas com embriões somáticos em estágio globular das regiões pró-embriogênicas coletadas. Foi realizado um levantamento das aberrações estruturais observáveis com a metodologia em questão, em um número variável de metáfases de cada material.

Os resultados obtidos mostraram que, nos diversos calos amostrados, existem alguns eventos comuns, em variados graus de expressão. Por exemplo: metáfases observadas em preparações de calos das linhagens 131311/1 e 132331/1 apresentaram um predomínio de aberrações envolvendo o cromossomo 7, semelhantes àquelas já descritas no experimento preliminar (item 4.3.1.), onde a banda do braço curto deste cromossomo aparece em uma posição intersticial, ao invés da localização telomérica normal. Outra figura comum em preparações com calos destes genótipos, apresentava o braço longo deste cromossomo possuindo uma banda com tamanho muito pronunciado, sugerindo a ocorrência de amplificação do DNA heterocromático (veja a Figura 28).

Os calos da linhagem 44114/2 apresentaram as seguintes anormalidades: metáfases apresentando os cromossomos 6 aderidos ao nível dos satélites e metáfases onde dois pares de cromossomos estão com aderência ao nível das bandas. Outras aberrações bastante pronunciadas foram detectadas: metáfases mostrando heterogeneidade para os cromossomos 7, apresentando um deles com ausência de banda no braço curto e o outro com a referida banda em posição intersticial; metáfases apresentando a banda no braço longo do cromossomo 7 aparentemente amplificada; metáfases onde o braço curto do cromossomo 7 possuía um pequeno fragmento cromossômico aderido, sugerindo a ocorrência de quebras.

Uma figura que realçou claramente o grau de instabilidade mitótica que pode ocorrer em células cultivadas *in vitro* foi observada nas preparações com o calo 57. Algumas metáfases deste genótipo apresentaram um dos cromossomos 7 com o braço curto de dimensão muito avantajada, maior inclusive que o braço longo. Além disto, tal braço apresentava duas bandas e com evidências de ocorrência de quebras de cromátides em mitoses anteriores. O homólogo ao referido cromossomo era aparentemente normal, como pode ser observado na Figura 29. Foi elaborada uma hipótese de um possível mecanismo para a ocorrência daquela aberração, a ser descrita adiante.

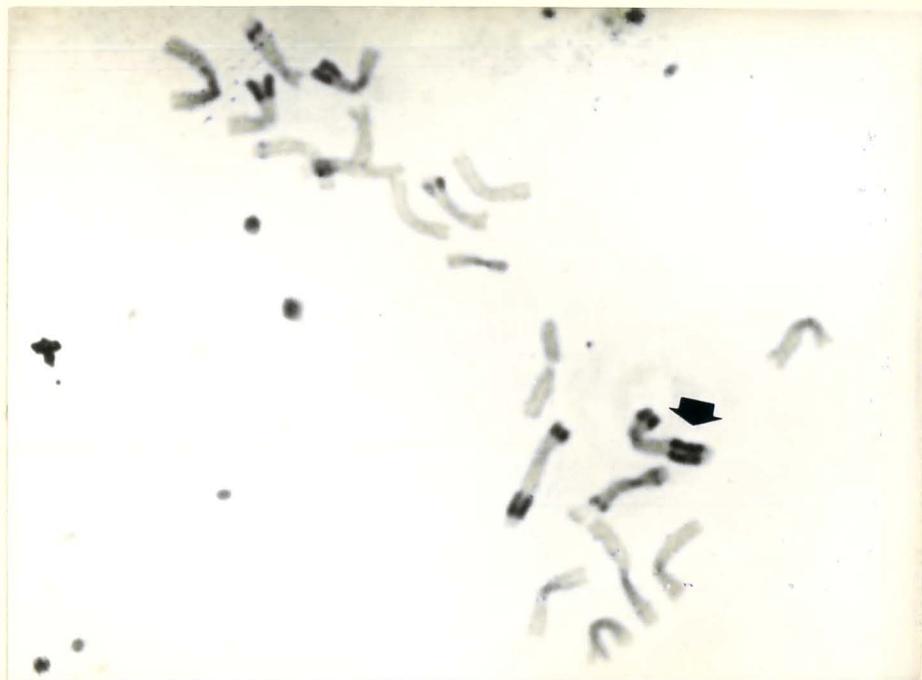


Figura 28



Figura 29

Figura 28: Metáfase mitótica de região pró-embriogênica de calo, corada através de bandamento-C e mostrando anormalidade para um dos cromossomos 7. A seta indica a banda-C correspondente ao knob heterocromático da posição K7L aparentemente amplificada. Notar que o homólogo apresenta-a com dimensão aparentemente normal. Material original: linhagem 132331/1 (Experimento 2.3.)

Figura 29: Metáfase mitótica de região pró-embriogênica de calo, corada através de bandamento-C e mostrando aberração para um dos cromossomos 7. A seta indica que o braço curto do referido cromossomo aparece com tamanho desproporcional e apresenta duas bandas-C. O homólogo está posicionado ao lado e possui morfologia aparentemente normal. Material original: Planta 03, calo 57 (veja Tabela 27).

4.4. Experimento 3: Outros genótipos

Para o Experimento 3, observou-se que os genótipos testados apresentaram resultados bastante variáveis, como apresentado na Tabela 38.

Observou-se que os explantes oriundos de plantas S3 derivadas da raça Zapalote Chico apresentaram morfologia muito característica durante o cultivo *in vitro*. Os embriões imaturos removidos destes materiais possuíam escutelo bem desenvolvido e formaram calos rapidamente (após somente uma semana de cultivo), exigindo que os subcultivos fossem mais freqüentes. Os calos induzidos eram de coloração branca, mais ou menos translúcidos, com intenso crescimento e não-embriogênicos. Eles foram mantidos em cultivo por vários meses, mas nunca originaram regiões friáveis ou qualquer formação embriogênica ou organogênica.

As linhagens endogâmicas selecionadas para alta capacidade de combinação para produção de grãos apresentaram um comportamento bastante heterogêneo. O grupo de linhagens "flint" apresentou a formação de calos não-embriogênicos com elevada taxa de crescimento, aspecto mucilaginoso e coloração branca (linhagens 1276 e 1383). Outras linhagens pertencentes a este grupo apresentaram calos mais ou menos friáveis, organogênicos, com pequena taxa de crescimento mas com capacidade de regeneração de plantas (linhagens 1055 e 1064). A linhagem 1284 foi a única que apresentou a formação de calos do Tipo II, friáveis e embriogênicos, com grande taxa de crescimento. Foi possível a regeneração de plantas completas a partir de alguns calos derivados de explantes dessa linhagem, embora estas plantas regeneradas não tenham sobrevivido ao período de aclimação às condições de cultivo em canteiros.

As linhagens pertencentes ao grupo do tipo "dentado" apresentaram resultados semelhantes entre si, mas

inferiores aos apresentados pelo grupo anterior. As linhagens 1622 e 1715 deste sub-grupo apresentaram a formação de calos compactos, com taxa de crescimento intermediário, coloração amarela diferenciada e formação de embriões somáticos globulares na superfície dos mesmos, que dificilmente se desenvolveram em embriões aptos a germinar e produzir plantas completas. Os calos induzidos de explantes destas linhagens foram freqüentemente organogênicos, com grande formação de raízes. Por sua vez, explantes da linhagem 1609 induziram calos tipicamente não-embriogênicos, com grande taxa de crescimento, aspecto mucilaginoso e coloração branca.

É importante ressaltar que, embora tenha sido analisada uma pequena amostra de linhagens pertencentes a estes dois grupos de materiais, os resultados mostraram que é promissora a tentativa de se encontrar genótipos com desempenho favorável ao cultivo *in vitro* (capacidade de indução de calos friáveis, altamente embriogênicos) em genótipos adaptados ao clima tropical.

Tabela 38: Freqüência de indução de calos embriogênicos no cultivo *in vitro* de linhagens endogâmicas com alta capacidade de combinação para a produção de grãos e progênies da geração S3 derivadas da raça Zapalote Chico (em porcentagem de calos induzidos).

Material	Planta 01	P1.02	P1.03	P1.04	Média
Linhagens com alta capacidade de combinação					
Sub-grupo Flint					
1276	9,09	43,48	8,00	4,54	16,28
1284	52,00	51,85	32,14	44,44	45,11
1055	27,00	20,00	33,33		26,78
1064	27,00	20,00	13,00		20,00
1276-1	13,00	13,00	20,00		15,33
1284-1	40,00	27,00	22,00		29,67
1383	26,00	12,00	20,00		19,33
Sub-grupo Dentado					
1622	38,46	14,28	0,00	22,22	18,74
1715	36,00	38,46	7,70	0,00	20,54
1622-1	13,00	16,00	20,00		16,33
1715	13,00	9,00	13,00		11,67
1609	0,00	13,00	13,00		8,67
Linhagem S3 de Zapalote-Chico					
275-12	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Observações:

- . Cada planta foi representada por 16 a 30 explantes
- . Cultivos realizados em meio de Murashige-Skoog, com sacarose a 3,0% e hidrolisado de caseína (20,0 mg/l).

4.5. Estabelecimento de suspensões celulares

4.5.1. Testes com meios de cultura

O experimento preliminar com calos do Tipo II de embriões F2 do cruzamento de linhagens superiores ("calo 57") considerou quatro composições diferentes de meios de cultura líquidos. A viabilidade das culturas foi avaliada através dos seguintes parâmetros: vitalidade dos microcalos, formação contínua de agregados de dimensões cada vez menores e tempo decorrido até a obtenção de suspensão finamente dispersa.

O procedimento de subcultivos freqüentes no período imediatamente anterior à inoculação em meio de cultura líquido, com o cuidado de se transferir os calos para meios sólidos com idêntica composição dos respectivos meios líquidos a serem utilizados para a indução de suspensões, produziram resultados visivelmente positivos. Desta maneira, além da adaptação gradativa ao ambiente de cultivo, os calos tiveram estímulo para o crescimento das regiões meristemáticas e/ou altamente embriogênicas, selecionadas para a inoculação.

Uma análise comparativa dos meios utilizados mostrou que as composições com solução salina N6 apresentaram comportamento superior ao das composições com sais MS nas duas características principais do cultivo em suspensão: crescimento dos agregados celulares e dispersão dos microcalos produzidos. Além disto, o tempo decorrido até o estabelecimento de suspensões finamente dispersas foi consideravelmente menor para as composições N6 (aos cinco meses de cultivo os frascos com meio N6 apresentaram suspensões finamente dispersas, com elevada taxa de crescimento, enquanto no mesmo período os frascos com meio MS possuíam calos de grandes dimensões e menor crescimento). A viabilidade das culturas pareceu ser influenciada pela presença de aminoácidos. Os meios contendo L-

prolina e L-asparagina apresentaram respostas mais favoráveis à indução e manutenção das suspensões. Estas respostas podem decorrer do efeito benéfico que a adição dos respectivos aminoácidos exerce sobre a indução de calos friáveis, altamente embriogênicos, em genótipos testados com o meio de cultura contendo solução salina de N6, comentado na revisão bibliográfica. Portanto, os resultados iniciais foram de que o meio de cultura com solução salina N6, acrescidos dos demais compostos orgânicos, vitaminas e auxina utilizados no meio de indução de calogênese, e os aminoácidos L-prolina (12 mM) e L-asparagina (6 mM), era o mais adequado para o estabelecimento de culturas em suspensão.

4.5.2. Teste de genótipos com diferentes tipos de calos

A avaliação dos diferentes tipos de calos induzidos de explantes de algumas linhagens com diferentes conteúdos de knobs heterocromáticos mostrou um comportamento variável entre os genótipos analisados. Calos não-embriogênicos (com morfologia mucilagínosa) produziram suspensões celulares em um período de tempo relativamente curto. Cerca de um mês após a inoculação em meio líquido os calos derivados de explantes das linhagens 21241/1 e 41242/2 haviam se desagregado completamente e formado uma suspensão celular finamente dispersa. Estas culturas aparentemente conservaram as características originais dos calos, com relação à coloração, estrutura das células e taxa de crescimento. Calos friáveis, altamente embriogênicos (Tipo II), formaram suspensões finamente dispersas após um período de tempo comparativamente maior (para ilustração, veja a Figura 30). Materiais provenientes das linhagens 131311/1 e 132331/1 produziram suspensões após quatro meses de cultivo em meio líquido.

O comportamento das suspensões induzidas por calos da linhagem 44114/2 foi superior ao das duas anteriores. Além de serem estabelecidas em menor tempo que os demais genótipos que induziram calos do Tipo II testados (cerca de dois meses), as suspensões produziram agregados celulares finamente dispersos e bastante adequados para experimentos de isolamento de protoplastos, como mencionado por diversos relatos na literatura. Suspensões celulares deste material foram mantidas por mais de seis meses, com uma acentuada taxa de crescimento (cerca de 3 a 4 vezes no período de 7 dias) e com manutenção das qualidades favoráveis observadas em calos cultivados em meio sólido.



Figura 30: Suspensões celulares obtidas a partir de calos do Tipo II (friáveis, altamente embriogênicos) da linhagem 131311/1, com 30, 90 e 150 dias após a inoculação em meio de cultura líquido. (diâmetro das placas de Petri = 5,0 cm)

5. DISCUSSÃO

5.1. Cultivo in vitro de calos de milho

5.1.1. Implantação da metodologia de cultivo in vitro

Os resultados obtidos a partir dos experimentos preliminares com as variedades Piranão de Inverno e Jac-Duro permitiram a padronização da metodologia de cultivo in vitro de calos de milho no laboratório. Além deste objetivo inicial, foi possível o estabelecimento de procedimentos mais adequados à cada etapa do cultivo, que representaram subsídios para a elaboração de outros trabalhos nesta linha de pesquisa.

Os estudos realizados foram baseadas em relatos da literatura. Desde o trabalho pioneiro de GREEN & PHILLIPS (1975), que mostrou a totipotência de calos induzidos do escutelo de embriões imaturos em um estágio de desenvolvimento específico, diversos pesquisadores vêm procurando determinar os mecanismos mais seguros para se alcançar o objetivo básico do cultivo in vitro de células vegetais, que é o estabelecimento de sistemas simplificados de estudo dos fenômenos complexos que ocorrem nas plantas inteiras.

Os experimentos com as variedades Piranão de Inverno e Jac-Duro mostraram que o comportamento destes materiais foi favorável ao cultivo in vitro, segundo a metodologia acima mencionada. Foram padronizadas no laboratório todas as etapas relativas aos cuidados dispensados às plantas doadoras de explantes, aos procedimentos de assepsia para o

início do cultivo *in vitro* e, principalmente, com relação à manipulação dos explantes e dos calos induzidos a partir destes. Os materiais apresentaram um comportamento semelhante ao de genótipos descritos por outros autores, onde reconheceu-se que a resposta ao cultivo é muito influenciada pelo estágio de desenvolvimento dos embriões imaturos inoculados. Os melhores resultados foram obtidos quando os explantes apresentavam entre 1,0 mm e 2,0 mm de comprimento, correspondente ao período de 12 a 18 dias após a polinização das espigas.

Os tipos de calos induzidos também foram semelhantes ao relatado na literatura, sendo possível a classificação em: calos embriogênicos dos Tipos I e II e calos não-embriogênicos. A variedade Piranão de Inverno apresentou um predomínio de formação de calos de morfologia compacta, semelhante ao calo do Tipo I descrito na literatura, embora tenha sido freqüente a observação de regiões friáveis, altamente embriogênicas, na superfície dos calos induzidos. A variedade Jac-Duro apresentou a formação de calos mais friáveis, com maior taxa de crescimento, e grande freqüência de formação de setores com características de calos do Tipo II, descritos na literatura. Com base na morfologia dos calos induzidos, foi verificada a afirmação de diversos autores, segundo a qual os calos mais compactos apresentam taxa de crescimento inferior e formação de massas celulares opacas muito rígidas (consistindo de escutelos de embriões somáticos que se originam de maneira justaposta e que acabam por tomar toda a estrutura do calo). Os calos com estas características acabam por cessar o crescimento de regiões indiferenciadas e, assim, tornam-se inviáveis para culturas de longa duração (GREEN et alii, 1983). O resultado positivo obtido com o cultivo das referidas variedades foi a possibilidade de se selecionarem linhagens celulares friáveis, altamente embriogênicas, com maior taxa de crescimento e com manutenção

da capacidade de regeneração por longos períodos de tempo (calos do Tipo II). Embora as taxas de formação de calos Tipo II tenham sido semelhantes entre as variedades, é importante notar que Jac-Duro produziu-o de maneira direta, enquanto Piranão de Inverno apresentou, na maioria das vezes, o seu crescimento a partir de calos originalmente do Tipo I.

Com relação aos testes com diferentes modificações nas composições de meio de cultura, foram obtidos resultados bastante coerentes com os apresentados na literatura. A presença de sacarose em altas concentrações (6% a 10%) no meio de indução de calogênese propiciou a formação mais rápida de calos friáveis, mas foi limitante para o estabelecimento de culturas regeneráveis por longos períodos de tempo. Neste meio de cultura, os embriões somáticos não se desenvolveram bem e quase sempre oxidavam após poucos dias de formados. A redução gradual na concentração para 2% a 3% de sacarose causou uma resposta positiva, com maior taxa de crescimento das regiões pró-embriogênicas na superfície dos calos e maior eficiência de regeneração de plântulas.

A adição de hidrolisado de caseína produziu um efeito bastante benéfico ao cultivo dos calos induzidos a partir de explantes da variedade Jac Duro. Alguns autores têm comentado que os diferentes aminoácidos podem causar efeitos variáveis nas respostas das culturas (GREEN, 1978), podendo ser estimulatórios na formação de calos embriogênicos, tais como a L-prolina e L-asparagina (ARMSTRONG & GREEN, 1985), ou mesmo inibidores, como a glutamina (TOMES, 1985a). Devido ao fato de que o papel metabólico destes aminoácidos ainda precisa ser melhor estudado, os autores recomendam que além da utilização de substâncias complexas (como o próprio hidrolisado de caseína), deve-se dar continuidade à experimentação com aminoácidos específicos ou outros metabólitos celulares estimulatórios.

As plantas regeneradas a partir das duas

variedades foram também utilizadas para o estabelecimento de procedimentos padrões de aclimação e cultivo em vasos e canteiros experimentais. Os resultados mostraram claramente que o sucesso nesta fase depende muito das influências ambientais a que as plântulas estão sujeitas, durante o cultivo *in vitro* e após o seu transplante para solo. Os cuidados durante o cultivo *in vitro* dizem respeito, principalmente, à manipulação das regiões embriogênicas. Deve-se observar continuamente o desenvolvimento dos embriões, de modo a se determinar qual a orientação destes em relação ao meio de cultura e qual composição de meio de cultura deve ser utilizada.

Com relação ao transplante para solo, as melhores respostas foram obtidas quando as plântulas eram transferidas para substrato com elevada fertilidade e porosidade, mantidas em ambiente com alta umidade relativa do ar, com temperatura controlada e sob fotoperíodo de 16/8 horas com intensidade luminosa de 3.200 lux. Procurou-se reduzir o período de tempo gasto (em todas as etapas necessárias para a completa aclimação ao ambiente de cultivo natural) ao mínimo possível, com o objetivo de se reduzir a ocorrência de distúrbios fisiológicos causados, possivelmente, pelo estresse a que as plantas regeneradas ficam sujeitas neste período. As plantas regeneradas cultivadas em canteiro foram autofecundadas e produziram sementes com diversas alterações fenotípicas em relação ao material original. Entre as alterações mais pronunciadas, destacam-se algumas citadas por outros autores (veja revisão em PHILLIPS et alii, 1988). Observou-se uma predominância de alterações em caracteres morfológicos das plantas e sementes, tais como: tamanho da inflorescência masculina, altura das plantas e de espigas, sementes volumosas e defectivas (com desenvolvimento anormal do endosperma), sementes com tamanhos variáveis, entre outras. Além disto, observou-se a ocorrência de variações para caracteres qualitativos, tais como: coloração de sementes e plantas anãs

(com porte reduzido). Com vistas a futuros trabalhos de análise das possíveis causas de tais modificações, foram produzidas progênes por quatro ciclos consecutivos de autofecundação das plantas regeneradas. É interessante notar que a maioria dos variantes fenotípicos transmitiu os caracteres modificados à descendência, que por sua vez mostrou uma pronunciada manifestação das variações observadas em R0 ou R1, a cada ciclo de autofecundação. Algumas progênes de plantas regeneradas a partir de um mesmo calo foram selecionadas para análise de sua estabilidade cromossômica, com o objetivo de se determinar as possíveis causas citológicas de tais variações. Os resultados serão discutidos mais adiante.

5.1.2. Linhagens endogâmicas com diferentes composições de knobs cromossômicos heterocromáticos

Os resultados obtidos com os 3 experimentos para a avaliação das respostas ao cultivo *in vitro* das famílias de linhagens analisadas podem ser comentados segundo diversas abordagens.

Sob o ponto de vista de identificação de genótipos com respostas favoráveis ao cultivo *in vitro*, é de se ressaltar o comportamento apresentado pelas linhagens pertencentes à família 300-1-3. Em todos os experimentos realizados, as linhagens desta família apresentaram respostas positivas, muito superiores ao comportamento médio das demais linhagens testadas, e comparável a resultados obtidos com genótipos de respostas superiores, relatados na literatura. A taxa média de produção de calos embriogênicos do Tipo II foi ao redor de 50% para o total de linhagens desta família, sendo que os genótipos com comportamento superior, pertencentes às sub-famílias 300-131 e 300-132, chegaram a atingir taxas superiores a 70% dos explantes removidos de determinadas espigas (veja

Tabelas 12, 13, 14 e 15). Estes genótipos apresentaram, portanto, todas as vantajosas características daquele tipo de calo e possibilitaram o estabelecimento de cultivos de longa duração. Alguns calos induzidos a partir das linhagens testadas no Experimento 2.3. (realizado em 1990) continuam sendo subcultivados até o presente e com evidências de manutenção da sua capacidade embriogênica. Algumas das linhagens pertencentes a esta família tiveram sua totipotência comprovada nos Experimentos 2.1. e 2.2. (realizados respectivamente em 1987 e 1988). Foram regeneradas plantas férteis a partir de calos com 3 a 7 meses após a indução de calogênese, e as linhagens analisadas foram: 131/5, 132/1 e 133/4. Os métodos de regeneração e aclimação das plântulas da geração R0 foram aqueles padronizados durante os trabalhos com as variedades, já comentados. Foi observado que as plantas se adaptaram muito bem às condições de cultivo em canteiro experimental, pois apresentaram caracteres como: altura, vigor e produção de sementes semelhantes aos das plantas doadoras de explantes. Não foram detectadas variações fenotípicas notáveis nas sementes das plantas regeneradas, embora algumas das plantas R0 tivessem apresentado sintomas de algum estresse fisiológico, como: produção de flores femininas em inflorescências masculinas e uma ampliação no período de tempo entre os florescimentos masculino e o feminino. Apesar destas ocorrências, foi possível a produção de sementes para a grande maioria das plantas regeneradas (cerca de 50% delas produziram um número igual ou superior a 70 sementes R1 - veja Tabela 22). A manutenção destas sementes em câmaras-sécas e em geladeiras propiciará a sua posterior utilização em outros tipos de estudos.

A identificação de outros genótipos com respostas favoráveis ao cultivo *in vitro*, além daqueles já amplamente investigados e divulgados, tem sido reconhecida como necessária para o avanço desta linha de pesquisa (DUNCAN et alii, 1985; VASIL & VASIL, 1986 e PHILLIPS et alii, 1988). A

grande diversidade edafo-climática nas diferentes regiões produtoras deste cereal justifica a importância da avaliação dos melhores genótipos, adaptados a cada ambiente. Com relação a esta abordagem, é interessante notar que em seu trabalho de identificação de genótipos de milho com respostas favoráveis ao cultivo *in vitro*, adaptados às nossas condições de cultivo, PRIOLI (1987) e PRIOLI & SILVA (1989) mostraram que algumas linhagens com o germoplasma Cateto apresentaram as maiores taxas de indução de calos embriogênicos. É importante lembrar que a variedade Jac-Duro, a partir da qual foram obtidas as linhagens com diferentes composições de knobs cromossômicos heterocromáticos, apresenta em sua constituição de germoplasma vários materiais de raças Cateto.

Uma outra abordagem diz respeito à seleção de linhagens celulares para o desempenho de um papel específico nas diversas metodologias de cultivo *in vitro*. As linhagens pertencentes às famílias 301-2-1 e 303-4-1 apresentaram reduzida taxa de formação de calos embriogênicos, mas as características positivas dos seus calos poderiam ser úteis, conforme propostas de vários autores, para utilização em outros tipos de experimentos. Os calos induzidos por explantes de progênies destas linhagens apresentaram morfologia indiferenciada e regiões meristemáticas, dispersas, aparentemente, por toda a superfície dos mesmos (veja Figura 13). Estas qualidades podem ser benéficas quando deseja-se a proliferação celular, sem a necessária ocorrência de totipotência, como seria o caso da sua utilização como células nutrizas em experimentos de cultivo de protoplastos (por sua vez, isolados a partir de outro genótipo com comprovada totipotência celular). Testes relatados no presente trabalho mostraram que o referido tipo de calo (mucilaginoso, não-embriogênico) forma suspensões celulares em curto período de tempo e com elevada taxa de crescimento, em comparação aos outros genótipos testados.

A resposta da família de linhagens 303-4-4 para produção de calos embriogênicos e não-embriogênicos foi bastante variável em cada experimento. Determinados genótipos produziram unicamente calos não-embriogênicos, enquanto outros exibiram elevada taxa de indução de calos friáveis, altamente embriogênicos. Esta heterogeneidade da resposta ao cultivo *in vitro* pode estar relacionado com a forma de obtenção das progênes a cada ciclo de seleção das linhagens desta família. Segundo resultados obtidos no laboratório de Citologia do Departamento de Genética - ESALQ/USP, o levantamento da composição de bandas-C (correspondentes aos knobs cromossômicos heterocromáticos) em sementes de espigas autofecundadas das linhagens analisadas neste trabalho mostrou que em várias progênes com elevado grau de endogamia (S5 e S6) havia segregação para a presença e ausência de knobs (bandas-C) em alguns locos. Este fato indica que as linhagens utilizadas no presente trabalho podem apresentar também, segregação para outros caracteres condicionados por genes localizados nos braços cromossômicos com os knobs segregantes. Realmente, as plantas utilizadas como doadoras de explantes para algumas linhagens cultivadas no Experimento 2.3. (realizado em 1990), mostraram variações fenotípicas para caracteres como: esterilidade masculina, coloração de estilo-estigma, coloração de anteras, altura de plantas e altura de espigas. Conforme apresentado na revisão de literatura, a capacidade de formação de calos do Tipo II é um caráter governado geneticamente, e está influenciado pela freqüência de alelos favoráveis presentes na população analisada. Deste modo, a variabilidade observada entre as linhagens desta família, e mesmo dentro de uma mesma linhagem, poderia ser devido à possível ocorrência de variabilidade genética entre os explantes utilizados.

Um ponto importante a ser discutido se refere à identificação de genótipos (linhagens 44114/1 e 44114/2) que induziram um tipo de calo friável, altamente embriogênico e com

pronunciada taxa de crescimento nas condições de cultivo empregadas (Tabelas 14 e 15 e Figura 14). Setores com estas características foram selecionados a partir de calos originalmente não-embriogênicos. Eles passaram a ser cultivados isoladamente e, após aproximadamente 18 meses de cultivo *in vitro*, apresentam tais características de uma forma bastante pronunciada, o que os torna materiais interessantes para outras análises. Mais adiante, outras características desses mesmos calos serão comentadas, no que se refere à ocorrência de instabilidade cromossômica no cultivo *in vitro* e na capacidade de produção de suspensões celulares.

Com relação aos Experimentos 2.2. e 2.3., onde foram utilizados dois meios de cultura com composições distintas, notou-se que o comportamento das linhagens testadas foi bastante semelhante em cada um destes (veja Tabelas 13, 14 e 15). A análise estatística comprovou estas observações, com a apresentação de valores de F para as interações linhagens x meios (segundo o modelo inteiramente casualizado) e linhagens dentro de sub-famílias dentro de famílias x meios (segundo o modelo hierárquico) não-significativos. O acompanhamento de todas as fases das culturas através de fichas de avaliação permite também a conclusão de que o comportamento dos genótipos não variou em função dos diferentes meios de cultura utilizados no presente trabalho. Entretanto, é importante ressaltar que a adição de determinados compostos orgânicos pode exercer grande influência sobre o comportamento de calos de milho cultivados *in vitro*, às vezes sendo mais favoráveis quando presentes em um meio de cultura e menos favorável quando presentes no outro. Um exemplo é a adição de L-prolina em meio com solução salina N6 (ARMSTRONG & GREEN, 1982; 1985). Como apresentado pelo presente trabalho, meios de cultura MS e N6 contendo os aminoácidos L-prolina e L-asparagina foram utilizados em cultivos de suspensões celulares, com resultados positivos e semelhantes ao relatado na literatura, comentados adiante.

5.1.3. Genótipos incluídos no Experimento 3

Os resultados obtidos pelo cultivo *in vitro* de explantes oriundos das linhagens com alta capacidade de combinação para a produção de grãos foram satisfatórios. Embora tenham sido testados poucos genótipos (5 linhagens do sub-grupo "Flint" e 3 linhagens do sub-grupo "Dentado"), e em apenas um experimento, a caracterização dos tipos de calos induzidos e a observação do potencial de cada um para o cultivo *in vitro* tornaram evidentes os seguintes pontos:

Os genótipos que apresentaram respostas mais favoráveis, com formação de calos friáveis e embriogênicos, foram as linhagens 1284 e 1284-1, com alta capacidade de combinação para a produção de grãos do sub-grupo "Flint". Os resultados mostraram que é promissora a seleção de linhagens que possuem ambas as características favoráveis de: alto valor agrônomo (produção de grãos) e desempenho superior no cultivo *in vitro* (indução de calos friáveis, embriogênicos e alta capacidade de regeneração de plantas). Deve-se ressaltar que o número de genótipos com estas características descritos na literatura é muito pequeno, talvez inferior a uma dezena. Somente este fato já justifica a continuidade dos trabalhos de avaliação de outros genótipos adaptados ao clima tropical em sua resposta ao cultivo *in vitro*. A importância de se possuir genótipos que combinem as qualidades citadas tem estimulado pesquisadores a desenvolverem programas de melhoramento com dois enfoques básicos: a) transferência do caráter (capacidade de produção de calos do Tipo II) para genótipos de grande importância comercial, e b) avaliação de genótipos superiores do ponto de vista agrônomo ("materiais elite"), para identificação dos mais favoráveis ao cultivo *in vitro* (TOMES & SMITH, 1985; VASIL & VASIL, 1986).

As demais linhagens apresentaram, em sua maioria, a formação de calos não-embriogênicos, com morfologia

indiferenciada. É importante ressaltar o comportamento dos calos induzidos de explantes das progênies S3 derivadas da raça Zapalote Chico (calos com morfologia indiferenciada, e elevada taxa de crescimento), recordando a suposição levantada por PHILLIPS (1986), segundo a qual genótipos com elevado conteúdo de knobs cromossômicos poderiam apresentar maior instabilidade citogenética durante a fase de cultivo *in vitro*. Um ponto a ser discutido seria o fato de que culturas altamente instáveis do ponto de vista genético e citogenético poderiam ser incapazes de regenerar plantas, ou mesmo de apresentar qualquer reorganização de tecidos e/ou morfogênese. Os calos observados realmente possuíam um crescimento rápido e uma morfologia indiferenciada, e o fato de não terem sido utilizados para a verificação da ocorrência de possíveis aberrações cromossômicas nos leva a sugerir a elaboração de futuros trabalhos para a verificação da referida hipótese.

5.2. Avaliação da instabilidade mitótica

5.2.1. Análise de anáfases em células dos calos

Esta análise envolveu duas etapas distintas:

Em primeiro lugar, foi realizado um levantamento da ocorrência de pontes e outras anormalidades cromossômicas em anáfases mitóticas (iniciais, típicas e finais) em regiões pró-embriogênicas e meristemáticas dos calos de algumas linhagens selecionadas, com o objetivo de se avaliar o comportamento de cada uma com relação à instabilidade cromossômica decorrente da passagem pela fase de calo.

O segundo estudo foi realizado com algumas destas linhagens e teve por objetivo a determinação do possível envolvimento das regiões dos knobs cromossômicos

heterocromáticos com a formação de pontes anafásicas em células dos calos. Para tanto, foi utilizada a metodologia do bandamento-O e alguns dos genótipos mais intensamente analisados no estudo anterior.

5.2.1.1. Avaliação de linhagens com diferentes composições de knobs cromossômicos

A classificação dos diversos tipos de anormalidades cromossômicas observadas nas anáfases possibilitou a análise dos seguintes pontos, relacionados com a determinação do grau de instabilidade mitótica dos calos dos genótipos envolvidos neste estudo:

Como é observado nas Tabelas 34, 35, 36 e 37, as figuras mais adequadas para a avaliação das anormalidades cromossômicas nos calos foram as anáfases iniciais e típicas. Nestes estágios, as anáfases permitem a identificação de aberrações de maneira mais precisa, em comparação com anáfases finais, onde os cromossomos dispõem-se de forma mais aglomerada e com maior grau de descondensação, prejudicando a perfeita visualização da morfologia dos mesmos.

De acordo com os resultados das análises citadas, pode-se observar que algumas evidências tornam-se bastante consistentes. A linhagem 44114/2 foi a que apresentou menor frequência de formação de pontes cromossômicas e menor frequência das anormalidades observadas nas anáfases mitóticas, entre todos os materiais analisados.

É importante recordar as observações levantadas por PHILLIPS et alii (1988), de que a indução dos diferentes tipos de calos pode ocorrer a partir das mesmas células iniciais dos explantes, influenciadas pelas condições ambientais de cultivo *in vitro*. Esta suposição relaciona-se diretamente com o comportamento apresentado pelos calos

induzidos a partir de explantes da linhagem 44114/2, mencionando-se uma vez mais que eles foram selecionados a partir de setores friáveis surgidos na superfície de calos originalmente não-embriogênicos, com morfologia mucilaginosa.

As duas linhagens que apresentaram maior frequência de ocorrência de pontes cromossômicas e outras anormalidades nas anáfases iniciais e típicas foram: 131312/1 e 132331/1, respectivamente. Estas linhagens foram algumas das que apresentaram melhor desempenho no cultivo *in vitro*, com elevada taxa de indução de calos friáveis, altamente embriogênicos, do Tipo II. Conforme já discutido na revisão de literatura, diversos autores (ARMSTRONG & PHILLIPS, 1988 e SOMERS et alii, 1988) comentaram a possibilidade de haver uma relação entre o tipo de calo induzido e a maior taxa de ocorrência de anormalidades mitóticas, principalmente relacionado à elevada taxa de crescimento dos calos do Tipo II. Entretanto, é de se notar que explantes da linhagem 41242/2 formam um tipo de calo com características bem distintas, apresentando morfologia mucilaginosa e que é classificado como não-embriogênico. Tal linhagem apresentou frequências elevadas de formação de pontes e outras anormalidades cromossômicas nas anáfases, comparáveis às apresentadas pelas linhagens anteriores. Em adição a este fato, pode-se observar que o grupo de linhagens que apresentou comportamento intermediário com relação à ocorrência de anormalidades mitóticas e formação de pontes anafásicas apresenta tanto linhagens que induzem calos do Tipo II, tais como: 13151/1, 131311/1 e 13153/1, como também linhagens que formam calos não-embriogênicos e com morfologia mucilaginosa, tais como os genótipos: 21241/1, 41123/2 e 44133/2. Estes dados indicam que a relação existente entre o tipo de calos induzidos e a ocorrência de instabilidade mitótica deve ser complexa, necessitando de análises adicionais para a determinação da correlação existente entre os caracteres descritos.

Foi verificado que as pontes anafásicas se originaram predominantemente em braços cromossômicos contendo knobs (comprovado pelas observações de figuras coradas pela metodologia de bandamento-C, descritas a seguir). No entanto, os genótipos que possuem maior conteúdo de knobs heterocromáticos não apresentaram as maiores freqüências de formação de pontes cromossômicas. A linhagem 44114/2 é a que apresenta bandas-C (correspondentes aos knobs heterocromáticos) em maior número de posições nos cromossomos entre todas as linhagens incluídas no presente estudo (veja Tabelas 34 a 37). Como observado nos resultados, este genótipo apresentou a menor freqüência de formação de pontes anafásicas ou outras anormalidades mitóticas nos calos analisados. Com um raciocínio semelhante, observa-se que as linhagens com menor conteúdo de knobs, pertencentes à sub-família 300-133 (linhagens 13351/2, 133512/2 e 133112/2) apresentaram instabilidade mitótica em maior amplitude, variando de valores próximos a extremos opostos.

As linhagens pertencentes a uma mesma sub-família e que apresentam composições de bandas-C (correspondentes aos knobs cromossômicos heterocromáticos) diferentes entre si representam um tipo de material bastante adequado para a determinação das possíveis influências genéticas exercidas pelos knobs heterocromáticos em milho. Como comentado anteriormente, as linhagens pertencentes à uma mesma sub-família devem possuir uma acentuada homogeneidade genética. Assim, as linhagens com composições de knobs diferentes, dentro de uma sub-família, poderão apresentar diferenças em relação aos lócos das proximidades dos knobs contrastantes. Este raciocínio poderia ser aplicado para algumas das linhagens utilizadas neste estudo, tais como:

Sub-família 300-133: linhagens 133131/3 e 13333/1, com presença do knob localizado no braço longo do cromossomo 3, e linhagens 133112/2, 13351/2 e 133512/2, com

ausência do referido knob heterocromático.

Sub-família 303-441: linhagem 44114/2, com presença do knob localizado no braço curto do cromossomo 7 e linhagem 44133/2, com ausência do referido knob.

De acordo com este raciocínio, os resultados obtidos mostraram os seguintes aspectos:

As linhagens da sub-família 300-133 apresentaram um comportamento muito variável, existindo genótipos com freqüências de formação de pontes anafásicas próximas dos valores extremos. Os dados obtidos mostram uma aparente ausência de relação entre a presença de knob no braço longo do cromossomo 3 e a formação de pontes nas anáfases mitóticas de calos das linhagens testadas. A freqüência de formação de pontes foi inferior (em torno de 4% a 5% das anáfases iniciais + típicas) tanto para as linhagens 133512/2 e 13351/2, que não possuem o knob, como para a linhagem 133131/3, homozigótica para a sua presença. Em contraste à esta observação, as linhagens 13333/1 e 133112/2 apresentam taxas mais elevadas (entre 6% e 7% das anáfases iniciais + típicas) embora sejam, respectivamente, homozigóticas para a presença e para a ausência do referido knob.

Com relação à sub-família 303-441, os resultados devem ser considerados com maior cuidado, uma vez que foram avaliadas somente duas linhagens, diferentes entre si para a presença de knob no braço curto do cromossomo 7. A freqüência de formação de pontes anafásicas em células dos calos induzidos a partir do genótipo homozigótico para a ausência do knob (linhagem 44133/2) foi aproximadamente o dobro da freqüência de ocorrência de pontes cromossômicas em anáfases (iniciais + típicas) apresentada pelas células dos calos da linhagem homozigótica para a presença de knobs heterocromáticos para a referida posição (linhagem 44114/2).

O predomínio de aberrações cromossômicas estruturais envolvendo ambos os braços do cromossomo 7, como observado na análise de metáfases descrita adiante, poderia ser um indicativo do possível papel desempenhado por este cromossomo ou por suas regiões heterocromáticas na ocorrência das anormalidades verificadas. Entretanto, os resultados obtidos parecem ser contraditórios ao relacionar a presença de knobs neste cromossomo e a ocorrência de anormalidades em anáfases dos calos analisados. O primeiro fato foi descrito acima, a respeito da freqüência muito superior de formação de pontes anafásicas na linhagem 44133/2, que não apresenta o knob localizado no braço curto deste cromossomo. Em adição, deve-se lembrar que as linhagens pertencentes às sub-famílias 300-131 e 300-132 também possuem uma constituição genética semelhante e a mesma composição de bandas-C. Estas linhagens apresentam, como mencionado anteriormente, bandas-C em ambos os braços do cromossomo 7 e também no braço curto do cromossomo 9, além daquelas localizadas nos braços longos dos cromossomos 6 e 8. Os resultados mostraram que as freqüências de formação de pontes anafásicas e de ocorrência das diversas anormalidades mitóticas observadas foram sensivelmente elevadas nestes genótipos. Em todas as análises realizadas para as anáfases iniciais e típicas, entre as mais instáveis sempre estavam presentes as linhagens 131312/1 e 132331/1.

5.2.1.2. Análise de pontes cromossômicas através da coloração pelo bandamento-C

Os resultados obtidos através do emprego da metodologia de bandamento-C revelaram diversos aspectos do envolvimento das regiões dos knobs heterocromáticos na formação de pontes e na ocorrência de quebras de cromátides em anáfases mitóticas de regiões pró-embriogênicas dos calos analisados.

Foi observado um evento caracterizado pelo atraso na separação de cromátides irmãs, e que, pelo fato de apresentar uma aparente aderência de braços cromossômicos ao nível das regiões contendo knobs, foi considerado como um evento preliminar. A partir do referido evento, começaria a existir uma tensão nas cromátides durante a migração dos centrômeros para os pólos opostos, o que possibilitaria a ocorrência de quebras. Diversas figuras anafásicas comprovam que a região relacionada com o referido evento é muito coesa e com grande resistência à separação normal das cromátides envolvidas. Foram observadas anáfases onde as extremidades envolvidas com o evento aparentemente não mostravam alterações, enquanto a porção localizada entre o knob e o centrômero apresentava regiões com pronunciada descondensação, como resultado da forte tensão sofrida. Esta descondensação foi observada, em alguns casos, até mesmo em dois ou três pontos diferentes ao longo das referidas cromátides. A ocorrência de knobs nos locais de atraso na separação de cromátides foi comprovada pela utilização da metodologia de bandamento-C. Foram analisados materiais que apresentam bandas-C em posição telomérica. Neste caso, a coloração diferencial da heterocromatina dos knobs não foi prejudicada pela presença de regiões eucromáticas com maior grau de condensação, como observado quando as cromátides envolvidas com a formação do evento apresentam knobs em posições intersticiais.

A análise de um grande número de anáfases com estas configurações permitiu a constatação de algumas características interessantes. Algumas anáfases apresentaram bandas (envolvidas com a formação de pontes) com dimensões variáveis, desde um tamanho aparentemente normal até a presença de bandas muito pequenas ou mesmo inexistentes (veja Figura 25). Foi considerado que estes eventos foram decorrentes de sucessivos ciclos de formação de pontes, com perda gradual das regiões heterocromáticas dos knobs.

A ocorrência de pontes cromossômicas simples ou duplas (duas pontes na mesma anáfase), com ausência de bandas na sua extensão foi detectada em todos os materiais analisados. Seguindo os raciocínios anteriores, elas poderiam ser conseqüências da quebra de cromátides em regiões eucromáticas localizadas entre o knob e o centrômero. Caso estas extremidades quebradas não tenham sido "cicatrizadas" durante a intérfase posterior, poderia ocorrer a fusão delas após a duplicação de cromátides. Isto resultaria na formação de uma cromátide dicêntrica e, desse modo, novamente ocorreria a formação de pontes anafásicas, conforme mencionado nos trabalhos pioneiros de McCLINTOCK (1938; 1939 e 1941) descrevendo o ciclo de quebra-fusão-ponte em células de milho. Segundo a autora, o processo consistiria de: a) quebra cromossômica, b) replicação do braço com extremidade quebrada, c) fusão das cromátides irmãs ao nível das extremidades quebradas, devido à ausência das seqüências teloméricas, formando uma cromátide dicêntrica, d) formação de uma ponte na anáfase, e e) repetição da primeira etapa.

A ocorrência de pontes anafásicas poderia ser detectada, portanto, em vários ciclos mitóticos das células filhas a partir de um evento preliminar único. A viabilidade de cada célula resultante passaria a ser influenciada pelo grau de anormalidade existente. É de se esperar que as células contendo cromossomos com duplicações tenham mais condições de sobreviver por algumas gerações do que células contendo cromossomos que tenham sofrido deleções em regiões muito extensas (RHOADES & DEMPSEY, 1973; 1982 e 1983). A população de células que estaria se diferenciando em embriões somáticos ou em regiões meristemáticas dos calos seria, portanto, composta de tipos celulares diferentes entre si em uma taxa que dependeria, a princípio, dos seguintes fatores: a) freqüência da ocorrência de pontes anafásicas, ou dos eventos considerados preliminares, de atraso na separação de cromátides irmãs; b) grau ou extensão

dos rearranjos causados pela quebra de cromátides, seja devido à deleção, duplicação e/ou translocação de regiões cromossômicas gênicas (que influenciaria na capacidade das células aberrantes sobreviverem e participarem na diferenciação dos tecidos e na morfogênese dos calos); c) ocorrência de mutações gênicas, pela ativação de elementos de transposição; d) possibilidade das extremidades quebradas se "cicatrizarem", cessando o ciclo de quebra-fusão-ponte; e) interações destes eventos com as condições ambientais de cultivo *in vitro*, entre outros.

De todas estas influências, talvez a que desperta maior atenção e suscita maior especulação vem a ser a possibilidade das extremidades quebradas das cromátides envolvidas na formação de pontes anafásicas cicatrizarem-se após determinado período de tempo. É importante lembrar que, em seus artigos a respeito do ciclo de quebra-fusão-ponte em células de milho, McCLINTOCK (1938; 1939 e 1941) comentou que se o cromossomo sofresse quebra em uma anáfase meiótica anterior e esta célula chegasse a participar da formação do endosperma, tanto através do gametófito masculino como do feminino, o ciclo continuaria em sucessivas divisões nucleares durante o desenvolvimento do tecido do endosperma. Entretanto, segundo a autora, cromossomos quebrados de células que participassem dos núcleos zigóticos, tanto pelo lado do tubo polínico como da oosfera, não resultariam em configurações de pontes nas divisões nucleares sucessivas do tecido esporofítico. As extremidades quebradas se cicatrizariam, e haveria uma completa paralização do ciclo de quebra-fusão-ponte. Deste modo, o ciclo estaria confinado aos tecidos gametofíticos e do endosperma nas gerações imediatamente seguintes à quebra cromossômica inicial. A cicatrização das extremidades quebradas no esporófito embriônico seria, de acordo com as evidências apresentadas pela autora, permanente. Quando um cromossomo com a extremidade quebrada já cicatrizada

fosse introduzido nos tecidos gametofíticos ou do endosperma nas gerações seguintes, não ocorreria nenhum evento de fusão de extremidades quebradas de cromátides irmãs ou entre dois cromossomos que apresentavam tal característica anteriormente.

Este comportamento das extremidades quebradas de cromossomos de milho foi observado através da análise de padrões de variegação do endosperma de sementes (veja uma descrição completa em McCLINTOCK, 1941). O método proposto baseou-se na análise de genes marcadores dominantes presentes no braço cromossômico contendo quebras e permitiu a determinação de eventos de deleção ou duplicação das regiões contendo os genes após sucessivos ciclos de quebra-fusão-ponte. Dependendo do local de quebra da ponte, um ou mais marcadores poderiam ser perdidos ou duplicados a cada divisão nuclear no endosperma. O ciclo de quebra-fusão-ponte não foi observado em tecidos esporofíticos (McCLINTOCK, 1938 e 1939). Aparentemente, um processo presente no embrião, mas ausente no endosperma ou gametófito, causaria uma cicatrização da extremidade quebrada. McCLINTOCK (1941) ponderou que os fatores responsáveis pela fusão ou pela cicatrização provavelmente estariam relacionados com o método pelo qual os cromossomos se quebram e pelas condições fisiológicas envolvendo a extremidade quebrada. O processo de cicatrização é reconhecido atualmente como sendo uma adição de um novo telômero à extremidade quebrada (McCLINTOCK, 1984).

Foi observado que as pontes tendem a sofrer quebras no mesmo local em sucessivas divisões (McCLINTOCK, 1941), com uma indicação de que as fusões das cromátides irmãs após as quebras poderiam ser frágeis ou incompletas. Em adição, SCHWARTZ & MURRAY (1957) sugeriram que fusões incompletas ocorrem freqüentemente, resultando em configurações de anáfases normais ao invés da ocorrência de cromátides dicêntricas. MILES (1971) verificou que certas cromátides dicêntricas sempre quebravam ao nível do sítio de quebra original, durante o

desenvolvimento do endosperma. O autor verificou que quebras em regiões heterocromáticas algumas vezes mostraram uma completa ausência de perdas genéticas associadas com o ciclo de quebra-fusão-ponte. Assim, de acordo com CARLSON (1988), a expectativa de serem produzidos cromossomos com complexas deficiências e duplicações, como resultado de quebras das pontes aleatoriamente poderia não ser sempre verdadeira.

Além do ciclo descrito, com produção de cromátide dicêntrica e envolvendo a fusão entre extremidades quebradas de cromátides do mesmo cromossomo, denominado de ciclo da cromátide, McCLINTOCK (1942; 1951 e 1978) demonstrou a existência de um ciclo do cromossomo. Segundo a autora, se dois cromossomos contendo quebras fossem introduzidos no zigoto, um através do tubo polínico e o outro através do saco embrionário, haveria uma freqüente fusão das extremidades quebradas dos diferentes cromossomos, formando um dicêntrico. A ponte dicêntrica resultante abrangeria dois centrômeros diferentes (e não cromátides de um centrômero duplicado, como no caso anterior), sendo que na anáfase haveria a formação de duas pontes. A quebra das pontes enviaria dois cromossomos com extremidades quebradas para cada polo. A fusão dos cromossomos quebrados produziria novamente um dicêntrico, e a formação subsequente de pontes duplas pelo dicêntrico reiniciaria o ciclo. McCLINTOCK (1942 e 1978) observou que o ciclo do cromossomo depende da habilidade com que as extremidades quebradas dos cromossomos fundem-se entre si, uma propriedade conhecida como "viscosidade". Segundo a referida autora, esta fusão aparentemente deveria ocorrer antes da síntese de DNA, uma vez que dois cromossomos quebrados não resultaram em dois ciclos da cromátide separadamente. Além disto, a fusão deveria ter ocorrido antes do processo de cicatrização esporofítica, uma vez que o ciclo do cromossomo pôde ser encontrado tanto em tecidos esporofíticos como no endosperma. Entretanto, foi observado que o ciclo freqüentemente cessou com o

desenvolvimento do esporófito, resultando na produção de dois cromossomos estáveis a partir do dicêntrico.

Existem evidências na literatura de que um ciclo da cromátide pode ser convertido espontaneamente em um ciclo do cromossomo (SCHWARTZ & MURRAY, 1957), embora sejam considerados eventos distintos. A análise do comportamento de cromossomos quebrados durante o desenvolvimento do endosperma mostrou que anáfases com pontes simples (padrão de ciclo da cromátide) sofreram modificações para ocorrência de pontes duplas (padrão de ciclo do cromossomo). Os autores comentaram que pontes simples ocasionalmente resultam em não-disjunção ao invés de quebras na anáfase. A migração de ambos os centrômeros para o mesmo polo estabeleceria o ciclo de quebra-fusão-ponte do tipo cromossômico nas divisões seguintes (SCHWARTZ & MURRAY, 1957).

Com relação às observações descritas no presente trabalho, pode-se dizer que muitos aspectos são semelhantes aos observados pelos vários autores mencionados. Entretanto, por representarem eventos observados em células cultivadas *in vitro*, onde mesmo os aspectos básicos de avaliação do fenótipo dos tecidos merecem ainda ser melhor considerados, faz-se necessária a realização de muitos outros estudos para o melhor conhecimento do mecanismo responsável pela ocorrência e pelo comportamento das anormalidades mitóticas ao longo das sucessivas gerações celulares.

5.2.2. Análise de metáfases mitóticas

No presente estudo, foram analisados dois tipos de materiais:

- a) meristemas radiculares de sementes da geração R1 das variedades Piranão de Inverno e Jac-Duro, e
- b) regiões pró-embriogênicas de calos derivados de linhagens endogâmicas com knobs determinados.

5.2.2.1. Meristemas radiculares de progênies de plantas regeneradas

O primeiro grupo de materiais foi utilizado para a verificação de possíveis aberrações numéricas existentes em progênies de plantas regeneradas que apresentaram variações fenotípicas em relação à variedade original. A análise mostrou o predomínio de células diplóides normais (acima de 70% em todos os materiais). A ocorrência de células com número de cromossomos inferior ao diplóide ($2n=20$) sugeriu a possível ocorrência de rompimento de células durante o preparo de lâminas. Estes possíveis desvios foram minimizados com o emprego de tratamento enzimático (solução de pectinase a 2.5% por 5 a 10 minutos) e com coloração do citoplasma com Fast-Green. As evidências mais claras de anormalidades decorrentes do cultivo *in vitro* foram observadas em células dos materiais R1-(PI) 369 B12 G2 e R1-(PI) 369 B3 G3. Estas anormalidades, representadas pela ocorrência de células com elevado grau de ploidia e diversas aberrações nucleares (no primeiro material) e de células aneuplóides onde os cromossomos homólogos permaneciam dispostos aos pares, em metáfases mitóticas (no segundo material), apareceram sempre na forma de setoriamento, isto é: algumas células da mesma planta eram aparentemente normais enquanto outras apresentavam as aberrações. Outros trabalhos relatando setoriamento em plantas de milho regeneradas *in vitro* (EDALLO et alii, 1981; McCOY & PHILLIPS, 1982 e ARMSTRONG & PHILLIPS, 1988) dão suporte à idéia de que tal evento pode ter duas explicações primárias: elas podem ser uma evidência da origem multicelular das plantas regeneradas, seja por organogênese ou por embriogênese somática. Assim, células com número de cromossomos diferentes poderiam participar da diferenciação de uma mesma planta e inclusive da formação das inflorescências e dos gametas e serem transmitidas às progênies. A segunda idéia seria a evidência de que as

células cultivadas *in vitro* poderiam sofrer influência de agentes desestabilizadores do genoma, mesmo após a diferenciação em tecidos dos embriões somáticos ou dos órgãos da planta completa. As hipóteses poderiam ser comprovadas através da análise sistemática da estabilidade ou instabilidade cromossômica em plântulas em desenvolvimento durante o cultivo *in vitro*. Por exemplo, em meristemas radiculares surgidos diretamente a partir de calos organogênicos, ou então, pela germinação dos embriões somáticos.

5.2.2.2. Regiões embriogênicas de calos

Os materiais utilizados para esta análise foram calos friáveis, altamente embriogênicos, induzidos a partir de explantes de algumas linhagens endogâmicas com knobs cromossômicos determinados. O objetivo foi a avaliação da ocorrência de aberrações cromossômicas estruturais, através da utilização da metodologia de bandamento-C em metáfases mitóticas dos calos selecionados. Foram observadas diversas figuras comuns entre os materiais analisados. Em sua maioria, as figuras analisadas representam evidências do envolvimento direto ou indireto das regiões dos knobs heterocromáticos com a ocorrência de pontes cromossômicas em anáfases mitóticas durante o cultivo *in vitro*.

As figuras observadas com maior frequência apresentaram um predomínio de aberrações para o cromossomo 7. A análise através da metodologia de bandamento-C mostrou que algumas metáfases apresentavam um dos homólogos do referido cromossomo com a banda-C do braço curto localizada em posição intersticial, enquanto o outro apresentava-a na posição normal, telomérica. É muito provável que este evento tenha surgido através da ocorrência de quebras de cromátides envolvidas com a formação de pontes. Uma possível explicação para a ocorrência

desta figura relaciona-se com as descrições de McCLINTOCK (1938; 1939 e 1941), na análise dos padrões de variação do endosperma de sementes de milho contendo um dos cromossomos 9 com rearranjos induzidos por raios-X na fase meiótica imediatamente anterior à fertilização dos gametas. Assim, caso a ponte tenha surgido ao nível do knob do braço curto do cromossomo 7 e a quebra ocorreu entre este knob e o centrômero, as cromátides resultantes assumiriam a morfologia característica das figuras apresentadas por este trabalho. O fato das bandas relacionadas com esta figura apresentarem dimensões aparentemente normais, no braço curto do cromossomo 7, pode ser devido à ocorrência de quebras dentro do knob heterocromático, anteriormente à quebra entre o knob e o centrômero. Este mecanismo proposto considera, portanto, que as extremidades quebradas não seriam "cicatrizadas" antes de algumas divisões celulares, ou seja, ocorreria um determinado número de ciclos quebra-fusão-ponte e todas as possíveis conseqüências mencionadas na hipótese.

Metáfases que apresentavam cromossomos 7 com a banda-C localizada no braço longo com dimensões muito grandes também foram observadas em todos os materiais analisados (veja Figura 28). Talvez esta figura tenha sido conseqüência de uma amplificação do DNA heterocromático dos knobs (veja trabalho de SHANG & WANG, 1991). A maioria destas figuras apresentou apenas um dos cromossomos com esta anomalia e o homólogo aparentemente normal. Conforme observações de McCLINTOCK (1939), esta figura poderia ser conseqüência de mecanismo análogo ao descrito anteriormente. Considerando-se que o knob localizado no braço longo do referido cromossomo esteja relacionado com a formação de ponte, e a quebra ocorresse em posição adjacente ao knob, entre este e o telômero. A fusão das extremidades quebradas produziria cromátides dicêntricas, contendo o knob com uma dimensão duplicada e aparentemente único. Se a quebra seguinte ocorrer na eucromatina localizada entre o knob e o centrômero,

haveria a formação de dois tipos de cromossomos com morfologias distintas: um contendo deleção para as regiões localizadas entre o knob e o telômero e entre o knob e a segunda quebra, e o outro com deleção para a primeira região, mas com duplicação para a segunda. Esta última figura seria semelhante à observada no presente trabalho, onde as metáfases analisadas apresentaram o braço longo do cromossomo 7 contendo a banda com dimensão ampliada, e em posição intersticial.

Com relação a algumas metáfases observadas (onde um dos cromossomos 7 apresentou o braço curto com tamanho pronunciado e contendo duas bandas-C, enquanto o homólogo pareceu possuir tamanho e morfologia normais, com apenas a banda-C telomérica no referido braço cromossômico), foi elaborada a seguinte hipótese para explicar a sua origem: o knob localizado no braço curto do cromossomo 7 estaria relacionado com a formação de ponte anafásica, que resultaria na quebra de cromátides. Se esta quebra ocorresse dentro da heterocromatina do referido knob e as extremidades quebradas não fossem cicatrizadas, haveria a produção de cromátide dicêntrica. Na anáfase seguinte, ocorreria novamente ponte, e conseqüentemente, quebras de cromátides. Se a quebra ocorresse entre o knob e o centrômero, os cromossomos resultantes seriam: um com deficiência e o outro com duplicação para a região localizada entre o local desta última quebra e o local de fusão de cromátides do ciclo anterior. A célula contendo o cromossomo com duplicação (portanto, contendo o knob heterocromático) poderia formar novamente ponte cromossômica na próxima anáfase, considerando-se novamente a fusão das extremidades quebradas e a formação de cromátide dicêntrica. Se a conseqüente quebra ocorresse entre o centrômero e um dos knobs duplicados, o resultado seria a produção de: cromátide com deleção para uma grande extensão do braço curto do referido cromossomo, e uma figura semelhante à apresentada por este trabalho (veja a Figura 29).

A observação de metáfases onde cromossomos homólogos apresentavam aderências ao nível dos knobs foi interessante sob o ponto de vista de que análises anteriores (com células de meristemas radiculares de sementes R1 provenientes das variedades Piranão de Inverno e Jac-Duro) haviam mostrado eventos semelhantes. Algumas metáfases daqueles materiais apresentavam os cromossomos dispostos aos pares, com a ressalva de que o método de coloração empregado não tenha permitido a visualização de bandas-C (correspondentes aos knobs heterocromáticos) nos braços cromossômicos envolvidos.

É importante mencionar que as hipóteses enunciadas para a explicação das diferentes aberrações observadas em mitoses de regiões pró-embriogênicas dos calos analisados no presente trabalho são preliminares e refletem um estágio inicial de estudo. Deve-se ressaltar que todas estas estão sujeitas à uma confirmação através de outros experimentos, com uma amostragem maior de figuras mitóticas e, principalmente, através do uso de outros marcadores genéticos e/ou citogenéticos e metodologias que assegurem uma perfeita conclusão sobre os mecanismos responsáveis pela origem das anormalidades descritas.

5.3. Cultivo de suspensões celulares

Este método de cultivo *in vitro* representa um passo em direção ao estudo de protoplastos. São reconhecidas as suas vantagens de: controle das condições de cultivo, ausência de microrganismos contaminantes, habilidade de crescimento em meios de cultura de composição definida e manutenção da totipotência celular mesmo em culturas de longa duração (veja revisão em STREET, 1973). Aliado a estas características, está o fato de que suspensões celulares finamente dispersas representam um tipo de material muito apropriado para

experimentos de isolamento de protoplastos. Em comparação a outros tecidos vegetais que poderiam ser utilizados com este objetivo, a suspensão celular possui as qualidades de representar uma população muito grande de microcalos de dimensões bastante reduzidas, o que torna mais eficiente o tratamento enzimático para a remoção da parede celular. Suspensões induzidas a partir de algumas linhagens celulares apresentam uma elevada taxa de crescimento, e manutenção da capacidade de regeneração de plantas por mais de um ano de cultura (SOMERS et alii, 1988).

Os experimentos realizados com o objetivo de se estabelecer suspensões celulares a partir das linhagens celulares com desempenho superior ao cultivo *in vitro* produziram resultados positivos. Nesta etapa preliminar, cujos testes empregaram o material "calo 57" (descrito anteriormente), foram determinados os procedimentos básicos em cada uma das etapas deste tipo de cultivo. As atividades estabelecidas foram baseadas em relatos da literatura, mencionados na revisão bibliográfica. Para aquele genótipo, foi observado que o meio de cultura N6, modificado para a presença dos aminoácidos L-prolina e L-asparagina, produziu suspensões celulares finamente dispersas em menor período de tempo e com qualidades superiores, em relação aos demais meios de cultura testados. O resultado foi coerente com o apresentado por outros autores (GREEN et alii, 1983 e KAMO & HODGES, 1986) e demonstram a importância de se determinar o papel metabólico dos aminoácidos livres e de outras substâncias que possam influenciar positivamente nas respostas das culturas de células vegetais *in vitro*.

Em uma etapa posterior, foram testados outros genótipos com respostas superiores ao cultivo *in vitro* (elevada frequência de formação de calos do Tipo II), assim como outros com comportamento contrário, isto é, materiais que induziram a formação de calos não-embriogênicos.

Os resultados obtidos mostraram que ambos os grupos de materiais são capazes de formar suspensões. Embora os calos do Tipo II das linhagens 131311/1 e 132331/1 tenham produzido suspensões após um período de tempo relativamente maior (cerca de 4 meses), este resultado foi semelhante ao observado com outros genótipos superiores apresentados na literatura (veja relatos de VASIL & VASIL, 1986; 1987; KAMO & HODGES, 1986; SHILLITO et alii, 1989 e PRIOLI & SONDAHL, 1989).

Os calos não-embriogênicos (derivados das linhagens 21241/1 e 41242/2) produziram suspensões após apenas um mês de inoculação em meio de cultura líquido. Estes cultivos não são adequados para o isolamento de protoplastos (pois não apresentam totipotência celular), no entanto, podem ser utilizados nos mesmos experimentos na forma de células nutrizas, uma vez que apresentam elevada taxa de crescimento e grande viabilidade ao cultivo por longos períodos de tempo. Esta sugestão é baseada em dados da literatura, relatando o uso de suspensões não-embriogênicas na forma de células nutrizas para o cultivo de protoplastos isolados a partir de suspensões totipotentes (RHODES et alii, 1988a e b).

Com relação aos calos do Tipo II derivados da linhagem 44114/2, foi observada a produção de suspensões finamente dispersas em um período de tempo relativamente curto (2 meses após a inoculação em meio líquido). Estas culturas apresentaram um crescimento muito pronunciado, em torno de 3 a 4 vezes no período de 7 dias. Os calos que deram origem a estas suspensões estão sendo mantidos em meio de cultura sólido e conservam sua capacidade embriogênica após mais de 18 meses de cultivo *in vitro*. Este genótipo apresenta características muito favoráveis que justificam a sua utilização em futuros trabalhos de isolamento e cultivo de protoplastos.

6. CONCLUSÕES

Os resultados apresentados no presente trabalho comprovam que foi completamente padronizada e implantada a metodologia de cultivo *in vitro* de calos de milho induzidos a partir de escutelos de embriões imaturos no laboratório de Citologia do Depto. de Genética da ESALQ/USP. Os experimentos preliminares, realizados com as variedades Piranão de Inverno e Jac-Duro permitiram que fossem analisados vários aspectos da cultura de tecidos de milho. O primeiro ponto foi a verificação da necessidade de se possuírem genótipos com elevada taxa de indução de calos embriogênicos, altamente regeneráveis e estabelecer metodologias de cultivo que obtenha a máxima resposta destes materiais. Um outro aspecto foi a observação de variabilidade fenotípica nas progênie de plantas regeneradas. Este fato conduziu os trabalhos no sentido de se estudar as causas de tais modificações, através da avaliação da instabilidade mitótica em meristemas radiculares de plantas regeneradas e nos calos cultivados *in vitro*.

As análises preliminares serviram de base para a elaboração dos experimentos com quatro famílias de linhagens endogâmicas com diferentes composições de knobs cromossômicos, enfoque principal do presente trabalho.

A avaliação da capacidade de indução de calos embriogênicos nas referidas linhagens endogâmicas mostrou que os genótipos pertencentes à família 300-1-3 apresentam um comportamento muito favorável, com uma alta frequência de formação de calos friáveis, altamente embriogênicos. Algumas linhagens pertencentes à referida família foram testadas na sua

capacidade de regenerar plantas e os resultados obtidos foram satisfatórios, tanto com relação à aclimatação das plantas regeneradas como com relação à fertilidade das mesmas. Estes genótipos também foram utilizados em experimentos de cultivo em meios líquidos e produziram suspensões celulares finamente dispersas e com grande crescimento. As linhagens pertencentes às famílias 301-2-1 e 303-4-1 apresentaram resultados semelhantes entre si, com formação de calos do tipo não-embriogênicos, mucilaginosos. Com relação à família 303-4-4, os resultados obtidos foram variáveis: algumas linhagens testadas produziram calos não-embriogênicos, enquanto que outras apresentaram a formação de linhagens celulares com características muito favoráveis (linhagens 44114/1 e 44114/2). Estas linhagens celulares induzidas eram friáveis, com intenso crescimento, altamente embriogênicas e permitiram sua utilização em outros experimentos, de verificação da ocorrência de anormalidades cromossômicas em anáfases mitóticas dos mesmos e em experimentos de obtenção e cultivo de suspensões celulares, com resultados promissores em ambos os aspectos (pequena taxa de ocorrência de aberrações cromossômicas nos calos e rápido estabelecimento de suspensão celular).

Para a avaliação da ocorrência de aberrações cromossômicas em células de calos, também foi necessária uma fase de estabelecimento de procedimentos para a implantação da metodologia. Todas as atividades básicas, como a frequência de subcultivos antes da coleta dos calos, a determinação das condições de maceração com soluções enzimáticas e o método de preparação de lâminas, foram estabelecidas no laboratório. Os experimentos preliminares revelaram a existência de diversas anormalidades mitóticas em células de calos e mostraram que a frequência de sua ocorrência é variável entre os materiais.

A classificação dos tipos de aberrações e a determinação das melhores fases da divisão mitótica para esta avaliação permitiu a constatação de diferenças entre os

genótipos, com relação às freqüências de ocorrência de aberrações cromossômicas (pontes anafásicas e outras anormalidades estruturais).

Os dados obtidos permitem a conclusão de que as regiões dos knobs heterocromáticos dos cromossomos de milho devem estar relacionadas com a ocorrência de pontes anafásicas. Análises através da metodologia de bandamento-C mostraram que as pontes se originam em braços cromossômicos que possuem knobs heterocromáticos. Entretanto, as linhagens avaliadas que apresentam maior conteúdo de knobs (determinado através da presença de bandas-C em metáfases mitóticas) não apresentaram maior freqüência de formação de pontes nas anáfases dos calos analisados. Em adição, diversas das linhagens que apresentaram maior freqüência de formação de pontes anafásicas pertencem à família 300-1-3, que produzem predominantemente calos do Tipo II, friáveis, altamente embriogênicos. É interessante notar que dentro desta família existem materiais com elevado grau de endogamia e selecionados para a presença e ausência de determinados knobs heterocromáticos. Pelo fato de representarem, desta forma, um tipo de material bem próximo de linhas isogênicas, os resultados obtidos mostraram que não houve uma correlação absoluta entre a presença de knobs heterocromáticos e a ocorrência de pontes anafásicas, para as posições de knobs avaliadas.

Aparentemente, não foi observada relação entre o tipo de calo induzido e a freqüência de formação de pontes nas anáfases em suas células. Em ambos os casos, tanto para materiais que produzem calos do Tipo II como para materiais que induzem calos não-embriogênicos, as freqüências de formação de pontes observadas foram semelhantes.

Houve uma certa predominância de aberrações estruturais envolvendo o cromossomo 7, em diversos dos materiais analisados através do bandamento-C. Em alguns materiais que apresentam bandas-C tanto no braço curto como no

braço longo deste cromossomo, a análise de metáfases mitóticas de calos mostrou que as aberrações estruturais podem atingir regiões relativamente extensas dos cromossomos.

A observação de diversos tipos de aberrações mitóticas, tais como a presença de pontes com bandas-C e sem bandas-C, bem como a presença de atraso na separação de cromátides irmãs e pontes típicas, parecem indicar a ocorrência de ciclos de quebra-fusão-ponte em células dos calos analisados. Foram identificadas figuras representativas dos diversos eventos envolvidos no referido ciclo, e com algumas indicações da existência de ambos os ciclos: da cromátide (produção de cromátide dicêntrica e com ocorrência de ponte simples nas anáfases) e do cromossomo (produção de cromossomo dicêntrico e com formação de duas pontes nas anáfases). Estas idéias e as hipóteses mencionadas no presente trabalho, para explicação da ocorrência das diversas figuras metafásicas descritas, devem ser consideradas como observações preliminares, sendo indispensável a elaboração de outras análises para a confirmação das mesmas.

Os experimentos para obtenção e cultivo de suspensões celulares a partir de calos friáveis, altamente embriogênicos e calos mucilaginosos, não-embriogênicos foram bem sucedidos no sentido de se determinar que o meio de cultura com composição salina de N6, e com presença dos aminoácidos L-prolina e L-asparagina era o mais adequado para este tipo de cultivo. Os genótipos testados produziram suspensões celulares finamente dispersas em período de tempo relativamente curto, ou seja, entre um e quatro meses. A obtenção de linhagens celulares friáveis, altamente embriogênicas, totipotentes e que mantém estas características por mais de 18 meses de cultivo deve ser considerada como de grande potencial para a utilização em experimentos de isolamento e cultivo de protoplastos.

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**(1): 23-30. Jan./Mar. 1985.
- AGUIAR-PERECIN, M.L.R. de & DECICO, M.J.U. Preliminary results on the segregation of knobs (C-bands) in inbred lines derived from a flint variety. *Maize Genetics Cooperation News Letter*, Columbia, **62**: 100, 1988.
- AGUIAR-PERECIN, M.L.R. de & FLUMINHAN Jr., 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 Jr., 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 & 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 Jr., 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, Ribeirão Preto, **14**(3): 73, Sept. 1991.

- ANDERSON, P.C.; GEORGESON, M.A.; HIBBERD, K.A. Cell culture selection of herbicide tolerant corn. In: ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN SOCIETY OF AGRONOMY, 76., Las Vegas, 1984. Abstracts. *Agronomy Abstracts*, Madison, 76: 56, 1984.
- 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, embryogenic tissue cultures of maize. *Crop Science*, Madison, 28(2): 363-9, Mar. 1988.
- BAKER, R.J. & NELDER, J.A. *The GLIM system. Release 3. Generalized linear interactive modelling*. Oxford, Numerical Algorithms Group, 1978. 213p.
- BALZAN, R. Karyotype instability in tissue cultures derived from the mesocotyl of *Zea mays* seedlings. *Caryologia*, Florence, 31(1): 75-87, Jan./Mar. 1978.
- BARTKOWIAK, E. Tissue cultures of maize. III. Plantlet regeneration from scutellar callus. *Genetica Polonica*, Warsaw, 23: 93-101, 1982.
- BAYLISS, M.W. Chromosomal variation in plant tissues in culture. In: VASIL, I.K., ed. *Perspectives in plant cell and tissue culture*. New York, Academic Press, 1980. p.113-44. (International Review of Cytology, Suppl. 11A).
- BECKERT, M. Research of genetic variability from *in vitro* culture in maize. Rennes, 1980. 71p. (Docteurment - École Nationale Supérieure de Agronomie de Rennes/ Université de Rennes).
- BECKERT, M. & QING, C.M. Results of a diallel trial and a breeding experiment for *in vitro* aptitude in maize. *Theoretical and Applied Genetics*, New York, 68(3): 247-51, 1984.
- BECKERT, M.; POLLACSEK, M.; QING, C.M. Etude de la variabilité génétique obtenue chez le maïs après callogénèse et régénération de plantes *in vitro*. *Agronomie*, Versailles, 3(1): 9-18, 1983.

- 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.
- BIANCHI, A.; SALAMINI, F.; PARLAVECCHIO, R. On the origin of controlling elements in maize. *Genetica Agraria*, Rome, **22**: 335-44, 1969.
- BOCK, M. & GREENBLATT, I. Karyotype stability of haploid and diploid maize root tissue cultures. *Maize Genetics Cooperation News Letter*, Columbia, **39**: 121-5, 1965.
- BOYER, C.D. & SHANNON, J.C. Chromosome constitution and cell division in in vitro cultures of *Zea mays* endosperm. *In Vitro*, Gaithersburg, **9**: 458-62, 1974.
- BRAR, D.S.; RAMBOLD, S.; GAMBORG, O.; CONSTABEL, F. Tissue culture of corn and sorghum. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, Stuttgart, **95**: 377-88, 1979.
- BRETTEL, R.I.S.; CONDE, M.F.; PRING, D.R. Analysis of mitochondrial DNA from four different maize lines obtained from a tissue culture carrying Texas cytoplasm. *Maize Genetics Cooperation NewsLetter*, Columbia, **56**: 13-4, 1982.
- BRETTEL, R.I.S.; DENNIS, E.S.; SCOWCROFT, W.R.; PEACOCK, W.J. Molecular analysis of a somaclonal mutant of maize alcohol dehydrogenase. *Molecular and General Genetics*, New York, **202**(2): 235-9, Feb. 1986.
- BROWN, W.L. Maize variability of potential interest to plant molecular geneticists. *Maydica*, Bergamo, **30**(2): 225-33, 1985.
- BRUNEAU, R. Regeneration in vitro a partir de cals d'embryons immatures de maïs. Aspects quantitatifs et transmission héréditaire. *Agronomie*, Versailles, **5**(7): 591-6, 1985.
- BURR, B. & BURR, F.A. Controlling-element events at the Shrunken locus in maize. *Genetics*, Chapel Hill, **98**(1): 143-56, May 1981.
- CAI, G.G.; KUO, C.S.; QIAN, Y.Q.; JING, R.X.; ZHOU, Y.L. Plant regeneration from protoplasts of corn (*Zea mays* L.). *Acta Botanica Sinica*, Beijing, **29**: 453-8, 1987.

- CARLBERG, I.; JONSSON, L.; BERGENSTRAHLE, A.; SODERHALL, K. Purification of a trypsin inhibitor secreted by embryogenic carrot cells. *Plant Physiology*, Rockville, 84(1): 197-200, May 1987.
- CARLSON, P.S. & POLACCO, J.C. Plant cell cultures: genetic aspects of crop improvement. *Science*, Washington, 188(4188): 622-5, May 1975.
- CARLSON, W.R. The cytogenetics of corn. In: SPRAGUE, G.F. & DUDLEY, J.W. ed. *Corn and corn improvement*. 2.ed. Madison, ASA/CSSA/SSSA, 1977. p.225-304. (Agronomy Monographs, 18).
- CARLSON, W.R. The cytogenetics of corn. In: SPRAGUE, G.F. & DUDLEY, J.W. ed. *Corn and corn improvement*. 3.ed. Madison, ASA/CSSA/SSSA, 1988. p.259-343. (Agronomy Monographs, 18).
- CARSWELL, G.K.; JOHNSON, C.M.; SHILLITO, R.D.; HARMS, C.T. Acetyl-salicylic acid promotes colony formation from protoplasts of elite maize inbreds. *Plant Cell Reports*, New York, 8(5): 282-4, 1989.
- CHALEFF, R.S. *Genetics of higher plants - applications of cell culture*. Cambridge, University Press, 1981. 275p.
- 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(4): 183-5, 1983.
- CHEN, C.C. The somatic chromosomes of maize. *Canadian Journal of Genetics and Cytology*, Ottawa, 11(3): 752-4, Sept. 1969.
- CHEN, L.J. & LUTHE, D.S. Analysis of proteins from embryogenic and non-embryogenic rice (*Oryza sativa* L.) calli. *Plant Science*, Limerick, 48(3): 181-8, 1987.
- CHOUREY, P.S. & ZURAWSKI, D.B. Callus formation from protoplasts of a maize cell culture. *Theoretical and Applied Genetics*, New York, 59(6): 341-4, 1981.
- CHOW, C. & LARTER, E.N. Centromeric banding in maize. *Canadian Journal of Genetics and Cytology*, Ottawa, 23(2): 255-8, 1981.
- 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.

- D AMATO, F. Cytogenetics of differentiation in tissue and cell culture. In: REINERT, J. & BAJAJ, Y.P.S., ed. *Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue and organ culture*. New York, Springer-Verlag, 1977. p.343-57.
- D AMATO, F. Chromosome number variation in cultured cells and regenerated plants. In: THORPE, T.A., ed. *Frontiers of plant tissue culture*. Calgary, University of Calgary Press/IAPTC, 1978. p.257-79.
- DHALIWAL, H.S. & KING, P.J. Biochemical selection of immature haploid embryos of *Zea mays* L. *Theoretical and Applied Genetics*, New York, 55(6): 257-62, 1979.
- DIEDRICK, T.J.; FRISCH, D.A.; GENGENBACH, B.G. Tissue culture isolation of a second mutant locus for increased threonine accumulation in maize. *Theoretical and Applied Genetics*, New York, 79(2): 209-15, 1990.
- 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.
- DUNCAN, D.R. & WIDHOLM, J.M. Improved plant regeneration from maize callus cultures using 6-benzylaminopurine. *Plant Cell Reports*, New York, 7(6): 452-5, 1988.
- DUNCAN, D.R.; SINGLETARY, G.W.; BELOW, F.E.; WIDHOLM, J.M. Increased induction of regenerable callus cultures from cultured kernels of the maize inbred FR27rhm. *Plant Cell Reports*, New York, 8(6): 350-3, 1989.
- DUNCAN, 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.
- EARLE, E.D. & GRACEN, V.E. Somaclonal variation in progeny of plants from corn tissue cultures. In: HENKE, R.R., ed. *Tissue culture in forestry and agriculture*. New York, Plenum Press, 1985. p.139-51.
- 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. & REED, S.M. Cytogenetics techniques. In: THORPE, T.A., ed. *Plant tissue culture*. New York, Academic Press, 1981. p.213-40.

- EVANS, D.A. & SHARP, W.R. Single gene mutations in tomato plants regenerated from tissue culture. *Science*, Washington, **221**(4614): 949-51, Sept. 1983.
- EVANS, D.A.; SHARP, W.R.; MEDINA FILHO, H.P. Somaclonal and gametoclonal variation. *American Journal of Botany*, Columbus, **71**(6): 759-74, July 1984.
- FAHEY, J.W.; REED, J.N.; READDY, T.L.; PAGE, G.M. Somatic embryogenesis from three commercially important inbreds of *Zea mays*. *Plant Cell Reports*, New York, **5**(1): 35-8, 1986.
- FLUMINHAN Jr., A. & AGUIAR-PERECIN, M.L.R. de. Análise citológica de plantas regeneradas *in vitro* de duas variedades de milho. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA PARA O PROGRESSO DA CIÊNCIA, 39., Brasília, 1987. Resumos. *Ciência e Cultura*, Suplemento, São Paulo, **39**(7): 776, 1987.
- FRANSZ, P.F.; RUIJTER, N.C.A. de; SCHEL, J.H.N. Isozymes as biochemical and cytochemical markers in embryogenic callus cultures of maize (*Zea mays* L.). *Plant Cell Reports*, New York, **8**(2): 67-70, 1989.
- FREELING, M. Plant transposable elements and insertion sequences. *Annual Review of Plant Physiology*, Palo Alto, **35**: 277-98, 1984.
- FREELING, M.; WOODMAN, J.C.; CHENG, D.S.K. Developmental potentials of maize tissue cultures. *Maydica*, Bergamo, **21**(3): 97-112, 1976.
- FREIRE, E.C. & PATERNIANI, E. Seleção entre e dentro de famílias de meios-irmãos na população de milho ESALQ VD2-S182, em condições de inverno. *Revista Brasileira de Genética*, Ribeirão Preto, **9**(3): 459-65, jul./set. 1986.
- FRISCH, D.A. & GENGENBACH, B.G. Allelism test for two threonine over-producer mutants. *Maize Genetics Cooperation News Letter*, Columbia, **60**: 115, 1986.
- FROMM, M.E.; MORRISH, F.; ARMSTRONG, C.; WILLIAMS, R.; KLEIN, T.M. Inheritance and expression of chimeric genes in the progeny of transgenic maize plants. *Bio-Technology*, New York, **8**: 833-9, 1990.
- GENGENBACH, B.G. & GREEN, C.E. Selection of T-cytoplasm maize callus cultures resistant to *Helminthosporium maydis* race T pathotoxin. *Crop Science*, Madison, **15**(5): 645-9, Sept./Oct. 1975.

- GENGENBACH, B.G.; GREEN, C.E.; DONOVAN, C.M. Inheritance of selected pathotoxin resistance in maize plants regenerated from cell cultures. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Washington, 74(11): 5113-7. Nov. 1977.
- GENGENBACH, B.G.; CONNELLY, J.A.; PRING, D.R.; CONDE, M.F. Mitochondrial DNA variation in maize plants regenerated during tissue culture selection. *Theoretical and Applied Genetics*. New York, 59(3): 161-7. 1981
- GOMES, F.P. *Curso de estatística experimental*. Piracicaba. ESALQ/Instituto de Genética, 1960. 299p.
- 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 Jr., W.R.; WILLETS, N.G.; RICE, T.B.; MACKAY, C.J.; KRUEGER, R.W.; KAUSCH, A.P.; LEMAUX, P.G. Transformation of maize cells and regeneration of fertile transgenic plants. *Plant Cell*, Rockville, 2: 603-18. 1990.
- GREEN, C.E. Prospects for crop improvement in the field of cell culture. *HortScience*. Alexandria, 12(2): 7-10. Apr. 1977.
- GREEN, C.E. In vitro plant regeneration in cereal 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 Co., 1982. p.107-8.
- GREEN, C.E. New developments in plant tissue culture and plant regeneration. In: HOLLAENDER, A., ed. *Basic biology of new developments in biotechnology*. New York, Plenum Press, 1983. p.195-209.
- GREEN, C.E. & PHILLIPS, R.L. Plant regeneration from tissue cultures of maize. *Crop Science*. Madison, 15(3): 417-21. May/June 1975.
- GREEN, C.E. & RHODES, C.A. Plant regeneration in tissue cultures of maize. In: SHERIDAN, W.F., ed. *Maize for biological research*. Charlottesville, Plant Molecular Biological Assoc., 1982. p.367-72.
- 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.; KLEESE, R.A. Tissue cultures of maize (*Zea mays* L.): initiation, maintenance and organic growth factors. *Crop Science*, Madison, 14(1): 54-8, Jan./Feb. 1974.
- GREEN, C.E.; PHILLIPS, R.L.; WANG, A.S. Cytological analysis of plants regenerated from maize tissue cultures. *Maize Genetics Cooperation News Letter*, Columbia, 51: 53-4, 1977.
- GRESSHOFF, P.M. & DOY, C.H. *Zea mays*: methods for diploid callus culture and the subsequent differentiation of various plant structures. *Australian Journal of Biological Science*, Victoria, 26(2): 505-8, Apr. 1973.
- GU, M.G. & TING, Y.C. Ploidy stability of maize callus lines. *Maize Genetics Cooperation News Letter*, Columbia, 59: 29, 1985.
- HADLACZKY, G.Y. & KALMAN, L. Discrimination of homologous chromosomes of maize with Giemsa staining. *Heredity*, Essex, 35(2): 371-4, Dec. 1975.
- 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, Dez. 1976.
- HEINZ, D.J. & MEE, G.W.P. Plant differentiation from callus tissue of *Saccharum* species. *Crop Science*, Madison, 9(3): 346-8, May/June 1969.
- HEINZ, D.J.; KRISHNAMURTHI, M.; NICKELL, L.G.; MARETZKI, A. Cell, tissue and organ culture in sugarcane improvement. In: REINERT, J. & BAJAJ, Y.P.S., ed. *Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue and organ culture*. Berlin, Springer-Verlag, 1977. p.3-17.
- HENDRE, R.R.; MASCARENHAS, A.F.; PATHAK, M.; JAGANNATHAN, V. Tissue cultures of maize, wheat and sorghum. Part II Growth and nutrition of callus cultures. *Indian Journal of Experimental Biology*, New Delhi, 13: 108-11, 1975.
- HIBBERD, K.A. Induction, selection and characterization of mutants in maize cell cultures. In: VASIL, I.K., ed. *Cell culture and somatic cell genetics of plants*. New York, Academic Press, 1984. v.1. p.152-8.
- HIBBERD, K.A. & GREEN, C.E. Inheritance and expression of lysine plus threonine resistance selected in maize tissue culture. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Washington, 79(2): 559-63, Jan. 1982.

- HIBBERD, K.A.; WALTER, T.; GREEN, C.E.; GENGENBACH, B.G. Selection and characterization of a feedback-insensitive tissue culture of maize. *Planta*, New York, 148: 183-7. 1980.
- HODGES, T.K.; KAMO, K.K.; BEOWAR, M.R.; SCHROLL, S. Regeneration of maize. In: ZAITLIN, M., ed. *Biotechnology in plant science*. New York, Academic Press, 1985. p.15-33.
- HODGES, T.K.; KAMO, K.K.; IMBRIE, C.; BEOWAR, M.R. Genotype specificity of somatic embryogenesis and regeneration in maize. *Bio-Technology*, New York, 4: 219-23, 1986.
- IMBRIE-MILLIGAN, C.W. & HODGES, T.K. Microcalli formation from maize protoplasts prepared from embryogenic callus. *Planta*, New York, 168(3): 395-401. 1986.
- IMBRIE-MILLIGAN, C.; KAMO, K.K.; HODGES, T.K. Microcallus growth from maize protoplasts. *Planta*, New York, 171(1): 58-64. 1987.
- IVANTSOV, A.I. & AKHMETOV, R.R. Cultivation of isolated protoplasts of maize. *Fiziologiya Rastenii*, Moscow, 25: 1136-8. 1978.
- JACOBS, M.; NEGRITIU, I.; DIRKS, R.; CAMMAERTS, D. Selection programmes for isolation and analysis of mutants in plant cell cultures. In: GREEN, C.E., ed. *Plant tissue and cell culture*. New York, Alan Liss, 1987. p.243-64. (Plant Biology, 3).
- JOHNSON, S.S.; PHILLIPS, R.L.; RINES, H.W. Meiotic behavior in progeny of tissue culture regenerated oat plants (*Avena sativa* L.) carrying near-telocentric chromosomes. *Genome*, Ottawa, 29(3): 431-8. June 1987a.
- 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. June 1987b.
- JOHRI, M.M. & COE Jr., E.H. Clonal analysis of corn plant development. I. The development of the tassel and ear shoot. *Developmental Biology*, San Diego, 97: 154-72. 1983.
- 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.
- KAMO, K.K.; BEOWAR, M.R.; HODGES, T.K. Regeneration of *Zea mays* L. from embryogenic callus. *Botanical Gazette*, Chicago, 146(3): 327-34. Sept. 1985.

- KAMO, K.K.; CHANG, K.L.; LYMM, M.E.; HODGES, T.K. Embryogenic callus formation from maize protoplasts. *Planta*, New York, 172(2): 245-51, 1987.
- KAPLAN, D.R. & HAGEMANN, W. The relationship of cell and organism in vascular plants. *BioScience*, Versailles, 41(10): 693-703, Nov. 1991.
- KEMBLE, R.J.; FLAVELL, R.D.; BRETTEL, R.I.S. Mitochondrial DNA analysis of fertile and sterile maize plants derived from tissue culture with the Texas male sterile cytoplasm. *Theoretical and Applied Genetics*, New York, 62(3): 213-7, 1982.
- KHAVKIN, E.E.; MISHARIN, S.I. IVANOV, V.N.; DANOVICH, K.N. Embryonal antigens in maize caryopses: the temporal order of antigen accumulation during embryogenesis. *Planta*, New York, 135: 225-31, 1977.
- KING, P. & SHIMAMOTO, K. Cereals: maize. In: SHARP, W.R., ed. *Handbook of plant cell culture, crop species*. New York, MacMillan, 1984. v.2, p.69-91.
- KUANG, V.D.; SHAMINA, Z.B.; BUTENKO, R.G. Use of nurse tissue culture to obtain clones from cultured cells and protoplasts of corn. *Fiziologiya Rastenii*, Moscow, 30: 803-12, 1983.
- 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.
- 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(4): 197-214, 1981.
- LEE, M. & PHILLIPS, R.L. Genetic variation in progeny of regenerated corn plants. In: ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN SOCIETY OF AGRONOMY, 76., Las Vegas, 1984. Abstracts. *Agronomy Abstracts*, Madison, 76: 76, 1984.
- LEE, M. & PHILLIPS, R.L. Genomic rearrangements in maize induced by tissue culture. *Genome*, Ottawa, 29(1): 122-8, Feb. 1987a.
- LEE, M. & PHILLIPS, R.L. A search for cytoplasmic restoration of genetic male sterility among regenerated plants and their progeny. *Maize Genetics Cooperation News Letter*, Columbia, 61: 87, 1987b.

- 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.
- LEE, M.; GEADELMANN, J.L.; PHILLIPS, R.L. Agronomic evaluation of inbred lines derived from tissue cultures of maize. *Theoretical and Applied Genetics*, New York, 75(6): 841-9, 1988.
- LINSMAYER-BEDNAR, E.M. & BEDNAR, T.W. Light and hormonal control of root formation in *Zea mays* callus cultures. *Development, Growth and Differentiation*. Tokyo, 14: 165-74, 1972.
- LONGLEY, A.E. Chromosomes of maize from North American Indians. *Journal of Agricultural Research*. Islamabad, 56(3): 177-95, Feb. 1938.
- 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: 285-9, 1983.
- LUDWIG, S.R.; SOMERS, D.A.; PETERSEN, W.L.; POHLMAN, R.F.; ZAROWITZ, B.G.; GENGENBACH, B.G.; MESSING, J. High frequency callus formation from maize protoplasts. *Theoretical and Applied Genetics*, New York, 71(2): 344-50, 1985.
- LUPOTTO, E. In vitro culture of isolated somatic embryos of maize (*Zea mays* L.). *Maydica*. Bergamo, 31(2): 193-201, 1986.
- LYZNIK, L.A.; KAMO, K.K.; GRIMES, H.D.; RYAN, R.; CHANG, K.L.; HODGES, T.K. Stable transformation of maize: the impact of feeder cells on protoplast growth and transformation efficiency. *Plant Cell Reports*. New York, 8(5): 292-5, 1989.

- MALIGA, P. Isolation and characterization of mutants in plant cell culture. *Annual Review of Plant Physiology*, Palo Alto, 35: 519-42, 1984.
- MASCARENHAS, A.F.; HENDRE, R.R.; RAO SEETHARAMA, B.; JAGANNATHAN, V. Tissue cultures of maize, wheat, jowar and rice. *Indian Journal of Experimental Biology*, New Delhi, 7: 65-7, 1969.
- MASCARENHAS, A.F.; PATHAK, M.; HENDRE, R.R.; JAGANNATHAN, V. Tissue cultures of maize, wheat, rice and sorghum: Part I - Initiation of viable callus and root cultures. *Indian Journal of Experimental Biology*, New Delhi, 13: 103-7, 1975a.
- MASCARENHAS, A.F.; PATHAK, M.; HENDRE, R.R.; GHUGALE, D.D.; JAGANNATHAN, V. Tissue cultures of maize, wheat, rice and sorghum: Part IV - Studies of organ differentiation in tissue cultures of maize, wheat and rice. *Indian Journal of Experimental Biology*, New Delhi, 13: 116-9, 1975b.
- MASTENBROEK, I. & WET, J.M.J. de. Chromosome C-banding of *Zea mays* and its closest relatives. *Canadian Journal of Genetics and Cytology*, Ottawa, 25(3): 203-9, June 1983.
- McCLINTOCK, B. A cytological demonstration of the location of an interchange between two non-homologous chromosomes of *Zea mays*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Washington, 16: 791-6, 1930.
- McCLINTOCK, B. Cytological observations of deficiencies involving known genes, translocations and an inversion in *Zea mays*. *Research Bulletin of Missouri Agricultural Experimental Station*, Columbia, 163: 1-31, 1931.
- McCLINTOCK, B. The association of non-homologous parts of chromosomes in the mid-prophase of meiosis in *Zea mays*. *Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie*, Berlin, 19: 191-237, 1933.
- 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: 458-463. 1942.
- McCLINTOCK, B. The origin and behavior of mutable loci in maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Washington, 36: 344-55. 1950.
- 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 Press. 1978. p.25-48.
- McCLINTOCK, B. The significance of responses of the genome to challenge. *Science*. Washington, 226(4676): 792-801. Nov. 1984.
- McCORMICK, S. Friable maize callus and suspension cultures using IAA amino acid conjugates. *Maize Genetics Cooperation News Letter*. Columbia, 54: 45-6. 1980.
- 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.
- McNAY, J.W.; CHOUREY, P.S.; PRING, D.R. Molecular analysis of genomic stability of mitochondrial DNA in tissue cultured cells of maize. *Theoretical and Applied Genetics*. New York, 67(5): 433-7. 1984.
- MEADOWS, M.G. Characterization of cells and protoplasts of the B73 maize cell line. *Plant Science Letters*. Amsterdam, 28(3): 337-48. 1992/1983.
- MEINS Jr., 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 News Letter*, Columbia, 45: 136-9, 1971.
- MIRANDA FILHO, J.B. Cruzamentos dialélicos e síntese de compostos de milho (*Zea mays* L.) com ênfase na produtividade e no porte da planta. Piracicaba, 1974. 155p. (Doutorado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/ USP).
- MIRANDA FILHO, J.B. Obtenção de linhagens endogâmicas em dois compostos de milho. *Relatório Científico do Departamento e Instituto de Genética*. ESALQ/USP, Piracicaba, 13: 172-9, 1979.
- MITCHELL, J.C. & PETOLINO, J.F. Haploid suspension and protoplast culture from isolated microspores of maize. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON PLANT TISSUE AND CELL CULTURE, 7., Amsterdam, 1990. *Progress in plant cellular and molecular biology: proceedings*, edited by H.J.J. Nijkamp and others. Dordrecht, Kluwer Academic, 1990. p.264-9. (Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture, 9).
- MOHANTY, B.D.; PAUL, N.K.; GHOSH, P.D. Chromosomal behaviour in callus culture of *Zea mays* L. *Cytologia*, Tokyo, 51(1): 37-41, Mar. 1986.
- MOLNAR, S.J.; GORDON, P.N.; RICE, T.B. Initiation of totipotent tissue cultures from underdeveloped axillary and secondary ears. *Maize Genetics Cooperation News Letter*, Columbia, 54: 52-3, 1980.
- MORO, J.R. Biotecnologia e melhoramento genético do milho. In: PATERNIANI, E. & VIEGAS, G.P., ed. 2.ed. *Melhoramento e produção do milho*. Campinas, Fundação Cargill, 1987a. v.1. p.341-72.
- MORO, J.R. Seleção em milho para capacidade de regeneração em cultura de tecidos somáticos. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA PARA O PROGRESSO DA CIÊNCIA, 39., Brasília, 1987. Resumos. *Ciência e Cultura*, Suplemento, São Paulo, 39(7): 789, 1987b.
- MORO, J.R. & GUERREIRO, L.E. Embriogênese somática e regeneração de plantas de milho (*Zea mays* L.). In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA PARA O PROGRESSO DA CIÊNCIA, 36., São Paulo, 1984. Resumos. *Ciência e Cultura*, Suplemento, São Paulo, 36(7): 859, 1984.

- MÓRO CZ, S.; DONN, G.; NÉMETH, J.; DUDITS, D. An improved system to obtain fertile regenerants via maize protoplasts isolated from a highly embryogenic suspension culture. *Theoretical and Applied Genetics*, New York, 80(6):721-6, 1990.
- MOTOYOSHI, F. Protoplasts isolated from callus cells of maize endosperm. Formation of multinucleate protoplasts and nuclear division. *Experimental Cell Research*, San Diego, 68(2): 235-46, Oct. 1971.
- MOTT, R.L. & CURE, W.W. Anatomy of maize tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, 42(1): 139-45, Jan. 1978.
- MURASHIGE, T. & NAKANO, R. Chromosome complement as a determinant of the morphogenic potential of tobacco cells. *American Journal of Botany*, Columbus, 54(8): 963-70, Sept. 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.
- NABORS, M.W.; HEYSER, J.W.; DYKES, T.A.; DeMOTT, K.J. Long-duration high-frequency plant regeneration from cereal tissue cultures. *Planta*, New York, 157: 385-91, 1983.
- NESTICKY, M.; NOVAK, F.J.; PIOVARCI, A.; DOLEZELOVA, M. Genetic analysis of callus growth of maize (*Zea mays* L.). *Zeitschrift für Pflanzenzüchtung*, Berlin, 91(4): 322-8, Dec. 1983.
- NEUFFER, M.G. Stability of the suppressor element in two mutator systems of A-1 locus in maize. *Genetics*, Chapel Hill, 53(3): 541-9, Mar. 1966.
- 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.
- OSWALD, T.H.; NICHOLSON, R.L.; BAUMAN, L.F. Cell suspension and callus culture from somatic tissue of maize. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, 41(1): 45-50, 1977.

- PAGLIARINI, M.S. Avaliação da frequência de quiasmas em milho (*Zea mays* L.) e suas implicações com a capacidade de combinação para a produção de grãos. Piracicaba, 1989. 190p. (Doutorado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).
- PATERNIANI, E. Origem e comportamento do milho Piranão. Relatório Científico do Departamento e Instituto de Genética. ESALQ/USP. Piracicaba, 7: 148-60. 1973.
- PESCHKE, V.M. & PHILLIPS, R.L. Activation of the maize transposable element Suppressor-mutator (*Spm*) in tissue culture. *Theoretical and Applied Genetics*, New York, 81(1): 90-7. 1991.
- PESCHKE, V.M.; PHILLIPS, R.L.; GENGENBACH, B.G. Discovery of *Ac* activity among progeny of regenerated maize plants. *Maize Genetics Cooperation News Letter*, Columbia, 59: 91. 1985.
- PESCHKE, V.M.; PHILLIPS, R.L.; GENGENBACH, B.G. Discovery of transposable element activity among progeny of tissue culture-derived maize plants. *Science*, Washington, 238(4828): 804-7, Nov. 1987.
- 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(2): 121-9. 1991.
- PHILLIPS, R.L. Cómo el advenimiento de la ingeniería genética afectará el uso del germoplasma. In: FORO LATINOAMERICANO SOBRE INVESTIGACION EN FITOMEJORAMIENTO. Caracas, 1985. *América Latina e sus recursos abundantes de alimento para el futuro*. Des Moines. Pioneer Hi-Bred International, 1986. p.191-227.
- PHILLIPS, R.L. Somaclonal and gametoclonal variation. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF GENETICS, 16., Toronto, 1988. Proceedings. *Genome*, Ottawa, 31(2): 1119-20. 1989.
- PHILLIPS, R.L. & PESCHKE, V.M. Discovery of *Ac* activity among progeny of tissue-culture-derived maize plants. In: NELSON, D., ed. *Plant transposable elements*. New York, Plenum Press, 1988. p.305-15.
- PHILLIPS, R.L. & WANG, A.S. Chromosome analysis. In: VASIL, I.K., ed. *Cell culture and somatic cell genetics of plants*. New York, Academic Press, 1984. p.712-27.

- PHILLIPS, R.L.; KAEPLER, S.M.; PESCHKE, V.M. Do we understand somaclonal variation? In: INTERNATIONAL CONGRESS ON PLANT TISSUE AND CELL CULTURE, 7., Amsterdam, 1990. **Progress in plant cellular and molecular biology**; proceedings, edited by H.J.J. Nijkamp and others. Dordrecht, Kluwer Academic, 1990. p.131-41. (Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture, 9).
- PHILLIPS, R.L.; SOMERS, D.A.; HIBBERD, K.A. Cell/tissue culture and in vitro manipulation. In: SRAGUE, G.F. & DUDLEY, J.W., ed. **Corn and corn improvement**. 3.ed. Madison, ASA/CSSA/SSSA, 1988. p.345-87. (Agronomy Monographs, 18).
- PLANCKAERT, F. & WALBOT, V. Transient gene expression after electroporation of protoplasts derived from embryogenic maize callus. **Plant Cell Reports**, New York, 8(3): 144-7, 1989.
- POLIKARPOCHKINA, R.T.; GAMBURG, K.Z.; KHAVKIN, E.E. Cell-suspension culture of maize (*Zea mays* L.). **Zeitschrift für Pflanzenphysiologie**, Stuttgart, 95: 57-67, 1979.
- POTRYKUS, I.; HARMS, C.T.; LORZ, H. Callus formation from cell culture protoplasts of corn (*Zea mays* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, New York, 54(5): 209-14, 1979.
- POTRYKUS, I.; HARMS, C.T.; LORZ, H.; THOMAS, E. Callus formation from stem protoplasts of corn (*Zea mays* L.). **Molecular and General Genetics**, New York, 156(3): 347-50, 1977.
- PRIOLI, L.M. Cultura de tecidos e células, controle genético da embriogênese somática e variação somaclonal em milho (*Zea mays* L.). Campinas, 1987. 232p. (Doutorado - Universidade Estadual de Campinas).
- PRIOLI, L.M. & SILVA, W.J. Somatic embryogenesis and plant regeneration capacity in tropical maize inbreds. **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, 12(3): 553-66, Jul./Set. 1989.
- PRIOLI, L.M. & SONDAHL, M.R. Plant regeneration and recovery of fertile plants from protoplasts of maize (*Zea mays* L.). **Bio-Technology**, New York, 7: 589-94, 1989.
- PRIOLI, L.M.; ARRUDA, P.; SILVA, W.J. Otimização da indução de calos e regeneração de plantas in vitro em uma linhagem com alta frequência de embriogênese somática. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA PARA O PROGRESSO DA CIÊNCIA, 37., Belo Horizonte, 1985. Resumos. **Ciência e Cultura**, Suplemento, São Paulo, 37(7): 787, 1985a.

- PRIOLI, L.M.; SILVA, W.J.; ARRUDA, P. Variação somaclonal em linhagens de milho. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA PARA O PROGRESSO DA CIÊNCIA, 38., Curitiba, 1986. *Ciência e Cultura*. Suplemento, São Paulo, 38(7): 901. 1986.
- PRIOLI, L.M.; SILVA, W.J.; SONDAHL, M.R. Tissue, cell, and protoplast culture of maize (*Zea mays* L.). In: INTERNATIONAL CONGRESS ON PLANT TISSUE AND CELL CULTURE, 7., Amsterdam, 1990. *Progress in plant cellular and molecular biology: proceedings*, edited by H.J.J. Nijkamp and others. Dordrecht, Kluwer Academic, 1990. p.38-43. (Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture, 9).
- PRIOLI, L.M.; ARRUDA, P.; SILVA, W.J.; AZEVEDO, R.A. Capacidade de regeneração *in vitro* em linhagens isogênicas de milho (*Zea mays* L.). In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA PARA O PROGRESSO DA CIÊNCIA, 37., Belo Horizonte, 1985. Resumos. *Ciência e Cultura*. Suplemento, São Paulo, 37(7): 787. 1985b.
- PRYOR, A.; FAULKNER, K.; RHOADES, M.M.; PEACOCK, W.J. Asynchronous replication of heterochromatin in maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Washington, 77: 6705-9. 1980.
- QUEIROZ, M.A. Correlações genéticas e fenotípicas em progênies de meios irmãos de milho (*Zea mays* L.) e suas implicações no melhoramento. Piracicaba, 1969. 71p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).
- RAPELA, M.A. Indirect somatic (nonzigotic) embryogenesis in tissue cultures of maize. *Maize Genetics Cooperation Newsletter*. Columbia, 58: 110-2. 1984.
- RAPELA, M.A. Maize organogenesis and somatic embryogenesis: stage of the donor tissue. *Maize Genetics Cooperation Newsletter*. Columbia, 59: 59. 1985.
- RAYBURN, A.L.; PRICE, H.J.; SMITH, J.D.; GOLD, J.R. C-band heterochromatin and DNA content in *Zea mays*. *American Journal of Botany*. Columbus, 72(10): 1610-7. Oct. 1985.
- REDDY, A.R. & PETERSON, P.A. Callus initiation from waxy endosperm of various genotypes of maize. *Maydica*. Bergamo, 22(3): 125-31. 1977.
- REECE, S.L. & MADDOX, S.E. Cryopreservation of embryogenic maize suspension cultures. *In Vitro*. Gaithersburg, 24: 36. 1987.
- RHOADES, M.M. Meiosis in maize. *Journal of Heredity*. New York, 41(3): 58-67. Mar. 1950.

- RHOADES, M.M. The cytogenetics of maize. In: SPRAGUE, G.F. ed. **Corn and corn improvement**. Madison, ASA/CSSA/SSSA, 1955. p.123-219. (Agronomy Monographs, 18).
- RHOADES, M.M. & DEMPSEY, E. On the mechanism of chromatin loss induced by the B chromosome of maize. **Genetics**, Chapel Hill, 71(1): 73-96, May 1972.
- RHOADES, M.M. & DEMPSEY, E. Chromatin elimination induced by the B chromosome of maize. I. Mechanism of loss and the pattern of endosperm variegation. **Journal of Heredity**, New York, 64(1): 12-8, Jan./Feb. 1973.
- RHOADES, M.M. & DEMPSEY, E. The induction of mutable systems in plants with the high-loss mechanism. **Maize Genetics Cooperation News Letter**, 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 News Letter**, Columbia, 57: 14-7, 1983.
- RHODES, C.A.; LOWE, K.S.; RUBY, K.L. Plant regeneration from protoplasts isolated from embryogenic maize cell cultures. **Bio-Technology**, New York, 6: 56-60, 1988a.
- 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, June 1986.
- RHODES, C.A.; PIERCE, D.A.; METTLER, I.J.; MASCARENHAS, D.; DETMER, J.J. Genetically transformed maize plants from protoplasts. **Science**, Washington, 240(4849): 204-7, Apr. 1988b.
- RIVIN, C.J.; ZIMMER, E.A.; CULLIS, C.A.; WALBOT, V.; HUYNH, T.; DAVIS, R.W. Evaluation of genomic variability at the nucleic acid level. **Plant Molecular Biology Reports**, Dordrecht, 1: 9-16, 1983.
- SANTOS, M.A. & TORNÉ, J.M. A comparative analysis between totipotency and growth environment conditions of the donor plants in tissue culture of *Zea mays* L. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, 123(4): 299-305, May 1986.
- SCHWARTZ, D. & MURRAY, O. 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.

- SHANG, X.M. & WANG, W.C. DNA amplification, chromatin variations, and polytene chromosomes in differentiating cells of common bread wheat *in vitro* and roots of regenerated plants *in vivo*. *Genome*, Ottawa, 34: 799-809, 1991.
- SHANNON, J.C. & BATEY, J.W. Inbred and hybrid effects on establishment of *in vitro* cultures of *Zea mays* L. endosperm. *Crop Science*, Madison, 13(4): 491-3, July/Aug. 1973.
- SHANNON, J.C. & LIU, J.W. A simplified medium for the growth of maize (*Zea mays*) endosperm tissue in suspension culture. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, 40(4): 285-91, 1977.
- SHEPARD, J.F.; BIDNEY, D.; SHALIN, E. Potato protoplasts in crop improvement. *Science*, Washington, 208(4439): 17-24, Apr. 1980.
- SHERIDAN, W.F. Tissue culture of maize. I. Callus induction and growth. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, 33(2): 151-6, 1975.
- SHERIDAN, W.F. Tissue culture of maize. II. Effect of glutamate, aspartate and aromatic amino acid families on callus growth of several maize strains. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, 41(3): 172-4, 1977.
- SHILLITO, R.D.; CARSWELL, G.K.; JOHNSON, C.M.; DiMAIO, J.J.; HARMS, C.T. Regeneration of fertile plants from protoplasts of elite inbred maize. *Bio-Technology*, New York, 7: 581-7, 1989.
- SHIMAMOTO, K. & NELSON, D.E. Isolation and characterization of aminopterin-resistant cell lines in maize. *Planta*, New York, 153: 436-42, 1981.
- SMITH, J.A.; GREEN, C.E.; GENGENBACH, B.G. Feeder layer support of low density populations of *Zea mays* L. suspension cells. *Plant Science Letters*, Amsterdam, 36(1): 67-72, 1984.
- SNEDECOR, G.W. & COCHRAN, W.G. *Statistical methods*. 7.ed. Ames. Iowa State University Press, 1980. 789p.
- SOMERS, D.A.; PHILLIPS, R.L.; RINES, H.W. Corn and oat tissue cultures and genetic variation in regenerated plants. Taipei City, Food & Fertilizer Technology Center, 1988. 9p. (Technical Bulletin, 110).

- SOMERS, D.A.; BIRNBERG, P.R.; PETERSEN, W.L.; BRENNER, M.L. The effect of conditioned medium on colony formation from Black Mexican Sweet corn protoplasts. *Plant Science*. Limerick. **53**(3): 249-56. 1987.
- 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.
- STIRN, S. & JACOBSEN, H.J. Marker proteins for embryogenic differentiation patterns in pea callus. *Plant Cell Reports*. New York, **6**(1): 50-4. 1987.
- STRAUS, J. Maize endosperm tissue grown in vitro. II. Morphology and cytology. *American Journal of Botany*. Columbus, **41**(10): 833-9. Dec. 1954.
- STRAUS, J. Spontaneous changes in corn endosperm tissue cultures. *Science*. Washington, **128**(3323): 537-8. Sept. 1958.
- STRAUS, J. Maize endosperm tissue grown in vitro. III. Development of a synthetic medium. *American Journal of Botany*. Columbus, **47**(8): 641-7. Oct. 1960.
- STRAUS, J. & LA RUE, C.D. Maize endosperm tissue grown in vitro. I. Culture requirements. *American Journal of Botany*. Columbus, **41**(8): 687-94. Oct. 1954.
- STREET, H.E. Plant cell cultures: their potential for metabolic studies. In: MILBORROW, B.V., ed. *Biosynthesis and its control in plants*. London. Academic Press, 1973. p.93-125. (Annual Proceedings of the Phytochemical Society, 9).
- SUN, C.S.; PRIOLI, L.M.; SONDAHL, M.R. Regeneration of haploid and dihaploid plants from protoplasts of supersweet (sh2sh2) corn. *Plant Cell Reports*. New York, **8**(6): 313-6. 1989.
- SUN, M.H. & ULLSTRUP, A.J. In vitro growth of corn endosperm. *Bulletin of Torrey Botany Club*. Washington, **98**: 251-8. 1971.
- 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.

- TABATA, M. & MOTOYOSHI, F. Hereditary control of callus formation in maize endosperm cultured in vitro. *Japanese Journal of Genetics*, Mishima, 40: 343-55, 1965.
- TAYLOR, A.R.D. & HALL, J.L. Some physiological properties of protoplasts isolated from maize and tobacco tissues. *Journal of Experimental Botany*, Oxford, 27(97): 383-91, Apr. 1976.
- THOMAS, E.; KING, P.J.; POTRYKUS, I. Improvement of crop plants via single cells in vitro - an assessment. *Zeitschrift für Pflanzenzüchtung*, Berlin, 82(1): 1-30, Feb. 1979.
- TOMES, D.T. Cell culture, somatic embryogenesis and plant regeneration in maize, rice, sorghum and millets. In: BRIGHT, S.W.J. & JONES, M.G.K., ed. *Advances in agricultural biotechnology, cereal tissue and cell culture*. Boston, Nijhoff/Junk, 1985a. p.175-203.
- TOMES, D.T. Opportunities and limitations of the genotypic influences on establishment and plant regeneration from callus and cell cultures of crop species. In: ZAITLIN, M., ed. *Biotechnology in plant science*. New York, Academic Press, 1985b. p.3-14.
- 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.
- TUBEROSA, R. & PHILLIPS, R.L. Isolation of methotrexate-tolerant cell lines of corn. *Maydica*, Bergamo, 31(2): 215-25, 1986.
- UMBECK, P.F. & GENGENBACH, B.G. Streptomycin and other inhibitors as selection agents in corn tissue cultures. *Crop Science*, Madison, 23(4): 717-9, July/Aug. 1983.
- VASIL, I.K. Isolation and culture of protoplasts of grasses. *International Review of Cytology*, San Diego, (Suppl. 16): 79-87, 1983.
- VASIL, I.K. Developing cell and tissue culture systems for the improvement of cereal and grass crops. *Journal of Plant Physiology*, Stuttgart, 128(3): 193-218, May 1987.

- 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. & VASIL, I.K. Formation of callus and somatic embryos from protoplasts of a commercial hybrid of maize (*Zea mays* L.). *Theoretical and Applied Genetics*. New York, 73(6): 793-8, 1987.
- 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.
- VOSA, C.G. The use of Giemsa and other staining techniques in karyotype analysis. *Current Advances in Plant Science*. Elmsford, 6: 495-510, 1975.
- WANG, A.S.; PHILLIPS, R.L.; MI, C.C. Cell cycle parameters and accumulation of metaphase cells in maize suspension cultures. *Plant Science*. Limerick, 46(1): 53-61, 1986.
- WARD, E.J. Banding patterns in maize mitotic chromosomes. *Canadian Journal of Genetics and Cytology*. Ottawa, 22(1): 61-7, 1980.
- WILLIAMS, E.G. & MAHESWARAN, G. Somatic embryogenesis: factors influencing coordinated behaviour of cells as an embryogenic group. *Annals of Botany*. Oxford, 57(4): 443-62, Apr. 1986.
- YEOMAN, M.M. & FORCHE, E. Cell proliferation and growth in callus cultures. In: VASIL, I.K., ed. *Perspectives in plant cell and tissue culture*. New York, Academic Press, 1980. p.1-24. (International Review of Cytology, Suppl. 11A).