

Este exemplar corresponde a versão Final
da Tese defendida pela candidata Laudemir
Maria Prioli e aprovada pela Comissão
Julgadora

CULTURA DE TECIDOS E CÉLULAS, CONTROLE GENÉTICO DA EMBRIOGÊNESE

SOMÁTICA E VARIACÃO SOMACLONAL EM MILHO (*Zea mays* L.).

Illegible signature
30/07/87

Laudemir Maria Prioli

Tese apresentada ao Instituto
de Biologia da Universidade
Estadual de Campinas para a
obtenção do Título de Doutor
em Ciências. Área: Genética
Vegetal

Orientador: Prof. Dr. William José da Silva

CAMPINAS

Estado de São Paulo - Brasil

1987

A Juliana,

por me dar forças no que eu faço
e com esperança de um futuro melhor,

dedico.

AGRADECIMENTOS

- Ao Dr. William José da Silva pela orientação, estímulo, apoio e inúmeros exemplos de atitude científica e respeito pela Ciência, fundamentais para a minha formação científica e para a realização desse trabalho.
- Ao Dr. Maro R. Sondahl pela colaboração científica, estímulo, apoio e confiança em mim depositada, que muito contribuíram para a realização deste trabalho e para minha formação profissional.
- Ao Dr. Paulo Arruda, colega de trabalho, pelo estímulo, colaboração e valiosas discussões durante todos esses anos.
- Ao Dr. William R. Sharp e Dr. David A. Evans pela confiança em meu trabalho e pela oportunidade de realização de estágios de treinamento junto à DNA Plant Technology Corp.
- Ao Dr. Alberto J. Prioli pela colaboração, estímulo, sugestões, auxílio nas análises estatísticas e valiosas discussões.
- Ao biólogo João B. Rosolen pelo valioso auxílio e dedicação na manutenção das sementes e ensaios de campo.

- A Dra. Margarida L. P. de Aguiar Perecin, Dra. Linda Caldas, Dr. José Roberto Moro, Dr. Herculano P. Medina F^o, Dr. Rolf D. Ilg, Dr. José Alfredo Usberti F^o e Dr. Antonio Celso N. Magalhães, membros da Banca Examinadora desta Tese, pelas valiosas críticas e sugestões apresentadas.
- Ao Dr. Benedito de Campos Vidal e Ângelo L. Cortelazzo pelas discussões, sugestões e colaboração na realização de alguns experimentos.
- Ao Dr. Aquiles Piedrabuena pelas discussões, sugestões e auxílio em algumas análises estatísticas.
- A MS. Laura M. M. Ottoboni pela valiosa colaboração, discussões e assistência técnica nos experimentos de focalização isoelétrica de zeína.
- A Maria Tereza de Paula pelo auxílio técnico na preparação das cópias das fotomicrografias e micrografias eletrônicas.
- Aos biólogos Olivete Bonfim, Fátima S. Mendonça Ribeiro e Cleide E. Simon pelo auxílio técnico em alguns experimentos de cultura de tecidos.
- Ao Biólogo Ricardo A. Azevedo pela assistência técnica nos experimentos de análise de aminoácidos livres.

- A Márcia T. A. Camargo e Renata S. Barbosa Maia pela dedicação e paciência com que trabalharam na digitação e impressão desta tese.

- Ao Osmar pelo estímulo, apoio e companheirismo de tantos anos.

- Aos alunos e funcionários do Departamento de Genética e Evolução e a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

ÍNDICE

	PÁGINA
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO DA LITERATURA	07
2.1. Considerações gerais sobre cultura de tecidos vegetais.....	07
2.2. Cultura "in vitro" em Gramíneas	19
2.3. Cultura de tecidos, células em suspensão e protoplastos de milho	22
2.4. Variação somaclonal	29
2.4.1. Variação somaclonal em milho	37
3. MATERIAL E MÉTODOS	42
3.1. Cultura de tecidos, células e protoplastos de milho	42
3.1.1. Capacidade de regeneração "in vitro" em linhagens homozigóticas	42
3.1.2. Calos embriogênicos friáveis	47
3.1.3. Cultura de células em suspensão	48
3.1.4. Isolamento e cultura de protoplastos	49
3.2. Microscopia óptica e eletrônica de calos de milho	51
3.3. Herança da capacidade de regeneração "in vitro"	54
3.4. Variação somaclonal em linhagens homozigóticas de milho	56
3.4.1. Somaclones	56
3.4.2. Variação somaclonal	56
3.4.2.1. Avaliação dos somaclones no campo ..	57
3.4.2.2. Determinação de pigmentos fotossintéticos	57
3.4.2.3. Análise de aminoácidos livres	59

3.4.2.4.	Análise de polipeptídeos de zeína ..	60
4.	RESULTADOS	65
4.1.	Cultura de tecidos, células e protoplastos de milho.	
4.1.1.	Capacidade de regeneração "in vitro" em linhagens homozigóticas	65
4.1.2.	Calos embriogênicos semi-friáveis e friáveis.	85
4.1.3.	Cultura de células em suspensão	91
4.1.4.	Isolamento e cultura de protoplastos	94
4.2.	Alguns aspectos histológicos e citológicos de calos embriogênicos	97
4.2.1.	Microscopia óptica	97
4.2.2.	Microscopia eletrônica	103
4.3.	Herança da capacidade de regeneração "in vitro"	109
4.4.	Variação somaclonal em linhagens homozigóticas de milho	126
4.4.1.	Somaclones	126
4.4.2.	Variação somaclonal	127
4.4.2.1.	Mutantes morfológicos	129
4.4.2.2.	Esterilidade masculina	132
4.4.2.3.	Mutantes deficientes em clorofila ..	136
4.4.2.4.	Mutantes de endosperma	137
4.4.2.5.	Heterose	140
4.4.2.6.	Aminoácidos livres	140
4.4.2.7.	Polipeptídeos de zeína	143
5.	DISCUSSÃO	151
5.1.	Cultura de tecidos, células e protoplastos	152
5.2.	Capacidade de regeneração em linhagens homozigóticas	166
5.3.	Herança da capacidade de regeneração	170

5.4. Variação somaclonal	189
6. CONCLUSÕES	200
7. RESUMO/ABSTRACT	204
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	211

1. INTRODUÇÃO

A possibilidade de se manipular os genes e as células de microorganismos, animais e plantas superiores tem revolucionado o futuro de diversas áreas da Ciência. A genética vegetal encontra-se entre essas áreas do conhecimento que atualmente estão passando por rápidas alterações e revisões de conceitos e métodos.

A manipulação genética "in vitro" associada a técnicas de cultura de células somáticas de plantas superiores tem aberto novas perspectivas para a aquisição de conhecimentos nas áreas de genética básica, fisiológica e molecular, bem como para a aplicação prática desses conhecimentos em programas de melhoramento genético.

Nos últimos 12-15 anos houve um avanço extraordinário na área de biologia molecular, o que tem possibili-

tado o desenvolvimento de métodos eficientes para a análise e manipulação de DNA, incluindo-se genes individuais. A associação desses métodos a sistemas eficientes de transformação de células e organismos poderá levar à obtenção de novos variantes genéticos, inclusive variantes ainda não encontrados na natureza. Entretanto, os progressos para a aplicação desses métodos de manipulação genética a sistemas vegetais são ainda bastante lentos. Entre as várias limitações destaca-se o fato de que a maioria dos esquemas propostos para transferência de genes requer a capacidade de se regenerar plantas a partir de células isoladas ou protoplastos. Esta metodologia, entretanto, não está ainda desenvolvida para a maioria das espécies, inclusive a maioria daquelas de interesse agrônomo.

Independente de sua interação com as técnicas de DNA recombinante, a cultura "in vitro" apresenta um grande potencial para a aquisição de conhecimentos básicos em diversas áreas da biologia e também como técnica auxiliar no melhoramento vegetal. Os métodos convencionais de melhoramento vêm sendo, há cerca de quatro décadas, utilizados para a obtenção de variantes genéticas visando características como produtividade, resistência a condições ambientais adversas e qualidade nutritiva do produto. A utilização desses métodos convencionais tem, por si só, produzido resultados excelentes, que têm garantido a disponibilidade de alimentos para uma população humana sempre crescente. Cada vez mais, entretanto, vem sendo reconhecida a necessidade de se desenvolver e aplicar conhecimentos básicos de biologia para auxiliar esses programas de melhoramento. Isto

acontece principalmente para populações de espécies já bastante melhoradas e geneticamente conhecidas, por exemplo, o milho (*Zea mays* L.). Esses conhecimentos, associados ao desenvolvimento e aplicação de técnicas de cultura de tecidos, células e protoplastos, deverão permitir, como já mostrado em alguns exemplos na literatura, a obtenção de novas variantes genéticas. Além disso, as técnicas de cultura de tecidos e células vegetais constituem sistemas que permitem o estudo de passos metabólicos específicos sob condições experimentais bem controladas e definidas. Assim, deverão possibilitar uma melhor identificação e seleção de variações genéticas naturais e/ou induzidas artificialmente em passos de vias metabólicas importantes para caracteres de interesse genético e agrônomico. A utilização de células em sistemas altamente simplificados tem, por exemplo, se mostrado bastante eficiente para a seleção "in vitro" de mutantes bioquímicos para resistência a alguns herbicidas, resistência a patógenos e acúmulo de aminoácidos.

Outro aspecto importante da utilização de técnicas de cultura de tecidos é a exploração da variabilidade genética que ocorre entre as plantas regeneradas, que é denominada "variação somaclonal". Essa variabilidade tem se mostrado bastante atrativa para trabalhos visando conhecimentos básicos e para o melhoramento, embora o reconhecimento de sua existência seja bastante recente.

Sistemas de cultura de tecidos, células e protoplastos altamente eficientes para a regeneração de plantas são, portanto, de enorme importância para a aplicação de técni-

cas de DNA recombinante a sistemas vegetais, e fundamentais para permitir trabalhos de hibridização somática, transferência de organelas, seleção "in vitro" de mutantes bioquímicos e exploração da variação somaclonal. Sistemas eficientes de cultura "in vitro" e regeneração de plantas precisam ainda ser desenvolvidos para a maioria dos cereais e, entre eles, o milho.

O milho é uma espécie que apresenta uma série de vantagens para estudos biológicos por possuir características favoráveis de sistema reprodutivo, grande variabilidade genética disponível, grande amplitude de locais onde pode se desenvolver, considerável acúmulo de conhecimentos de genética, citogenética, anatomia, fisiologia, aspectos de interesse agrônomo e, mais recentemente, biologia molecular. Além disso, é o terceiro mais importante cereal no mundo, sendo superado apenas pelo arroz e o trigo. Assim, o desenvolvimento das técnicas de cultura de tecidos, células e protoplastos tem uma importância relevante nesta espécie.

Regeneração de plantas a partir de cultura de tecidos em milho foi descrita há cerca de dez anos em uma linhagem de milho americana. Há cerca de 3-4 anos atrás o desenvolvimento da cultura "in vitro" em milho teve um grande impulso e hoje é possível regenerar plantas a partir de calos provenientes de embriões imaturos em vários genótipos adaptados a clima temperado. O estabelecimento de cultura de células totipotentes em suspensão foi reportado apenas para dois genótipos e as tentativas para se regenerar plantas a partir de protoplastos ainda não tiveram sucesso.

Existe, portanto, a necessidade de se desenvolver a metodologia de cultura de tecidos e células em milho, estendê-la a um número maior de genótipos, incluindo-se os adaptados a clima tropical, estudar os mecanismos genéticos que controlam a diferenciação de células "in vitro" e avaliar a extensão de seu potencial para auxiliar programas de melhoramento. Pesquisas nesse sentido são fundamentais para permitir a exploração da cultura de tecidos e células em milho, para a aquisição de novos conhecimentos de genética básica, fisiológica e molecular, para a transformação genética "in vitro" e para sua aplicação prática ao melhoramento genético.

O presente trabalho teve como objetivo estudar alguns aspectos do desenvolvimento e da aplicação da metodologia de cultura "in vitro" de milho. Para tanto foram utilizadas linhagens homozigóticas de milho adaptadas a clima tropical. O trabalho foi dirigido no sentido de:

- Avaliar a capacidade de regeneração de plantas em linhagens homozigóticas.
- Estudar a herança da capacidade de regeneração de plantas a partir de cultura de tecidos em milho utilizando-se algumas famílias.
- Obter calos embriogênicos friáveis em culturas de longa duração.
- Estabelecer culturas de células totipotentes em suspensão.

- Avaliar calos embriogênicos friáveis e células em suspensão como fonte de células para o isolamento de protoplastos.
- Estudar alguns aspectos histológicos e citológicos de calos de milho.
- Avaliar a ocorrência de variação somaclonal em linhagens homozigóticas de milho.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Consideração gerais sobre cultura de tecidos vegetais

A própria teoria celular, expressa independentemente e quase simultaneamente por SCHLEIDEN (1838) em relação a plantas e por SCHWANN (1839) considerando plantas e animais, admite implicitamente que a célula tem capacidade de autonomia e, além disso, é totipotente. O interesse pelo desenvolvimento da cultura de tecidos e células "in vitro" para se demonstrar esta autonomia e totipotência data do século passado. Porém, a primeira abordagem experimental bem sucedida para cultura de células ocorreu apenas em 1912, quando BURROWS & CARREL estabeleceram um método para se cultivar tecidos animais. Foram necessários mais alguns anos para que esse sucesso se estendesse para os tecidos vegetais.

A possibilidade de se cultivar tecidos não organizados de vegetais por períodos ilimitados de tempo foi reportada independentemente e simultaneamente para cenoura (GAUTHERET, 1939; NOBÉCOURT, 1939a) e híbrido de *Nicotiana glauca* x *Nicotiana langsdorffii* (WHITE, 1939a). O ácido indolacético, um hormônio recém-descoberto, foi utilizado para estimular e manter a divisão celular de massas de células em proliferação, que haviam sido obtidas espontaneamente em cultura de tecidos cambiais de cenoura e de tumores produzidos espontaneamente pelo híbrido interespecífico de *Nicotiana*.

A primeira tentativa bem sucedida de se obter cultura de tecidos em monocotiledôneas ocorreu em 1947-1949 quando LA RUE estabeleceu culturas de endosperma de milho (*Zea mays* L.) e obteve sub-culturas.

As propostas de novas composições químicas para os meios de cultura teve uma importância considerável no desenvolvimento das pesquisas de cultura "in vitro". Um importante estudo foi desenvolvido por MURASHIGE e SKOOG (1962) sobre os requerimentos minerais de cultura de tecidos de tabaco. Desse estudo resultou a formulação de um meio muito mais concentrado em sais minerais, especialmente NO₃ e NH₄, do que os meios utilizados até então. Este meio possibilitava um crescimento das culturas cinco a sete vezes mais ativo do que os outros. Seguindo-se esse trabalho, outros pesquisadores sugeriram outros meios de cultura, a maioria deles contendo alta concentração de sais minerais. A descoberta de novos hormônios e substâncias que podem atuar como reguladores de crescimento também teve um

papel fundamental para o desenvolvimento da área de cultura de tecidos e células vegetais.

Como discutido por GAUTHERET (1985), nos primeiros trabalhos com cultura de tecidos a atenção dos pesquisadores era dirigida para a produção de calos. O termo calo, no contexto de cultura de tecidos é utilizado para denominar massas não-organizadas de células parenquimáticas em proliferação. Com a idade, esses calos podem apresentar regiões meristemáticas, traqueídeos e células pigmentadas (CONSTABEL, 1984). Embora nesses primeiros trabalhos alguns pesquisadores tenham observado estruturas organizadas nos calos (NOBÉCOURT, 1939b; WHITE, 1939 b), a totipotência de células somáticas, ou seja, a possibilidade de se regenerar plantas a partir de cultura de células somáticas foi constatada apenas cerca de vinte anos mais tarde. Em 1957, SKOOG e MILLER demonstraram a possibilidade de se manipular com hormônios a formação de gemas e raízes em culturas de tabaco. STEWARD et al. (1958) e REINERT (1958, 1959) demonstraram a diferenciação e maturação de embriões somáticos em culturas de células de cenoura. Plantas inteiras, aparentemente normais podiam ser regeneradas a partir desses embriões somáticos (STEWARD et al., 1966). Posteriormente, vários outros pesquisadores reportaram o fenômeno de regeneração de plantas a partir de cultura de tecidos. Isto ocorria particularmente em algumas famílias de dicotiledôneas, como as Umbelliferae, Solanaceae e Cruciferae. Recentemente o sucesso da regeneração de plantas a partir de cultura de tecidos tem se estendido para outros grupos vegetais, incluindo-se as gramíneas.

Os estudos pioneiros de cultura de tecidos estabeleceram os padrões básicos de estímulo e resposta das células cultivadas "in vitro". As massas de células, denominadas calos, são submetidas a uma sequência de mudanças de meios que permitem a sua manutenção e proliferação, bem como a subsequente morfogênese. Com o avanço das pesquisas nessa área, observando-se mais em profundidade as respostas das células cultivadas "in vitro" em um número maior de espécies, constatou-se que as vias de desenvolvimento de plantas nessas culturas ocorrem de modo complexo e com um certo grau de plasticidade.

Atualmente é bem conhecido que existem duas vias básicas de regeneração de plantas a partir de cultura de tecidos: organogênese e embriogênese. Na organogênese ocorre a diferenciação e desenvolvimento "de novo" de órgãos, parte aérea e raízes, a partir de células meristemáticas de tecidos cultivados "in vitro". Ainda se tem dúvidas se a origem dessas células meristemáticas ocorre a partir de uma única célula ou de um grupo de células. STEWART (1978), baseado em observações de quimeras, sugeriu que a formação de um meristema apical envolve um grupo de três ou mais células que, por sua vez, podem ou não ser derivadas de uma célula única. Entretanto, a ausência ou frequência muito baixa de quimeras em gemas adventícias e a alta frequência de mutantes não-quiméricos em plantas regeneradas sugerem sua origem a partir de uma célula única (BROERTJES & KEEN, 1980). O desenvolvimento de gemas e raízes em culturas "in vitro" ocorre, geralmente, de modo semelhante ao observado "in vivo", inclusive com a presença de tecido vascular se esten-

dendo para dentro da massa de células que constituem o calo (HACCIUS, 1978). A embriogênese somática, por sua vez, caracteriza-se pela diferenciação de embriões a partir de células meristemáticas, que geralmente ocorrem dentro do calo como pequenos grupos discretos de células (McWILLIAM *et al.*, 1974; TISSERAT & DeMASON, 1980; NESSLER, 1982.). Como demonstrado para algumas espécies, esses grupos de células podem se desenvolver em um embrião ou um agregado de embriões com adicional desenvolvimento de embriões secundários, que frequentemente surgem a partir de embriões maiores e mais maduros (HALPERIN, 1966; AMMIRATO, 1974). Existem algumas evidências histológicas de que os embriões somáticos se originam a partir de células individuais em culturas em suspensão de cenoura (McWILLIAM *et al.*, 1974; HACCIUS, 1978) e salsação (DUSTAN *et al.*, 1982), em folhas de *Dactylis glomerata* (CONGER *et al.*, 1983) e em calos provenientes de embriões, folhas e inflorescências de *Pennisetum* (VASIL & VASIL, 1982). Entretanto, a origem dos embriões somáticos a partir de células individuais ou grupos de células em outras espécies é ainda uma questão em aberto.

A maturação dos embriões somáticos parece ocorrer de modo semelhante aos embriões zigóticos, mas uma grande variabilidade nos padrões de maturação também tem sido observada (HALPERIN & WETHERELL, 1964; AMMIRATO & STEWARD, 1971; KONAR *et al.*, 1972, LU *et al.*, 1982, 1983; NOVAK *et al.*, 1983). Como discutido por AMMIRATO (1985), alguns fenômenos ocorrem com certa frequência na maturação dos embriões somáticos, tais como: germinação precoce, embriões múltiplos, malformação da parte aé-

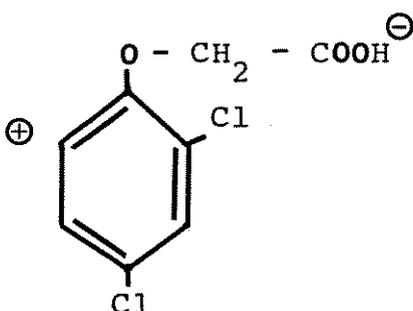
rea e emergência prematura da parte aérea. Estes fenômenos ainda não são bem estudados. Até o momento, ainda não se compreende totalmente a flexibilidade dos sistemas de organogênese e embriogênese somática para regeneração de plantas e como ela pode ser regulada em condições de cultura. Um aspecto importante a ser considerado em cultura de tecidos é o controle genético da capacidade de regeneração de plantas "in vitro". Existem evidências para a existência desse controle genético em algumas espécies, tais como alfafa (KEYES & BINGHAM, 1979; REISCH & BINGHAM, 1980), milho (BECKERT & QING, 1984; TOMES & SMITH, 1985; HODGES *et al.*, 1985, 1986), arroz (MIAH *et al.*, 1985, ABE & FUTSUHARA, 1986) e petúnia (IZHAR & POWER, 1977). TOMES e SMITH (1985) encontraram variação genotípica do tipo aditiva e, em alguns casos, efeito de heterose em experimentos dialélicos parciais com cinco linhagens de milho. Foi proposta a existência de dois genes nucleares dominantes com interação envolvidos diretamente no controle da capacidade de regeneração a partir de cultura de tecidos em alfafa (REISCH & BINGHAM, 1980) e algumas linhagens americanas de milho (HODGES *et al.*, 1985).

Nos últimos 40-50 anos, muitos fenômenos regulados por hormônios têm sido descobertos em plantas superiores. O número de substâncias que agem como hormônios em plantas é aparentemente limitado, pelo menos considerando-se os conhecimentos de que dispomos até o momento. Estas substâncias são classificadas em grupos denominados auxinas, citocininas e giberelinas. Sabe-se que o etileno, que é produzido por todas as plantas superiores, também tem propriedades de regulador de

crescimento. Além disso, tem se tornado evidente que a maioria das plantas contêm substâncias que podem atuar como inibidores de crescimento, tais como ácidos fenólicos e ácido abscísico (ABA).

As auxinas foram os primeiros hormônios vegetais descritos (WENT, 1928; KOEL & HAAGEN-SMIT, 1931). O ácido indolacético (IAA) é a principal auxina que ocorre naturalmente em plantas (BANDURSKI & NONHEBEL, 1984). O conhecimento da estrutura química do IAA levou à descoberta de compostos com estruturas relacionadas, que têm atividade de auxina. Esta descoberta teve consequências importantes que levaram ao conhecimento dos requerimentos para que uma substância atue como auxina e ao desenvolvimento de herbicidas sintéticos. Uma característica comum das substâncias que atuam biologicamente como auxinas é a presença de um grupo carboxila com uma carga negativa livre e uma carga positiva num anel aromático que deve estar a $5,5 \text{ \AA}$ da carga negativa (THIMANN & LEOPOLD, 1955 - citado por BANDURSKI e NONHEBEL, 1984). Existem sugestões de que esta estrutura química é necessária para a ligação dessas substâncias a uma proteína receptora na célula vegetal. Os efeitos do IAA em plantas superiores são bastante variados e envolvem: estímulo da divisão celular, estímulo da elongação celular, estímulo do crescimento da parte aérea da planta, inibição do crescimento da raiz, controle da diferenciação do sistema vascular, controle da diferenciação em cultura de tecidos, controle da dominância apical, retardamento da senescência, promoção do florescimento e desenvolvimento e amadurecimento de frutos.

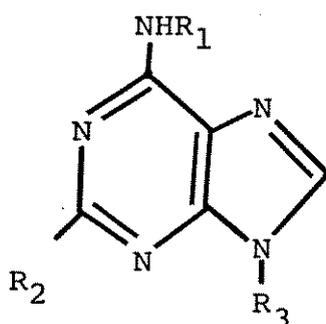
Como discutido por MOORE (1979), HATZIOS e PENNER (1982), FEDTKE (1982) e BANDURSKI e NONHEBEL(1984), existem hoje vários herbicidas que têm ação fisiológica semelhante ao IAA e estão compreendidos em quatro principais categorias do tipo: ácido indol, ácido naftaleno, ácido clorofenoxi e ácido benzóico. Entre as auxinas do tipo ácido clorofenoxi, encontra-se o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) cuja fórmula está representada abaixo.



O 2,4-D tem se mostrado altamente efetivo para a iniciação e manutenção de culturas de tecidos de várias espécies, incluindo-se as gramíneas. Em concentrações adequadas, o 2,4-D, é bastante efetivo e seletivo para a maioria das dicotiledôneas e comparativamente não efetivo para as monocotiledôneas. Como discutido por FEDTKE (1982), os efeitos causados em plantas sensíveis devem-se a um desequilíbrio hormonal provocado pelo herbicida.

São classificados como citocininas os compostos naturais ou sintéticos que promovem citocinese em células vegetais. Os testes de divisão celular mais frequentemente utilizados para se detectar atividade de citocinina envolvem o crescimento de calos provenientes de medula de caule de tabaco

(MURASHIGE & SKOOG, 1962) e calos provenientes de cotilédones de soja (MILLER, 1963), em uma concentração ótima de auxina. Assim, uma substância é classificada como citocinina com base em sua atividade fisiológica, ao invés de um critério químico. Entretanto, a vasta maioria de citocininas com estrutura química conhecida são aminopurinas com substituição no nitrogênio 6, como representada abaixo (HORGAN, 1984).



A primeira substância conhecida com atividade de citocinina foi isolada de DNA de esperma autoclavado de arenque (MILLER *et al.*, 1956). Esta substância foi identificada como 6-(furfurylamino) purina e foi denominada cinetina. A cinetina não era um componente do DNA, mas derivado da quebra e rearranjo durante a autoclavagem. Alguns anos depois, uma citocinina foi isolada a partir de sementes imaturas de *Zea mays* L. e denominada zeatina (LETHAM *et al.*, 1964). Outras citocininas têm sido isoladas a partir de tRNAs e tecidos vegetais (HORGAN, 1984). Além de seu efeito na divisão celular, as citocininas apresentam uma série de efeitos fisiológicos quando aplicadas externamente a plantas inteiras, tecidos ou órgãos vegetais. Entre esses efeitos destaca-se a interrelação com auxinas na re-

gulação da morfogênese (SKOOG & MILLER, 1957; WEILER & SPANIER, 1981), estímulo do alongamento celular e retardamento da senescência (HORGAN, 1984).

As giberelinas (GAs) constituem uma grande família de ácidos diterpênicos. Como discutido por JONES e MACMILLAN (1984), essas substâncias provavelmente têm ocorrência universal em plantas superiores. Em geral, órgãos reprodutivos, tais como sementes imaturas, contêm mais giberelinas do que tecidos vegetativos. Segundo esses autores, ainda se discute se as giberelinas promovem crescimento das plantas por influenciar a divisão celular ou expansão celular ou ambos.

O etileno é produzido por todas as plantas superiores e, em pequenas quantidades, interage com outros hormônios vegetais, especialmente auxinas, para coordenar e regular uma ampla variedade de processos de crescimento e desenvolvimento (BEYER *et al.*, 1984). É uma substância gasosa com estrutura química bastante simples, C_2H_4 , sendo derivada a partir dos carbonos 3 e 4 da metionina (LIBERMAN & MAPSON, 1964). Esta conversão ocorre através de um composto intermediário estável denominado ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico. É produzido em todas as partes das plantas superiores (ABBELES, 1973). Como discutido por BEYER *et al.* (1984), sua produção varia de acordo com o tipo de tecido e estágio de desenvolvimento. Geralmente é sintetizado mais intensamente em tecidos meristemáticos e regiões nodais.

Como discutido por MILBORROW (1984), extratos de plantas superiores invariavelmente contêm inibidores do

crescimento. Alguns compostos monofenólicos, por exemplo, parecem estimular a atividade da enzima IAA oxidase, enquanto que ácidos difenólicos parecem inibir esta atividade (NITSCH & NITSCH, 1962). Entretanto, até o momento, o envolvimento dos ácidos fenólicos na regulação do crescimento não é bem conhecido (MILBORROW, 1984). O ABA, por sua vez, é um inibidor presente em todos os tecidos de plantas vasculares examinados. É transportado rapidamente através do floema e de célula para célula. Como os outros hormônios vegetais, o ABA apresenta efeitos fisiológicos múltiplos. Tem efeito principalmente na regulação dos estômatos, dormência de sementes, dormência de gemas e abscisão de órgãos (MOORE, 1979; MILBORROW, 1984).

Os mecanismos de regulação dos hormônios e reguladores de crescimento sintéticos em plantas e culturas de tecidos ainda são desconhecidos. Em cultura de tecidos, as auxinas e citocininas são os principais hormônios utilizados para a indução de calos e para a diferenciação celular. Como discutido por FUKUDA e KOMAMINE (1985), as auxinas geralmente induzem alongação ou divisão em células vegetais e são um dos mais importantes fatores da iniciação e da sequência de diferenciação em plantas superiores. Existem indicações de que nos sistemas de cultura "in vitro" a iniciação da diferenciação celular é determinada pela relação citocinina/auxina numa ação cooperativa desses dois hormônios (SKOOG & MILLER, 1957; FUKUDA & KOMAMINE, 1980). Não há evidências diretas mostrando o papel primário das auxinas e citocininas na diferenciação celular, mas tem sido reportado que esses hormônios podem induzir rapidamente a expres-

são de alguns genes específicos em coleótilos de milho (ZURFLUH & GUILFOYLE, 1982) e células isoladas de *Zinnia* (FUKUDA & KOMAMINE, 1983). Ácido giberélico, ácido abscísico e etileno também podem ter algum efeito no processo de diferenciação celular, como discutido por FUKUDA e KOMAMINE (1985). Além disso, estudos sobre diferenciação de traqueídeos em calos de *Zinnia*, *Parthenocissus*, cenoura, alface e *Sinapsis* indicam que outros fatores físicos e químicos, além de hormônios, podem influenciar a diferenciação celular "in vitro". Esses fatores são: carboidratos como, por exemplo, sacarose (WETMORE & RIER, 1963; MINOCHA & HALPERIN, 1974), fontes de nitrogênio inorgânico (PHILLIPS & DODDS, 1977), aminoácidos (ROBERTS & BABA, 1968), luz (MIZUNO *et al.*, 1971), temperatura (SHININGER, 1979) e pressão osmótica (FUKUDA & KOMAMINE, 1980). Entretanto, ainda não foram realizadas análises detalhadas dos mecanismos de ação de tais fatores no processo de diferenciação de células "in vitro".

Consideráveis progressos têm sido feitos na área de cultura de tecidos vegetais desde o seu início, há cerca de 40 anos. As manipulações básicas de um sistema de cultura "in vitro" incluem calos, células e protoplastos. A aquisição de novos conhecimentos nesta área tem permitido o desenvolvimento da metodologia em diferentes espécies. As aplicações práticas da cultura "in vitro" de plantas superiores surgiram e se desenvolveram, no início lentamente e depois de uma maneira explosiva. Atualmente, as principais aplicações da cultura de tecidos, células vegetais e protoplastos têm sido nas áreas de morfologia, bioquímica, patologia e genética, incluindo-se a

agricultura (KLEESE & DUVICK, 1980; SONDAHL *et al* 1983; SHARP *et al*, 1984; EVANS & SHARP, 1986).

2.2. Cultura "in vitro" em gramíneas

Até há poucos anos atrás, as gramíneas eram consideradas espécies recalcitrantes no que se refere ao estabelecimento de culturas "in vitro" totipotentes (KING *et al*, 1978; COCKING, 1978). A intensificação das pesquisas nessa área permitiu um rápido progresso, principalmente após 1980, com a descoberta da embriogênese somática nessas espécies. A utilização de tecidos meristemáticos, tais como embriões imaturos, inflorescências jovens e folhas jovens, como explantes iniciais, e 2,4-D, como principal regulador de crescimento, foi de fundamental importância para a obtenção de calos totipotentes em gramíneas. Segundo VASIL & VASIL (1984), explantes de tecidos maduros de gramíneas geralmente levam à produção de calos não-regeneráveis ou que produzem apenas raízes.

Regeneração de plantas a partir de cultura de tecidos já foi obtida para muitas espécies de gramíneas que apresentam importância econômica (YAMADA, 1977; GREEN, 1978; VASIL *et al*., 1979; VASIL, 1985). A regeneração de plantas ocorre através de organogênese (RANGAN, 1974; NAKANO & MAEDA, 1979; SHIMADA & YAMADA, 1979; SPRINGER *et al*., 1979; LOWE *et al*., 1985) ou embriogênese somática (VASIL, 1982a, b, 1983; VASIL, 1986). A primeira observação de ocorrência de embriogênese

somática em cereais foi feita por NORSTOG (1970) em cevada, porém os embriões somáticos não regeneraram plantas. Os resultados obtidos para cultura de tecidos em gramíneas nos últimos 6-7 anos sugerem que a embriogênese somática é a via preferencial de regeneração "in vitro" nessas espécies (VASIL, 1985).

Os explantes, colocados em meio de cultura contendo 2,4-D, produzem calos de coloração branca ou amarelada, com aspecto opaco, compacto e, frequentemente, nodular. Esses calos possuem organização complexa, têm sido descritos como embriogênicos (VASIL & VASIL, 1980, 1981a) e têm sido obtidos a partir de diferentes explantes e genótipos em várias espécies de gramíneas, como por exemplo: *Sorghum bicolor* (DUNSTAN et al., 1978; WERNICKE & BRETTELL, 1980), *Sorghum arundinaceum* (BOYES & VASIL, 1984), *Oriza sativa* (WERNICKE et al., 1981; GENOVESI & MAGILL, 1982; ABE & FUTSURARA, 1985); *Pennisetum americanum* (VASIL & VASIL, 1981; BOTT & VASIL, 1984); *Pennisetum purpureum* (HAYDU & VASIL, 1981); *Panicum maximum* (LU & VASIL, 1981a); *Panicum miliaceum* e *Panicum miliare* (RANGAN & VASIL, 1983); *Panicum bisulcatum* e *Panicum millioides* (FLADUNG & HESSELBACH, 1986); *Echinochloa crusgalli* (WANG & YAN, 1984); *Setaria italica* (ZHI-HONG et al., 1984); *Coix lacrymajobii* (SUN & CHU, 1986; PRIOLI et al., 1985); *Saccharum officinarum* (HO & VASIL, 1983); *Triticum aestivum* (SHIMADA, 1978; MADDOCK et al., 1983; OZIAS-AKINS & VASIL, 1982); *Zea mays* (GREEN & PHILLIPS, 1975; LU et al., 1982); *Zea diploperennis* (PRIOLI et al., 1984).

Os calos de gramíneas são heterogêneos e a seleção visual pode ser extremamente importante para manter uma

linhagem de calos regeneráveis (NABORS *et al.*, 1983). Esses calos compactos e de organização complexa, não têm se mostrado adequados para o estabelecimento de culturas de células em suspensão e apenas raramente têm sido selecionados calos com características apropriadas para se iniciar essas culturas (VASIL, 1985).

Culturas de células em suspensão com capacidade de regenerar plantas têm sido estabelecidas em muitas espécies de angiospermas. Em gramíneas, entretanto, o estabelecimento de culturas de células totipotentes em suspensão é ainda um fenômeno raro (HARMS, 1982; VASIL & VASIL, 1984). Na maioria dos casos consistem de meristemas radiculares que liberam constantemente células grandes e vacuoladas, que geralmente não se dividem (KING *et al.*, 1978; KING, 1980). Tais culturas não são úteis para cultura de células e regeneração de plantas.

Recentemente, o estabelecimento de culturas de células em suspensão com capacidade de embriogênese foi reportado para algumas poucas espécies, ou seja, Pennisetum americanum (VASIL & VASIL, 1981b), Saccharum officinarum (HO & VASIL, 1983), Panicum maximum (LU & VASIL, 1981b), Pennisetum purpureum (VASIL *et al.*, 1983) e Zea mays L. (GREEN *et al.*, 1983; VASIL & VASIL, 1986).

A regeneração de plantas a partir de protoplastos em gramíneas também é, ainda, bastante difícil de ser obtida. Em quase todos os casos, os calos obtidos a partir de protoplastos não são regeneráveis (DALE, 1983; VASIL, 1983; VASIL, 1985). Calos embriogênicos, embriões somáticos e plântulas

verdes foram eventualmente obtidos a partir de protoplastos isolados de culturas de células em suspensão de *Pennisetum americanum* (VASIL & VASIL, 1980; LORZ et al., 1981), *Panicum maximum* (LU et al., 1981) e *Pennisetum purpureum* (VASIL et al., 1983). Em nenhum desses casos, entretanto, foi obtido sucesso na transferência das plântulas para o solo e desenvolvimento até a maturidade. Recentemente, foi reportada a regeneração de plantas a partir de calos provenientes de protoplastos de *Oriza sativa* (ABDULLAH et al., 1986; TORIYAMA & HINATA, 1986; SHIMAMOTO et al., 1986; FUJIMURA et al., 1986, YAMADA et al., 1986) e *Saccharum officinarum* (VASIL et al., 1986). As plantas de arroz foram desenvolvidas até a maturidade e algumas produziram sementes.

2.3. Cultura de tecidos, células e protoplastos de milho

O estabelecimento de culturas de tecidos totipotentes em milho era considerado extremamente difícil até 3-4 anos atrás (LU et al., 1982, 1983). Regeneração de plantas a partir de cultura de tecidos em milho foi descrita pela primeira vez em 1975 por GREEN e PHILLIPS. Esses autores reportaram regeneração em calos derivados de embriões imaturos da linhagem de milho americana A118. Esses resultados, entretanto, ficaram restritos a alguns poucos genótipos, e quase todas as informações publicadas se limitavam à linhagem A188, a despeito do empenho de vários grupos de pesquisa que iniciaram trabalhos nesta área. Estudos realizados por SPRINGER et al. (1979) mostraram

evidências de organogênese nas culturas da linhagem A188. Posteriormente foi descoberta a ocorrência de embriogênese somática em milho a partir de calos compactos de híbridos comerciais (LU *et al.*, 1982) e a partir de calos friáveis da linhagem A118 (GREEN, 1982). Desde então, novos progressos vêm sendo obtidos na área de cultura de tecidos de milho, incluindo-se a descoberta de novos genótipos que respondem favoravelmente às condições de cultura "in vitro" (NOVAK *et al.*, 1983; DUNCAN *et al.*, 1985; EARLE & GRACEN, 1985; LOWE *et al.*, 1985; RAPELA, 1985; TOMES & SMITH, 1985; FAHEY *et al.*, 1986; HODGES *et al.*, 1986; PRIOLI *et al.*, 1985a; PRIOLI & SONDAHL, 1987).

O desenvolvimento de culturas de tecidos de milho com capacidade de regeneração de plantas foi somente possível com a identificação de explantes adequados para se iniciar os calos, definição do meio de cultura e identificação de genótipos que respondem favoravelmente às condições experimentais utilizadas.

O primeiro e, aparentemente o mais apropriado, explante utilizado para se iniciar culturas regeneráveis em milho foi embrião imaturo isolado de sementes cerca de 11-14 dias após a polinização, com comprimento variando entre 1,0 - 2,0 mm (GREEN & PHILLIPS, 1975). A orientação dos embriões no meio tem grande influência na iniciação das culturas. Quando o embrião é colocado com o eixo embrionário em contato com o meio de cultura, ocorre a iniciação do calo a partir do escutelo. Quando a orientação é feita de modo que o escutelo fique em contato com o meio de cultura ocorre a germinação do embrião, o que

impede ou dificulta a formação de calo (GREEN & PHILLIPS, 1975; GREEN, 1978; LU *et al.*, 1982). Vários outros tecidos esporofíticos têm sido testados com relativamente pouco sucesso, tais como mesocótilo (HARMS *et al.*, 1976; TORNE *et al.*, 1980), espiga imatura (MOLNAR *et al.*, 1980), panícula jovem (RHODES *et al.*, 1982, 1986) e glumas de flores masculinas (SUPRASANNA *et al.*, 1986).

Embora diferentes meios de cultura sejam capazes de manter as culturas de tecido de milho provenientes de diferentes tecidos esporofíticos, os meios frequentemente usados são MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) e N6 (CHU *et al.*, 1975). O 2,4-D como principal regulador de crescimento é um componente crítico no meio de cultura. Concentrações entre 2,5-10 μM têm se mostrado adequadas para a iniciação e manutenção dessas culturas. As culturas são incubadas no escuro ou em condições de baixa intensidade luminosa, ou seja, aproximadamente $1,5 \text{ W.m}^{-2}$.

O calo que se forma a partir do escutelo geralmente tem aspecto compacto, nodular e opaco, e possui organização complexa. Ocorrência de meristemas apicais e radiculares (SPRINGER *et al.*, 1979; LOWE *et al.*, 1985) e meristemas que se diferenciam em embriões somáticos (VASIL & VASIL, 1985) foi encontrada nesses calos. A regeneração de plantas a partir dessas culturas ocorre com a redução do nível de 2,4-D ou a sua omissão no meio de cultura. As observações e as análises de culturas de tecidos de milho de vários genótipos sugerem a ocorrência de embriogênese somática como a principal via de regeneração de plantas nesta espécie (LU *et al.*, 1982, 1983; GREEN, 1982; GREEN *et*

al., 1983; NOVAK *et al.*, 1983; VASIL & VASIL, 1985; PRIOLI *et al.*, 1985; HODGES *et al.*, 1986, PRIOLI & SONDAHL, 1987), porém organogênese pode também ocorrer (SPRINGER *et al.*, 1979; LOWE *et al.*, 1985; VASIL & VASIL; 1985; PRIOLI & SONDAHL, 1987).

Os calos compactos regeneráveis, que se iniciam a partir do escutelo, são bastante heterogêneos e apresentam alta tendência de germinação dos embriões somáticos, mesmo quando mantidos em meio com 2,4-D, o que dificulta sua manutenção em culturas de longa duração. Para alguns genótipos tem sido possível selecionar setores que originam diferentes linhagens de calos. Em culturas da linhagem de milho americana B73, LOWE *et al.* (1985) selecionaram calos com alta capacidade de organogênese. Após mais de um ano de cultura, um setor de calo embriogênico foi selecionado a partir desses tecidos organogênicos.

Controle genético para capacidade de indução de calos embriogênicos a partir de embriões imaturos de milho foi observado por HODGES *et al.* (1985, 1986). Esses autores, sugerem a existência de dois genes dominantes com interação para controle de regeneração de plantas em algumas linhagens americanas de milho.

Além de calos compactos com organização bastante complexa, ocorre em milho um outro tipo de calo que é friável e embriogênico (GREEN, 1982; ARMSTRONG & GREEN, 1985; VASIL & VASIL, 1986). Caracteriza-se por apresentar morfologia relativamente indiferenciada e crescimento rápido. Quando observados com o auxílio de um microscópio estereoscópico ou microscópio de varredura, numerosos pró-embriões ou embriões somá-

ticos em estágio globular podem ser reconhecidos. Com o procedimento de sub-culturas a cada 15 dias, esses calos podem ser mantidos em cultura por longos períodos de tempo, sem alterar sua morfologia e sem perder a capacidade de regeneração (GREEN & RHODES, 1982). O desenvolvimento dos embriões somáticos segue uma sequência muito semelhante à sequência de desenvolvimento dos embriões zigóticos, o que ocorre quando os calos são transferidos para meio sem 2,4-D (GREEN, 1982).

Os calos embriogênicos friáveis são iniciados diretamente a partir do escutelo ou, mais frequentemente, como setores espontâneos que surgem nos calos compactos regeneráveis. A linhagem de milho americana A188 tem tendência para produzir calos embriogênicos altamente friáveis, o que tem se repetido em vários experimentos (GREEN, 1982; GREEN *et al.*, 1983; ARMSTRONG & GREEN, 1985; KAMO & HODGES, 1986). Em 1986, VASIL e VASIL, reportaram o estabelecimento de uma linhagem de calo embriogênico friável a partir de culturas provenientes de embrião imaturo de um híbrido comercial de milho denominado Dekalb XL82. O estabelecimento de culturas de calos embriogênicos altamente friáveis é, ainda, um fenômeno raro, descrito na literatura apenas para esses dois genótipos. Aparentemente, existe um controle genético para a produção desse tipo de calo, como discutido por TOMES (1985). Além disso, modificações no meio de cultura podem influenciar a produção desses calos. ARMSTRONG e GREEN (1985), utilizando embriões somáticos da linhagem A188, reportaram o efeito de L-prolina para aumentar a frequência de indução de calos embriogênicos friáveis e a produção de embriões

somáticos obtidos nessas culturas. Esses resultados não se repetiram para cultura do híbrido Dekalb XL82 (VASIL & VASIL, 1986). Calos embriogênicos friáveis de milho têm sido utilizados para a seleção de mutantes resistentes e análogos de aminoácidos (HIBBERD *et al.*, 1980; HIBBERD & GREEN, 1982; HIBBERD, 1984; HIBBERD *et al.*, 1986) e herbicidas (ANDERSON & GEORGESON, 1986).

Os calos embriogênicos friáveis também têm se mostrado adequados para o estabelecimento de culturas em suspensão de milho com capacidade de produzir calos e regenerar plantas quando plaqueadas sobre meio sólido, como reportado para a linhagem A188 (GREEN *et al.*, 1983; KAMO & HODGES, 1986) e para o híbrido Dekalb XL82 (VASIL & VASIL, 1986). Apesar dos esforços nessa área, essas são as únicas publicações de sucesso em regeneração de plantas a partir de culturas em suspensão de milho.

As culturas de células em suspensão têm sido frequentemente utilizadas para o isolamento de protoplastos em milho (OSWALD *et al.*, 1977; POTRYKUS *et al.*, 1977; SHANNON & LIU, 1977; SHERIDAN, 1977; SANCHES de JIMENEZ *et al.*, 1978; BRAR *et al.*, 1979; POLIKARPOCHKINA *et al.*, 1979; McCORMICK, 1980; CHOUREY & ZURAWSKI, 1981; LUDWIG *et al.*, 1986). Raramente em cereais tem sido estabelecida uma cultura em suspensão adequada para o isolamento de protoplastos. Culturas em suspensão típicas com populações de células não-diferenciadas, não-organizadas, com alta capacidade de divisão e agrupadas em pequenos agregados, porém não-regeneráveis, têm sido estabelecidas para Triticum monococcum (GAMBORG & EVELEIGH, 1968), para a variedade

de milho Black Mexican Sweet (SHERIDAN, 1975, 1982) e para a linhagem de milho B73 (POTRYKUS *et al.*, 1977). Protoplastos podem ser obtidos com relativa facilidade a partir de células dessas culturas bastante dispersas e de crescimento rápido (POTRYKUS *et al.*, 1979; CHOUREY & ZURAWSKI, 1981; LUDWIG *et al.*, 1986). Esses protoplastos, entretanto, não possuem capacidade de regenerar plantas e, como discutido por HARMS (1982), teriam pouco uso em genética de células somáticas.

Por outro lado, culturas em suspensão heterogêneas (KING *et al.*, 1978), também não têm se mostrado adequadas para o isolamento de protoplastos totipotentes (HARMS, 1982). Não há ainda, publicações de isolamento de protoplastos totipotentes de milho a partir das culturas em suspensão da linhagem A118 e do híbrido Dekalb XL82 ou qualquer outra fonte de células.

Isolamento de protoplastos a partir de calos embriogênicos friáveis da linhagem A188 foi reportado por IMBRIE-MILLIGAN e HODGES (1986). Cerca de 25% desses protoplastos se mostraram viáveis quando plaqueados em densidade de 1.10 protoplastos/ml. Os microcalos resultantes cresceram até 0,1 - 0,5 mm de diâmetro e pararam de crescer. VASIL e VASIL (1986), reportaram a obtenção de calos a partir de protoplastos da culturas em suspensão estabelecida para o híbrido Dekalb XL82.

2.4. Variação Somaclonal

Há alguns anos atrás foi observado que plantas regeneradas a partir de células somáticas, utilizando-se cultura de tecidos, não são geneticamente uniformes. A variabilidade genética apresentada por essas plantas é denominada "variação somaclonal". Tem sido discutido se a variação somaclonal resulta de variabilidade genética pré-existente em células somáticas (SKIRVIN & JANICK, 1976) ou se é induzida por compostos presentes no meio de cultura (LORZ & SCOWCROFT, 1983). As publicações existentes na literatura sugerem que ambas origens são possíveis (D'AMATO, 1986).

A variação encontrada para as plantas regeneradas a partir de cultura "in vitro" tem sido atribuída a uma série de fatores, incluindo-se a fonte de explante, genótipo da planta, grau de organização meristemática, compostos presentes no meio de cultura, idade da cultura e consequências cumulativas de eventos ocorridos durante o período de cultura (D'AMATO, 1977; ORTON, 1983, 1984, LARKIN *et al.*, 1985; D'AMATO, 1986; BENZION *et al.*, 1986). Inicialmente supunha-se que a variação somaclonal era decorrente principalmente de poliploidias, aneuploidias e rearranjos cromossômicos. Muitos exemplos de tais alterações em plantas obtidas através de cultura de tecidos foram demonstrados (D'AMATO, 1977; ORTON, 1983; LARKIN *et al.*, 1985; BENZION *et al.*, 1986). Mais recentemente, a análise de variantes somaclonais permitiu descrever vários outros fenômenos ocorrendo durante o período de cultura.

Como discutido por D'AMATO (1978) e LARKIN *et al.* (1985), alterações numéricas de cromossomos são frequentemente observadas em culturas de tecidos vegetais e têm sido reportadas em várias espécies, incluindo-se tabaco, cana-de-açúcar, trigo, batata e milho. As aneuploidias incluem plantas monossômicas e trissômicas que são úteis para a localização de genes nos cromossomos e podem ser obtidas nessas culturas em um tempo relativamente curto. Análise de meiose de plantas regeneradas tem também mostrado a ocorrência de inversões, translocações e deleções resultantes de quebras cromossômicas. Tem sido sugerido que replicação tardia de heterocromatina pode estar envolvida neste fenômeno. Se a replicação de uma região do cromossomo for suficientemente tardia, ocorre a formação de ponte seguida de quebra. É possível que a alta taxa de divisão celular nas culturas "in vitro" acentue este fenômeno e aumente a frequência de quebras (McCOY *et al.*, 1982; BENZION *et al.*, 1986).

Como considerado por LARKIN *et al.* (1985), inversões cromossômicas podem ocorrer nos somaclones sem ter efeito fenotípico imediato, a não ser que a expressão dos genes próximos ao local de quebra seja alterada, ocorrendo, então, um efeito de posição. Seguindo-se a meiose em uma inversão pericêntrica heterozigota e recombinação da região invertida, alguns gametas teriam deleções e duplicações. De modo semelhante, nos heterozigotos para inversão paracêntrica pode ocorrer crossing-over na região invertida, formação de pontes na anáfase I e formação de fragmentos acêntricos, com consequentes deleções em al-

guns gametas.

Translocações e trocas de cromátides-irmãs durante a meiose têm sido encontradas em somaclones (LAPITAN *et al.*, 1984). Em estudos recentes de variação somaclonal para álcool desidrogenase-1 (ADH-1) em trigo, DAVIES (citado por LARKIN *et al.*, 1985) analisou segregação para isoenzimas ADH-1 em progênies de 551 somaclones. Essas enzimas diméricas são codificadas por um conjunto de genes localizados nos cromossomos 4A, 4B e 4D. Foram encontradas progênies com quatro doses do gene Adh-A1 sendo todas as cópias funcionais, como determinado pela intensidade de bandas de isoenzimas. Essas progênies apresentavam translocações entre os cromossomos 4A e 7B. Em somaclones de trigo também têm sido observados isocromossomos (KARP & MADDOCK, 1984) que, do mesmo modo que as translocações encontradas para ADH, são úteis para estudos de efeito de dosagem de genes.

Mesmo quando híbridos férteis podem ser obtidos convencionalmente, a recombinação entre os dois genomas pode ocorrer em baixa frequência, ou não ocorrer, o que dificulta a transferência de genes desejáveis. Uma aplicação de rearranjos cromossômicos induzidos através de cultura de tecidos seria aumentar a frequência de introgressão de genes exóticos em um genoma que se tenha interesse (LARKIN *et al.*, 1985).

Outro fenômeno que pode ocorrer na variação somaclonal, é o aumento da frequência de recombinação gênica. SIBI *et al.* (1984) detectaram alterações na frequência de recombinação em locos marcadores em somaclones de tomate. Esses autores usaram dois marcadores no cromossomo I e dois marcadores

no cromossomo 11. Estudos prévios haviam indicado que cada par era separado por 20-30 unidades. De cada planta F1, um cotilédone foi utilizado para indução de calos e regeneração de plantas e a planta foi desenvolvida para ser utilizada como controle. A análise de milhares de somaclones e plantas controle mostrou que a distância entre os genes marcadores aumentou em cerca da metade dos somaclones. Esse aumento de distância no mapa genético foi ao redor de 30%, o que pode ser significativo para se obter recobinantes desejáveis para genes muito próximos (LARKIN *et al.*, 1985).

Amplificação gênica pode ser extremamente importante para estudos de genética básica e melhoramento. O fenótipo da planta pode ser alterado de modo significativo, sem que novas informações genéticas sejam introduzidas. Respostas a condições de estresse, incluindo-se herbicidas (DONN *et al.*, 1984 - citado por LARKIN *et al.*, 1985) podem ser alteradas através de amplificação de genes já existentes no genoma da planta. Existem numerosos exemplos de amplificação gênica em linhagens de células animais como resposta a pressão de seleção (SCHIMKE *et al.*, 1977, WAHL *et al.*, 1979). Aumento da proporção de certas frações de heterocromatina também tem sido observada quando culturas de células vegetais são iniciadas (DURANTE *et al.*, 1983 - citado por LARKIN *et al.*, 1985). Aumento em certas classes de DNA repetitivo foi encontrada em dihaplóides de *Nicotina sylvestris* (DE PAEPE *et al.*, 1982/83 - citado por LARKIN *et al.*, 1985). Amplificação de uma única sequência gênica devido à pressão de seleção em cultura de células vegetais foi demonstra-

da pela primeira vez por DONN *et al.* (1984). Esses autores obtiveram uma linhagem de células de alfafa 20 vezes mais resistente ao herbicida L-fosfinotricina, que é um inibidor competitivo da enzima glutamato sintase. Essa linhagem de células apresentou 6-7 vezes mais atividade de glutamato sintase, 8 vezes o teor de mRNA para esta enzima e 4-11 vezes o número de cópias do gene que codifica esta enzima.

Ocorrência de deficiência de DNA também tem sido observada em plantas regeneradas a partir de células somáticas através de cultura de tecidos. Deficiência para um clone de DNA repetitivo 25S-rDNA foi, por exemplo, encontrada em somaclones de batata (LANDSMANN & UHRIG, 1985).

Um outro aspecto extremamente interessante da cultura de células vegetais é a aparente ativação de transposons, que também são denominados elementos controladores. A primeira evidência ocorreu em variantes de alguns híbridos somáticos de *Nicotiana tabacum* (EVANS *et al.*, 1983) e um protoclonal de *Nicotiana tabacum* (LORZ & SCOWCROFT, 1983), que apresentaram alta frequência de manchas nas folhas, associadas, em alguns casos, a variegação na pigmentação das flores. Mutante instável para cor das flores foi encontrado em um somaclone de alfafa (GROOSE & BINGHAM, 1986a, b). A planta doadora apresentava flores de cor vermelha, que é condicionada por um gene dominante, e possuía genótipo Cccc. O mutante era homocigoto (cccc), apresentando flores brancas. O novo alelo recessivo, no entanto, era de algum modo instável produzindo, entre 7500 flores, 0,12% flores de cor vermelha. Explantes desse mutante foram utiliza-

dos para reiniciar cultura de tecidos e, entre 1356 plantas regeneradas, 23% apresentaram flores vermelhas. Portanto, a instabilidade desse mutante foi aumentada em condições de cultura de tecidos. Estes resultados sugerem que as condições de cultura *in vitro* não apenas ativaram o gene mutador, mas também induziram uma alta frequência de reversão da mutação. Observações semelhantes têm sido, recentemente, feitas por PESCHKE *et al.* (1986) em somaclones de milho OH43 x A188. Os genomas parentais possuem sequências que reagem com probes do elemento controlador "Activador" (Ac), mas não apresentam atividade alguma de Ac. Cruzamentos testes de 301 plantas regeneradas resultaram em 56 testes positivos para o elemento Ac. Dessas plantas, 10 apresentaram atividade para o elemento controlador Ac, o que não foi encontrado em plantas desenvolvidas a partir de sementes. As mesmas linhagens de calo que produziram essas 10 plantas produziram também plantas sem atividade do Ac.

Variabilidade genética envolvendo, aparentemente, apenas um loco gênico tem sido observada em plantas regeneradas a partir de cultura *in vitro*. Essas mutações apresentam segregação de acordo com o modelo manofatorial em autofecundações e cruzamentos-testes e foram descritas, por exemplo, em tabaco (DE PAEPE *et al.*, 1981; PRAT, 1983) tomate (EVANS & SHARP, 1983; EVANS *et al.*, 1984), alface (ENGLER & GROGAN, 1984), trigo (LARKIN *et al.*, 1984), arroz (SUN *et al.*, 1983) e milho (EDALLO *et al.*, 1981; McCOY & PHILILPS, 1982; EARLE & GRACEN, 1985; WOODMAN & KRAMER, 1986). Alguns poucos mutantes com modificações na estrutura primária do gene, tais como alte-

rações em bases simples ou pequenas inserções no gene ou seu promotor, têm sido estudados. Recentemente BRETTELL *et al.* (1986) isolou um variante eletroforético para Adh-1 em somaclones de milho. Um clone genômico foi isolado do gene mutante utilizando-se o clone Adh-1 p15.1 como "probe". Análises com diferentes enzimas de restrição apresentaram resultados consistentes com a hipótese de ser esta uma mutação de ponto, sem deleções ou inserções. Clonagem e sequenciamento do gene mutante mostrou alterações em uma única base do DNA. Outra evidência de mutação na estrutura primária do gene é um variante de tabaco resistente ao herbicida clorsulfuron, isolado através de seleção "in vitro". Este mutante possui acetolactato sintase, enzima alvo do herbicida, altamente resistente, sem aumentar em quantidade quando comparada com a enzima de plantas não resistentes (CHALEFF & MAUVAIS, 1984).

Alterações na expressão de famílias multigênicas também têm sido observadas em somaclones. É conhecido que fenótipos para os quais a análise genética e do produto gênico sugerem o controle de gene simples, podem estar, na realidade, relacionados com pequenas famílias multigênicas (SCARPULLA *et al.*, 1982). Variabilidade genética para gliadinas, uma classe de proteínas de reserva de sementes em trigo, codificada por uma família multigênica, foi obtida por LARKIN *et al.* (1984) e COOPER *et al.* (1986). Modificações nas bandas dessas proteínas sugerem alterações na regulação da expressão dessa família de genes.

Variabilidade genética observada em somaclones não se restringe apenas ao núcleo. Rearranjos no genoma citoplasmático também têm sido encontrados. Exemplos de características que apresentam herança citoplasmática são: variantes morfológicas em alface (SIBI, 1976, citado por LARKIN *et al.*, 1985); resistência à toxina T, macho-esterilidade e alterações no padrão de restrição do DNA mitocondrial em milho com citoplasma T (GENGENBACH *et al.*, 1977, 1981; BRETTEL *et al.*, 1980; UMBECK & GENGENBACH, 1983) alterações no padrão de restrição de DNA de cloroplasto em tomate (FLICK *et al.*, citado por EVANS *et al.*, 1984); alterações no padrão de restrição de DNA mitocondrial de batata (KEMBLE & SHEPARD, 1984); ocorrência de macho-esterilidade citoplasmática em somaclones de milho provenientes de culturas de tecidos de plantas férteis (GRACEN & EARLE, 1985).

Um outro fenômeno interessante é a ocorrência de mutantes homozigotos em somaclones Ro, ou seja, plantas obtidas diretamente de culturas "in vitro". São conhecidos alguns exemplos, tais como, mutante anão em somaclones de arroz (OONO, 1981), alteração no pedicelo de tomate (EVANS & SHARP, 1983) e cor do grão de trigo (LARKIN *et al.*, 1984). Alguns mutantes se comportam como monogênicos em cruzamentos-testes, enquanto outros apresentam segregação alterada. Ainda não se tem explicação para a ocorrência dessas mutações recessivas homozigotas em somaclones RO. Algumas poderiam ser devidas a heterozigose pré-existente na planta doadora. EVANS & SHARP (1983), interpretaram a mutação homozigota ocorrida em tomate como re-

sultante de crossing-over mitótico.

Assim, parecem existir vários mecanismos responsáveis pela variação somaclonal, desde mutações simples envolvendo alterações na molécula de DNA até alterações cromossômicas, como rearranjos e mudanças no número de cromossomos.

Embora o reconhecimento da variação somaclonal seja relativamente recente, ela tem despertado o interesse de pesquisadores em várias áreas da Ciência, principalmente em genética e melhoramento. Além de sua importância para se adquirir novos conhecimentos de genética básica, fisiológica e molecular, a variação somaclonal tem sido avaliada quanto ao seu potencial de contribuição para o melhoramento vegetal. Alguns exemplos recentes têm sido publicados, tais como, aumento do vigor em alface (ENGLER & GROGAN, 1984), aumento do teor de proteínas em arroz (SCHAEFFER *et al.*, 1984), tolerância a salinidade e aumento de produtividade em linho (MCHUGHEN & SWARTZ, 1984), resistência a Pseudomonas e Alternaria em tabaco (THANUTONG *et al.*, 1983, resistência a Fusarium em alfafa (HARTMAN *et al.*, 1984) pedicelo "jointless" em tomate (EVANS & SHARP, 1983) e algumas características agronômicas em milho (GRACEN & EARLE, 1985).

2.4.1. Variação somaclonal em milho

Variabilidade em plantas regeneradas a partir de cultura "in vitro" tem sido reportada há alguns anos para

várias espécies (LARKIN & SCOWCROFT, 1981), incluindo-se o milho. Poliploidia, aneuploidia e mutações aparentemente monogênicas para endosperma e plântulas foram observadas em plantas de milho regeneradas a partir de calos provenientes de embriões imaturos (EDALLO *et al.*, 1981; RICE, 1982; McCOY & PHILLIPS, 1982). Com os progressos na área de cultura de tecidos de milho, tem sido possível, recentemente, ampliar esses estudos e avaliar o potencial da variação somaclonal para estudos genéticos e para aplicação prática ao melhoramento do milho. O trabalho pioneiro nesta área foi desenvolvido por EARLE & GRACEN (1985) no Departamento de Melhoramento e Biometria da Universidade de Cornell, USA. Esses autores utilizaram a linhagem isogênica de milho W182BN fértil e com esterilidade masculina T,C e S. Esta é uma das linhagens utilizadas para produção de híbridos comerciais no Nordeste dos Estados Unidos.

Avaliações de 88 progênies de somaclones desenvolvidas no campo mostraram a ocorrência de mutantes anões, braquíticos, folhas "blotch", virescentes e estriados. Alguns desses mutantes eram recessivos e, segundo os autores, aparentemente semelhantes àqueles obtidos por EDALLO *et al.* (1981), RICE (1982) e McCOY & PHILLIPS (1982). A base genética desses mutantes obtidos por GRACEN & EARLE (1985) não foi ainda bem determinada. Entretanto, foram selecionadas linhagens homozigotas de plantas anãs, estriadas e folhas "blotch".

Algumas progênies de somaclones W182BN apresentaram variabilidade genética para características agrônomicas, tais como, aumento de vigor, florescimento tardio, aumento

ou diminuição da altura, perfilhamento e número de espigas, folhas verde mais escuras e indução ou reversão de esterilidade masculina citoplasmática. Avaliações preliminares de híbridos envolvendo linhagens derivadas de somaclones mostraram que alguns desses híbridos eram significativamente mais produtivos do que os mesmos híbridos envolvendo a linhagem original (GRACEN & EARLE, 1985).

Em 1986, WOODMAN & KRAMER apresentaram estudos de ocorrência de variação somaclonal na linhagem B73, uma das mais importantes linhagens elites de milho nos Estados Unidos. Os autores obtiveram frequência de 35% de mutação em 110 somaclones. Todos os mutantes segregaram como monogênicos recessivos. Foram obtidas mutações para cor de espiga e aborto de 50% de pólen ou sementes. Os autores não descreveram avaliações para características de interesse agrônomo. Mutantes deficientes em clorofila, vivíparos, anões, macho-estéreis, com esdosperma branco, diminuição do número de fileiras na espiga e diminuição da altura de plantas foram observados por WILLIAMS e WIDHOLM (1986) em somaclones da linhagem FR27rhm, que é um derivado da linhagem B73.

Variação somaclonal em linhagens americanas de milho de pipoca foi reportado por PRIOLI & SONDAHL (1987). Foram obtidos mutantes para características qualitativas, quantitativas e citoplasmáticas, tais como, deficiência em clorofila, braquíticos, anões, aumento ou diminuição de altura de plantas, alterações em época de florescimento, esterilidade masculina e aumento de vigor.

Estudos de variação somaclonal em milho a nível bioquímico e molecular foram recentemente realizados. Em 1986, BRETTEL *et al.* realizaram uma avaliação para ocorrência de mutantes de ADH-1 e ADH-2 em somaclones da linhagem A188 de milho. Foi encontrado um mutante para ADH-1 e, como anteriormente descrito, análises desse somaclone mostraram alteração para um par de bases do gene Adh-1 no exon 6. Essa mutação é responsável pela substituição de uma valina por um ácido glutâmico nessa enzima.

Mutantes albinos, estriados e com folhas enrugadas e vivíparos, foram encontrados entre somaclones da linhagem A188 (GOBEL & LORZ, 1986; GOBEL *et al.*, 1986). As plantas foram desenvolvidas em casa de vegetação e não foram feitas avaliações para características de importância agrônômica. Análise molecular de plantas R2 (BROWN & LORZ, 1986) mostrou diferenças significativas no estado de metilação do DNA.

McNAY *et al.* (1984) analisaram o DNA mitocondrial de células em suspensão da variedade Black Mexican Sweet. Análise dos fragmentos de restrição produzidos por duas endonucleases mostraram estabilidade do genoma mitocondrial nas células analisadas.

Como discutido por EARLE & GRACEN (1985), os primeiros estudos de variação somaclonal em milho já têm mostrado excelentes perspectivas para a utilização desta fonte de variabilidade em trabalhos de genética básica e melhoramento. A aquisição de novos conhecimentos nesta área é de fundamental importância para uma melhor compreensão da natureza da variação

somacional e sua exploração em milho e outras espécies.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Cultura de tecidos, células e protoplastos de milho

3.1.1. Capacidade de regeneração "in vitro" em linhagens homozigóticas de milho.

Trinta e quatro linhagens homozigóticas de milho do Banco de Germoplasma do Departamento de Genética e Evolução - Instituto de Biologia - Universidade Estadual de Campinas, foram avaliadas quanto à capacidade de regeneração de plantas "in vitro". Essas linhagens foram derivadas de nove diferentes germoplasmas, como descrito na Tabela 1. Foram realizados três experimentos independentes, iniciados em fevereiro e maio de 1985 e fevereiro de 1986. As plantas doadoras foram desenvolvidas no campo, em uma área experimental do campus da Uni-

TABELA 1: Linhagens homozigóticas de milho avaliadas quanto à capacidade de regeneração de plantas "in vitro".

LINHAGEM	ORIGEM	ENDOSPERMA
Cat 100-1	Raça Cateto *	Flint
-2	· ·	·
-3	· ·	·
-4	· ·	·
-5	· ·	·
-6	· ·	·
-7	· ·	·
-8	· ·	·
Cat 85-1	85% Cateto + 15% População	Flint
-2	Coastal Tropical Flint	·
-3	· ·	·
Eto-1	Eto Amarillo	(Tipo)flint
TuxTe 50-1	População Tuxpeño ** x Teosinte Chalco	· ·
-2	· ·	· ·
-3	· ·	· ·
-4	· ·	· ·
Ast-1	Raça Tuxpeño	(Tipo)flint
TuxPc-1	População Tuxpeño 87,5% + Pajimaca	·
-1 sud2	Cubano 12,5%	· sugary
Cyd-1	Cuban yellow Dent	(Tipo) Dente
TuxMo-1	População Tuxpeño 87,5% + Mo5 12,5%	·
Tux 100-1	Raça Tuxpeño	Dente
-2	· ·	·
-3	· ·	·
-4	· ·	·
-5	· ·	·
-6	· ·	·
-7	· ·	·
-8	· ·	·
-9	· ·	·
-10	· ·	·
-11	· ·	·
-12	· ·	·
-13	· ·	·

* Raça autóctone de milho flint adaptada ao sul da Costa Atlântica do Brasil.

** Raça de milho dente adaptado a baixas altitudes da Costa Atlântica do México.

versidade Estadual de Campinas. Espigas de plantas autofecundadas foram coletadas 10-13 dias após polinização e esterilizadas durante 20 min. com solução de hipoclorito de sódio 0,75% contendo 1 gota/ 100 ml de Tween-20 e enxaguadas duas vezes com água destilada e esterilizada. Embriões imaturos (1,0-1,5 mm de comprimento) foram retirados das sementes, sob um microscópio estereoscópico (8 x), com o auxílio de um estilete de ponta arredondada (Figura 1) e então utilizados para indução de calos (GREEN & PHILLIPS, 1975). Os embriões foram imediatamente colocados sobre meio de cultura sólido (Figura 2) de indução e manutenção de calos, contendo sais N6 (CHU *et al.*, 1975), glicina (2 mg/l), tiamina-HCl (15 uM), ácido nicotínico (7,5 uM), piridoxina (7.5 uM), inositol (550 uM), sacarose (3% e 6%), 2,4-D (2,5 uM e 10 uM) e gelrite (Kelco Co.) (2,3 g/l). O pH foi ajustado para 5,8 antes dos meios serem autoclavados. As culturas foram mantidas no escuro dentro de caixas de madeira cobertas com tecido preto (Figura 3), em câmara com temperatura de $28 \pm 1^{\circ} \text{C}$ e sub-culturas foram feitas a cada 15-20 dias. Os calos foram avaliados quanto à capacidade de produzir embriões somáticos pelo menos duas vezes no período de 10 a 35 dias de cultura em meio com 2,4-D. A utilização de um microscópio estereoscópico (magnificação 8x) facilitou o reconhecimento dos embriões somáticos. Os calos que produziram embriões somáticos foram considerados embriogênicos e aqueles que não produziram embriões somáticos foram considerados não-embriogênicos. Nos casos em que houve dúvidas quanto à ocorrência de embriões somáticos verdadeiros ou apenas estruturas nodulares semelhantes ao escutelo

Figuras 1-4. Fotografias mostrando algumas etapas da cultura de tecidos de milho. Figura 1. Embrião imaturo recém-retirado da semente. 10X. Figura 2. Embriões imaturos recém-inoculados em meio de cultura de indução de calos, suplementado com 2,4-D. Figura 3. Manutenção de calos em placas de Petri contendo meio de cultura, mantidas em condições de escuro. Figura 4. Regeneração de plantas após transferência dos calos para frascos contendo meio sem 2,4-D, mantidos em presença de luz.

desses embriões, o calo foi considerado não-embriogênico. Um calo embriogênico típico está representado na Figura 11.

Para os três experimentos (fevereiro/1985, maio/1985 e fevereiro/1986) foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado no modelo fatorial com três repetições por tratamento. Cada repetição consistiu de 20 embriões imaturos colocados sobre 25 ml de meio de cultura em uma placa de Petri plástica (100 mm de diâmetro x 15 mm de altura). No primeiro experimento, iniciado em fevereiro/1985, foram utilizados dois meios de indução e manutenção de calos contendo 2,4-D (10 μ M), que diferiam apenas no teor de sacarose (3% e 6%). Nos dois outros experimentos foram utilizados quatro meios de cultura contendo: 2,4 -D (2,5 μ M) + sacarose (3%), 2,4-D (2,5 μ M) + sacarose (6%), 2,4-D (10 μ M) + sacarose (3%) e 2,4-D (10 μ M) + sacarose (6%). Apenas as vinte linhagens que apresentaram capacidade de regeneração foram utilizadas nas análises estatísticas. A transformação ($x + \frac{1}{2}$), onde x é o número de calos embriogênicos induzidos a partir de embriões imaturos, foi utilizada nessas análises (STEEL & TORRIE, 1980). Foram realizadas análises de variância para os três experimentos em conjunto e separadamente.

Após 20-35 dias em meio de indução os embriões somáticos foram isolados individualmente ou em pequenos grupos (5-8 embriões) e transferidos para frascos (150 ml) contendo meio de regeneração consistente de sais MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), tiamina-HCl (15 μ M), ácido nicotínico (7,5 μ M), piridoxina (7,5 μ M), sacarose (2%) e gelrite (2,3 g/l). Não foram utilizados reguladores de crescimento no meio de regenera-

ção. As culturas foram mantidas em câmara de crescimento (Figura 4) ajustada para 14 horas de fotoperíodo ($125 \text{ uE. m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) e temperatura de $28 \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Avaliações para produção de plântulas foram feitas pelo menos três vezes no intervalo de 5-35 dias em meio sem 2,4-D. Foi feita análise de correlação entre o número de calos embriogênicos em meio com 2,4-D e número de calos que produziram plântulas em meio sem 2,4-D. As plântulas (6-8 cm de altura), obtidas após 10-20 dias a partir dos calos, foram transferidas para frascos de vidro (350 ml) contendo meio de crescimento consistindo de metade da concentração de sais MS, sacarose (2%), vitaminas e gelrite (2,0 g/l). Após 10-15 dias em meio de crescimento as plântulas foram colocadas em vaso (500 ml) contendo vermiculita, regadas com solução de Hoagland e mantidas em condições de alta umidade por 5-8 dias. Após esta fase de aclimação as plântulas foram transferidas para vasos contendo terra e mantidas em casas de vegetação ou então foram transferidas para o campo.

3.1.2. Calos embriogênicos friáveis.

Calos embriogênicos compactos, opacos e morfológicamente complexos, que têm sido denominados Tipo I (ARMSTRONG & GREEN, 1985), obtidos a partir de embriões imaturos de quatro linhagens homozigóticas de milho (Cat 100-1, Cat 100-6, Cat 100-8, TuxMo-1), foram utilizados para o estabelecimento de culturas de longa duração. Regiões desses calos que eram alta-

mente embriogênicas e que apresentavam aspecto menos compacto e opaco foram consideradas adequadas para a derivação de calos embriogênicos friáveis e semi-friáveis, de crescimento rápido, denominados Tipo II (ARMSTRONG & GREEN, 1985). As linhagens acima referidas foram escolhidas, com exceção da Cat 100-1, com base na tendência dos calos para produzirem os setores em questão. Os calos foram transferidos para meio de manutenção de calos friáveis contendo sais N6, tiamina-HCl (15 uM), ácido nicotínico (7,5 uM), piridoxina (7,5 uM), inositol (550 uM), glicina (2mg/l), sacarose (3%), 2,4-D (5,0 uM e 10 uM) e gelrite (2,3 g/l). As sub-culturas foram feitas a cada 15 dias e os calos foram mantidos no escuro em temperatura de $28 \pm 1^{\circ} \text{C}$. Os calos friáveis e semi-friáveis foram transferidos para meio de regeneração contendo ou não cinetina (10 uM). Foram utilizadas duas concentrações de sacarose (2% e 6%), no meio de regeneração. No meio contendo sacarose 6%, os calos foram mantidos por apenas 10-20 dias e, então, transferidos para o meio contendo este açúcar na concentração de 2%. As plântulas obtidas no meio de regeneração foram transferidas para meio de crescimento e posteriormente para vermiculita e solo.

3.1.3. Cultura de células em suspensão.

Calos embriogênicos friáveis das linhagens Cat 100-1, e TuxMo-1, foram utilizados para iniciar culturas de células em suspensão. Os calos foram colocados em erlemmyers

(250 ml) contendo meio líquido, em uma densidade de 2g de peso fresco de calo por 100 ml de meio, e mantidos no escuro sob agitação (150 rpm). Os meios de cultura utilizados consistiram de:

- 1) Sais MS, tiamina-HCl (15 uM), ácido nicotínico (7,5 uM), piridoxina (7,5 uM), biotina (0,5 mg/l), ácido málico (100 mg/l), ABA (0,1 uM), 2,4-D (10, 20, 40 e 80 uM), IAA (0 e 10 uM), sacarose (15 %), glicose (0,5%), L-glutamina (100 mg/l), L-asparagina (50 mg/l), L-arginina (50 mg/l) e L-glicina (10 mg/l);
- 2) Sais MS, excluindo-se os compostos KNO_3 e NH_4NO_3 , tiamina-HCl (15 uM), ácido nicotínico (7,5 uM), piridoxina (7,5 uM), biotina (0,5 mg/l), ácido málico (100 mg/l), ABA (0,1 uM), 2,4-D (10 uM e 20 uM), IAA (0 e 10 uM), sacarose (15 g/l), glicose (5 g/l), L-glutamina (800 mg/l), L-asparagina (250 mg/l), L-arginina (200 mg/l) e L-glicina (75 mg/l).

Sub-culturas foram feitas inicialmente a cada 3 dias escoando-se o meio de cultura e substituindo-o por meio fresco. Após 25-30 dias as sub-culturas passaram a ser feitas a cada 7 dias apenas com a adição de meio fresco. Após dois, três e quatro meses, amostras das culturas foram filtradas, utilizando-se filtros com poros de 250 um de diâmetro e colocadas sobre meio sólido de manutenção de calos friáveis, como descrito anteriormente. Os calos, assim obtidos foram mantidos no mesmo meio com sub-culturas a cada 15 dias. Para se obter a regeneração de plantas, estes calos foram transferidos para o mesmo meio sem 2,4-D.

3.1.4. Isolamento e cultura de protoplastos

Calos embriogênicos friáveis e células em suspensão das linhagens Cat 100-6 e TuxMo-1, foram utilizados para o isolamento de protoplastos. Os calos e as células em suspensão foram colocados em meio de incubação contendo sais N6, tiamina-HCl (15 uM), ácido nicotínico (7,5 uM), piridoxina (7,5 uM), glicina (2 mg/l), glutamina (0,1 g/l), 2,4-D (10 uM), cloreto de cálcio (0,05 M), sacarose (0,01 M) e glicose (0,02 M). Este meio possui osmolaridade aproximada de 0,660 Os/Kg H₂O e densidade específica aproximada de 1,036 g.cm⁻³. O pH foi ajustado para 5,6 e o meio foi filtrado (filtro 0,4 um). Após 30 min., quando as células já se tornaram plasmolisadas, foi adicionada uma solução enzimática consistindo de celulase 0,5%, 1,0% ou 2% (Cellulysin - Calbiochem Behring Corp.), macerase 0,5%, 1,0% ou 2% (Macero-Calbiochem Behring Corp.), pectoliase 0,5%, 1,0% ou 2% (Pectolyase Y-23, Seishin Pharmaceutical Co. Ltd.), tampão MES (3 mM), e o mesmo meio de incubação descrito anteriormente. O pH foi ajustado para 5,6 e a solução enzimática foi filtrada (filtro 0,4 um). A incubação foi feita no escuro durante 4 horas, sob agitação lenta, em temperatura de 28° C. Os protoplastos assim obtidos foram separados por filtração (filtro 75 um) e flutuados através de centrifugação a 40 x g durante 5 min. em meio com osmolaridade aproximada de 0,68 Os/Kg H₂O e densidade específica aproximada de 1,08g.cm⁻³. Este meio contém sais N6, tiamina-HCl (15 uM), glicina (2mg/l), glutamina (0,1 g/l) 2,4 D (10 uM), cloreto de cálcio (0,005 M) e sacarose (0,58 M). O pH foi ajustado para 5,8 e o meio foi filtrado

(filtro 0,4 μ m). Sob estas condições os protoplastos que flutuaram no topo da solução, foram coletados com uma pipeta Pasteur e lavados novamente, repetindo-se o procedimento descrito. Para retirar o excesso de sacarose foi adicionada solução de cloreto de cálcio à suspensão de protoplastos 2:1 (v/v). Após centrifugação a 40 x g durante 5 minutos os protoplastos sedimentados foram ressuspensos em meio de cultura com osmolaridade aproximada de 0,5 Os/Kg H₂O. Este meio de cultura é constituído por sais N6, tiamina-HCl (15 μ M), ácido nicotínico (7,5 μ M), piridoxina (7,5 μ M) glicina (2 mg/l), cloreto de cálcio (0,005 M), inositol (550 μ M), glutamina (0,1 g/l), manitol (0,1 M), sacarose (30 g/l), glicose (30 g/l), água de côco (20 ml/l) e 2,4-D (10 μ M). A suspensão de protoplastos foi cultivada em pequenas gotas de meio de cultura contidas em placas de Petri plásticas (50 mm de diâmetro x 15 mm altura).

3.2. Microscopia óptica e eletrônica de calos de milho.

Com o objetivo de estudar alguns aspectos histológicos e citológicos de calos embriogênicos Tipo II de milho, amostras (1-2 mm de diâmetro) de calos semi-friáveis e friáveis das linhagens Cat 100-1 e TuxMo-1, mantidos em meio com 2,4-D (10 μ M), foram fixados com glutaraldeído 4% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M (pH 7,5) durante 4 h a 4^o C. A seguir, as amostras foram lavadas durante 15 horas (2x30min. e 1x14h) em tampão cacodilato de sódio 0,1M (pH 7,4) e pós-fixadas com OsO₄

(0,5%) no mesmo tampão por 12 horas a 4^o C. Os espécimes foram então lavados com água destilada durante 15h (2x30 min. e 1x14 h). Contrastação "in bloco" foi feita com acetato de uranila 2% em tampão maleato de sódio 0,05M (pH 6,0) durante 2-5h (KARNOVSKY, 1967). Posteriormente, as amostras foram lavadas em água destilada (3x15min. e 2x30min) e desidratadas em gradiente de acetona, como se segue: 30% - 10 min., 50% - 10 min., 70% - 20 min., 100% - 2x30 min. e 1x60 min. A inclusão foi feita em mistura Epon/Araldite (MOLLENHAUER, 1964), seguindo-se a composição: Epon 812 (25%), anidrido dodecenilsuccínico (DDSA) (55%), Araldite 6005 (15%), dibutil ftalato (DBP) (0,5%) e benzildimetilamina (BDMA) (4,5%). Como solvente para esta mistura, utilizou-se acetona nas seguintes proporções resina : acetona: 1:3 - 15 min. 1:1 - 50 min. e 3:1 - 12 h. As amostras foram então incluídas em resina pura, que foi polimerizada a 38^o C durante 24 h. e 60^o C durante 48h.

Cortes ultra-finos (60-90nm) para microscopia eletrônica foram obtidos com navalhas de vidro em ultramicrotomo Porter-Blum MT-1. Os cortes foram montados em telinhas de cobre e contrastados com citrado de chumbo (REYNOLDS, 1963). As micrografias eletrônicas foram obtidas em um microscópio eletrônico Zeiss EM-10.

Cortes semi-finos (1-2 um) para microscopia óptica foram obtidos com navalhas de vidro em ultramicrotomo Porter Blum MT-1. Os cortes foram colocados sobre uma lâmina de vidro para microscopia e tratados com ácido periódico 1% durante 5 min. Após lavagem com água, os cortes foram corados com azul

de toluidina (0,5%), em solução de bórax (1%).

Para estudos de nucléolo, amostras de calos embriogênicos friáveis da linhagem Cat 100-1 foram submetidas a método de impregnação por prata descrito por RISUENO *et al.* (1973). As amostras foram fixadas em solução aquosa de formaldeído (10%) e hidroquinona (1%) na proporção 1:1 (v/v) durante 90 min. A seguir, foram lavadas em água destilada (3 x 30 min.) e, então, imersas em solução de nitrato de prata (2%), onde permaneceram por 16 h a 70 °C, em condições de escuro. Após serem lavadas com água destilada (30 min.), os calos foram novamente colocados na solução fixadora anteriormente descrita durante 1 h. e depois lavados em água destilada (30 min.). Foi, então, feita uma imersão em ácido acético 45% (20-30 min.), seguida pelo esmagamento dos calos. A lamínula foi retirada com aplicação de nitrogênio líquido. A seguir, as amostras foram desidratadas com etanol e foi feita a montagem das lâminas com Bálsamo do Canadá.

Reação de Feulgen foi realizada para calos fixados em etanol-acético 3:1 (v/v). Esses calos foram hidrolisados por 1 h. e 30 min. com HCl 4N à temperatura ambiente, seguindo-se a metodologia utilizada por VIDAL *et al.* (1984). Após a aplicação do Reativo de Schiff, os calos foram esmagados e as lamínulas retiradas com nitrogênio líquido. A seguir, as amostras foram desidratadas com etanol e foi feita a montagem com Bálsamo do Canadá.

3.3. Herança da capacidade de regeneração "in vitro".

O controle genético da capacidade de indução de calos embriogênicos a partir de embriões imaturos de milho foi estudado em quatro conjuntos familiares (Tabela 2) envolvendo duas linhagens que nos experimentos anteriormente descritos apresentaram alta capacidade de regeneração (Cat 100-1, Cat 100-8) e cinco linhagens que não apresentaram capacidade de regeneração (Tux 100-1, Tux 100-5, Tux 100-8 e Tux 100-14). Cada conjunto familiar foi constituído pelas linhagens parentais L1 e L2, pelo seu cruzamento L1 x L2, pela geração F2 do cruzamento L1 x L2, obtido por autofecundação (L1 x L2)A, e pelos retrocruzamentos envolvendo os dois parentais (L1 x L2) x L1 e (L1 x L2) x L2. As plantas doadoras foram desenvolvidas no campo. Embriões imaturos (1,0 -1,5 mm de comprimento) foram retirados de pelo menos cinco espigas de cada genótipo e colocados sobre meio de indução de calos contendo sais N6, glicina (2 mg/l), tiamina-HCl (15 uM), ácido nicotínico (7,5 uM), piridoxina (7,5 uM), inositol (550 uM), sacarose (3% e 6%), 2,4-D (7,5 uM) e gelrite (2,3 g/l). O pH foi ajustado para 5,8 antes dos meios serem autoclavados. Foram inoculados 20 embriões imaturos por placa de Petri. O número total de embriões utilizados para cada genótipo e tratamento está descrito nas Tabelas 4-7. As culturas foram mantidas no escuro em temperatura de $28 \pm 1^{\circ}\text{C}$ e após 15 dias, foram transferidas para condições de luz. No intervalo de 10-35 dias em meio com 2,4-D as culturas foram avaliados quanto à indução de calos com capacidade de produzir embriões somáti-

TABELA 2 . Conjuntos familiares de milho utilizadas para avaliação da capacidade de regeneração de plantas "in vitro". O parental representado à esquerda foi utilizado como fêmea.

=====

I - Linhagens parentais e cruzamentos

1. Cat 100-1 x Tux 100-8
2. Cat 100-8 x Tux 100-5
3. Cat 100-8 x Tux 100-14
4. Cat 100-8 x Tux 100-1

II - Constituição dos conjuntos

Conjuntos 1 - 3

L1
 L2
 L1 x L2
 L2 x L1
 (L1 x L2) A
 (L2 x L1) A
 (L1 x L2) x L1
 L1 x (L1 x L2)
 (L1 x L2) x L2
 L2 x (L1 x L2)
 (L2 x L1) x L1
 L1 x (L2 x L1)
 (L2 x L1) x L2
 L2 x (L2 x L1)

Conjunto 4

L1
 L2
 L1 x L2
 (L1 x L2) A
 (L1 x L2) x L1
 (L1 x L2) x L2

=====

L1 = Linhagem parental 1

L2 = Linhagem parental 2

A = Autofecundação

cos, como anteriormente descrito.

Para as análises estatísticas foram utilizados: (1) Teste de qui-quadrado. (2) Teste de homogeneidade de acordo com BRANDT-SNEDECOR (SCOSSIROLI, 1962).

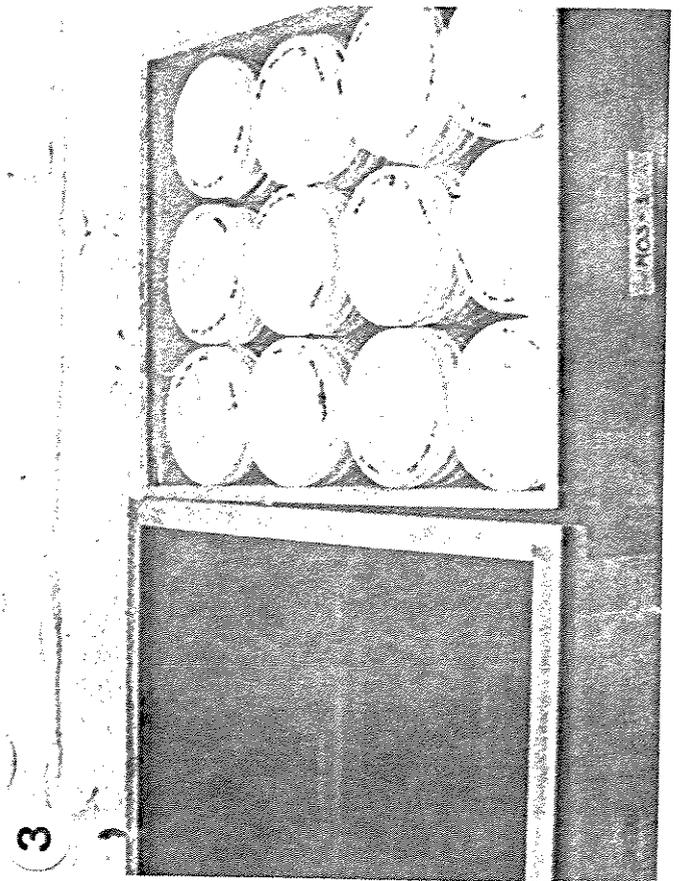
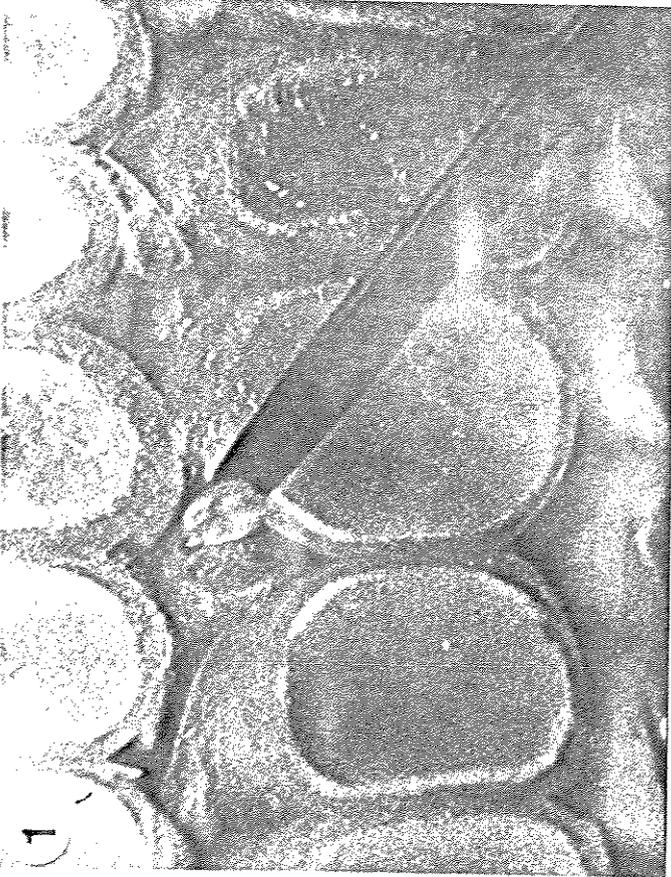
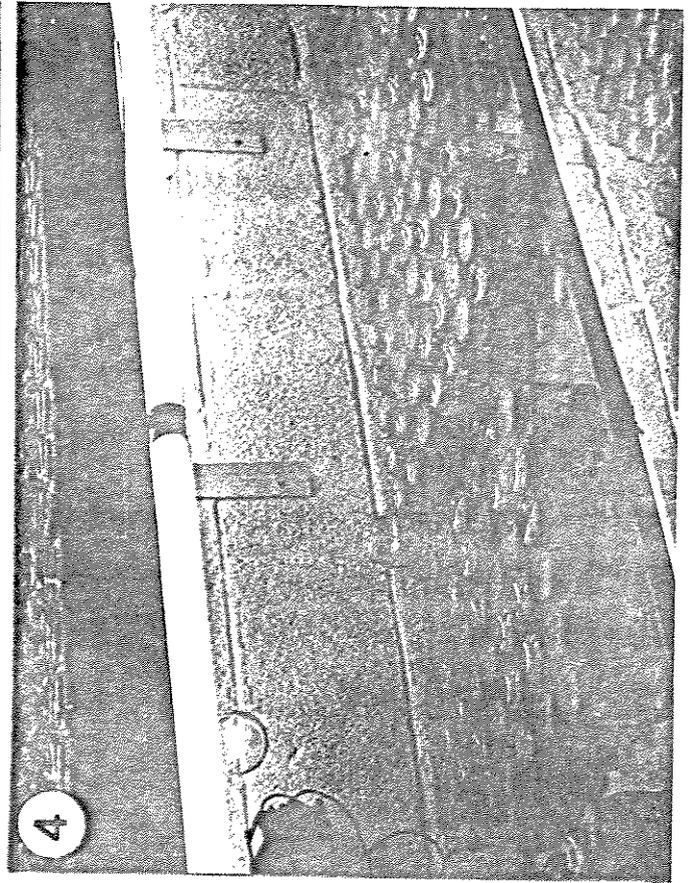
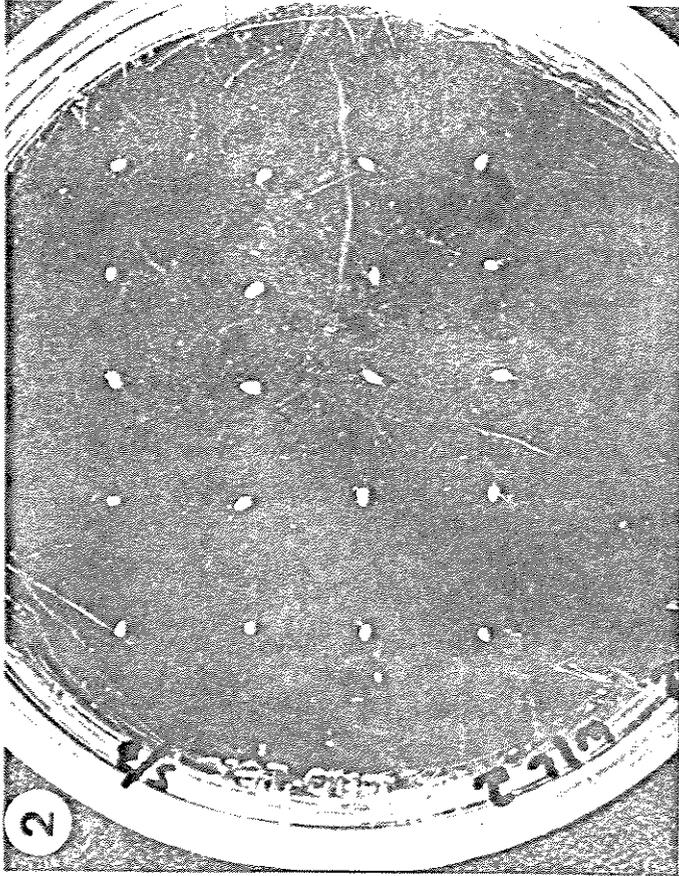
3.4. Variação somaclonal em linhagens homozigóticas de milho

3.4.1. Somaclones.

Progênes (R1 e R2) de plantas R0, regeneradas a partir de calos Tipo I e Tipo II de milho, foram avaliadas quanto à ocorrência de variabilidade genética. Esta avaliação foi feita para as linhagens Cat 100-1 (152 somaclones R0), Cat 100-8 (28 somaclones R0) e Ast-1 (23 somaclones R0). As plantas R0 foram desenvolvidas no campo ou em casa de vegetação e, sempre que possível, foram autofecundadas ou então cruzadas com a linhagem original. As progênes (R1 e R2) foram desenvolvidas no campo durante os verões 1984/1985 e 1985/1986.

3.4.2. Variação somaclonal.

Plantas regeneradas R0 e progênes R1 e R2 foram avaliadas quanto à ocorrência de variações morfológicas,



deficiência em clorofila, alterações de endosperma, macho-esterilidade, acúmulo de aminoácidos e alterações em polipeptídeos de zeína.

3.4.2.1. Avaliação dos somaclones no campo.

As progênies R1 e R2 de somaclones foram desenvolvidas no campo, em uma área experimental irrigada, no campus da Universidade Estadual de Campinas. Os plantios foram feitos nos meses de outubro de 1985 e outubro e dezembro de 1986, em linhas de 10m, com espaçamento de 1m entre as linhas. Foram plantadas 50 sementes de cada somaclone por linha. Os somaclones foram avaliados quanto à ocorrência de variações genéticas que pudessem ter interesse do ponto de vista agrônomo e de estudos de genética básica, tais como, mutantes para morfologia da planta, macho-esterilidade, deficiência em clorofila, alterações de endosperma, época de florescimento e vigor.

Os mutantes foram autofecundados e cruzados com a linhagem original e com plantas-irmãs de mesma progênie. Aqueles que apresentaram macho-esterilidade foram cruzados com a linhagem original e também com linhagens testadoras para alguns tipos de esterilidade masculina citoplasmática.

3.4.2.2. Determinação de pigmentos fotossintéticos.

Determinações de clorofila total, clorofilas *a* e *b* e carotenóides totais foram realizadas para plântulas normais e mutantes deficientes em clorofila. As plântulas foram desenvolvidas no campo e em câmara de crescimento com temperatura de $28 \pm 1^{\circ} \text{C}$, fotoperíodo de 14 horas e iluminação artificial de lâmpadas fluorescentes e incandescentes (2W : 1 W) com intensidade luminosa de aproximadamente 30 lux. Amostras de folhas (2,0g) foram coletadas cinco dias após a emergência das plântulas e imediatamente utilizadas para a determinação de pigmentos fotossintéticos.

Para a determinação de clorofila, as folhas foram homogeneizadas em acetona fria 80% (v/v) e o extrato centrifugado durante 5 min. a 15 xg. Imediatamente após a centrifugação o sobrenadante foi utilizado para medidas de absorbância a 645nm e 663nm, realizadas em um espectrofotômetro. Para as determinações de clorofila total foi utilizada a equação de ARNON (1949), como se segue:

$$\text{Clorofila total (mg/l)} = 20,2 D_{645} + 8,02 D_{663}$$

Para a determinação de carotenóides totais, os pigmentos fotossintéticos dissolvidos em acetona foram transferidos para hexano em um funil de separação, com a adição de NaCl 10% . O extrato assim obtido foi saponificado em solução metanólica de KOH 10% (1:1) por um período de 16-18 horas à temperatura ambiente (RODRIGUEZ *et al.*, 1976), no escuro, em at-

mosfera de nitrogênio. Após a saponificação o extrato foi lavado com NaCl 10% até eliminar a solução alcalina. A seguir, foi realizada a leitura espectrofotométrica dos carotenóides dissolvidos em hexano com registro do espectro de absorção em comprimentos de onda entre 400-500nm (DAVIES, 1976).

3.4.2.3. Análise de aminoácidos livres.

Foi realizada uma avaliação preliminar para ocorrência de variações qualitativas e quantitativas de aminoácidos em 85 plantas regeneradas das linhagens Cat 100-1, Cat 100-8 e Ast-1, através de cromatografia em camada delgada de extratos de espiguetas (DIEDRICH, 1984; AZEVEDO & ARRUDA, 1985). Foram utilizadas espiguetas de plantas da linhagem original, somaclones R0 e, ocasionalmente, de somaclones R1, coletadas da raqui logo após a exposição da panícula e antes da ântese. Os aminoácidos foram extraídos macerando-se uma espiguetas em 50 μ l de água destilada em tubo "eppendorf". As amostras assim maceradas foram centrifugadas a 15000 xg durante 10 min. e o sobrenadante foi utilizado para as análises de aminoácidos. As cromatografias em camada delgada de extratos de aminoácidos foram realizadas utilizando-se placas (20x20 cm) de sílica gel G Tipo 60 (MERCK) e celulose "Powder D Natural" (RIEDEL) na proporção 2:5 (p/p) com 0,5 mm de espessura. Para cada placa os compostos foram misturados em 27 ml de água destilada e agitados durante 10 min. A seguir, esta mistura foi aplicada em placas de vidro

utilizando-se um aplicador apropriado. As placas foram pré-ativadas através de aquecimento a 100°C por 30 min, e então foram aplicados 10 µl de extrato de cada amostra, num total de 23 amostras por placa. Placas assim preparadas foram utilizadas para cromatografia em cubas previamente saturadas por 30 min. com solvente contendo álcool butílico normal, acetona, hidróxido de amônia e água destilada (50:50:25:10). Após 90-120min. as placas foram retiradas das cubas e mantidas durante 72 h em estufa a 40°C com ventilação. Solução de ninidrina (0,2%) em acetona foi utilizada para revelação dos cromatogramas. A identificação dos aminoácidos presentes nas bandas obtidas nos cromatogramas foi feita com base em co-cromatografias com padrões de L-prolina, L-treonina, L-alanina, L-lisina, L-fenilalanina, L-ácido glutâmico, L-glutamina, L-asparagina, L-valina, L-histidina e L-triptofano. As variações para esses aminoácidos foram determinadas com base no padrão e intensidade das bandas dos aminoácidos dos somaclones comparados com a linhagem original.

3.4.2.4. Análise de polipeptídeos de zeína.

Sementes R1 de 104 somaclones da linhagem Cat 100-1 e sementes da linhagem Cat 100-1 foram avaliadas quanto à ocorrência de alterações em polipeptídeos de zeína presentes no endosperma. Foi utilizada a metodologia descrita por WILSON (1984) para focalização isoelétrica de zeína em gel de agarose. Em uma avaliação preliminar foi utilizada uma mistura

de amostras de endosperma pulverizado de 7 sementes R1 de cada somaclone. Avaliação de endosperma de sementes individuais foi realizada apenas para os somaclones que apresentaram variação para polipeptídeos de zeína. Após separação através de focalização isoeletrica, os polipeptídeos alterados foram submetidos a eletroforese em PAGE-SDS de acordo com LAEMMLI (1970) e WILSON (dados não publicados).

Extração de zeína. Amostras de endosperma foram obtidas através de perfurações do mesmo com auxílio de uma furadeira elétrica fixada em um suporte (OTTOBONI, 1985). Cerca de 50 mg de endosperma pulverizado foram misturados com 55% de 2-isopropanol em água (v/v) contendo 2-mercaptoetanol (1%). Foi utilizada a proporção 1:5 endosperma/solvente. A mistura foi mantida em tubos "eppendorf" por 15-18 horas à temperatura ambiente para extração de zeína e, então, centrifugada a 15000xg durante 3 min. em uma microcentrífuga. Amostras do sobrenadante foram aplicadas em gel de agarose-uréia.

Gel de agarose-uréia. A preparação, do gel de agarose-uréia para focalização isoeletrica seguiu as recomendações gerais de preparação de géis de agarose descritas por RIGHETTI (1983) e em publicações da FMC Corporation (SARAVIS & COOK, 1979). Seguindo-se a metodologia descrita por WILSON (1984), o gel consistiu de agarose IsoGel (FMC) (1%), anfólito (FMC) pH 5,0-8,0 (1,6%), anfólito (FMC) pH 3,5-9,5 (0,4%), uréia (5M) e ditiotreitol (0.002M). A agarose foi derretida sob agi-

tação em 15 ml de água 92-95°C em um tubo de ensaio em banho-maria e resfriada a 60-55°C. A seguir, adicionou-se a uréia, o ditiotreitól e, por último, os anfólitos, sempre sob agitação. O volume foi completado para 25 ml com a adição de água.

A solução do gel ainda morna foi aplicada entre duas folhas de suporte GelBond (FMC) aderidas a duas placas de vidro. As folhas do GelBond foram dispostas de modo a deixar exposta a face hidrofílica em uma folha e a face hidrofóbica na outra, separadas por fitas de borracha (0,75 mm de espessura/ 10mm de largura) em forma de U. As dimensões finais do gel foram 115 x 235 x 0,75 mm. Prendedores de papel foram utilizados para prender as placas de vidro com o GelBond. O gel foi mantido no refrigerador por pelo menos 15-18 horas. A seguir, as placas foram separadas delicadamente de modo que o gel ficou aderido à face hidrofílica do GelBond. Antes de ser colocado no aparelho para focalização isoelétrica, o excesso de água do gel foi retirado com o auxílio de papel de filtro.

Aplicação da amostra. Para a aplicação das amostras foi utilizada uma fita de borracha flexível (0,5mm de largura/15 mm de espessura), na qual foram abertos buracos de 2 x 3mm ou 2 x 7 mm ou 2 x 12 mm. A fita foi colocada sobre o gel, próxima do ânodo. A face em contato com o gel, foi coberta com óleo de silicone para impedir vazamento de amostras (RADOLA, 1980). Amostras de 2 ul ou 4 ul ou 5 ul foram aplicadas nos espaços abertos da fita de borracha. Quando esses buracos eram de 2 x 3mm, foi possível aplicar um total de 42 amostras de um úni-

co gel. As amostras foram aplicadas a 25 mm do ânodo.

Focalização isoelétrica. Foi utilizado um aparelho de focalização isoelétrica construído em acrílico, ligado a uma fonte de alta voltagem (Squant Instruments, Inc.). Conjuntos de tiras de papel de germinação (4-5 tiras de 4-5 mm de largura/23,5 cm de comprimento) foram embebidas nos eletrólitos. Foi utilizado NaOH (1M) como eletrólito do cátodo e ácido acético (0,05 M) como eletrólito do ânodo. O excesso de eletrólito foi removido com papel filtro e as tiras foram colocadas nas regiões terminais do gel.

A focalização foi iniciada com 200V (voltagem constante) durante 15min. A corrente elétrica foi então, interrompida por alguns poucos minutos para a retirada da fita de borracha utilizada para a aplicação das amostras. A seguir, foi aplicada uma voltagem de 600V/20W durante 20 min., que depois foi aumentada para 1000V e assim mantida por 40-45 min..

Após a focalização, o gel, ainda aderido ao GelBond, foi fixado em 150 ml de uma mistura de ácido acético (5%) e ácido tricloroacético (3%), sob a agitação lenta. Após 1h o fixador foi trocado e após 30 min. o gel foi lavado com água. Foram utilizados papel de filtro e um secador de cabelo para secar o gel (SARAVIS & COOK, 1979). Após a remoção do papel de filtro o gel foi fixado novamente por mais 1 hora e corado com uma solução contendo 5 ml de Coomassie blue R(1%) em metanol, adicionados a 95 ml de metanol/ácido acético/água (20:10:70 v/v), durante 15 min.. A solução corante foi retirada e

substituída pelo mesmo solvente que agiu com descorante por 10 min. Para secar o gel ainda aderido ao Gelbond foi novamente utilizado um secador de cabelo. Os géis foram fotografados com filme Kodak Panatomic-x utilizando-se filtro amarelo (Y [k2]) ou com filme ektachrome 100 ASA.

4. RESULTADOS

4.1. Cultura de tecidos, células e protoplastos de milho.

4.1.1. Capacidade de regeneração "in vitro" em linhagens homozigóticas.

Os embriões imaturos (Figura 5) das trinta e quatro linhagens de milho produziram calos a partir do escutelo em todos os meios de cultura utilizados. Após 4-5 dias em cultura, observou-se aumento de tamanho do escutelo e o desenvolvimento de um tecido nodular, que iniciou-se na porção terminal do escutelo onde se encontra a coleorriza (Figura 6). Este tecido proliferou-se rapidamente ocupando, dentro de 7-10 dias, toda a superfície do escutelo. Formaram-se, assim, calos com aspecto nodular e quase sempre opaco, acompanhados, muitas vezes, de um

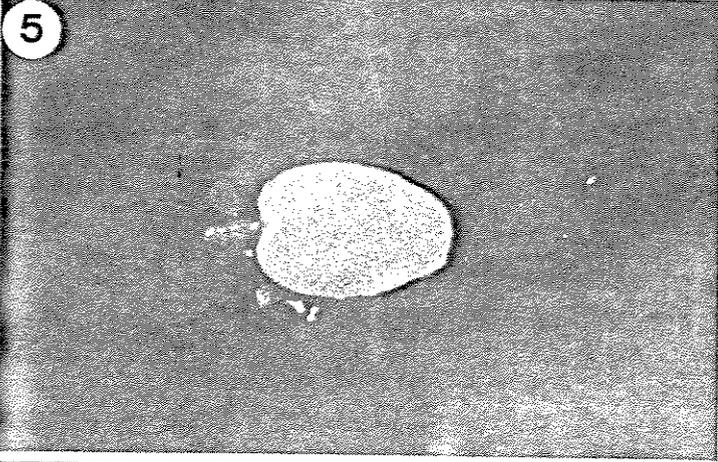
início de crescimento do coleoptilo do embrião imaturo, que cessou após 2-10 mm (Figura 7). Quando não foi produzido calo, o escutelo aumentou de tamanho, conservando o seu aspecto opaco ou tornando-se translúcido (Figura 8). Mesmo mantidos em meio de cultura, esses "escutelos" não produziram calos e, após 2-3 subculturas, tornaram-se escuros e morreram. Além dos calos produzidos a partir do escutelo, foi também observado, com alta frequência, o desenvolvimento de calos a partir do eixo embrionário. Esses calos produzidos simultaneamente ou não aos calos do escutelo eram sempre moles, não-regeneráveis, com aspecto aquoso e não-granular, tinham tendência de produzir raízes (Figura 9) e quase sempre adquiriam cor escura e morriam após 2-3 semanas. Calos aparentemente mais compactos e com crescimento um pouco mais lento foram observados nos meios de cultura contendo 6% de sacarose, comparados com aqueles desenvolvidos em meios contendo 3% deste açúcar.

Foram observadas diferenças entre as linhagens homozigóticas de milho quanto à morfologia e capacidade de regeneração dos calos provenientes do escutelo. Na Figura 10 está representado um calo compacto e nodular típico que não possui capacidade de produzir embriões somáticos e de regenerar plantas. Este foi o tipo de calo mais comum observado em todos os meios de cultura para as linhagens que não apresentaram capacidade de regeneração de plantas. Esses calos foram capazes de crescer e foram mantidos durante algumas subculturas, porém não regeneraram plantas. Os calos embriogênicos, por sua vez, puderam ser reconhecidos pelo desenvolvimento de embriões somáticos

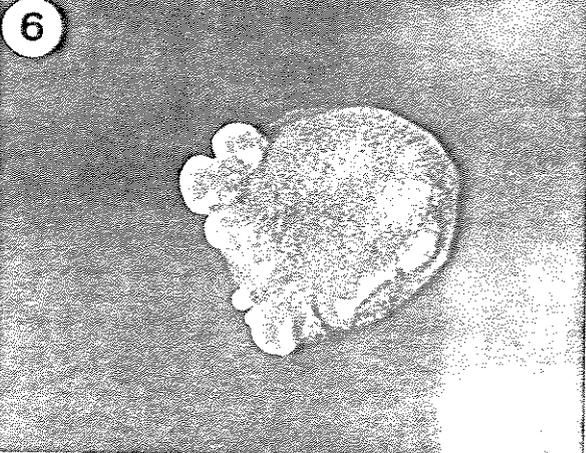
FIGURAS 5-10. Embrião imaturo de milho e formação de calos a partir do escutelo em meio de cultura N6 suplementado com 2,4-D.

Figura 5. Embrião imaturo recém-inoculado no meio de cultura. 20X. Figura 6. Embrião imaturo 4 dias após a inoculação. Notar desenvolvimento de tecido nodular na porção terminal do escutelo onde se encontra a coleorriza. 14X. Figura 7. Calos embriogênicos compactos e opacos (Tipo I) da linhagem Cat 100-1, 18 dias após a inoculação. Notar coleoptilo do embrião imaturo (seta) 4,5X. Figura 8. Escutelo de um embrião imaturo sem capacidade de produzir calo, 30 dias após a inoculação. Notar o aumento de volume, o aspecto translúcido e a alteração da forma do escutelo. 10X. Figura 9. Calos formados a partir do eixo embrionário de embriões imaturos da linhagem Cat 100-5. Notar o extensivo desenvolvimento de raízes 4 X. Figura 10. Calo compacto, opaco, nodular e não-embriogênico da linhagem Cyd-1, 30 dias após a inoculação. Esse tipo de calo pode ser mantido durante poucas subculturas, mas não é capaz de regenerar plantas. 5 X.

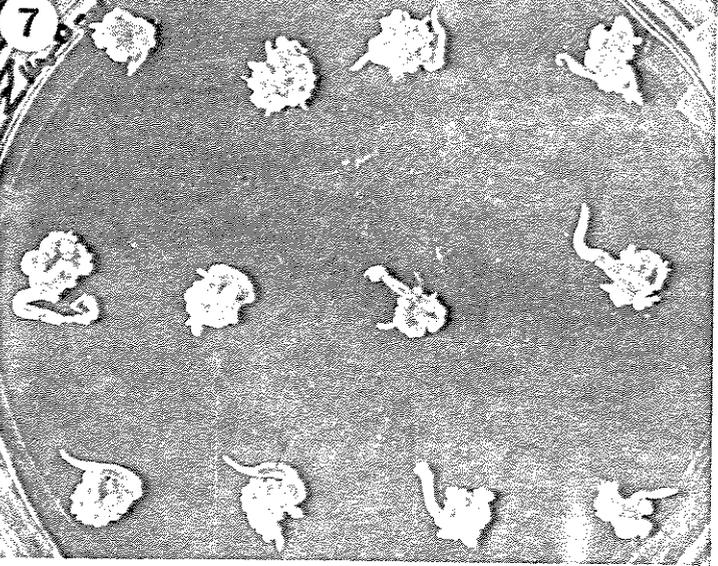
5



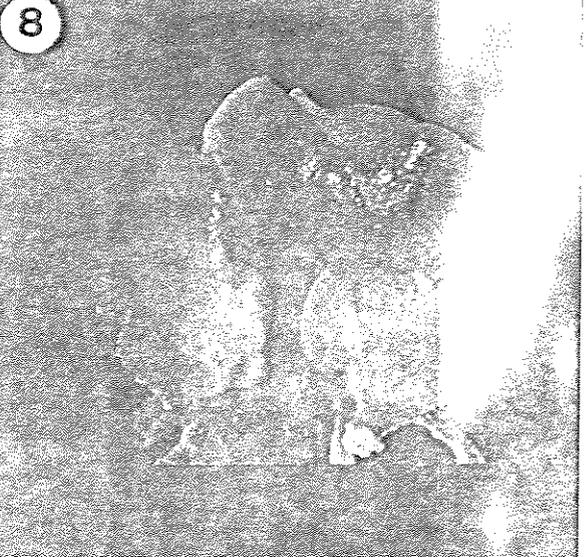
6



7



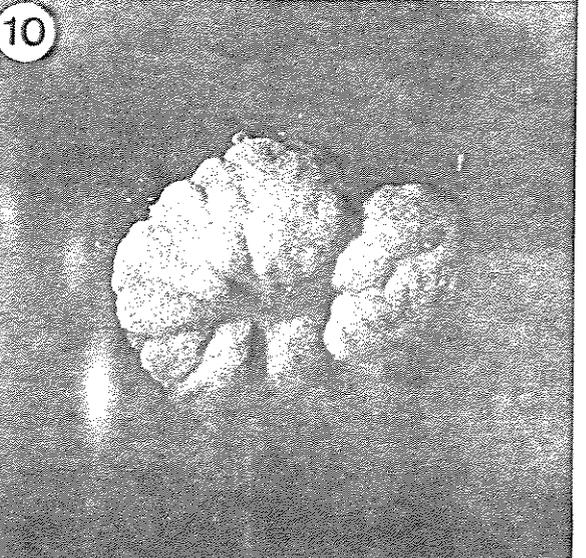
8



9



10



7-15 dias após a inoculação. Já nos experimentos preliminares foi observado que a utilização de embriões imaturos com 1,0-2,0 mm de comprimento é um fator crítico para a indução de calos embriogênicos nos genótipos utilizados. Na maioria das linhagens, o desenvolvimento dos embriões somáticos ocorreu rapidamente e, ainda em meio com 2,4-D, produziram estruturas semelhantes ao escutelo de embriões zigóticos, seguidas pelo desenvolvimento de coleótilos. Após 15-20 dias de cultura, foram observados embriões somáticos em diferentes estágios de diferenciação, distribuídos por toda a superfície do calo (Figuras 7 e 11). O escutelo desses embriões tinham uma forte tendência de proliferação secundária associada à produção de novos embriões somáticos.

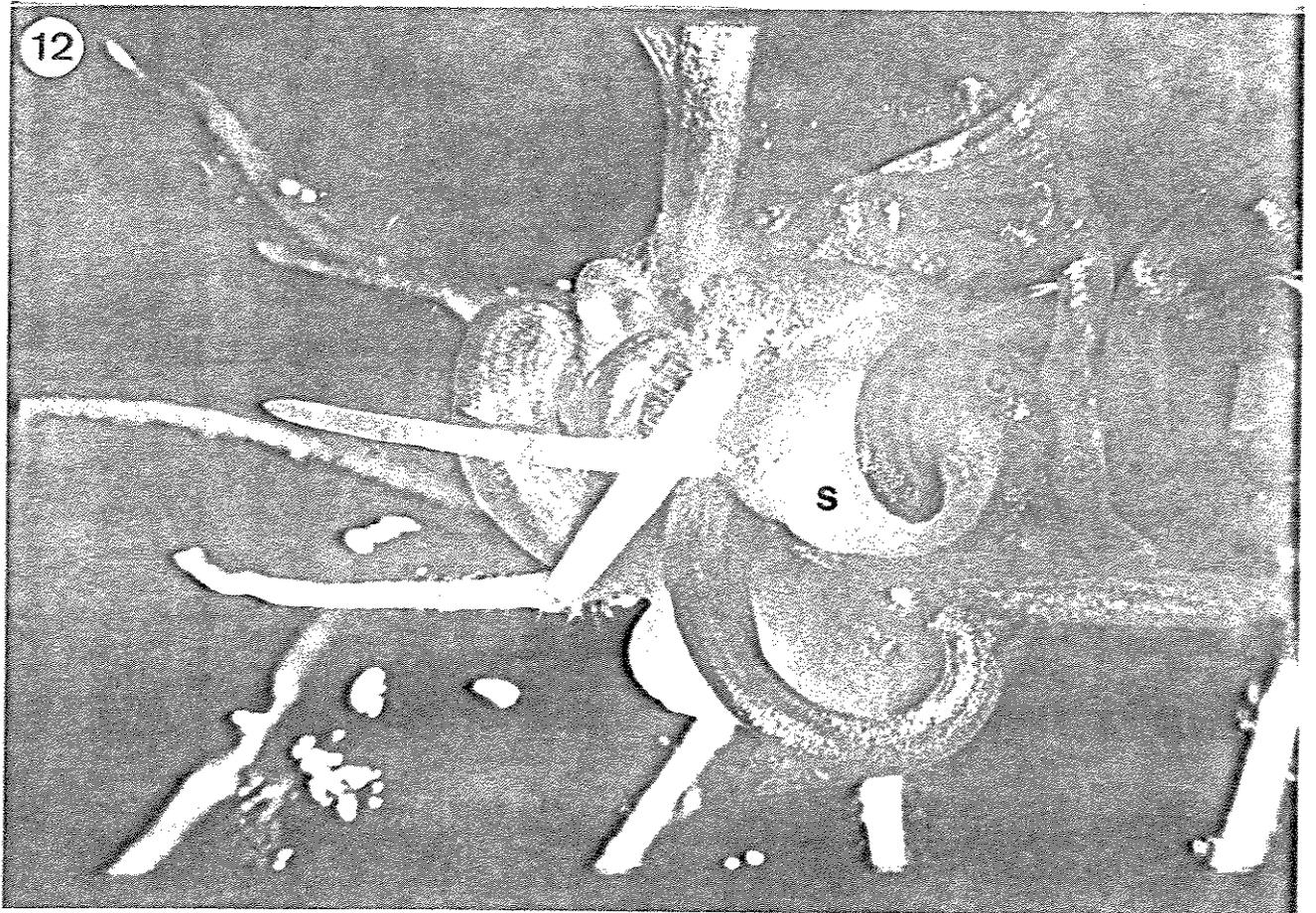
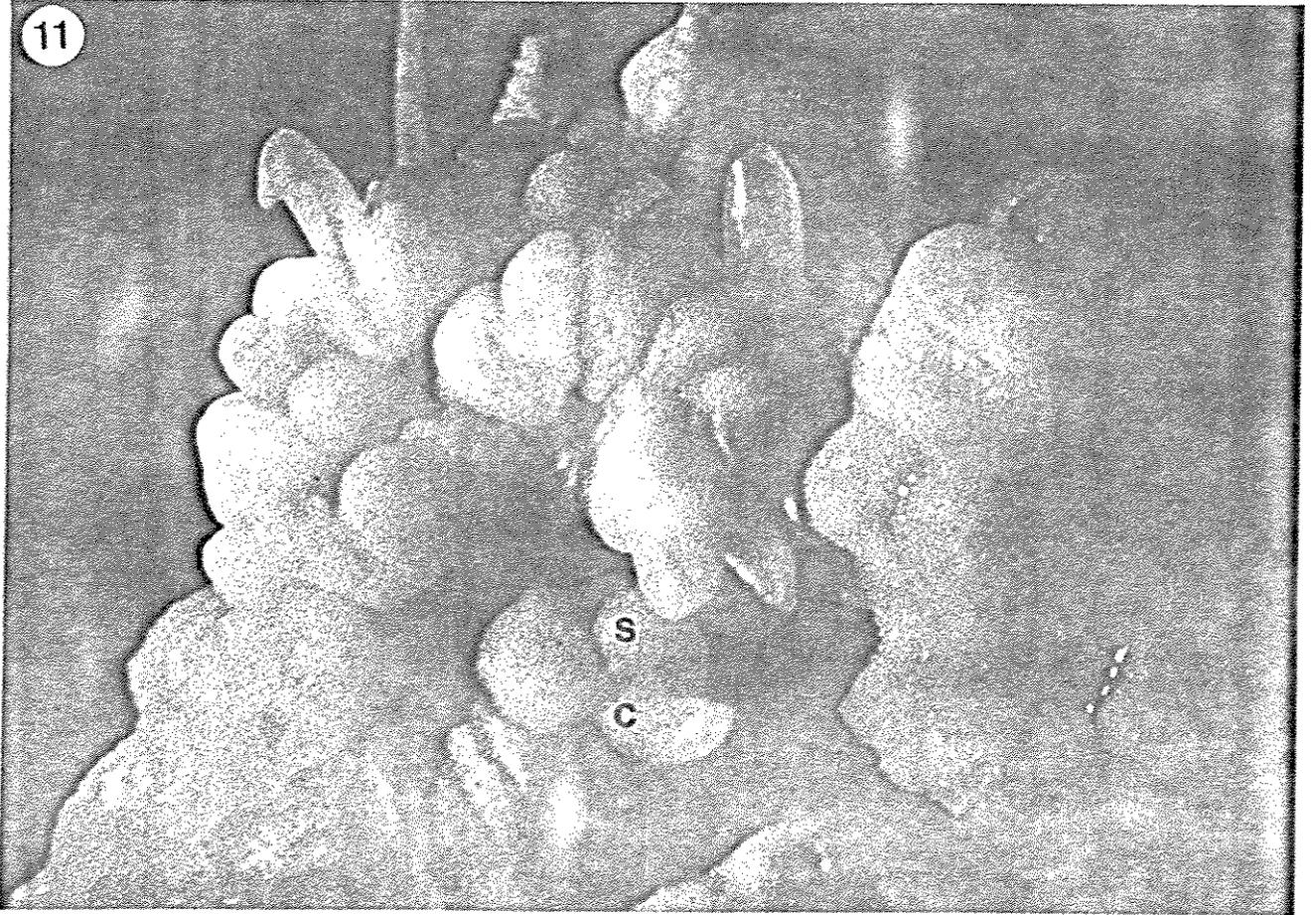
Em alguns casos foram observados embriões atípicos, com dois ou mais coleótilos. Nas avaliações dos calos, em meio com e sem 2,4-D, ao microscópio estereoscópico não foram encontrados setores com capacidade de desenvolver gemas apicais não associadas a estruturas embrionárias, ou seja, com capacidade de organogênese. Entretanto, a presença de embriões somáticos ocupando totalmente ou quase totalmente esses calos era bastante evidente (Figura 11). Assim, estes calos foram denominados embriogênicos. Apenas duas linhagens apresentaram tendência de produzir calos semi-friáveis (Cat 100-8 e TuxMo-1) ou friáveis (TuxMo-1), logo nos primeiros estágios de indução, ou seja, 8-15 dias após inoculação. Neste caso, os embriões somáticos permaneceram em estágio globular, enquanto mantidos em meio com 2,4-D.

Com a transferência dos calos embriogênicos para meio sem 2,4-D e presença de luz, ocorreu germinação dos

embrões somáticos, de modo semelhante aos embrões zigóticos. A técnica de isolar os embrões somáticos individualmente ou em pequenos grupos (5 a 8 embrões) e transferi-los para meio sem 2,4-D permitiu uma boa germinação (Figura 12) e alta frequência de recuperação de plântulas. Este procedimento foi muito mais eficiente do que a transferência de pedaços grandes de calos embriogênicos para meio de regeneração. Em meio, contendo 2,5 uM de 2,4-D ocorreu germinação precoce dos embrões somáticos em vários genótipos (Cat 100-1, Cat 100-2, Cat 100-3, Cat 100-6, Cat 100-8, Cat 85-1, Cat 85-2, Cat 85-3, TuxTe 50-1, TuxTe 50-4 e Tux 100-2). O nível mais alto de 2,4-D (10 uM) foi suficiente para retardar a germinação dos embrões em todas as linhagens, o que parece ter permitido um melhor desenvolvimento dos mesmos. A frequência de germinação dos embrões somáticos e produção de plântulas foi consideravelmente alta na maioria dos calos embriogênicos, quando transferidos para meio de regeneração (Figura 13). Entretanto, a recuperação de plântulas era sempre consideravelmente menor quando os embrões que já apresentavam coleoptilo eram mantidos por mais de uma semana em meio com 2,4-D. Foi observada deformação dos embrões somáticos em germinação com aumento de tamanho do escutelo e inibição do desenvolvimento do coleoptilo e/ou raiz, quando estes eram mantidos por mais de 8-10 dias em meio com 2,4-D. Calos embriogênicos compactos (Tipo I) de quase todas as linhagens com capacidade de regeneração tiveram uma forte tendência de desenvolvimento e germinação dos embrões somáticos, o que dificultou muito sua manutenção em culturas de longa duração. Sub-culturas a cada 10-15 dias com

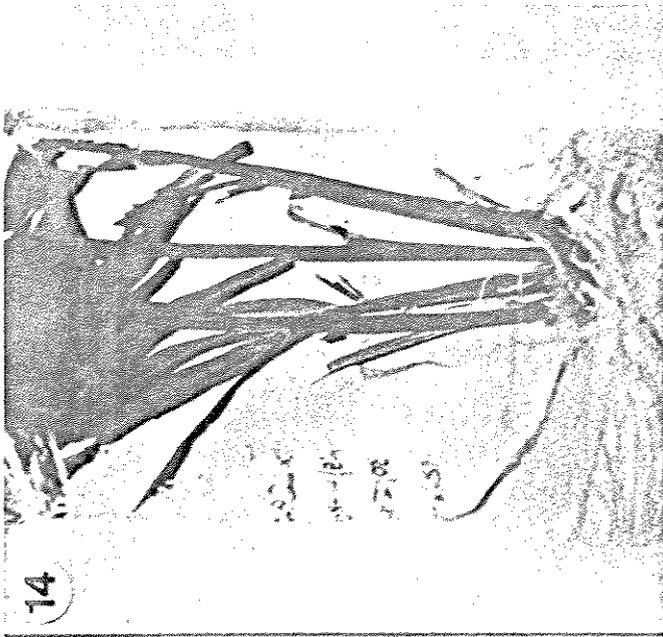
Figura 11. Calo embriogênico Tipo I da linhagem Cat 100-1, 18 dias após inoculação em meio N6 suplementado com 2,4-D (10 uM) e sacarose (3%), mantido em condições de escuro. Notar a presença de numerosos embriões somáticos (se), com desenvolvimento de escutelo (s) e, em muitos casos, de coleótilos (c). 100X.

Figura 12. Embriões somáticos de calos Tipo I da linhagem Cat 100-1, 8 dias após transferência para meio sem 2,4-D e presença de luz. Notar o desenvolvimento de raiz e coleótilo (c). Nesta fase os embriões somáticos ainda permanecem agregados. (s) escutelo. 120X.

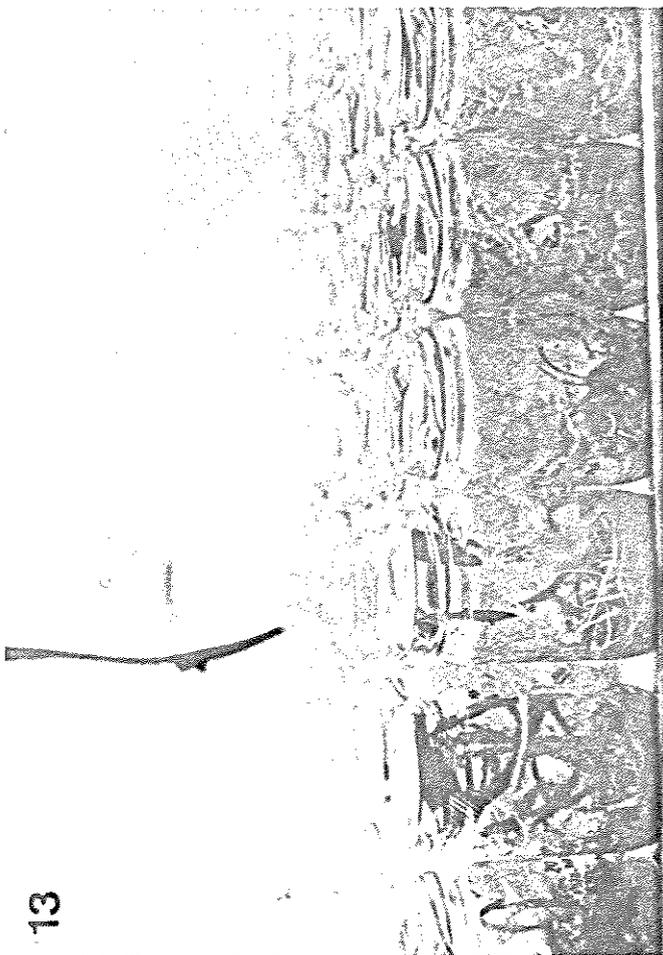


Figuras 13 e 14. Regeneração de plântulas a partir de calos Tipo I provenientes de embriões imaturos de milho. Figura 13. Regeneração de plântulas 15-25 dias após transferência para meio MS sem regulador de crescimento. 0,4X. Figura 14. Plântulas 8-10 dias após transferência para meio de crescimento contendo metade da concentração de sais MS, sacarose (2%) e gelrite (0,2%). 0,8X.

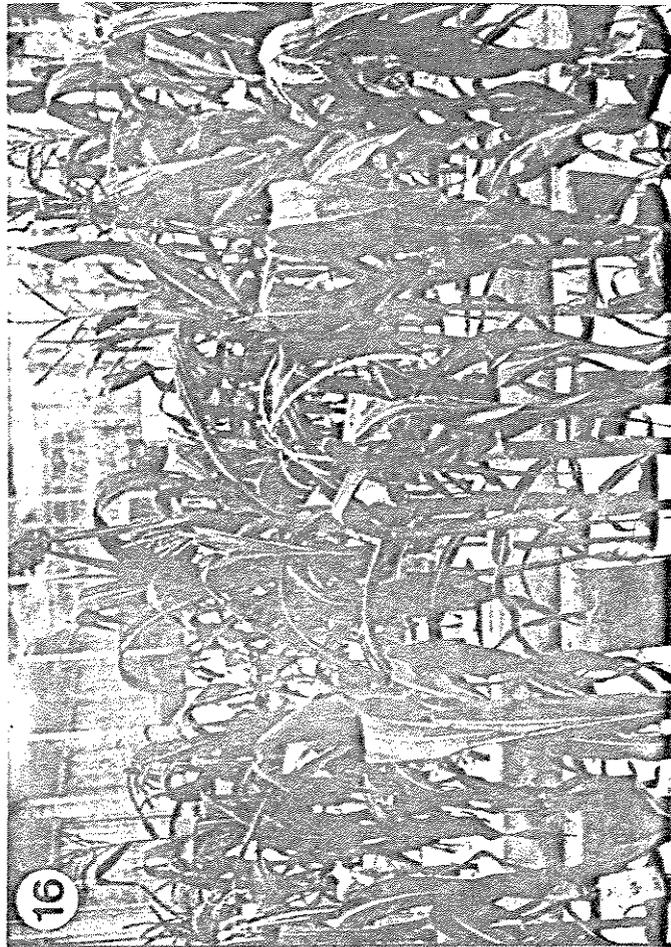
Figura 15 e 16. Plantas regeneradas (R0) a partir de cultura de tecidos de milho desenvolvidas em casa de vegetação. Figura 15. Planta 30 dias após transferência para vaso (25 cm diâmetro x 35 cm altura). Figura 16. Plantas em início de florescimento 55-60 dias após transferência para vaso.



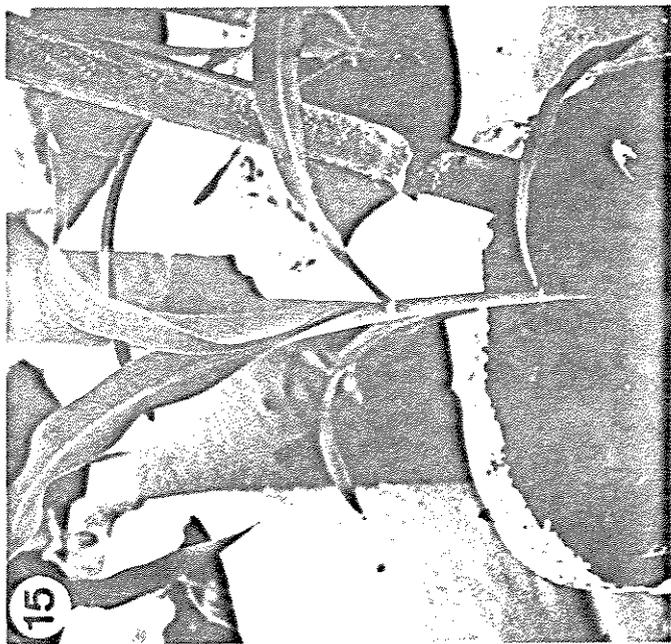
14



13



16



15

transferência de pequenos setores embriogênicos de calos para meio fresco auxiliaram a manutenção de alguns calos durante vários meses.

Um bom crescimento e desenvolvimento das plantas regeneradas foi obtido quando estas foram transferidas com 5-8 cm de altura do meio de regeneração (Figura 13) para meio de crescimento (Figura 14), que contém apenas metade da concentração de sais MS. O enraizamento das plântulas foi, aparentemente, melhor em meio contendo gelrite do que em meio contendo agar. Após 10-20 dias as plântulas foram transferidas para vasos contendo vermiculita e regadas com solução de Hoagland. Condição de alta umidade durante os primeiros 5-10 dias em vaso foi essencial para a sobrevivência das plântulas. Após esta fase de aclimação, as plantas puderam ser desenvolvidas normalmente em condições de campo ou em casa de vegetação (Figuras 15 e 16).

As avaliações das trinta e quatro linhagens homozigóticas de milho quanto à capacidade de regeneração de plantas a partir de calos provenientes de embriões imaturos foram feitas, como descrito em Material e Métodos, em três diferentes épocas. As plantas doadoras desenvolvidas durante os verões de 1985 e 1986, portanto dentro da estação adequada de plantio desta espécie no Estado de São Paulo, apresentaram excelente desenvolvimento. Entretanto, as plantas desenvolvidas durante o outono de 1985, portanto fora da época normal de plantio de milho, apresentaram um acentuado decréscimo de vigor, a despeito dos cuidados com as condições de campo a que foram subme-

tidas, incluindo-se irrigação. O desenvolvimento dos embriões imaturo nestas plantas foi mais lento e, por isso, foram coletados com 17-18 dias após a polinização, quando apresentavam 1,0-1,5 mm de comprimento.

Nas análises de variância foram incluídas apenas as linhagens que produziram calos com capacidade de regeneração, num total de 20. As 14 linhagens restantes não apresentaram capacidade de produção de calos embriogênicos ou raramente produziram calos, com baixa capacidade embriogênica, ou seja, produção de 1-5 embriões somáticos apenas. A maioria desses embriões somáticos não produziu plântulas quando transferidos para meio de regeneração. Na Tabela 3 estão apresentados os resultados obtidos para indução de calos embriogênicos em todas as linhagens utilizadas. Como pode ser observado, a maioria das linhagens que não apresentaram capacidade de regeneração são originadas de germoplasma Tuxpeño. As linhagens Tux 100-1, Tux 100-3, Tux 100-4, Tux 100-5, Tux 100-6 e Cyd-1, produziram calos bastante nodulares, que se desenvolveram bem nos meios de cultura utilizados, porém não foram capazes de regenerar plantas.

Para a análise de variância com três fatores, ou seja, genótipos, épocas e meios de cultura, apenas os meios contendo 2,4-D (10 μ M) e sacarose (3% e 6%) foram considerados. Os resultados desta análise e dos testes de média estão apresentados no Quadro 1. Como pode ser constatado, as linhagens com capacidade de regeneração utilizadas neste estudo diferem significativamente entre si. Também existe uma diferença significativa entre os meios de cultura contendo 2,4-D (10 μ M) e

Tabela 3. Frequência de indução de calos embriogênicos a partir de embriões imaturos de 34 linhagens homocigóticas de milho. Foram utilizados meios de cultura N6 suplementados com 2,4-D (10 µM) e sacarose (3% e 6%) em três experimentos independentes. Foram inoculados 240 embriões de cada genótipo em cada experimento.

Genótipo	Calos embriogênicos (%)		
	Fevereiro/1985	Maior/1985	Fevereiro/1986
Cat 100-1	80,8 a	90,0 a	90,0 a
-2	30,0 abcdef	36,7 abcd	29,1 bc
-3	48,3 abcd	60,0 abc	89,2 a
-4	12,5 defg	17,5 cde	28,3 bcd
-5	0 g	0 g	0,7 d
-6	NT	13,0	52,0
-7	39,2 abcde	0 e	16,6 cd
-8	45,0 abcd	47,5 abcde	89,1 a
Cat 85-1	73,3 a	79,2 ab	38, ab
-2	45,8 abcd	52,5 abc	15,0 cd
-3	55,8 abc	80,0 ab	33,3 abc
Eto-1	0	0	0
TuxTe 50-1	24,2 bcdefg	27,5 bcd	34,2 abc
-2	4,0	0	0
-3	17,5 cdefg	28,3 bcd	38,3 abc
-4	51,6 abcd	9,2 de	71,7 ab
Ast-1	47,5 abcd	39,1 abcd	35,0 abc
TuxPc-1	4,2 fg	13,3 cde	19,2 cd
-1 su02	6,7 efg	25,0 cde	14,2 cd
Cyd-1	0	6,0	0
TuxMo-1	62,5 ab	38,3 abcd	25,8 bcd
Tuxi00-1	6,0	0	0
-2	35,8 abcde	15,0 cde	33,3 bc
-3	0	0	0
-4	0	0	0
-5	0	0	0
-6	0	0	0
-7	0	0	0
-8	0	0	0
-9	0	0	0
-10	14,2 defg	10,0 de	12,5 d
-11	0	0	0
-12	0	0	0
-13	0	0	0

Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente, ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

sacarose (3% e 6%). A resposta média dos genótipos não difere significativamente nas três diferentes épocas em que os experimentos foram realizados. Entretanto, foi constatada interação entre genótipos e épocas. Esta foi a única interação significativa encontrada, indicando que a resposta das linhagens para produção de calos embriogênicos foi distinta entre as três épocas. Considerando-se esses resultados, os genótipos foram comparados dentro de cada época. As diferenças entre as linhagens dentro das três épocas estão apresentadas no Quadro 1. O experimento iniciado em fevereiro/1985 foi o que melhor discriminou os genótipos quanto à capacidade de regeneração, com a formação de 7 grupos de linhagens. Nos experimentos iniciados em maio/1985 e fevereiro/1986, foi possível discriminar 5 e 3 grupos de linhagens, respectivamente. Assim, embora não tenham ocorrido diferenças significativas entre as médias das três épocas, as respostas das linhagens, quando comparadas entre si, foi significativa dentro das épocas, efeito responsável pela interação significativa de genótipo x ambiente já comentado.

Nos experimentos iniciados em maio/1985 e fevereiro/1986, além do nível de 10 uM e 2,4-D, foi também testado o nível de 2,5 uM desse regulador de crescimento. Assim, a resposta dos genótipos frente a esses quatro diferentes meios de cultura foi analisada dentro de cada uma das três épocas. Como pode ser observado nos Quadros 2-4, as linhagens diferem significativamente entre si dentro das três épocas, como mostrado pelo teste de F para fevereiro/1985 (21,77), maio/1985 (25,94) e fevereiro/1986 (27,78). Também foram constatadas diferenças

significativas entre os meios de cultura em todas as épocas. Como mostrado nos quadros 2 e 3, o meio de cultura contendo 10 uM de 2,4-D e 6% de sacarose foi o que deu, em média, a melhor resposta para a indução de calos com capacidade de regenerar plantas, seguido pelo meio contendo 10 uM de 2,4-D e 3% sacarose. A utilização de meios contendo 2,5 uM de 2,4-D alterou pouco a resposta média das linhagens no experimento iniciado em maio/1985 (Quadro 2 e 3). No experimento iniciado em fevereiro/1986 ocorreu interação entre genótipos e meios (Quadro 4), o que não foi constatado nas duas épocas anteriores. Assim, foi feito um desdobramento da interação genótipo x meio dentro da época fevereiro/1986. Os resultados mostraram que, quando comparados dentro de cada genótipo, os meios diferiram significativamente entre si para a metade das linhagens utilizadas. Portanto, nesta época, algumas linhagens produziram frequências de calos embriogênicos significativamente diferentes nos meios de cultura contendo 2,4-D (2,5 uM e 10 uM) e sacarose (3% e 6%). O mesmo não foi observado no experimento iniciado em maio/1985, quando esses meios de cultura foram utilizados.

Considerando-se que os quadrados médios para genótipos dentro de todos os meios foi significativo, os genótipos foram comparados dentro de cada meio (Quadro 4). Neste experimento, os meios que melhor discriminaram os genótipos quanto à capacidade de indução de calos embriogênicos foram aqueles contendo 6% de sacarose. A frequência maior de indução de calos ocorreu, em média, no meio contendo 10 uM de 2,4-D e 6% de sacarose, de modo semelhante ao observado nos experimentos anterior-

res. Um fato a ser destacado nesta época, é a resposta apresentada pela linhagem Cat 100-5 nos quatro diferentes meios de cultura. Como mostrado no Quadro 4, esta linhagem apresentou alta frequência de indução de calos regeneráveis nos meios contendo 2,5 uM de 2,4-D, posicionando-se no primeiro grupo de linhagens.

Quando os meios contendo 10 uM de 2,4-D foram utilizados, a frequência de indução de calos regeneráveis desse genótipo caiu acentuadamente, de tal modo que deu a pior resposta nesses meios. Nas épocas anteriores, a linhagem Cat-100-5 não produziu calos com capacidade de regeneração.

Algumas linhagens apresentaram alta frequência de produção de calos embriogênicos em todas as épocas, sem variar muito esta resposta. É o caso, por exemplo, das linhagens Cat 100-1, Cat 100-3, Cat 100-8, Cat 85-3, Cat 85-1, e Ast-1. Outras, entretanto, mantiveram frequências mais baixas de indução de calos embriogênicos nos três experimentos, como por exemplo, as linhagens Cat 100-5, TuxPc-1, TuxPc-1 suo2 e Tux 100-10. Todas as linhagens que possuem semente flint apresentaram capacidade de regeneração. Entre estas, as linhagens originadas de germoplasma Cateto tiveram tendência de se situarem entre as frequências mais altas de indução de calos embriogênicos. A linhagem Cat 100-1 apresentou a melhor resposta em todos os experimentos. Entre as linhagens derivadas de germoplasma Tuxpeño, apenas duas (Tux 100-2 e Tux 100-3) apresentaram capacidade de indução de calos embriogênicos a partir do escutelo.

Os coeficientes de variação dos experimentos realizados em fevereiro/1985, maio/1985 e fevereiro/1986 foram

QUADRO 1. Análise de variância com três fatores (genótipos, épocas e meios de cultura), médias e frequências, (%) de indução de calos embriogênicos em linhagens homozigóticas de milho, dos experimentos realizados em fevereiro/1985, maio/1985 e fevereiro/1986. Foram utilizados meios de cultura N6 suplementados com 2,4-D (10 µM) e sacarose (3% e 6%). Os experimentos foram realizados em delineamento inteiramente casualizado, com 3 repetições e 20 observações por parcela. Os dados foram transformados em $(X + 1/2)^{1/2}$. Os dados de frequência em porcentagem não foram transformados.

F.V.	G.L.	S.Ô.	Q.M.	F
GENÓTIPOS (G)	18	230,2847	12,7936	39,81 **
ÉPOCAS (E)	2	1,6265	0,8133	2,53 NS
MEIOS (M)	1	4,0802	4,0802	12,70 **
G x E	36	79,9898	2,2219	6,84 **
GENÓTIPO/FEV.85	18	101,1171	5,6177	17,48 **
GENÓTIPO/MAIO.85	18	119,0223	6,6124	20,57 **
GENÓTIPO/FEV.86	18	90,1351	5,0075	15,58 **
G x M	18	6,4033	0,3557	1,11 NS
E x M	2	0,3178	0,1589	0,49 NS
G x E x M	36	9,3886	0,2608	0,81 NS
ERRO	228	73,2843		
TOTAL	341	405,3702		
C V (%)		22,02		

continua ...

Cont. Quadro 1.

Genótipos/ Fev. 85	Médias	X	Genótipos/ Maio 85	Médias	X	Genótipos/ Fev. 86	Médias	X
Cat 100-1	4,08	80,8	Cat 100-1	4,30	90,0	Cat 100-1	4,28	90,0
Cat 85-1	3,88	73,3	Cat 85-3	4,05	80,0	Cat 100-3	4,28	89,2
TuxMo-1	3,58	62,5	Cat 85-1	4,01	79,2	Cat 100-8	4,28	89,1
Cat 85-3	3,39	55,8	Cat 100-3	3,38	60,0	TuxTe 50-4	3,84	71,7
TuxTe 50-4	3,26	51,6	Cat 85-2	3,27	52,5	Cat 85-1	2,82	38,0
Cat 100-3	3,17	48,3	Cat 100-8	2,99	47,5	TuxTe 50-3	2,76	38,3
Ast-1	3,08	47,5	Ast-1	2,86	39,2	Ast-1	2,71	35,0
Cat 85-2	3,07	45,8	TuxMo-1	2,80	38,3	Cat 85-3	2,67	33,3
Cat 100-8	3,04	45,0	Cat 100-2	2,69	36,7	TuxTe 50-1	2,62	34,2
Cat 100-7	2,84	39,2	TuxTe 50-1	2,44	27,5	Tux 100-2	2,58	33,3
Tux 100-2	2,73	35,8	TuxTe 50-3	2,41	28,3	Cat 100-2	2,50	29,1
Cat 100-2	2,50	30,0	TuxPc-1su02	2,22	25,0	Cat 100-4	2,39	28,3
TuxTe 50-1	2,17	24,2	Cat 100-4	1,95	17,5	TuxMo-1	2,30	25,8
TuxTe 50-3	1,91	17,5	Tux 100-2	1,75	15,0	TuxPc-1	2,03	19,2
Tux 100-10	1,72	14,2	Tux Pc-1	1,73	13,3	Cat 100-7	1,90	16,6
Cat 100-4	1,70	12,5	Tux 100-10	1,50	10,0	Cat 85-2	1,80	15,0
TuxPc-1su02	1,26	6,7	TuxTe 50-4	1,47	9,2	TuxPc-1su02	1,70	14,2
TuxPc-1	1,07	4,2	Cat 100-5	0,71	0	Tux 100-10	1,65	12,5
Cat 100-5	0,71	0	Cat 100-7	0,71	0	Cat 100-5	1,31	0,7

NS não significativo, ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste F.

** significativo, ao nível de 1% de probabilidade, pelo teste F.

Médias seguidas pela mesma barra não diferem significativamente, ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

Quadro 2 . Análise de variância com dois fatores (genótipos e meios) e médias do experimento realizado em maio/1985 para indução de calos embriogênicos em linhagens homocigóticas de milho. Foram utilizados meios de N6 contendo 2.4-D (2,5 uM e 10 uM) e sacarose (3% e 6%). O experimento foi fatorial em delineamento inteiramente casualizado, com três repetições e vinte observações por parcela. Os dados foram transformados em $(x + 1/2)^{1/2}$.

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
GENÓTIPOS (G)	19	213,4630	11,2349	25,94 **
MEIOS (M)	3	7,6272	2,5424	5,87 **
M x G	57	20,1924	0,3543	0,82 NS
ERRO	160	69,3019	0,4331	
TOTAL	239	310,5845		
CV (%)			28,65	

Genótipos	Médias
Cat 100-1	4,22
Cat 85-3	3,90
Cat 85-1	3,58
Cat 100-8	3,20
Cat 100-3	2,96
Cat 85-2	2,85
TuxMo-1	2,76
Cat 100-2	2,52
Ast-1	2,48
TuxTe 50-3	2,32
TuxPc-1suo2	1,92
TuxPc-1	1,76
Cat 100-6	1,75
Tux 100-2	1,63
Cat 100-4	1,60
Tux 100-10	1,55
Tuxte 50-4	1,46
TuxTe 50-1	1,20
Cat 100-5	0,71
Cat 100-7	0,71

NS Não significativo, ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste F.
 ** Significativo, ao nível de 1% de probabilidade, pelo testes F.
 Médias seguidas pela mesma barra não diferem significativamente, ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

QUADRO 3 . Análise de variância com dois fatores (genótipos e meios de cultura) do experimento realizado em fevereiro/1985 para indução de calos embriogênicos em linhagens homocigóticas de milho. Foram utilizados meios de cultura N6 contendo 2,4-D (2,5 uM e 10 uM) e sacarose (3% e 6%). O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado, com três repetições e vinte observações por parcela. Os dados foram transformados em $(x + 1/2)^{1/2}$.

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
GENÓTIPOS (G)	18	101,1185	5,6177	21,7759 **
MEIOS	1	2,2546	2,5424	8,7395 **
G x M	18	4,7573	0,2643	1,03 NS
ERRO	76	19,6063	0,4331	0,2580
TOTAL	113	127,7367		
CV (%)			19,63	
Meios		Médias		
2,4-D (10 uM) + sacarose (6%)		2,59		
2,4-D (10 uM) + sacarose (3%)		2,33		

NS Não significativo, ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste F.
 ** Significativo, ao nível de 1% de probabilidade, pelo teste F.

QUADRO 4. Análise de variância com dois fatores (genótipos e meios de cultura), e médias do experimento realizado em fevereiro/1986 para indução de calos embriogênicos em linhagens homozigóticas de milho. Foram utilizados meios de cultura N6 suplementados com 2,4-D (2,5 uM e 10 uM) e sacarose (3% e 6%). Foi utilizado delineamento inteiramente casualizado com três repetições e vinte observações por parcela. Os dados foram transformados em $(x + 1/2)^{1/2}$.

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
GENÓTIPOS (G)	19	134,0179	7,0536	27,78 **
MEIO (M)	3	10,9701	3,6567	14,40 **
G x M	57	67,2234	1,1794	4,65 **
M/Cat 100-1	3	1,2391	0,4130	1,63 NS
M/Cat 100-2	3	0,7885	0,2628	1,04 NS
M/Cat 100-3	3	14,6285	4,8762	19,21 **
M/Cat 100-4	3	9,4261	3,1420	12,37 **
M/Cat 100-5	3	3,4512	3,1504	12,41 **
M/Cat 100-6	3	11,3833	3,7945	14,95 **
M/Cat 100-7	3	5,6559	1,8853	7,43 **
M/Cat 100-8	3	0,6224	0,2075	0,82 NS
M/Cat 85-1	3	6,7348	2,2449	8,84 **
M/Cat 85-2	3	0,7801	0,2600	1,02 NS
M/Cat 85-3	3	0,2250	0,0750	0,30 NS
M/TuxTe 50-1	3	0,8107	0,2702	1,13 NS
M/TuxTe 50-3	3	0,5382	0,1794	0,71 NS
M/TuxTe 50-4	3	2,5037	0,8346	3,29 *
M/Ast-1	3	4,4838	1,4946	5,89 **
M/TuxPc-1	3	1,8460	0,6153	2,42 NS
M/TuxPc-1suo2	3	0,1158	0,0386	0,15 NS
M/TuxMo-1	3	2,9363	0,9788	3,86 *
M/Tux 100-2	3	3,0242	1,0081	3,97 **
M/Tux 100-10	3	1,0001	0,3334	1,31 NS
G/M1	19	37,2014	1,9580	7,71 **
G/M2	19	53,5825	2,8201	11,11 **
G/M3	19	58,5627	3,0823	12,14 **
G/M4	19	51,8947	2,7313	10,76 **
ERRO	160	40,6223	0,2539	
TOTAL	239	252,8337		
CV (%)			19,89	

continua ...

Cont. Quadro 4.

MÉDIAS

Genótipos / M1		Genótipos / M2		Genótipos / M3		Genótipos / M4	
Cat 100-1	4,02	TuxTe 50-1	3,98	Cat 100-3	4,30	Cat 100-1	4,53
Cat 100-8	3,89	Cat 100-8	3,80	Cat 100-6	4,26	Cat 100-8	4,38
TuxMo-1	3,24	Cat 100-1	3,62	Cat 100-8	4,18	Cat 100-3	4,26
Cat 100-5	3,19	Cat 100-7	3,52	TuxTe50-4	4,05	Cat 100-6	4,22
TuxTe 50-1	2,90	TuxMo-1	3,02	Cat 100-1	4,02	TuxTe 50-4	3,62
Cat 85-3	2,60	Cat 100-5	2,97	Ast-1	2,97	Tux 100-2	3,14
Cat 100-6	2,51	TuxTe 50-3	2,78	Cat 85-3	2,79	Cat 85-1	2,92
TuxTe 50-1	2,40	Tux 100-2	2,58	Cat 85-1	2,71	TuxTe 50-1	2,91
Cat 100-2	2,34	TuxPc-1	2,54	TuxTe 50-3	2,65	TuxTe 50-3	2,88
Tuxte 50-3	2,32	Cat 85-3	2,41	Cat 100-2	2,39	Cat 100-4	2,78
Cat 100-7	2,32	TuxTe 50-1	2,25	TuxTe 50-1	2,33	TuxMo-1	2,67
Cat 85-1	2,04	Cat 100-2	2,11	Tux 100-2	2,03	Cat 100-2	2,60
Cat 100-2	1,93	Cat 100-6	2,11	Cat 100-4	2,00	Cat 85-3	2,55
Tux 100-2	1,86	Cat 100-3	1,86	TuxMo-1	1,93	Ast-1	2,46
Ast-1	1,76	TuxPc-1suo2	1,46	Tux 100-10	1,91	TuxPc-1	2,41
TuxPc-1	1,76	Ast-1	1,39	Cat 100-7	1,66	Cat 100-7	2,15
Tux 100-10	1,74	Cat 85-2	1,34	TuxPc-1suo2	1,66	Cat 85-2	2,04
TuxPc-1suo2	1,68	Tux 100-10	1,18	TuxPc-1	1,64	TuxPc-1suo2	1,72
Cat 85-2	1,56	Cat 85-1	1,00	Cat 85-2	1,56	Tux 100-10	1,39
Cat 100-4	0,71	Cat 100-4	0,71	Cat 100-5	1,35	Cat 100-5	1,27

NS Não significativo, ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste F.

* Significativo, ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste F.

** Significativo, ao nível de 1% de probabilidade, pelo teste F.

Médias seguidas pela mesma barra não diferem, ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

M1 Meio 2,4-D (2,5 uM) + sacarose (3%)

M2 Meio 2,4-D (2,5 uM) + sacarose (6%)

M3 Meio 2,4-D (10 uM) + sacarose (3%)

M4 Meio 2,4-D (10 uM) + sacarose (6%)

Tabela 4. Correlação entre frequência de calos embriogênicos de linhagens homozigóticas de milho avaliados ao microscópio estereoscópico (magnificação 8x) em meio contendo 2,4-D e número de calos que produziram plântulas em meio de regeneração, em um total de 200 casos. Cada caso consistiu de 60 calos em tratamentos de 2,4-D (2,5 μ M ou 10 μ M) + sacarose (3% ou 6%), em três experimentos independentes.

Experimento	Meio de Cultura	Coefficiente de Correlação
Fevereiro/85	m3	0,918
	m4	0,890
Maio/85	m1	0,979
	m2	0,962
	m3	0,943
	m4	0,981
Fevereiro/85	m1	0,953
	m2	0,895
	m3	0,936
	m4	0,943
TOTAL		0,936

m1 Meio de cultura 2,4-D (2,5 μ M) + sacarose (3%).
 m2 Meio de cultura 2,4-D (2,5 μ M) + sacarose (6%).
 m3 Meio de cultura 2,4-D (10 μ M) + sacarose (3%).
 m4 Meio de cultura 2,4-D (10 μ M) + sacarose (6%).

relativamente altos, ou seja, 19,63%, 28,65% e 19,89%, respectivamente, apesar no número alto de embriões por placa e das repetições. Este fato pode demonstrar a dificuldade que ainda existe de se controlar os vários fatores que induzem variabilidade nesse tipo de experimentação.

A correlação entre frequências de calos embriogênicos avaliados em meio contendo 2,4-D e número de calos que produziram plântulas em meio sem 2,4-D para os três experimentos foi 0,936 \times . Como mostrado na Tabela 4, houve uma alta uniformidade de resposta para esta correlação nos diferentes experimentos e meios de cultura.

4.1.2. Calos embriogênicos friáveis e semi-friáveis.

Calos embriogênicos Tipo II, friáveis e/ou semi-friáveis, foram selecionados para as linhagens Cat 100-1, Cat 100-6, Cat 100-8 e TuxMo-1 (Figuras 17-19 e 21-23). Os calos friáveis caracterizaram-se por sua alta friabilidade, homogeneidade, crescimento rápido, produção de numerosos embriões somáticos (Figuras 17-27) que não se desenvolveram em meio com 2,4-D e, em geral, alta capacidade de regeneração de plantas. Ao microscópio estereoscópico é possível verificar que esses calos são, aparentemente, constituídos principalmente pró-embriões geralmente não conectados entre si, o que provavelmente determina sua alta friabilidade. A principal característica que distingue os calos friáveis dos semi-friáveis é a natureza mais

compacta desses últimos. Nos calos semi-friáveis da linhagem Cat 100-1 os pró-embriões são relativamente grandes e, em alguns casos, são aparentemente interligados como observado ao microscópio estereoscópico. Por outro lado, as estruturas que se assemelham a pró-embriões nos calos semi-friáveis das outras linhagens de milho são visivelmente interconectadas. Aparentemente, essas características determinam a natureza mais compacta dos calos considerados semi-friáveis. Os calos friáveis e semi-friáveis foram produzidos diretamente a partir do escutelo em culturas primárias (Cat 100-6, Cat 100-8 e TuxMo-1) ou isolados a partir de setores de calos embriogênicos Tipo I mantidos em cultura por vários meses (Cat 100-1, Cat 100-6, Cat 100-8, TuxMo-1). De um modo geral, foram obtidos inicialmente calos semi-friáveis e, a partir destes, foram obtidos os calos altamente friáveis. Os calos ou setores de calos que se mostraram adequados para o estabelecimento de cultura de longa duração e produção de calos Tipo II foram aqueles que apresentaram alta frequência de embriões somáticos em fase globular com tendência a se diferenciarem mais lentamente. Melhores resultados foram obtidos usando-se o procedimento de sub-culturas a cada 10-15 dias, quando novamente apenas setores de calos (1,5-2,0 mm de diâmetro) com alta frequência de embriões somáticos em fase globular eram transferidos para meio fresco. Quando as sub-culturas eram feitas com intervalo acima de 17-18 dias havia uma forte tendência de maturação dos embriões somáticos, com endurecimento do calo e desenvolvimento de estruturas semelhantes ao escutelo e desenvolvimento de coleótilos. Concentrações entre

10-20 uM de 2,4-D foram as melhores para manter os calos friáveis durante a fase inicial de seleção em todas as linhagens. Por outro lado foi observada uma redução na taxa de crescimento dos calos mantidos em concentrações de 2,4-D acima de 20 uM. Quando foram mantidos em concentrações de 2,4-D abaixo de 10 uM os calos tiveram uma tendência de endurecimento e de maturação dos embriões somáticos. Entretanto após a seleção dos calos friáveis e estabelecimento das culturas, a concentração de 5,0 uM de 2,4-D, foi a que melhor manteve as características de friabilidade e embriogênese desses calos. A utilização de L-prolina e hidrolisado de caseína (ARMSTRONG & GREEN, 1985) não teve efeito sobre a frequência da indução de calos semi-friáveis ou friáveis nas diferentes linhagens utilizadas. Estas substâncias também não foram efetivas para aumentar a frequência de produção de embriões somáticos em culturas já estabelecidas de calos Tipo II. Observou-se que essas culturas tiveram seu crescimento retardado e adquiriram cor castanha quando transferidas para meio contendo L-prolina (10-50 mM) e hidrolisado de caseína (100 mg/l).

Calos embriogênicos altamente friáveis foram produzidos diretamente a partir do escutelo alguns dias após a inoculação de embriões imaturos da linhagem TuxMo-1. A frequência de indução direta desses calos em culturas primárias variou de 0-10% dos calos embriogênicos induzidos a partir de aproximadamente 400 embriões imaturos dessa linhagem, usados como explantes em diversos experimentos. Entretanto, após algumas subculturas cerca de 70-100% dos calos Tipo I originaram setores

que permitiram o isolamento de linhagens de calos friáveis.

Fenômeno interessante ocorreu com a linhagem Tux 100-11, que não apresentou capacidade de regeneração a partir de calos Tipo I nos experimentos realizados. Em um experimento, em que embriões imaturos foram colocados sobre meio de indução de calos contendo 2,4-D (10 uM e 20 uM) ou picloram (10 uM e 20 uM), foi observado o desenvolvimento a partir do escutelo de alguns poucos embriões somáticos em fase globular. Alguns desses embriões em fase globular foram mantidos nos próprios calos, enquanto que outros 12 foram isolados. Os embriões somáticos mantidos nos próprios calos, assim como 9 dos embriões isolados, não aumentaram em número, não se desenvolveram e morreram após 2-3 sub-culturas. Dos embriões isolados, três produziram calos embriogênicos friáveis (Figura 20), que foram mantidos em meio com 2,4-D (10 uM). A capacidade embriogênica desses calos decresceu bastante após 2-3 meses em cultura, caindo para quase zero após 7-8 meses.

Os calos embriogênicos semi-friáveis e altamente friáveis das linhagens Cat 100-1, Cat 100-6 e Cat 100-8 foram os que apresentaram maior capacidade de regeneração, seguidos pelos calos friáveis da linhagem TuxMo-1 e Tux100-11, respectivamente. A utilização de cinetina (10 uM) no meio de regeneração e tratamento com sacarose 6% durante 10-20 dias parece permitir um melhor desenvolvimento e germinação dos embriões somáticos. As figuras 24-27 mostram uma sequência de desenvolvimento e germinação de embriões somáticos a partir de pró-embriões de calos friáveis. Os pró-embriões (Figura 24) se

Figuras 17-21. Calos embriogênicos friáveis (Tipo II) de cinco linhagens homocigóticas de milho mantidos em meio de cultura contendo 2,4-D (10 μ M) em condições de escuro. Notar a presença de numerosos pró-embriões em estágio globular, geralmente não conectados entre si. Figura 17. Linhagem TuxMo-1. Figura 18. Linhagem Cat 100-6. 30 X. Figura 19. Linhagem Cat 100-1. 30X. Figura 20. Linhagem TuxMo-1. 30X. Figura 21. Linhagem Cat 100-8. 23X.

Figura 22. Calo embriogênico semi-friável (Tipo II) da linhagem Cat 100-8 mantido em meio de cultura contendo 2,4-D (10 μ M) em condições de escuro. Notar o aspecto mais translúcido e mais compacto deste tipo de calo. 30X.

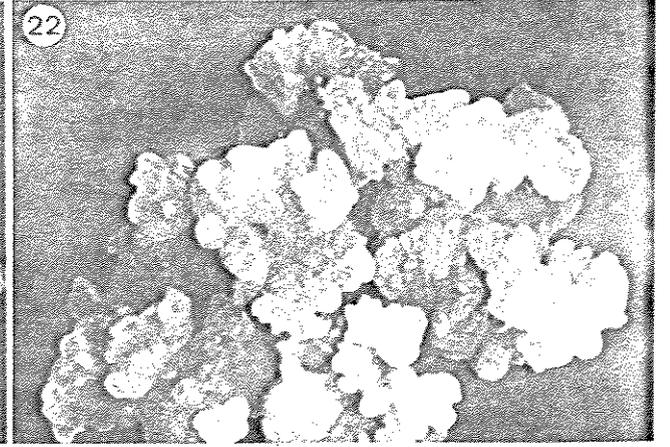
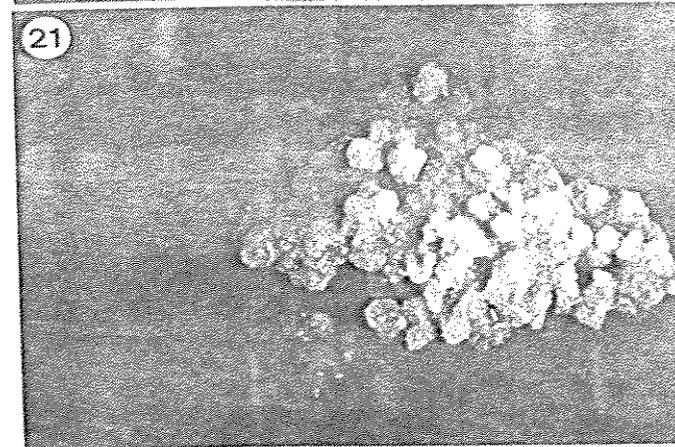
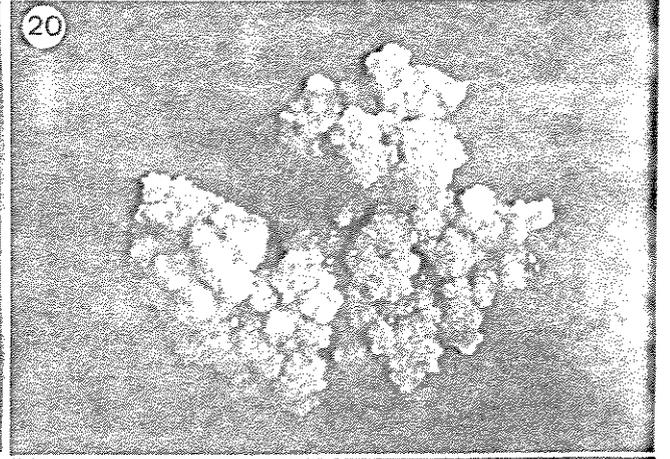
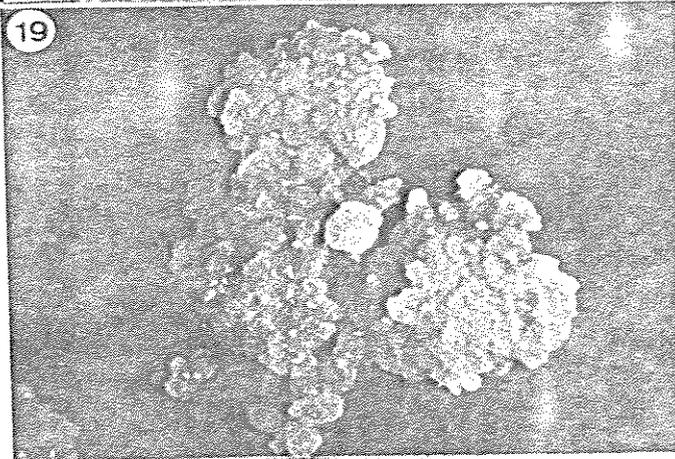
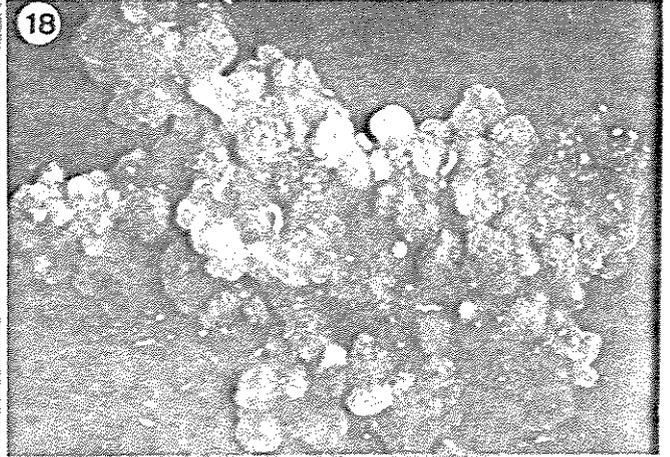
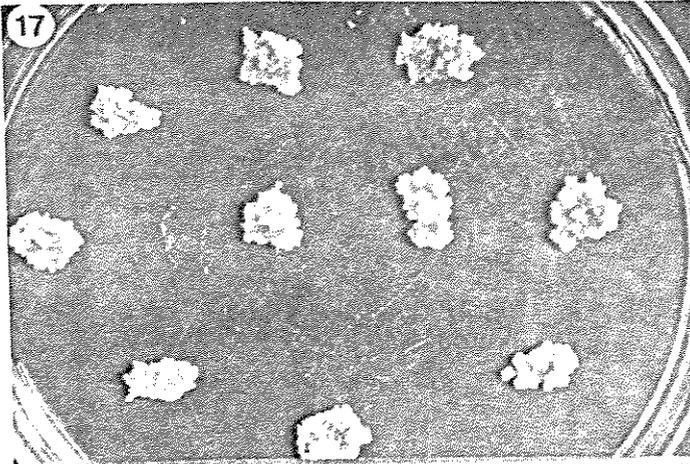
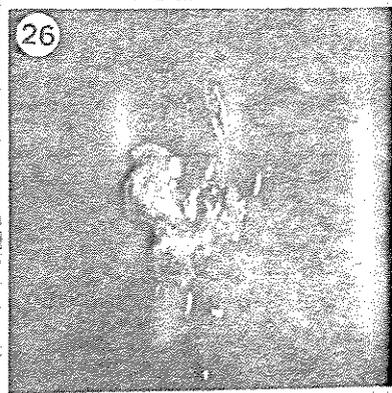
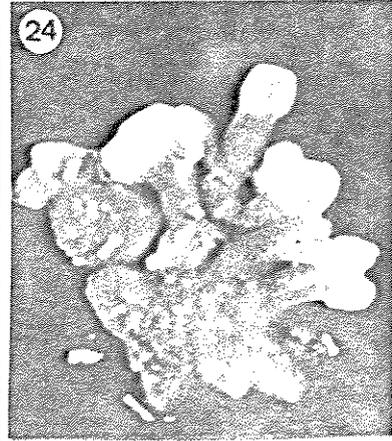
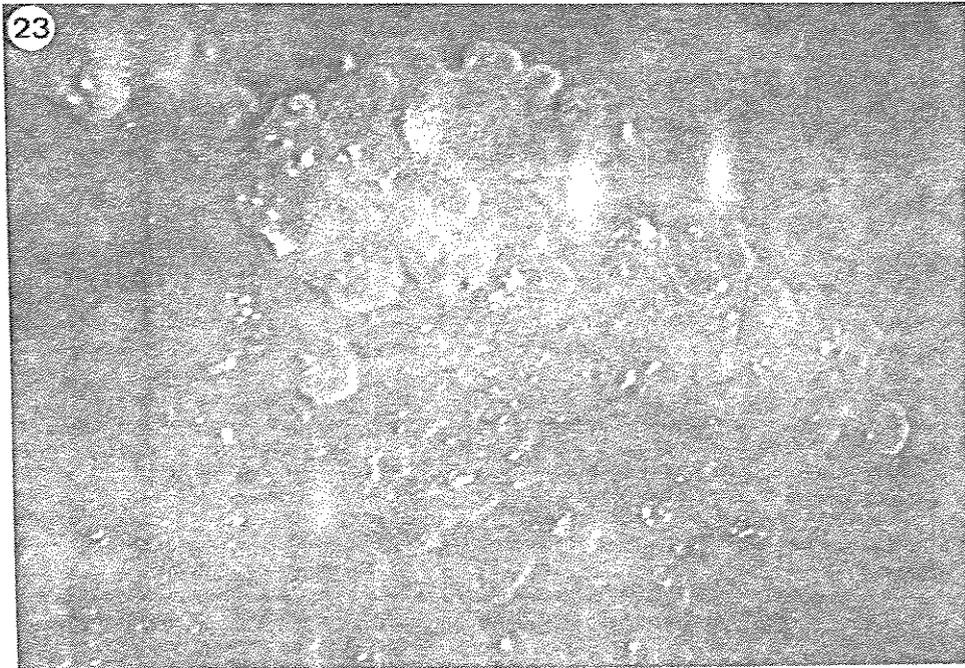


Figura 23. Calo embriogênico friável (Tipo II) de milho mantido em meio contendo 2,4-D (10 μ M) em condições de escuro. Notar presença de numerosos pró-embriões globulares que conferem friabilidade ao calo. 85 X.

Figuras 24-27. Maturação de embriões somáticos de calos friáveis (Tipo II) de milho em meio de regeneração, ou seja, sem regulador de crescimento, em presença de luz. **Figura 24.** Embriões somáticos 10 dias após transferência para meio de regeneração. Notar que esses embriões são desconectados entre si e ligados a um tecido mole, que parece lhes conferir sustentação no calo. 90 X. **Figura 25.** Embriões somáticos em germinação, 25 dias após transferência para meio de regeneração. Notar que, de modo diferente dos calos Tipo I, os embriões somáticos do calo Tipo II são, geralmente, desconectados um do outro. 25 X. **Figuras 26 e 27.** Embrião somático em germinação 25 dias e 27 dias após transferência do calo para meio de regeneração, respectivamente. 20 X.



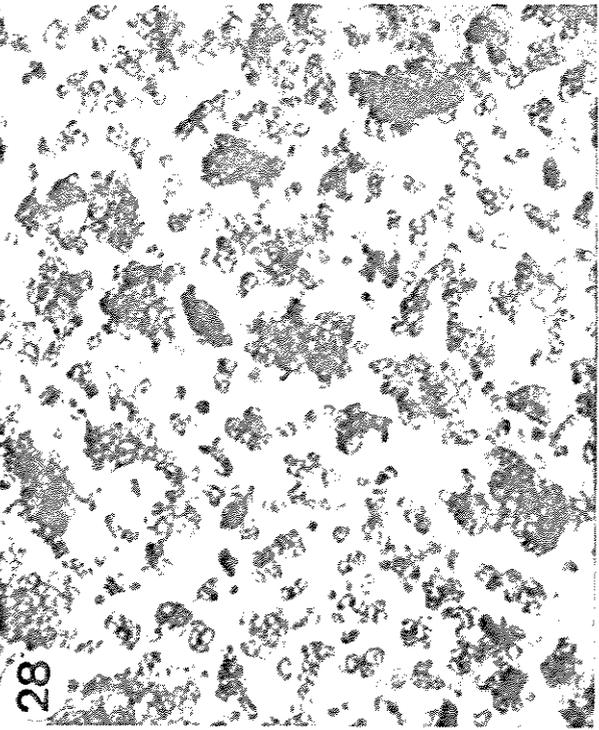
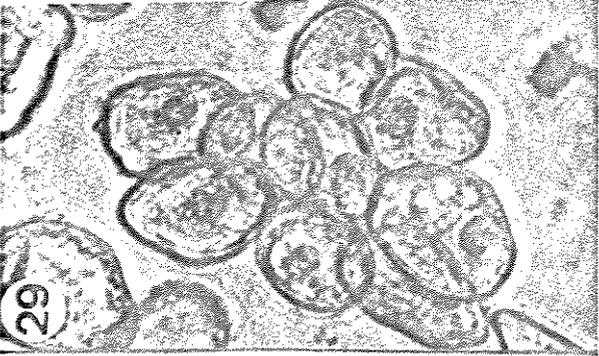
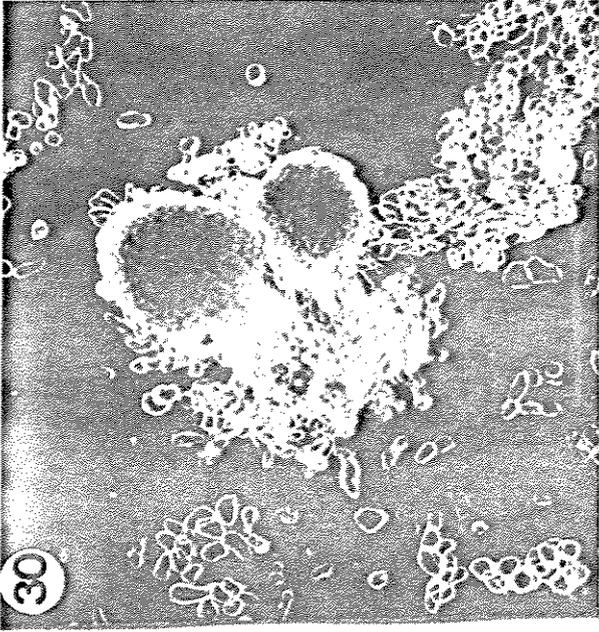
desenvolvem rapidamente quando o calo é transferido para meio sem 2,4-D. Como pode ser observado na Figura 25, os embriões somáticos em desenvolvimento são geralmente desconectados entre si, porém ligados a um tecido de calo aparentemente indiferenciado. Embriões somáticos em germinação são mostrados nas Figuras 26-28. Embora muitos desses embriões apresentassem organização aparentemente normal, vários outros com meristemas apicais múltiplos, incapacidade de desenvolvimento do coleoptilo e outras anomalias, foram observados também. Várias linhagens de calos friáveis e semi-friáveis estão sendo mantidas em cultura há mais de dois anos sem perder sua capacidade embriogênica.

4.1.3. Cultura de células em suspensão.

Culturas de células em suspensão foram iniciadas a partir de calos embriogênicos altamente friáveis das linhagens TuxMo-1 e Cat 100-1 (Figuras 17 e 19). Para ambas as linhagens foram estabelecidas culturas em suspensão finamente dispersas em aparência macroscópica (Figura 33). As culturas desses dois genótipos apresentaram diferenças quanto à dispersão das células no meio líquido, tamanho dos agregados celulares e características das células (Figuras 28, 29, 34 e 35).

Nas culturas da linhagem TuxMo-1, foram observados agregados celulares e com um certo padrão de organização e embriões somáticos em estágio globular (Figura 30). Aparentemente o meristema radicular desses embriões era bastante

Figuras 28-32. Fotomicrografias de células de milho em suspensão, calos e regeneração de plantas em culturas da linhagem TuxMo-1. Figura 28 e 29. Células em suspensão em meio de cultura líquido suplementado com 2,4-D. Notar a alta frequência de células pequenas e arredondadas ou ovais. As células mostradas na Figura 29 foram coradas com carmim-propiónico. 400X e 1400X. Figura 30. Pró-embrões presentes no meio líquido corados com carmim-propiónico. As células mais coradas possuem citoplasma mais denso. Aparentemente o meristema radicular é bastante ativo, liberando numerosas células para o meio. 560X. Figura 31. Calos embrionários friáveis provenientes de células em suspensão filtradas (filtro 350 μ m), após 50 dias de transferência para meio de cultura sólido contendo 2,4-D. 28X. Figura 32. Maturação e germinação de embriões somáticos, após 30 dias de transferência para meio sem 2,4-D. 30X.



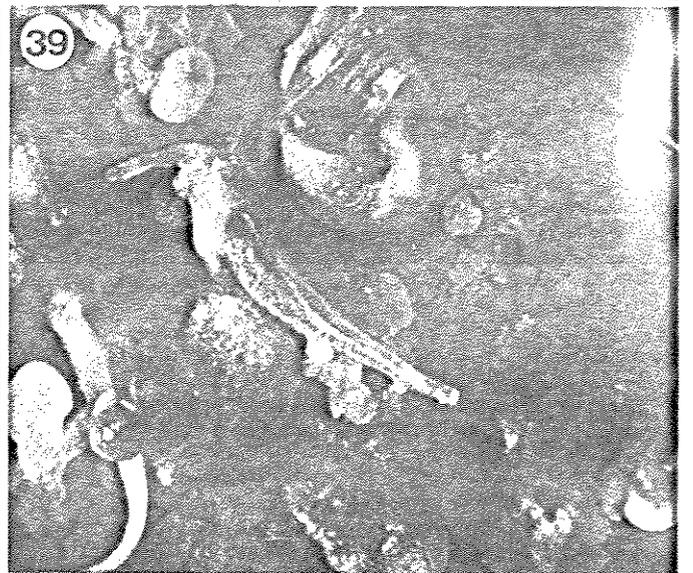
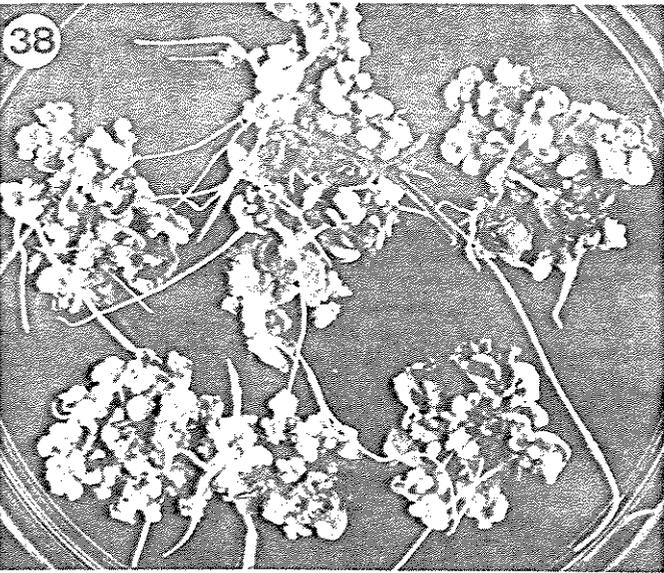
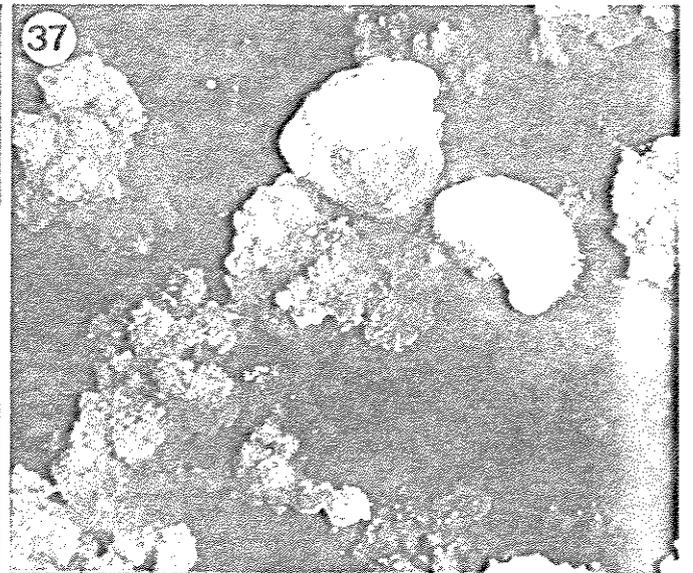
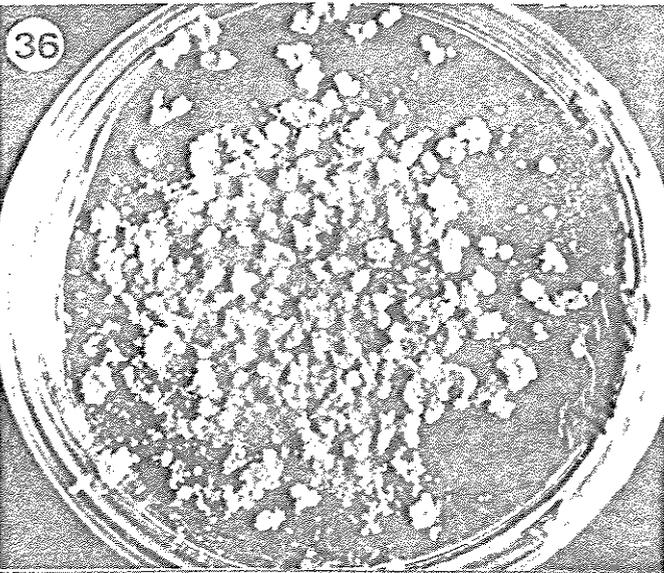
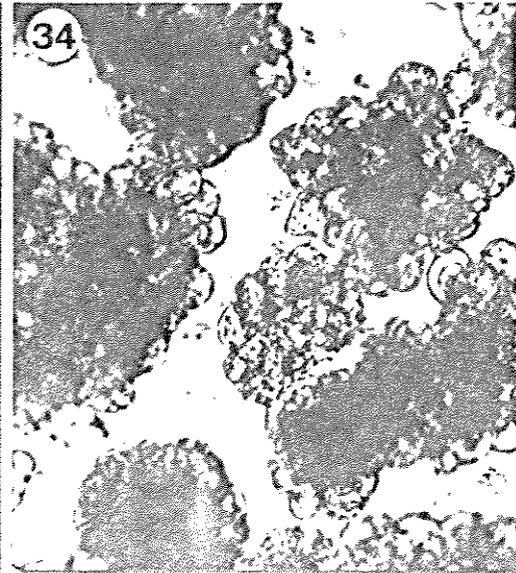
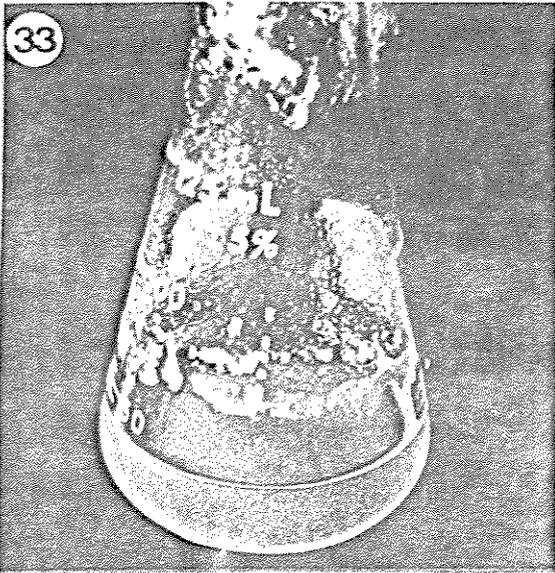
ativo, favorecendo o desprendimento de células para o meio líquido. Foram também observados agregados constituídos por poucas células de forma arredondada e citoplasma relativamente denso (Figura 29). Culturas com 2-5 meses de idade foram filtradas utilizando-se filtro com poros de 300 μm e o filtrado foi colocado sobre a superfície do meio de manutenção de calos friáveis contendo 2,4-D (5 μM ou 10 μM), sacarose 3% e gelrite (2,3 g/l).

Áreas densas de calos foram obtidas dentro de 50-60 dias, como mostrado na Figura 31. Embriões somáticos globulares se proliferaram rapidamente nesses calos.

As culturas em suspensão obtidas a partir dos calos da linhagem Cat 100-1 consistiram quase totalmente de pequenos aglomerados de células bem arredondadas que possuem citoplasma bastante denso, como mostrado nas Figuras 34 e 35. Algumas células vacuoladas foram, aparentemente produzidas a partir desses grupos de células. Não foram observados embriões somáticos nessas culturas e também não houve produção da substância mucilagínosa observada na linhagem TuxMo-1. Filtrados de células em suspensão (Filtros de 180 μm e 300 μm), obtidos de culturas com 3 meses de idade, foram colocados sobre meio de manutenção de calos friáveis. A proliferação dessas células foi relativamente rápida e, após 40-50 dias, densas áreas de calos embriogênicos puderam ser observadas (Figuras 36 e 37).

Os meios de cultura contendo níveis de 2,4-D entre 10 μM e 20 μM foram os melhores para proliferação das células em suspensão. Em tratamentos com níveis de 2,4-D acima de 20 μM ocorreu escurecimento e paralisação do crescimento dos ca-

Figuras 33-39. Cultura de células em suspensão, produção de calos, maturação e germinação de embriões somáticos da linhagem Cat 100-1. Figura 33. Células em meio de cultura líquido contendo 2,4-D. Figura 34. Amostra de células em suspensão. Notar a forma arredondada das células agregadas em pequenos grupos. 450X. Figura 35. Células em suspensão intensamente coradas com carmin-propilônico, mostrando, em sua maioria, forma arredondada e citoplasma denso. 1300X. Figura 36. Formação de calos a partir de células em suspensão filtradas (filtro 350 μ M), após 50 dias em meio sólido contendo 2,4-D. Notar heterogeneidade no tamanho dos calos. X. Figura 37. Início de maturação de embriões somáticos de calos ainda em meio contendo 2,4-D. 60X. Figuras 38 e 39. Maturação e germinação de embriões imaturos em meio de regeneração. X



los utilizados para iniciar as culturas. Tratamentos contendo IAA (10 uM) aparentemente deram resultados semelhantes àqueles sem este hormônio.

O desenvolvimento de embriões somáticos a partir dos calos embriogênicos obtidos de células em suspensão ocorreu em meio de regeneração suplementado ou não com cinetina (10 uM) (Figuras 32, 38 e 39). A manutenção desses calos durante 10-20 dias em meio contendo 6% de sacarose, e posterior transferência para meio contendo 2% desse açúcar, permitiu boa diferenciação e germinação dos embriões somáticos. Alguns embriões atípicos, como anteriormente descritos para os calos Tipo I e Tipo II foram também observados.

Foi bastante comum a ocorrência de bactérias não-identificadas em culturas em suspensão. Aparentemente estas estavam presentes nos calos utilizados para iniciar as culturas. Essas bactérias parecem não prejudicar o crescimento e desenvolvimento dos calos porém se proliferam rapidamente no meio líquido e prejudicam sensivelmente o estabelecimento e manutenção das culturas em suspensão.

4.1.4. Isolamento e cultura de protoplastos.

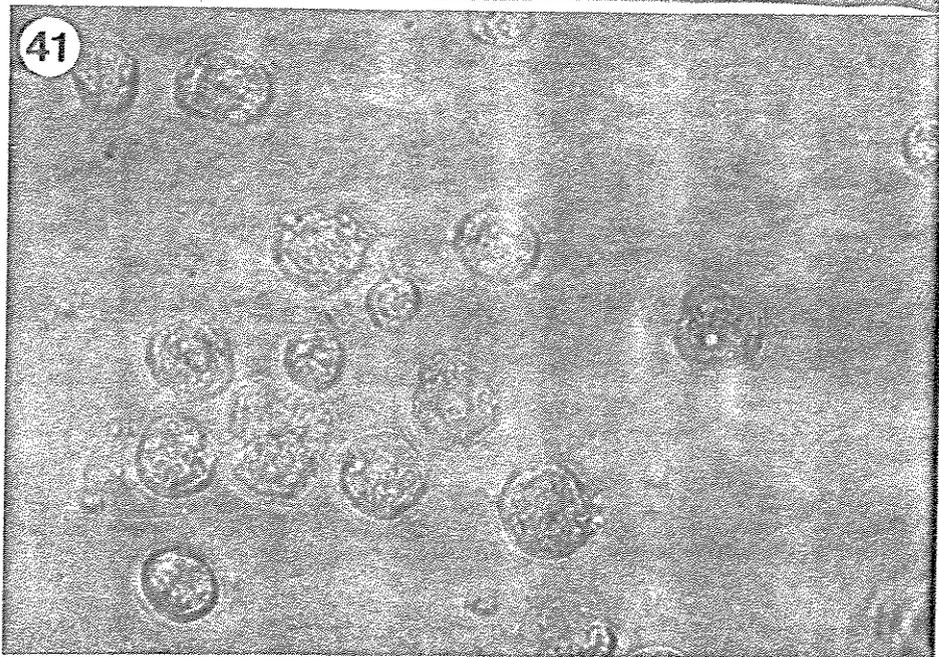
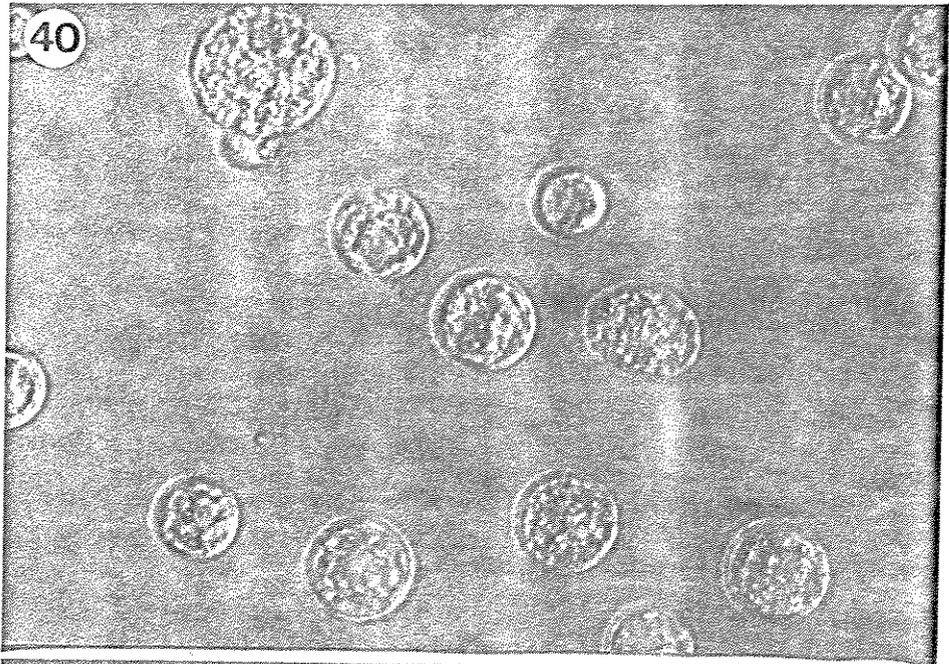
A solução enzimática contendo celulase 2%, macerase 2% e pectoliase Y-23 2% foi a que se mostrou mais adequada para a obtenção de protoplastos a partir de calos embriogênicos friáveis e células em suspensão. Em ambos os casos, po-

rém, a digestão da parede celular foi lenta e a frequência de células que produziram protoplastos após 4-8 horas de digestão foi relativamente baixa, não ultrapassando 10-20% do total de células utilizadas. Os protoplastos mais abundantes eram relativamente pequenos (15-20 μm) e possuíam citoplasma denso, como mostrado na Figura 40. Ocorreram também protoplastos maiores (40 μm ou mais) e vacuolados, provavelmente provenientes de células não-embriogênicas e produtos de fusão espontânea. Foram também observados protoplastos com características de digestão muito prolongada, que quebraram-se facilmente ou sofreram um deslocamento do citoplasma para um lado da célula (Figura 41), quando submetidos à centrifugação. A frequência desses protoplastos aumentou bastante quando o tempo de digestão foi prolongado para 8 horas ou mais.

Ao final da digestão ainda restavam agregados de células meristemáticas, algumas vezes envolvidos por células altamente vacuoladas e de parede celular espessa, que não haviam sofrido digestão. Aparentemente a solução enzimática não foi muito eficiente para digerir a parede celular dessas células não-embriogênicas e, portanto, não penetrou no tecido embriogênico. A manutenção em diferentes níveis de 2,4-D das culturas em suspensão e calos friáveis utilizadas como fonte de células parece não ter sido importante para a produção de protoplastos, considerando-se que as dificuldades encontradas no processo de isolamento foram semelhantes em todos os experimentos.

O meio rico em sacarose, com densidade específica de aproximadamente $1,08\text{g.cm}^{-3}$, permitiu uma boa flutuação

Figuras 40-41. Fotomicrografias de protoplastos isolados a partir de calos embriogênicos friáveis da linhagem TuxMo-1. Figura 40. Notar citoplasma denso distribuído de modo relativamente uniforme dentro das células. 1200X Figura 41. Notar deslocamento do citoplasma para um lado da célula, o que pode ser uma consequência de digestão muito prolongada. 1200 X.



dos protoplastos. Mesmo assim, houve perda de protoplastos durante o processo de purificação dos mesmos. Essa perda ocorreu dentro dos padrões normais de experimentos de purificação, mas considerando-se que a densidade inicial de protoplastos já não era muito alta, essas perdas comprometeram a sua transferência para meio de cultura. A densidade em meio de cultura foi de aproximadamente 100 protoplastos/ml. Embora tenha sido observado que vários protoplastos adquiriram forma ovalada, o que aparentemente é uma indicação de reestruturação da parede celular, divisões celulares não foram observadas nessas culturas.

4.2. Alguns aspectos histológicos e citológicos de calos embriogênicos.

4.2.1. Microscopia óptica

A análise de cortes semi-finos de amostras de calos embriogênicos friáveis das linhagens TuxMo-1 e Cat 100-1 ao microscópio óptico mostrou a existência de muitos centros meristemáticos circundados por células vacuoladas (Figuras 42 e 43). Geralmente essas células meristemáticas fazem parte de estruturas mais organizadas, que se assemelham a pró-embriões (Figura 42). Essas estruturas, que serão referidas como "pró-embriões", são semelhantes àquelas observadas em culturas em suspensão da linhagem TuxMo-1 (Figura 30). Nas amostras de ca-

los da linhagem Cat 100-1 foram também encontrados muitos centros merismáticos relativamente pequenos, localizados em estruturas pouco organizadas (Figura 43). As células meristemáticas coraram-se intensamente com carmim propiônico-acético, enquanto que as células vacuoladas, coraram-se bem mais lentamente (Figuras 30 e 47). Foi possível, assim, evidenciar melhor as células com citoplasma mais denso.

Os calos semi-friáveis da Cat 100-1 também eram constituídos principalmente por "pró-embriões" (Figura 44). Entretanto, estes eram, quase sempre, maiores do que aqueles observados nos calos friáveis. Como pode ser observado na Figura 44, a grande maioria das células desses "pró-embriões" possui citoplasma denso e se coram intensamente com azul de toluidina. Aparentemente, em meio com 2,4-D, o centro meristemático dessas estruturas localiza-se próximo do ápice.

Em nenhum dos calos foi observada a existência de células organizadas em epiderme. Também não foram observadas conexões vasculares de centros meristemáticos ou "pró-embriões" com o restante do calo. Tecidos ou células vasculares não foram observados nas amostras de calos analisados.

Os tipos de células encontradas nos calos embriogênicos friáveis e semi-friáveis diferem bastante de calos compactos (Tipo I). As Figuras 45 e 46 mostram cortes de calos Tipo I da linhagem Cat 100-1, 30 dias após a inoculação em meio com 2,4-D. Como pode ser observado, a maioria das células desses calos caracteriza-se por apresentar citoplasma rico em grânulos semelhantes a grânulos de amido. O núcleo é arredondado

e se posiciona no centro da célula. Tecidos ou grupos de células vasculares também ocorrem nesses calos (Figura 46).

Análises de cortes dos centros meristemáticos de calos embriogênicos friáveis e semi-friáveis em maior magnitude ao microscópio óptico também foram realizadas. As células presentes nessas regiões mostraram-se morfológicamente semelhantes em todos os calos analisados. As fotomicrografias 48-51 mostram alguns cortes de centros meristemáticos de calos friáveis e semi-friáveis da linhagem Cat100-1. Como pode ser observado, as células dessa região caracterizam-se por seu tamanho relativamente pequeno, parede celular delgada, citoplasma denso, pequenos vacúolos e núcleo posicionado na região central da célula. Estruturas semelhantes a proplastídeos também foram observadas. Amiloplastos não foram observados nessas células. Aparentemente as células dos centros meristemáticos permanecem indiferenciados e com alta atividade mitótica, como constatado pela alta frequência de células em diferentes estágios de divisão (Figuras 48, 49 e 51).

Os núcleos das células meristemáticas analisadas são grandes e arredondados apresentando, diferentes graus de compactação da cromatina. Um ou dois nucléolos bem organizados foram observado nesses núcleos. Também foi constatada a presença de pequenas áreas distribuídas em núcleos contendo matriz bem mais clara (Figura 50). Essas regiões assemelham-se a massas cromatínicas densas ou regiões de reorganização nuclear. Como mostrado na Figura 52, o método de impregnação com prata, utilizado para se estudar melhor esses núcleos, permitiu

Figuras 42-46. Fotomicrografias de cortes de calos embriogênicos friáveis, semi-friáveis e compactos de linhagens homozigóticas de milho corados com azul toluidina. Figura 42. Calo embriogênico friável da linhagem TuxMo-1. Notar pró-embriões contendo regiões consistindo de células bastante coradas e circundadas por células mais vacuoladas. 400 X. Figura 43. Calo embriogênico friável da linhagem Cat 100-1. Notar pequenos grupos de células meristemáticas circundadas por células maiores vacuoladas. 400 X. Figura 44. Pró-embrião de um calo semi-friável da linhagem Cat 100-1. Notar centro meristemático na região apical e ausência de epiderme. 330 X. Figura 45. Região de um calo compacto (Tipo I) da linhagem Cat 100-1, 30 dias após a inoculação. Notar presença de células mais diferenciadas circundando o calo. 350 X. Figura 46. Região de um calo compacto da linhagem Cat 100-1. Notar células com núcleo arredondado em posição central e citoplasma rico em grânulos de amido, conforme testes com iodina, e presença de células vasculares. 550 X.

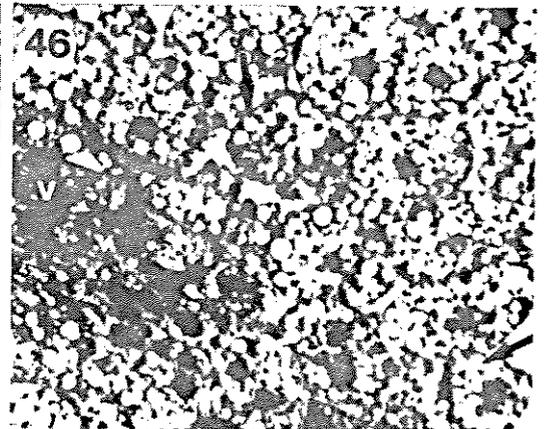
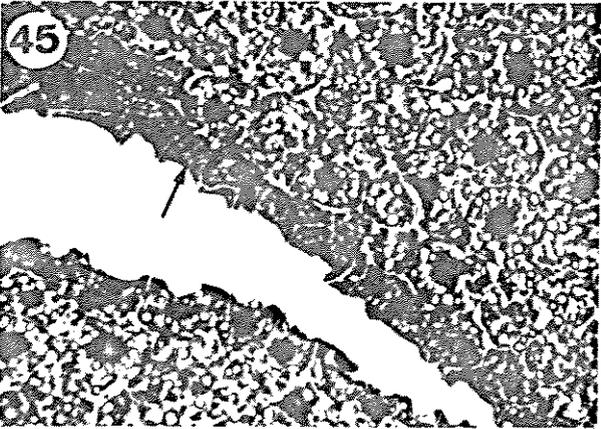
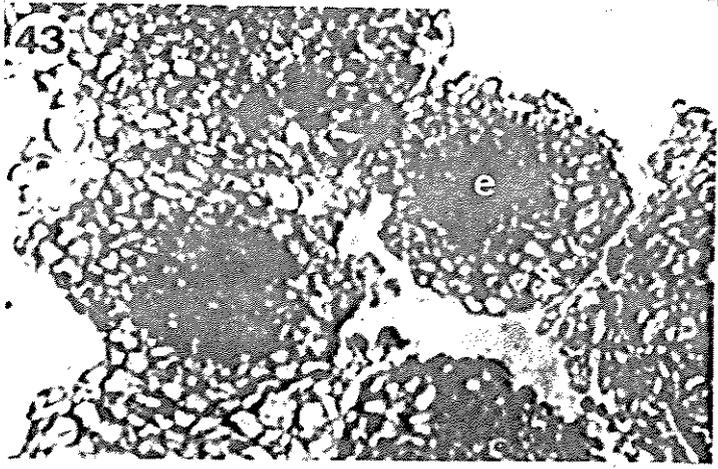
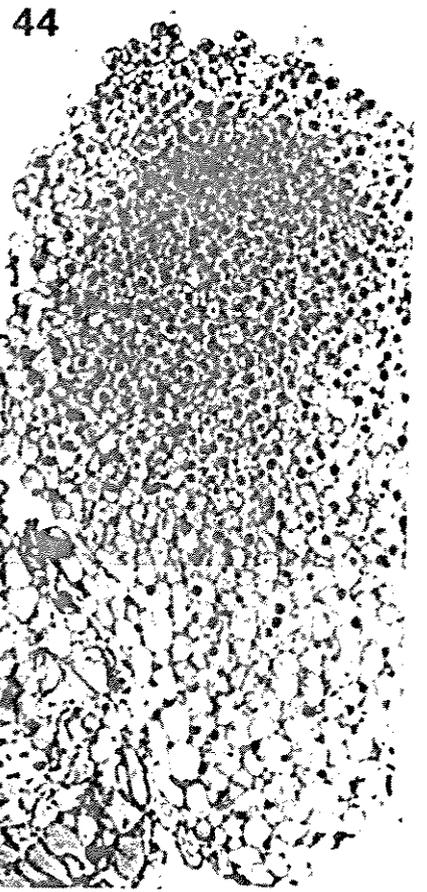
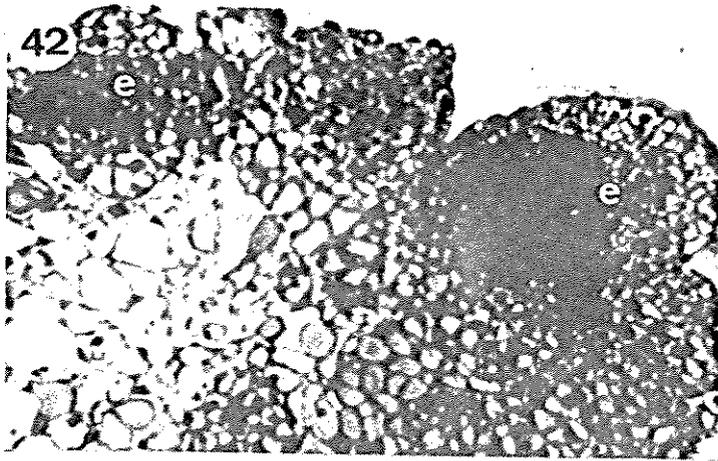
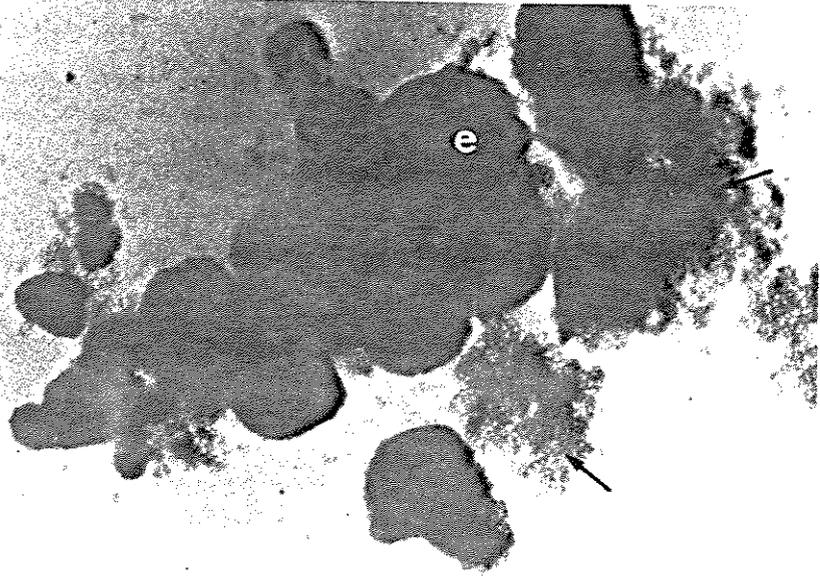


Figura 47. Fotomicrografia de uma amostra de calos embriogênicos friáveis da linhagem TuxMo-1 esmagada e corada com carmin-propíônico. Notar presença de numerosos pró-embriões globulares intensamente corados (e), circundados por células vacuoladas e coradas com menor intensidade (seta). 100 X.

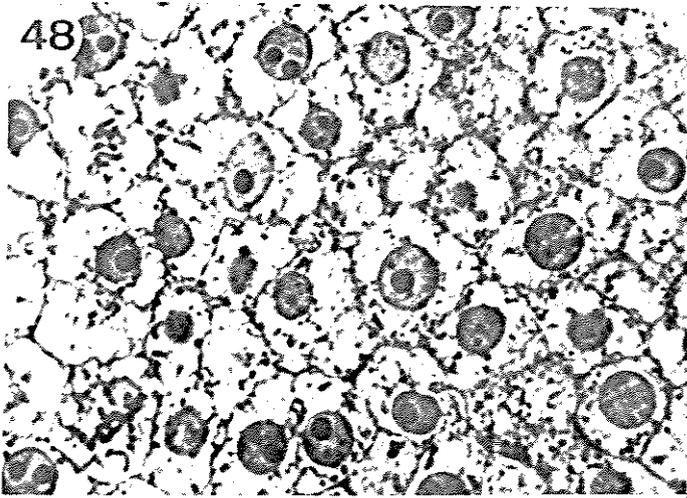
Figuras 48-50. Fotomicrografias de cortes de pró-embriões de calos semi-friáveis da linhagem Cat 100-1. Figuras 48 e 49. Notar núcleos arredondados posicionados na região central da células, presença de nucléolos e citoplasma denso, contendo poucos vacúolos. Notar células em divisão. 1800 X e 2800 X, respectivamente. Figura 50. Células periféricas do pró-embrião. Notar presença de pequenas áreas escuras e densas dentro do núcleo (seta), à semelhança do que pode ser observado em outras células do pró-embrião (Figuras 48 e 49). 3100 X.

Figura 51. Corte de um centro meristemático de calo friável da linhagem Cat 100-1. Notar núcleos com diferentes graus de compactação da cromatina, presença de nucléolos e pequenas áreas escuras e densas de alguns nucléolos (seta). 2800 X.

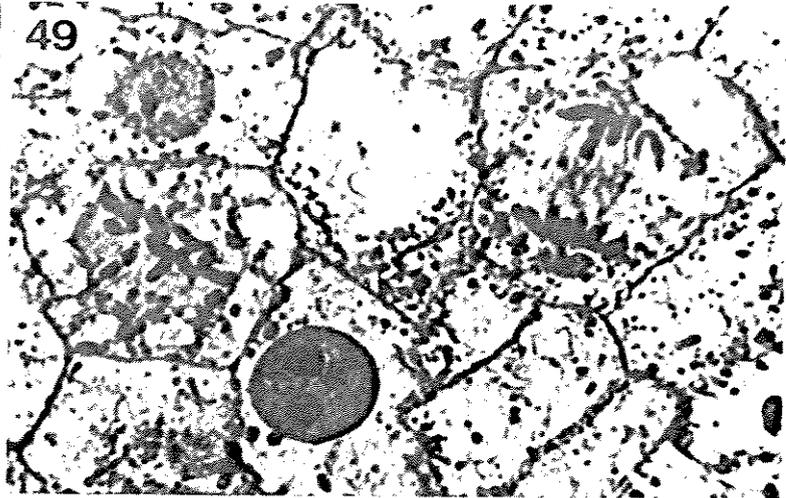
47



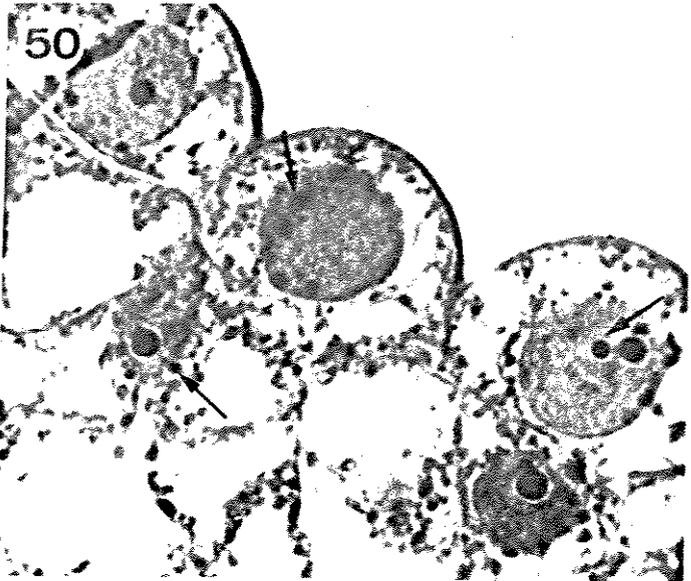
48



49



50



51

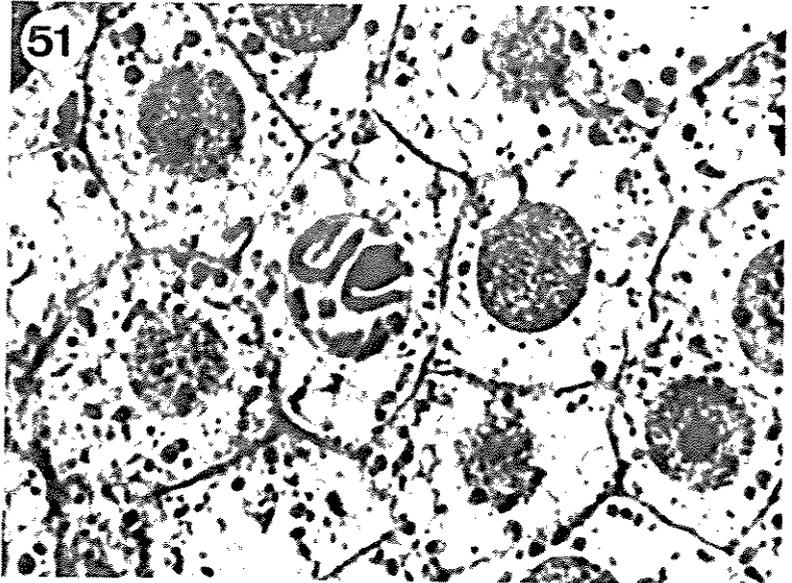
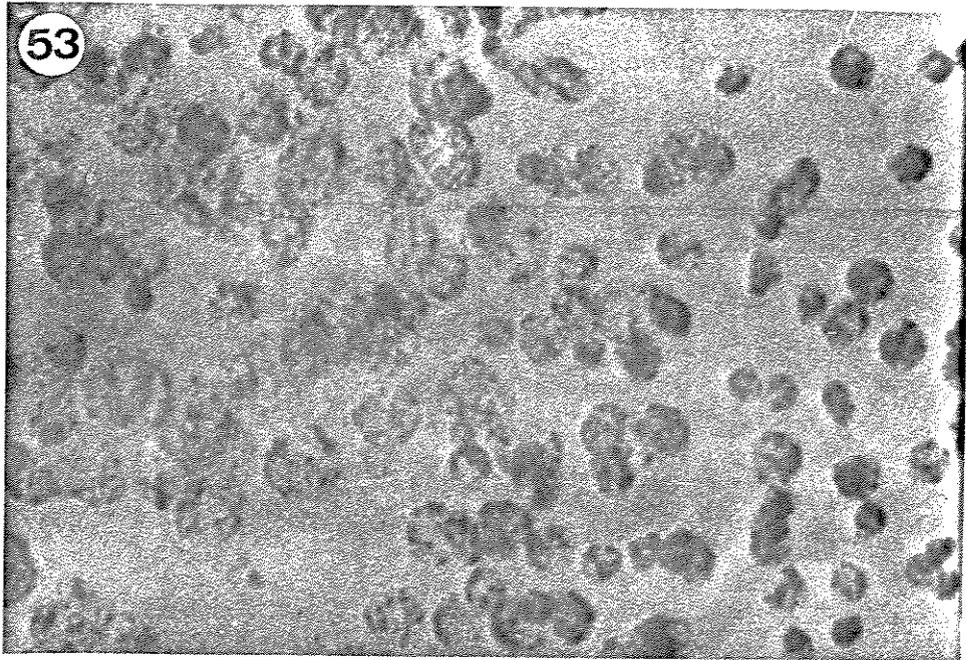
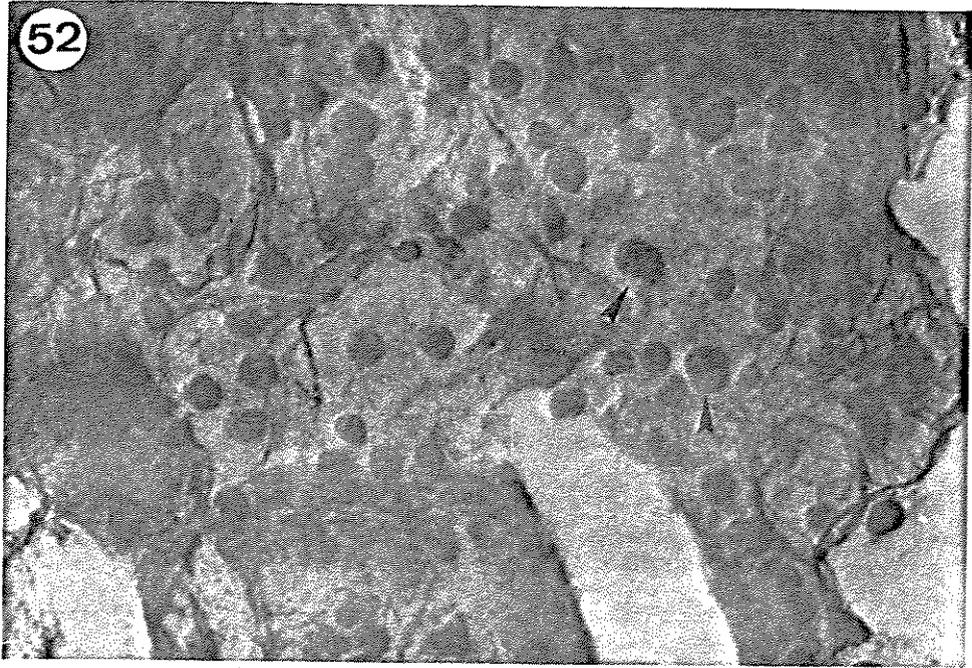


Figura 52. Fotomicrografia de amostra de calos embriogênicos friáveis da linhagem Cat 100-1 submetidos ao método de impregnação com prata, de acordo com RISUENO *et al.* (1973). Notar a presença de um ou dois nucléolos bem definidos na maioria dos núcleos e pequenas regiões de reorganização nucleolar em vários núcleos (setas).1400X.

Figura 53. Fotomicrografia de amostra de calos da linhagem Cat 100-1 submetidos à Reação de Feulgen. Notar forma arredondada dos núcleos, variação da densidade cromatínica, presença de "knobs" (setas) e região mais clara correspondente ao nucléolo. 1800X.



a identificação de um ou dois nucléolos bem definidos na maioria das células analisadas. Em alguns núcleos foi possível observar-se uma área mais escura ao redor do nucléolo. Pequenos pontos impregnados por prata foram também observados em vários núcleos.

Os resultados obtidos para Reação de Feulgen (Figura 53), mostram variações de densidade cromatínica nos núcleos dos calos analisados. Os núcleos arredondados contendo cromatina pouco condensada ou visivelmente fibrilar foram, aparentemente, os mais frequentes nas amostras estudadas. Áreas relativamente pequenas de cromatina compactada, correspondentes a "knobs", foram observadas nesses núcleos. Em algumas regiões dos calos foram encontrados núcleos menores, apresentando cromatina densamente compactada (Figura 53).

4.2.2. Microscopia eletrônica

A natureza meristemática das células que se coram intensamente, como observado ao microscópio óptico, foi confirmada nas análises ao microscópio eletrônico. Essas células foram observadas em todos os calos estudados e caracterizaram-se por apresentar parede celular delgada, numerosos plasmodesmos, matriz citoplasmática densa e rica em ribossomos, presença de alguns pequenos vacúolos e núcleo grande e arredondado, situado na região central de célula (Figuras 54 e 55). Próximo a estas foram observadas células maiores e vacuoladas (Figuras

56 e 59), semelhantes a células parenquimáticas normalmente encontradas em plantas. Em ambos os tipos de células analisadas, foram observadas numerosas mitocôndrias alongadas, arredondadas ou com forma irregular e proplastídeos contendo ou não grânulos de amido (Figura 63). Foi bastante comum a observação de dictiosomos e de concentração de membranas do retículo endoplasmático próximas à parede celular, como mostrado na Figura 61. Em muitas células ocorreram estruturas com diâmetro variando entre 0,5-1,5 μm , identificados como corpos lipídicos (GRUBER *et al.*, 1970; TOLBERT, 1980). Esses corpos lipídicos estão mostrados em maior magnificação na Figura 60. A parede celular das células meristemáticas mostrou-se bastante delgada e, geralmente, apresentado numerosos plasmodesmos. Também foram observadas várias evaginações da membrana plasmática para dentro do citoplasma, as quais são conhecidos como lomassomos, plasmalemosomos ou corpos paramurais (Figura 60).

O núcleo da maioria das células analisadas ao microscópio eletrônico apresentou forma arredondada e diferentes graus de compactação da cromatina. Foi bastante comum a ocorrência de núcleos contendo massas cromatínicas densas como mostrado nas Figuras 54 e 58. Nucléolos aparentemente pouco compactos, frequentemente contendo uma região central eletrotransparente (Figuras 54 e 57), foram observados. Essa região, conhecida como região organizadora do nucléolo, possui partículas granulares que muitas vezes puderam ser observadas em associação com uma pequena massa cromatínica condensada (Figura 57). Ocorreram também pequenos centros fibrilares, aparentemente

Figuras 54 e 55. Micrografias eletrônicas de corte e células do centro meristemático de pró-embriões da linhagem TuxMo-1. Notar parede celular delgada e rica em plasmodesmos, citoplasma denso onde podem ser visualizados numerosos ribossomos, mitocôndrias (m), proplastídeos contendo ou não grânulos de amido (a), dictiossomos (g) e alguns corpos lipídicos (li). No núcleo (n) grande e arredondado, posicionado na região central da células, podem ser observados os nucléolos (nu). Figura 54. 10000X. Figura 55. 25000X.

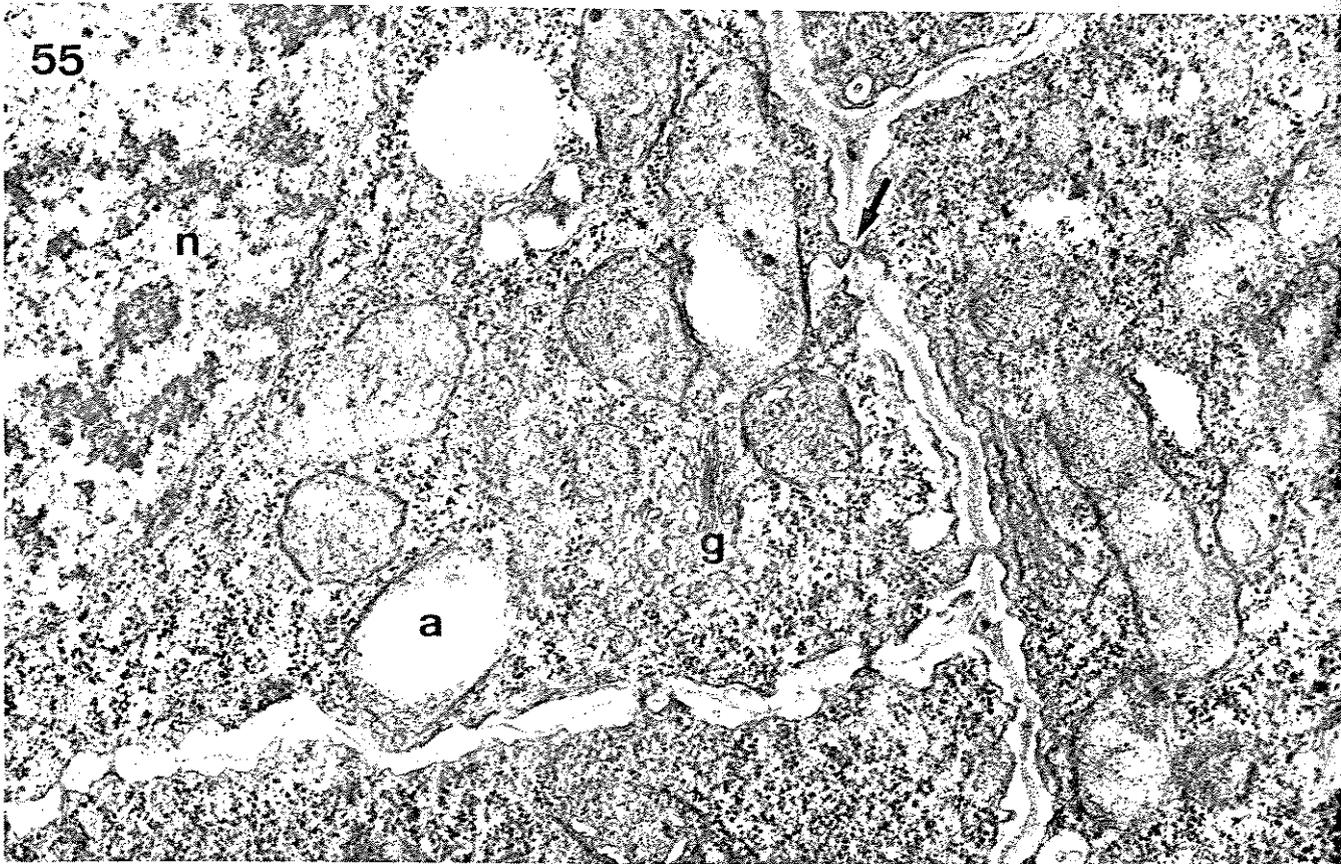
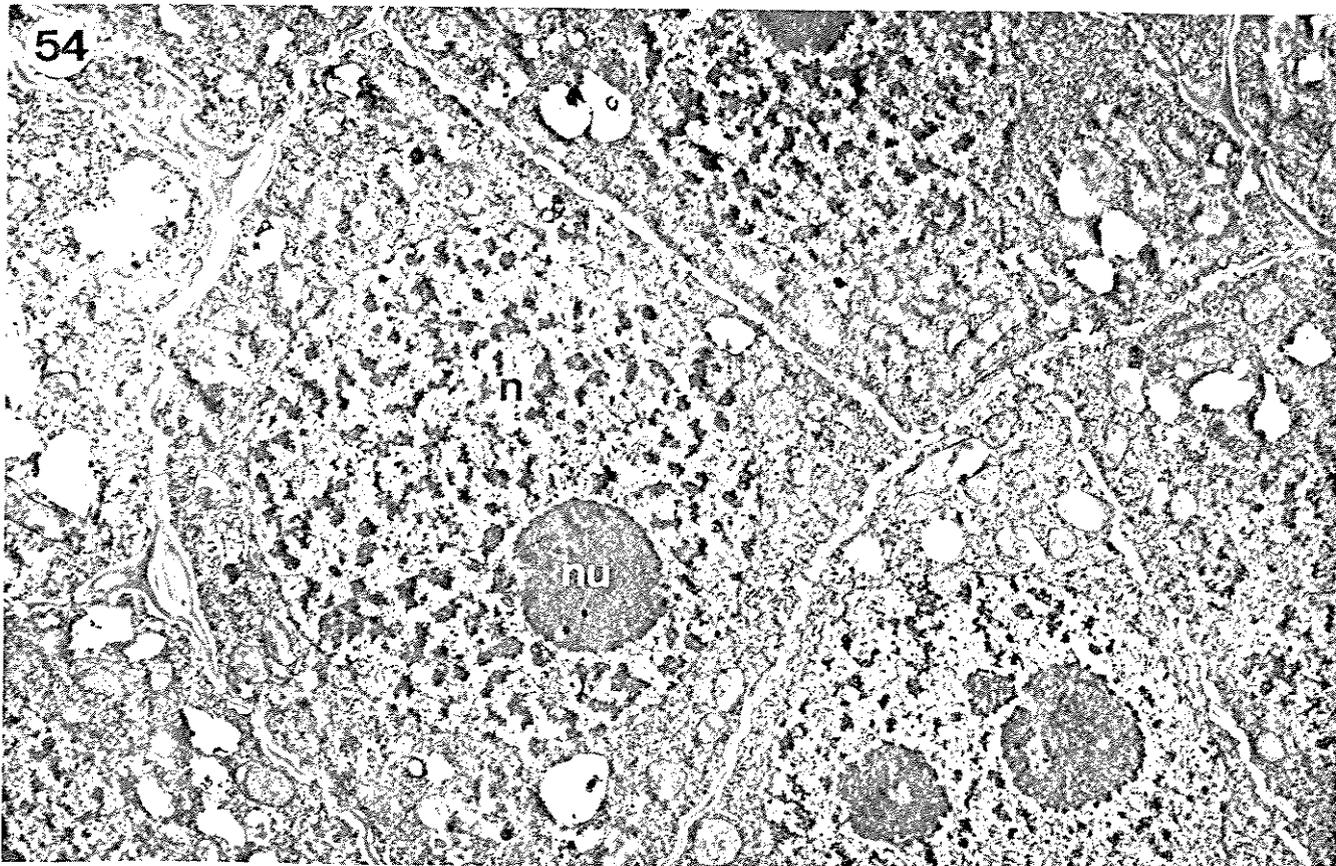
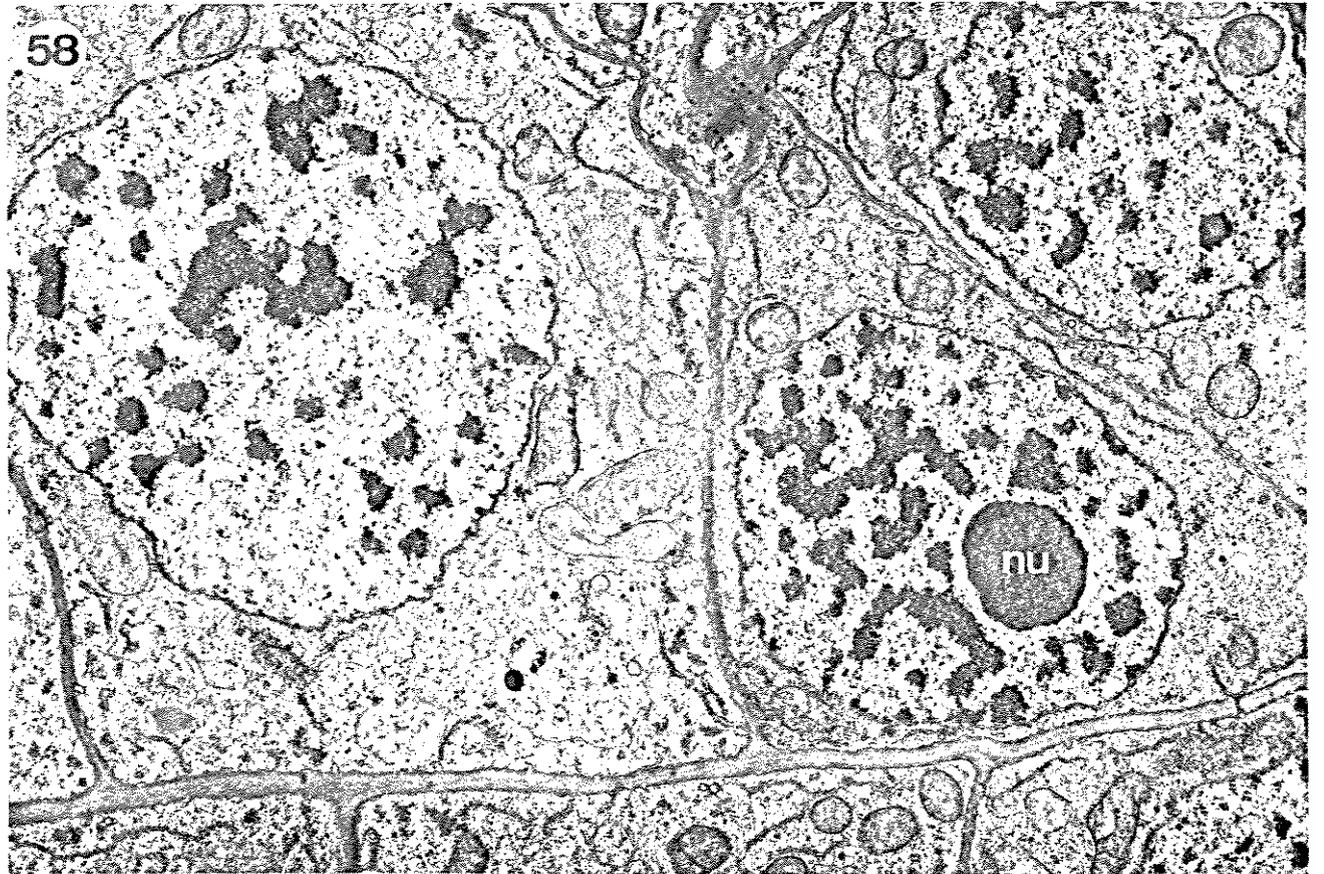
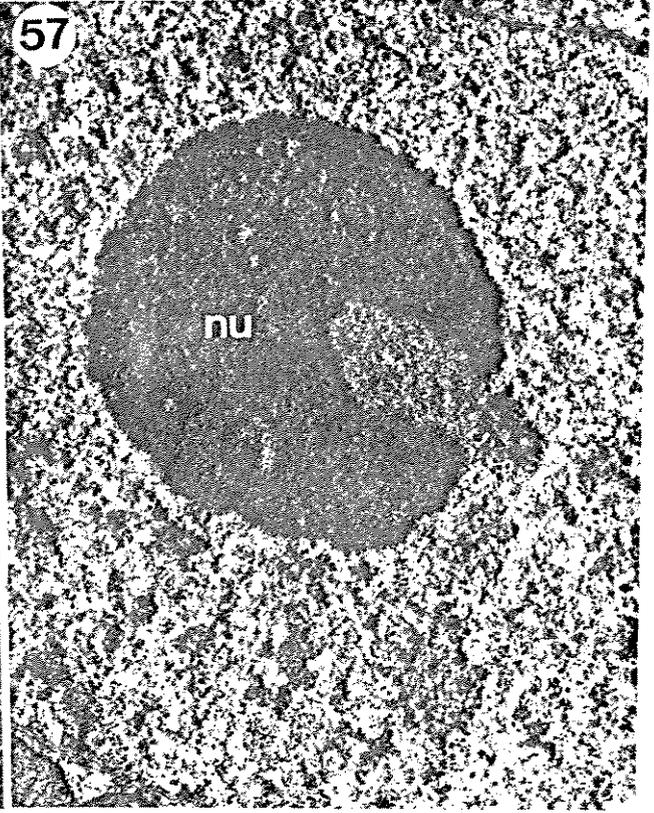
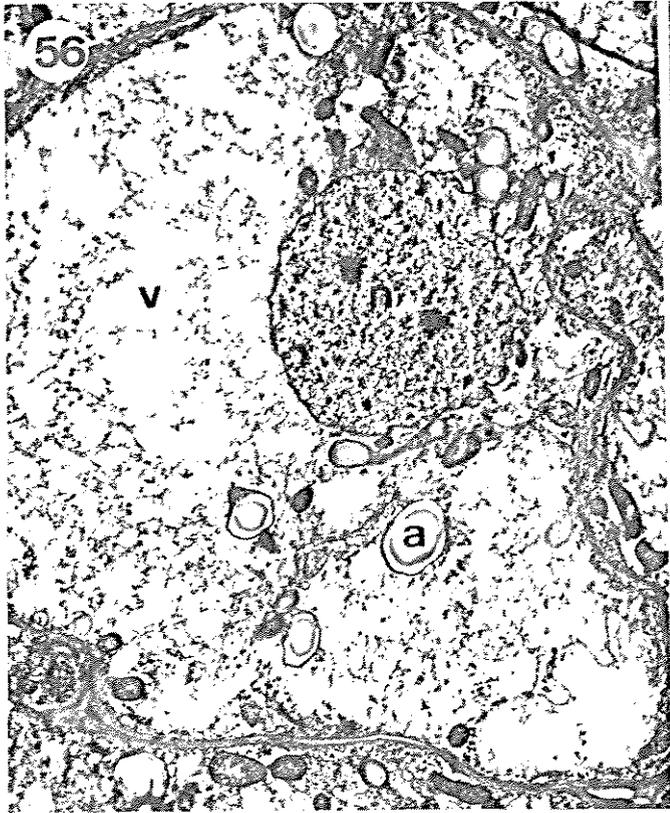


Figura 56. Micrografia eletrônica de corte de células vacuoladas que circundam o centro meristemático de pró-embriões de calos friáveis da linhagem TuxMo-1. Notar núcleo (n) em posição periférica na célula e presença de vacúolo (v) ocupando extensa área celular. (a) amiloplasto. 5250X.

Figuras 57-58. Micrografias eletrônicas de cortes de células de calos embriogênicos friáveis da linhagem Cat 100-1. Figura 57. Núcleo (n) apresentando pequenas áreas de cromatina condensada. Nucléolo (nu) apresentando uma região eletrotransparente, correspondente à região organizadora do nucléolo, como observado em estreita ligação com uma massa cromatínica. 3500X. Figura 58. Células meristemáticas apresentando citoplasma rico em ribossomos e organelas e núcleo grande e arredondado. (nu) nucléolo. 12000X.



Figuras 59-61. Micrografias eletrônicas de cortes de calos embriogênicos da linhagem Cat 100-1. Figura 59. Células vacuoladas (v) que circundam os centros meristemáticos. Notar presença de numerosas mitocôndrias (m), amiloplastos (a) e corpos lipídicos (li). 8820X. Figura 60. Secção de uma célula mostrando corpos lipídicos (li), amiloplasto (a), parede celular (pc) e plasmalemosomas (seta). 31500X. Figura 61. Secção de uma célula mostrando grande concentração de membranas do retículo endoplasmático (re) e dictiossomo (g) próximas à parede celular (pc). 18000X

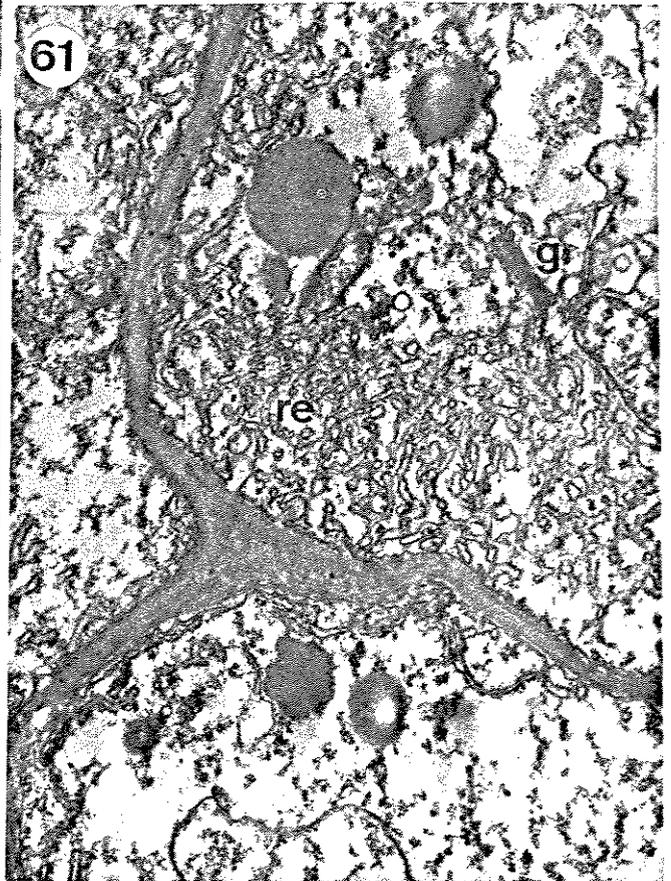
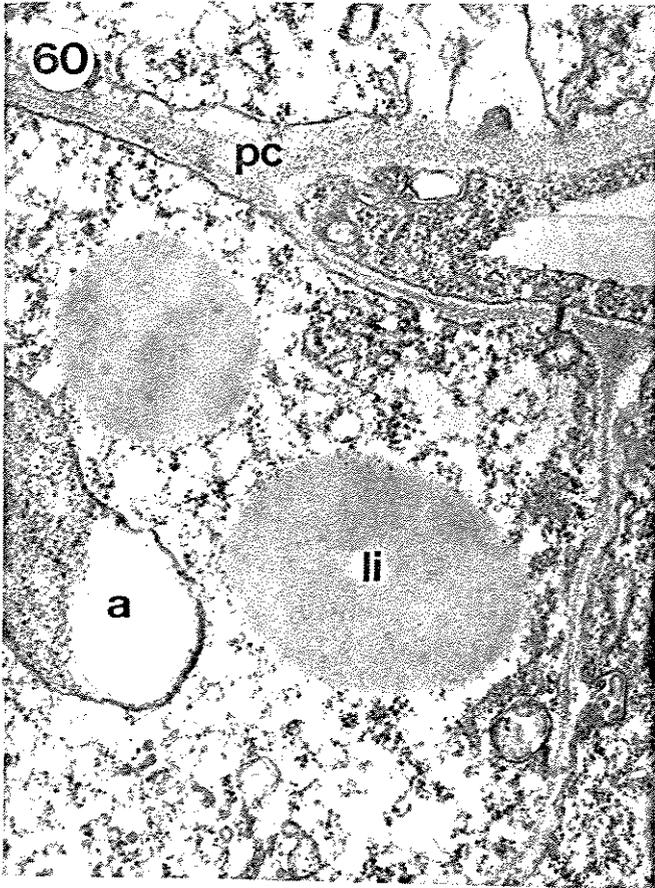
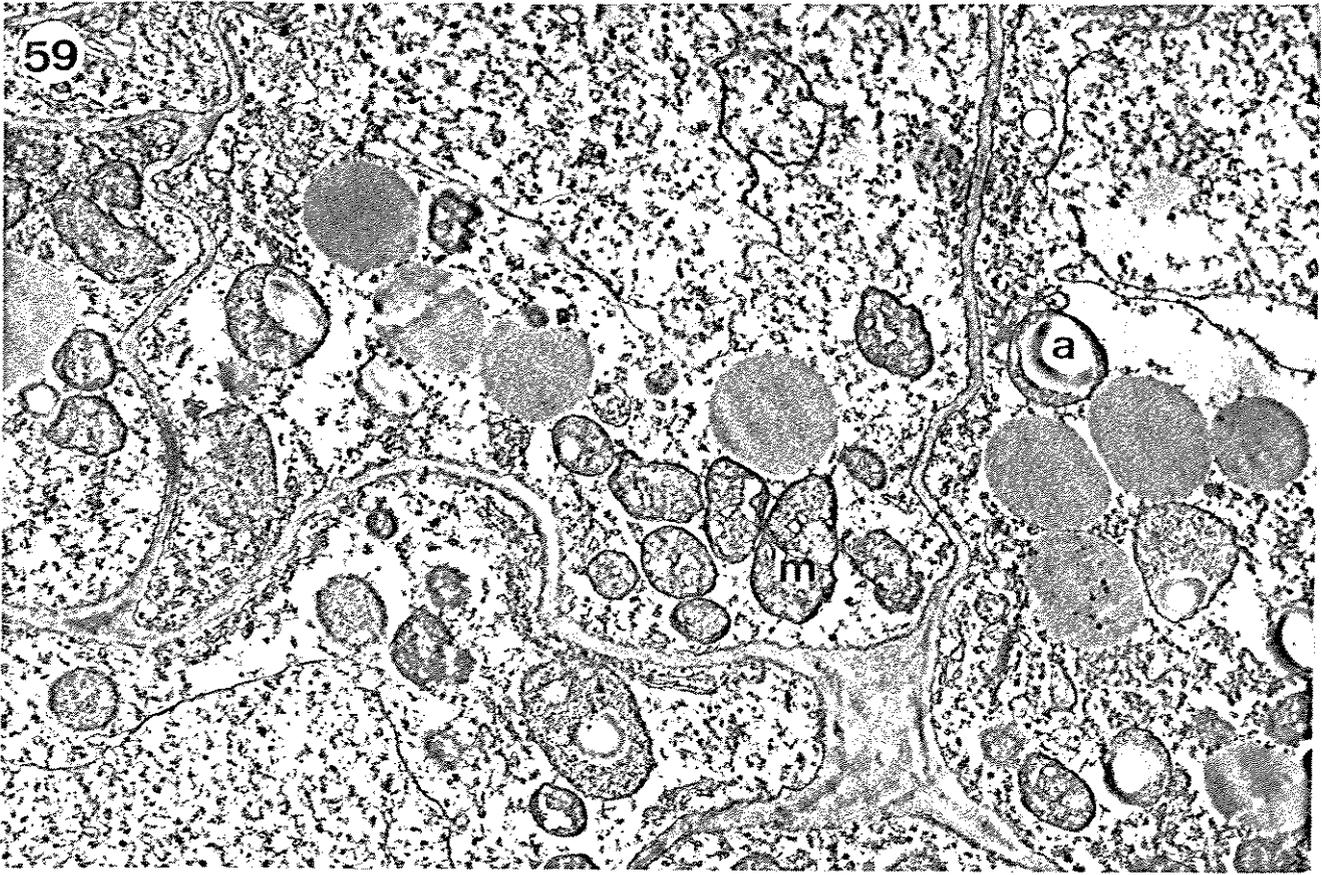


Figura 62. Micrografia eletrônica de corte de células meristemáticas de calo embriogênico semi-friável da linhagem Cat 100-1. Notar citoplasma denso, cromossomos (c), parede celular delgada (pc), mitocôndrias (m) e corpos lipídicos (li). 8400X.

Figura 63. Micrografia eletrônica de corte de uma células vacuolada que circundam o centro meristemático de pró-embriões dos calos friáveis da linhagem Cat 100-1. Notar presença de numerosas mitocôndrias (m), amiloplastos (a), proplastídeos (p), dictiossomo (d) e corpos lipídicos (li). 16000X.



constituídos por cromatina e uma área escura ao redor do núcleo. Células em divisão também foram observadas (Figura 62).

4.3. Herança da capacidade de regeneração "in vitro".

A herança da capacidade de regeneração, avaliada através da indução de calos embriogênicos a partir de embriões imaturos, foi estudada em quatro conjuntos familiares envolvendo linhagens de milho com e sem capacidade de regeneração (Tabela 2). Os resultados estão apresentados nas Tabelas 5-13. Para os testes de qui-quadrado, as frequências esperadas foram calculadas de acordo com o modelo hipotético apresentado nas Tabelas 14-16. Como pode ser observado, foram obtidos resultados contrastantes entre o conjunto familiar envolvendo as linhagens Cat 100-1 e Tux 100-8 e os conjuntos familiares envolvendo as linhagens Cat 100-8, Tux 100-5, Tux 100-12, e Tux 100-1. No primeiro caso (Tabela 5), a segregação para a indução de calos embriogênicos foi bastante próxima do modelo de segregação monogênica com dominância. A característica de formação de calos embriogênicos apresentou-se como recessiva. Entretanto, nesse conjunto ocorreram alguns casos com desvios significativos entre as frequências esperadas e observadas para calos embriogênicos e calos não embriogênicos (Tabelas 5 e 9). Esses casos ocorreram principalmente nas gerações F1 e F2 (Tabela 10), quando parece ter ocorrido um pouco de efeito materno ou talvez citoplasmáti-

co, no sentido de aumentar a frequência de calos embriogênicos em torno de 10%, quando a linhagem Cat 100-1 foi utilizada como fêmea. Este efeito não foi observado nos retrocruzamentos. A linhagem Cat 100-1 produziu 89% de calos embriogênicos em uma amostra de 280 embriões imaturos utilizados como explantes, enquanto que nenhum calo embriogênico foi produzido pela linhagem Tux 100-8. Com exceção da linhagem Tux 100-8, todos os genótipos desta família, para os quais esperava-se zero de calos embriogênicos, tiveram uma baixa frequência de indução desses calos, que variou entre 1-10% na maioria dos casos.

Nos outros conjuntos familiares estudados, que têm em comum a participação da linhagem Cat 100-8 (Tabelas 6-8), a característica indução de calos embriogênicos a partir de embriões imaturos, mostrou-se dominante. Nestas famílias, os resultados indicaram envolvimento de dois pares de genes com interação entre os dois locos, localizados em cromossomos distintos ou no mesmo cromossomo em regiões distantes, como ficou bastante evidente nos resultados de segregação 1:3 (calos embriogênicos:calos não-embriogênicos) obtidos para a maioria dos retrocruzamentos com a linhagem Cat 100-8. A frequência de indução de calos embriogênicos foi de 91% para a linhagem Cat 100-8 e 0-2% para as linhagens Tux 100-5, Tux 100-12 e Tux 100-1. Para todas as famílias, a indução de calos embriogênicos na geração F1 e retrocruzamentos para a linhagem Cat 100-8 variou entre 76% e 90%, e a segregação em F2 variou entre 9:7 e 3:1. Nos retrocruzamentos para as linhagens que não têm capacidade de regeneração a frequência de indução de calos embriogênicos ficou entre

Tabelas 5-8. Herança da capacidade de indução de calos embrionários a partir de embriões imaturos em quatro conjuntos familiares envolvendo linhagens homozigóticas de milho com e sem capacidade de regeneração. Foram utilizados meios de cultura N6 suplementados com 2,4-D (7,5 uM) e sacarose (3% e 6%). Os calos foram avaliados quanto à capacidade de produção de embriões somáticos pelo menos duas vezes no intervalo de 10-30 dias após a inoculação. Foi aplicado o teste de qui-quadrado para modelos com um e dois locos, de acordo com o proposto nas Tabelas 14-16.

E. Calos Embrionários. **NE.** Calos Não-Embrionários. **m1.** Meio N6 + 2,4-D (7,5 uM) + sacarose (3%). **m2.** Meio N6 + 2,4-D (7,5 uM) + sacarose (6%). **o.** Observado. **e.** Esperado.

TABELA 5. Conjunto familiar envolvendo as linhagens Cat 100-1 e Tux 100-8.

Genótipo	Meio de Cultura	Embrões Imaturos Nº	Calos Embrionários %	Proporção Esperada * E : NE	Calos		X ²
					Embrionários (e)	Não Embrionários (e)	
Cat 100-1	m1	280	89	1 : 0	248	(280)	32 (0)
Tux 100-8	m2	280	89	1 : 0	250	(280)	30 (0)
	m1	280	0	0 : 1	0	(0)	280 (280)
	m2	280	0	0 : 1	0	(0)	280 (280)
Cat 100-1 x Tux 100-8	m1	320	13	1 : 0	43	(0)	277 (320)
	m2	320	20	1 : 0	65	(0)	255 (320)
Tux 100-8 x Cat 100-1	m1	320	12	1 : 0	37	(0)	283 (320)
	m2	320	10	1 : 0	33	(0)	287 (320)
(Cat 100-1 x Tux 100-8)A	m1	400	34	↓ 1 : 3	137	(100)	263 (400)
	m2	400	38	↓ 1 : 3	151	(100)	249 (400)
(Tux 100-8 x Cat 100-1)A	m1	300	22	↓ 1 : 3	67	(75)	233 (300)
	m2	300	27	↓ 1 : 3	80	(75)	220 (300)
(Cat 100-1 x Tux 100-8) x Cat 100-1	m1	320	55	↓ 1 : 1	175	(160)	145 (320)
	m2	320	54	↓ 1 : 1	174	(160)	146 (320)
Cat 100-1 x (Cat 100-1 x Tux 100-8)	m1	320	57	↓ 1 : 1	178	(160)	142 (320)
	m2	300	51	↓ 1 : 1	164	(150)	136 (300)
(Tux 100-8 x Cat 100-1) x Cat 100-1	m1	280	46	↓ 1 : 1	130	(140)	150 (280)
	m2	280	53	↓ 1 : 1	148	(140)	132 (280)
Cat 100-1 x (Tux 100-8 x Cat 100-1)	m1	280	46	↓ 1 : 1	129	(140)	151 (280)
	m2	280	51	↓ 1 : 1	143	(140)	137 (280)
(Cat 100-1 x Tux 100-8) x Tux 100-8	m1	280	07	0 : 1	20	(0)	260 (280)
	m2	280	15	0 : 1	41	(0)	239 (280)
Tux 100-8 (Cat 100-1 x Tux 100-8)	m1	280	04	0 : 1	12	(0)	268 (280)
	m2	280	06	0 : 1	18	(0)	262 (280)
(Tux 100-8 x Cat 100-1) x Tux 100-8	m1	280	01	0 : 1	03	(0)	277 (280)
	m2	280	03	0 : 1	07	(0)	273 (280)
Tux 100-8 x (Tux 100-8 x Cat 100-1)	m1	280	04	0 : 1	11	(0)	269 (280)
	m2	280	07	0 : 1	20	(0)	260 (280)

* De acordo com o modelo proposto nas Tabelas 14 e 15.

NS Não significativo, ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste qui-quadrado.

* Significativo, ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste qui-quadrado.

** Significativo, ao nível de 1% de probabilidade, pelo teste qui-quadrado.

TABELA 6 . Conjunto familiar envolvendo as linhagens Cat 100-8 e Tux 100-5.

Genótipo	Meio de Cultura	Embriões Amadurecidos Nº	Calos Embrionários %	Proporção Esperada* E : NE	Calos		X ²
					Embrionários 0 (e)	Não-Embrionários 0 (e)	
Cat 100-8	m1	320	91	1 : 0	292 (320)	28 (0)	
Tux 100-5	m2	320	91	1 : 0	290 (320)	30 (0)	
Cat 100-8 x Tux 100-5	m1	320	02	0 : 1	06 (0)	314 (320)	
	m2	320	02	0 : 1	05 (0)	315 (320)	
Tux 100-5 x Cat 100-8	m1	320	83	1 : 0	265 (320)	55 (0)	
	m2	300	87	1 : 0	257 (300)	43 (0)	
(Cat 100-8 x Tux 100-5)A	m1	300	79	1 : 0	238 (300)	60 (0)	
	m2	300	84	1 : 0	251 (300)	49 (0)	
(Tux 100-5 x Cat 100-8)A	m1	400	74	3 : 1	296 (300)	104 (100)	0,21 NS
	m2	400	77	3 : 1	308 (300)	92 (100)	0,85 NS
(Cat 100-8 x Tux 100-5) x Cat 100-8	m1	400	70	11 : 5	279 (275)	121 (125)	0,18 NS
	m2	400	79	3 : 1	316 (300)	84 (100)	3,41 NS
Cat 100-8 x (Cat 100-8 x Tux 100-5)	m1	260	82	1 : 0	212 (260)	48 (0)	
	m2	260	84	1 : 0	218 (260)	42 (0)	
(Tux 100-5 x Cat 100-8) x Cat 100-8	m1	260	83	1 : 0	215 (260)	45 (0)	
	m2	260	76	1 : 0	197 (260)	63 (0)	
Cat 100-8 x (Tux 100-5 x Cat 100-8)	m1	240	82	1 : 0	197 (240)	43 (0)	
	m2	240	86	1 : 0	207 (240)	33 (0)	
(Cat 100-8 x Tux 100-5) x Tux 100-5	m1	240	89	1 : 0	214 (240)	46 (0)	
	m2	240	90	1 : 0	217 (240)	43 (0)	
Tux 100-5 x (Cat 100-8 x Tux 100-5)	m1	280	29	1 : 3	81 (70)	199 (210)	2,30 NS
	m2	300	29	1 : 3	87 (75)	213 (225)	2,56 NS
(Tux 100-5 x Cat 100-8) x Tux 100-5	m1	240	28	1 : 3	67 (60)	173 (180)	1,02 NS
	m2	240	26	1 : 3	63 (60)	177 (180)	0,20 NS
Tux 100-5 x (Tux 100-5 x Cat 100-8)	m1	240	33	1 : 2	78 (80)	162 (160)	0,07 NS
	m2	240	33	1 : 2	80 (80)	160 (160)	0 NS
Tux 100-5 x (Tux 100-5 x Cat 100-8)	m1	280	26	1 : 3	74 (70)	206 (210)	0,30 NS
	m2	280	31	1 : 2	86 (93)	194 (187)	0,79 NS

☆ De acordo com o modelo proposto nas Tabelas 14 e 16.

NS Não significativo, ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste qui-quadrado.

TABELA 7 . Conjunto familiar envolvendo as linhagens Cat 100-8 e Tux 100-12.

Genótipo	Meio de Cultura	Embriões Inaturos Nº	Calos Embriogênicos %	Proporção Esperada ☆ E : NE	Calos		χ ²
					Embriogênicos o (e)	Não-Embriogênicos o (e)	
Cat 100-8	m1	320	91	1 : 0	292 (320)	28 (0)	
Tux 100-12	m2	320	91	1 : 0	290 (320)	30 (0)	
Cat 100-8 x Tux 100-12	m1	320	02	0 : 1	05 (0)	315 (320)	
	m2	320	02	0 : 1	06 (0)	314 (320)	
Tux 100-12 x Cat 100-8	m1	280	79	↓ 1 : 0	220 (280)	60 (0)	
	m2	280	80	↓ 1 : 0	224 (280)	56 (0)	
(Cat 100-8 x Tux 100-12)A	m1	280	76	↓ 1 : 0	212 (280)	68 (0)	
	m2	280	75	↓ 1 : 0	211 (280)	69 (0)	
(Tux 100-12 x Cat 100-8)A	m1	320	72	3 : 1	229 (320)	91 (100)	1,12 NS
	m2	320	65	11 : 5	207 (320)	113 (80)	2,01 NS
(Cat 100-8 x Tux 100-12) x Cat 100-8	m1	320	69	5 : 3	214 (320)	106 (100)	0,65 NS
	m2	320	68	11 : 5	219 (320)	101 (120)	2,46 NS
Cat 100-8 x (Cat 100-8 x Tux 100-12)	m1	280	74	↓ 1 : 0	207 (280)	73 (0)	0,52 NS
	m2	280	72	↓ 1 : 0	202 (280)	78 (0)	2,61 NS
(Tux 100-12 x Cat 100-8) x Cat 100-8	m1	280	72	↓ 1 : 0	202 (280)	78 (0)	0,014 NS
	m2	280	80	↓ 1 : 0	223 (280)	57 (0)	
Cat 100-8 x (Tux 100-12 x Cat 100-8)	m1	280	81	↓ 1 : 0	228 (280)	52 (0)	
	m2	280	76	↓ 1 : 0	213 (280)	67 (0)	
(Cat 100-8 x Tux 100-12) x Tux 100-12	m1	280	80	↓ 1 : 0	223 (280)	57 (0)	
	m2	280	81	1 : 0	227 (280)	53 (0)	
Tux 100-12 (Cat 100-8 x Tux 100-12)	m1	280	19	1 : 3	54 (70)	226 (210)	4,87 *
	m2	280	20	1 : 3	56 (70)	224 (210)	3,73 NS
(Tux 100-12 x Cat 100-8) x Tux 100-12	m1	280	20	1 : 3	56 (70)	224 (210)	3,73 NS
	m2	280	19	1 : 3	52 (70)	228 (210)	6,16 *
Tux 100-12 x (Tux 100-12 x Cat 100-8)	m1	280	24	1 : 3	67 (70)	213 (210)	0,16 NS
	m2	280	20	1 : 3	55 (70)	225 (210)	4,27 *
(Cat 100-8 x Tux 100-12) x Cat 100-8	m1	280	30	1 : 3	85 (70)	195 (210)	4,27 *
	m2	280	28	1 : 3	79 (70)	201 (210)	1,54 NS

☆ De acordo com o modelo proposto nas Tabelas 14 e 16.

NS Não significativo, ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste qui-quadrado.

* Significativo, ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste qui-quadrado.

TABELA 8. Conjunto familiar envolvendo as linhagens Cat 100-8 e Tux 100-1.

Genótipo	Meio de Cultura	Embrões Imaturos Nº	Calos Embrionários %	Proporção Esperada * E : NE	Calos		X ²
					Embrionários O (e)	Não Embrionários O (e)	
Cat 100-8	m1	320	91	1 : 0	292 (320)	28 (0)	
	m2	320	91	1 : 0	290 (320)	30 (0)	
Tux 100-1	m1	320	02	0 : 1	06 (0)	314 (320)	
	m2	320	00	0 : 1	00 (0)	320 (320)	
Tux 100-1 x Cat 100-8	m1	320	81	1 : 0	258 (320)	62 (0)	
	m2	320	84	1 : 0	268 (320)	52 (0)	
(Tux 100-1 x Cat 100-8)A	m1	400	53	9 : 7	211 (225)	189 (175)	2,28 NS
	m2	400	64	10 : 6	256 (250)	144 (175)	0,30 NS
(Tux 100-1 x Cat 100-8) x Cat 100-8	m1	300	77	1 : 0	232 (300)	68 (0)	
	m2	300	81	1 : 0	244 (300)	56 (0)	
(Tux 100-1 x Cat 100-8) x Tux 100-1	m1	300	20	1 : 3	59 (75)	241 (225)	4,54 *
	m2	300	20	1 : 3	60 (75)	240 (225)	4,0 *

* De acordo com o modelo proposto nas Tabelas 14 e 16.

NS Não significativo, ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste qui-quadrado.

* Significativo, ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste qui-quadrado.

Tabelas 9 - 13 Homogeneidade, de acordo com o teste de BRANDT-SNEDECOR, os conjuntos familiares envolvendo as linhagens Cat 100-8, Tux 100-5, Tux 100-12 e Tux 100-1, quanto à capacidade de indução de calos embriogênicos a partir de embriões imaturos em meios de cultura contendo sacarose 3% e 6% e cruzamentos recíprocos. Comparações dentro dos grupos são apresentadas na diagonal. L1. Linhagem com capacidade de regeneração (Cat 100-8). L2. Linhagem sem capacidade de regeneração. F1. Geração resultante do cruzamento entre L1 e L2. F2. Geração resultante da autofecundação de F1. BC1. Retrocruzamento com o parental L1. BC2. Retrocruzamento com o parental L2.

Tabela 9. Homogeneidade, de acordo com o teste de BRANDT-SNEDECOR, dentro e entre gerações do conjunto familiar Cat 100-1 (L1) x Tux 100-8 (L2), quanto à capacidade de indução de calos embrionários a partir de embriões imaturos em meios de cultura contendo sacarose (3% e 6%) e cruzamentos recíprocos. Comparações dentro dos grupos são apresentadas na diagonal.

```

=====
L1          L2          F1          F2          BC1          BC2
=====
BC2  1485,06**  7,48**  25,17**  262,59**  1186,71**  16,31*
BC1  294,93**  592,58**  351,24**  188,16**  14,13*
F2   643,74**  185,66**  94,72**  24,33*
F1  1054,14**  36,22**  9,18*
L2  1167,60**  0,00NS
L1   0,034NS
=====

```

```

=====
NS Não significativo, ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste qui-quadrado.
* Significativo, ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste qui-quadrado.
** Significativo, ao nível de 1% de probabilidade, pelo teste qui-quadrado.
F1 Geração resultante do cruzamento entre L1 e L2.
F2 Geração resultante da autofecundação de F1.
BC1 Retrocruzamento com o parental L1.
BC2 Retrocruzamento com o parental L2.
=====

```

Tabela 10. Homogeneidade, de acordo com o teste de BRANDT-SNEDECOR, dentro e entre cruzamentos recíprocos do conjunto familiar Cat 100-1 x Tux 100-8, quanto à capacidade de indução de calos embriogênicos a partir de embriões imaturos em meios de cultura contendo sacarose (3% e 6%).

Geração	GL	2
F1	1	3,63NS
F1'	1	0,12NS
F1 vs F1'	1	9,42**
F2	1	1,14NS
F2'	1	1,31NS
F2 vs F2'	1	4,53*
BC1	3	5,18NS
BC1'	3	6,58NS
BC1 vs BC1'	1	0,01NS
BC2	3	56,65**
BC2'	3	3,82NS
BC2 vs BC2'	1	3,27NS

NS Não significativo, ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste qui-quadrado.

* Significativo, ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste qui-quadrado

** Significativo, ao nível de 1% de probabilidade, pelo teste qui-quadrado

F1, F2, BC1, BC2 - Gerações em que a linhagem Cat 100-1 foi utilizada como fêmea.

F1', F2', BC1', e BC2' - Gerações em que a linhagem Tux 100-8 foi utilizada como fêmea.

Tabela 11. Conjunto familiar, com cruzamentos recíprocos, envolvendo as linhagens Cat 100-8 (L1) e Tux 100-5 (L2).

	L1	L2	F1	F2	BC1	BC2
BC2	186,15**	155,46**	925,88**	440,39**	1174,23**	4,98NS
BC1	16,64**	16,64**	0,44NS	72,65**	6,56NS	
F2	102,89**	729,89**	16,37**	131,17**		
F1	10,90**	1153,62**	2,06NS			
L2	1058,69**	0,01NS				
L1	0,03NS					

NS Não significativo, ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste qui-quadrado
 * Significativo, ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste qui-quadrado.
 ** Significativo, ao nível de 1% de probabilidade, pelo teste qui-quadrado.

Tabela 12. Conjunto familiar, com cruzamentos recíprocos, envolvendo as linhagens Cat 100-8 (L1) x Tux 100-12 (L2).

	L1	L2	F1	F2	BC1	BC2
BC2	945,43**	87,17**	912,98**	680,54**	1349,46**	16,22*
BC1	39,16**	1144,25**	0,049NS	29,65**	13,44NS	
F2	91,90**	757,60**	21,95**	3,25NS		
F1	30,22**	946,22**	1,72NS			
L2	1032,93**	0,01NS				
L1	0,03NS					

NS Não significativo, ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste qui-quadrado.

* Significativo, ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste qui-quadrado.

** Significativo, ao nível de 1% de probabilidade, pelo teste qui-quadrado.

Tabela 13. Conjunto familiar, envolvendo as linhagens Cat 100-B (L1) x Tux100-1 (L2).

```

=====
L1          L2          F1          F2          BC1          BC2
=====
BC2  631,94**  44,18**  487,66**  206,28**  430,16**  0,007NS
BC1   16,89**  770,86**  1,02NS   61,00**   0,97NS
F2   152,69**  457,09**  81,66**  10,25**
F1    9,92**  855,61**  0,63NS
L2  1049,82**  0,23NS
L1    0,02NS
=====

```

NS Não significativo, ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste qui-quadrado.

* Significativo, ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste qui-quadrado.

** Significativo, ao nível de 1% de probabilidade, pelo teste qui-quadrado.

Tabelas 14-16. Modelos hipotéticos para explicar os resultados obtidos para a herança da capacidade de indução de calos embriogênicos a partir de embriões imaturos em quatro conjuntos familiares envolvendo linhagens homocigóticas de milho com e sem capacidade de regeneração "in vitro".

E Embriogênicos

NE Não-Embriogênicos

P1 Parental 1

P2 Parental 2

A Autofecundação

BC Retrocruzamento

Se2 e se2 Alelos com ausência de dominância para capacidade de indução de calos com produção de embriões somáticos.

Se3 e se3 Alelos dominante e recessivo para inibição da capacidade de indução de calos com produção de embriões somáticos. Inibe a ação dos genes Se1 e se2

↑ Resposta com pequena variação de frequência para indução de calos embriogênicos

↓ Resposta para indução de calos embriogênicos com frequência variável entre zero e o valor esperado.

TABELA 14. Modelo geral para explicar os resultados obtidos para a capacidade de regeneração em quatro conjuntos familiares estudados.

Genótipo				Fenótipo
Se1	Se1	se2	se2	E
Se1	se1	se2	se2	E
Se1	Se1	Se2	se2	↓ E
Se1	se1	Se2	se2	↓ E
Se1	Se1	Se2	Se2	↓ E
Se1	se1	Se2	Se2	↓ E
se1	se1	Se2	Se2	NE
se1	se1	Se2	se2	NE
se1	se1	se2	se2	NE

Se3	Se3			NE
Se3	se3			NE
se3	se3			E

TABELA 15. Conjunto familiar envolvendo as linhagens Cat 100-1 e Tux 100-8.

Geração	Genótipo	Frequência de calos	
		Embriog.	Não Embriog.
P1 Cat 100-1	Se1 Se1 se2 se2 se3 se3	1	0
P2 Tux 100-8	Se1 Se1 Se2 Se2 Se3 Se3	0	1
F1 (P1 x P2; P2 x P1)	Se1 Se1 Se2 se2 Se3 se3	0	1
F2 (F1 A)	Se1 Se1 ___ ___ Se3 Se3	0	4/16
	Se1 Se1 ___ ___ Se3 se3	0	8/16
	Se1 Se1 Se2 Se2 se3 se3	↓ 1/16	0
	Se1 Se1 Se2 se2 se3 se3	↓ 2/16	0
	Se1 Se1 se2 se2 se3 se3	↑ 1/16	0
BC (P1)	Se1 Se1 ___ ___ Se3 se3	0	1/2
	Se1 Se1 Se2 Se2 se3 se3	↓ 1/4	0
	Se1 Se1 Se2 se2 se3 se3	↑ 1/4	0
BC (P2)	Se1 Se1 ___ ___ Se3 Se3	0	1/2
	Se1 Se1 ___ ___ Se3 se3	0	1/2

TABELA 16. Conjuntos familiares envolvendo as linhagens Cat 100-8, Tux 100-1, Tux 100-5 e Tux 100-12. Essas linhagens foram consideradas como portadoras de genótipo duplo recessivo se3 se3 para o loco inibidor.

Geração	Genótipo	Frequência de calos	
		Embríog.	Não Embríog.
P1 Cat 100-8	Se1 Se1 se2 se2	1	0
P2 Tux 100-11 ou Tux 100-5 ou Tux 100-12	se1 se1 Se2 Se2	0	1
F1 (P1 x P2)	Se1 se1 Se2 se2	↓ 1	0
F2 (F1A)	Se1 Se1 Se2 Se2	↓ 1/16	0
	Se1 Se1 se2 se2	↓ 2/16	0
	Se1 Se1 Se2 se2	1/16	0
	Se1 se1 Se2 Se2	↓ 2/16	0
	Se1 se1 Se2 se2	↓ 4/16	0
	Se1 se1 se2 se2	2/16	0
	se1 se1 Se2 Se2	0	1/16
	se1 se1 Se2 se2	0	2/16
BC (P1)	Se1 Se1 Se2 se2	↓ 1/4	0
	Se1 Se1 se2 se2	1/4	0
	Se1 se1 Se2 se2	↓ 1/4	0
	Se1 se1 se2 se2	1/4	0
BC (P2)	Se1 se1 Se2 Se2	↓ 1/4	0
	Se1 se1 Se2 se2	↓ 1/4	0
	se1 se1 Se2 Se2	0	1/4
	se1 se1 Se2 se2	0	1/4

26% e 33% (F1 x Tux 100-5), 19% e 30% (F1 x Tux 100-12) e 20% (F1 x Tux 100-1). Embora tenha ocorrido uma certa variação para os resultados obtidos para estes conjuntos familiares, esta variação ocorreu dentro de limites que se repetiram dentro de cada geração, como mostrado pelo teste de homogeneidade (Tabelas 11-13). Entre os diferentes conjuntos familiares a frequência de indução de calos embriogênicos ficou dentro de limites relativamente próximos dentro de cada geração (Tabelas 6-8).

Considerando-se os resultados obtidos para os quatro conjuntos familiares, foi formulado um modelo hipotético na tentativa de explicar a herança da capacidade de indução de calos embriogênicos a partir de embriões imaturos de milho (Tabelas 14-16). Este modelo será discutido adiante.

4.4. Variação somacional em linhagens isogênicas de milho.

4.4.1. Somaclones

De um total de 1304 plantas regeneradas, 320 plantas sobreviveram à fase de aclimação logo após a transferência para vaso. Umidade, temperatura e intensidade luminosa, foram fatores de extrema importância durante esta fase. As condições que permitiram a melhor taxa de sobrevivência dos somaclones, em torno de 80-95%, foram casa de vegetação com nebulizadores para manter umidade alta, temperatura variando entre 18

C e 25 C e a utilização de telas escuras para reduzir a intensidade luminosa em 15-20% em dias ensolarados, durante 9-10 dias após transferência para vaso. Estes resultados são contrastantes com os observados em condições de aclimação à temperatura ambiente e umidade relativamente baixa, quando a taxa de sobrevivência ficou em torno de 5-10%. Após 15-20 dias as plantas foram transferidas para o campo ou então para vasos de 5 litros e mantidas em casa de vegetação.

Dos 300 somaclones que sobreviveram à fase de aclimação, foi possível obter-se progênies de 203, sendo 152 da linhagem Cat 100-1, 28 da linhagem Cat 100-8 e 23 da linhagem Ast-1. Essas progênies foram resultantes da autofecundação das plantas regeneradas ou, em alguns casos, de cruzamento com a linhagem original. Dos somaclones R0 restantes, cerca de 60 foram perdidos após 20-30 dias de transferência para o campo devido a condições de baixa temperatura durante o inverno, cerca de 40 não produziram sementes porque a espiga apodreceu e as demais morreram antes da fase de florescimento. As progênies R1 e R2 dos 203 somaclones foram desenvolvidas e avaliadas no campo durante os verões de 1985/1986 e 1986/1987.

4.4.2. Variação somaclonal

A frequência de variação fenotípica observada em plantas regeneradas (R0) desenvolvidas no campo ou em casa de vegetação foi em torno de 70%. De um modo geral essas

plantas regeneradas apresentaram menor vigor que as plantas produzidas a partir de sementes da linhagem original, o que dificultou a obtenção de sementes. Alterações fenotípicas bastante frequentes foram desenvolvimento de estilo-estigmas na panícula, produção de espiga terminal (Figura 64), redução de ramificações da panícula, macho esterilidade, redução do comprimento de internódios no terço terminal da planta (Figura 65), folhas estriadas e um somaclone com folhas erectas.

Muitas variações fenotípicas observadas nos somaclones R0 não foram transmitidas à descendência sugerindo que eram resultantes de efeito ambiental. Por outro lado, segregação para várias características, inclusive muitas que não haviam se manifestado nas plantas regeneradas R0, foram observadas nas gerações R1 e R2. Na Tabela 17, estão descritos os variantes genéticos observados nas várias progênes de somaclones. A variabilidade genética observada incluiu características monogênicas, poligênicas e citoplasmáticas, tais como, mutante braquítico (Figura 66 e 67), folhas erectas (Figuras 70-72), folhas enrugadas (Figura 68), esterilidade masculina (Figuras 69 e 75), produção de pólen sem amido (Figura 76), folhas estriadas (Figura 77), endosperma amarelo-limão associado à produção de plantas albinas (Figuras 78 e 79), endosperma amarelo-limão associado à produção de plantas verdes que secam algumas folhas na época do florescimento (Figuras 80-82), endosperma mais claro e mais opaco que o original (Figura 83), aumento de heterose (Figura 73) e alterações para polipeptídeos de zeína (Figuras 84-92).

4.4.2.1. Mutantes morfológicos.

Todas as progênies R1 e várias progênies R2 de somaclones desenvolvidas no campo foram avaliadas quanto à ocorrência de mutantes morfológicos. Autofecundação, cruzamentos entre plantas-irmãs de progênie e do mutante com a linhagem original foram realizados para as progênies R1 que apresentaram variabilidade para morfologia da planta. Como mostrado na Tabela 17, os mutantes morfológicos observados foram:

Braquítico - Na progênie R1 resultante da autofecundação do somaclone CT-129(Cat 100-1), com fenótipo normal, foram obtidas 36 plantas normais e 13 plantas braquíticas (Figura 66). Ocorreu, portanto, segregação 3:1. Autofecundação das plantas braquíticas produziu 100% de plantas (R2) braquíticas (Figura 67). Cruzamentos entre plantas normais irmãs e braquíticas produziram progênies (R2) 100% normais e progênies segregantes, normal e braquítico (1:1). Cruzamentos entre os somaclones braquíticos e a linhagem original produziram 100% de plantas (R2) normais para esta característica.

Folhas erectas - O somaclone R0 CT-830(Cat 100-8) apresentou folhas erectas. Esta alteração para posição erecta das folhas (Figuras 70-72) deveu-se a uma redução bastante acentuada do tamanho da lígula, como mostrado nas Figuras 70 e 72. Na progênie resultante da autofecundação deste somaclone

Figura 64. Somaclone (R0) da linhagem Cat 100-1 apresentando formação de espiga terminal, uma característica bastante comum em plantas regeneradas a partir de cultura de tecidos.

Figura 65. Somaclone R0 da linhagem Cat 100-1 apresentando redução de internódios no terço terminal da planta.

Figura 66. Mutante braquítico na progênie R1 do somaclone CT-129(Cat 100-1).

Figura 67. Linha de plantas braquíticas R2 resultante da autofecundação de um mutante braquítico na geração R1. à esquerda pode-se notar a presença de uma linha de plantas R2 resultantes da autofecundação de planta normal do mesmo somaclone.

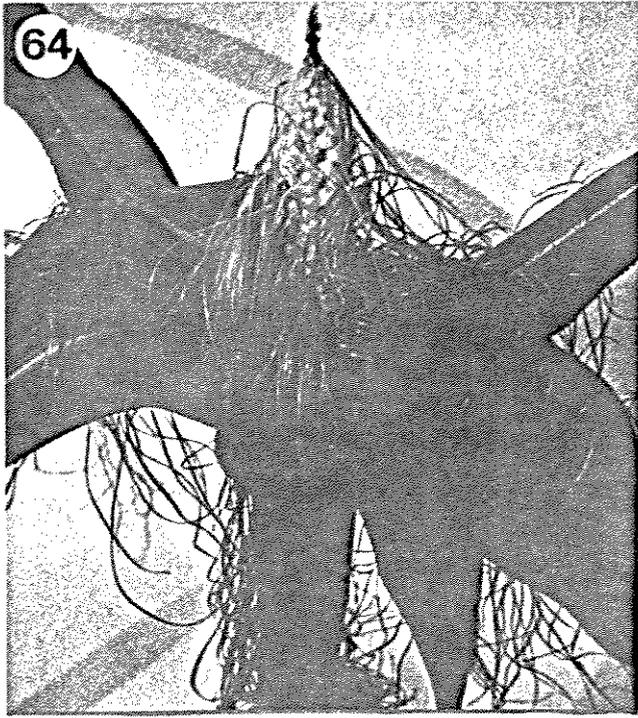
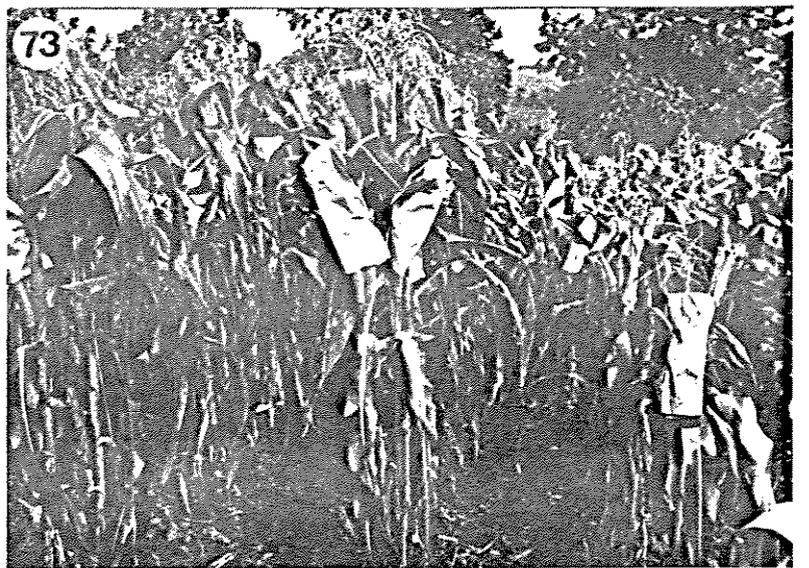
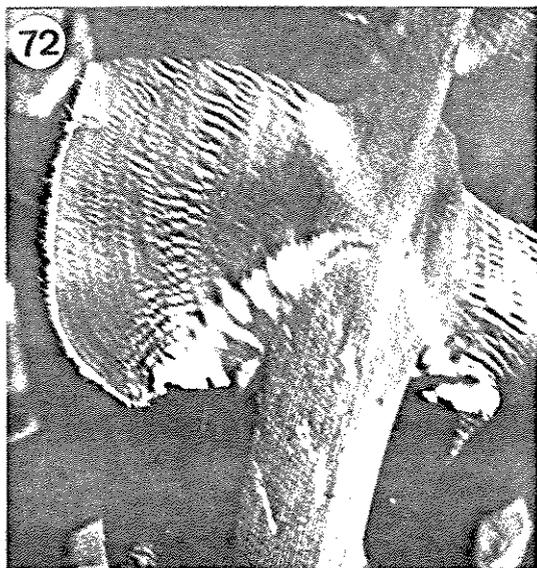
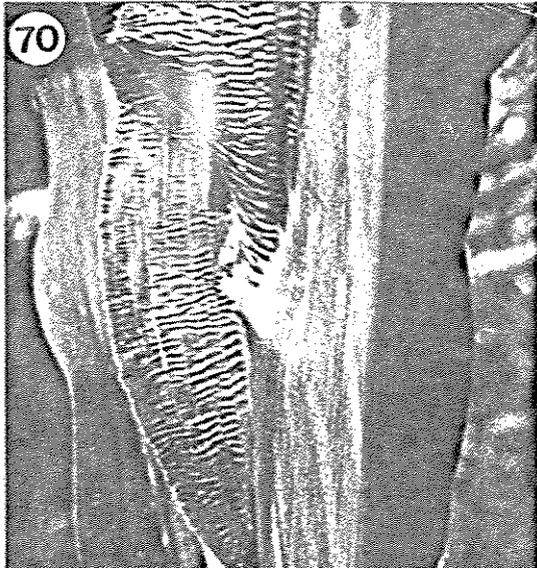


Figura 68. Plantas com folhas enrugadas da progênie R1 do Somaclone CT338(Ast-1).

Figura 69. Panícula de uma planta fértil (à esquerda) e de uma planta macho-estéril (à direita) da progênie R1 do somaclone CT-565(Cat 100-1).

Figura 70-72. Progênie R1 do somaclone CT-830(Cat 100-8). Figura 70. Planta erecta. Notar redução do tamanho da lígula. Figura 71. Planta normal, apresentando lígula normal. Figura 72. Plantas erectas e uma planta normal (seta).

Figura 73. Linhagem Cat 100-1 original na linha à direita. Híbridos F1 resultantes do cruzamento entre a linhagem Cat 100-1 original e duas plantas da progênie R1 do somaclone CT-127(Cat 100-1) nas linhas do centro e à esquerda. Notar a heterose dos híbridos F1, comparados com a linhagem original.



ocorreram plantas erectas e normais, numa proporção 43:7, respectivamente. Foram obtidas sementes R2 destas plantas, resultantes de autofecundação, cruzamentos entre irmãos germanos e cruzamentos com a linhagem original e com outras linhagens.

Folhas enrugadas - O somaclone CT338(Ast-1) apresentou fenótipo normal para características das folhas. A progênie resultante da autofecundação desse somaclone apresentou segregação 3:1 para enrugamento das folhas. Este enrugamento foi mais acentuado nas folhas do terço superior da planta (Figura 68). Avaliações de progenies R2 repetiram o padrão de segregação monofatorial 3:1, porém, observou-se que algumas plantas tinham folhas mais enrugadas que outras. Com o objetivo de se estudar posteriormente a determinação genética desta característica, foram realizados cruzamentos com a linhagem original, cruzamentos entre irmãos germanos e autofecundação das plantas com folhas enrugadas.

4.4.2.2. Esterilidade masculina.

Mutantes macho-estéreis foram avaliados quanto à produção de pólen observando-se as anteras com auxílio de um microscópio (magnificação 8-15 x) ou um microscópio óptico (magnificação 20-100 x). Foram observados três diferentes mutantes:

Esterilidade masculina citoplasmática - O somaclone CT-550(Cat 100-1) apresentou panícula morfologicamente normal, porém com anteras vazias. Este somaclone foi cruzado com a linhagem Cat 100-1 original (Figura 74). Foram obtidas 91 plantas R1, que foram desenvolvidas em condições de campo. Todas estas plantas apresentaram esterilidade masculina caracterizada pela ausência de pólen nas anteras (Figura 75). Não ocorreu restauração ou produção de setores férteis em nenhuma planta. Estes somaclones foram cruzados com a linhagem original e também com linhagens testadoras para restauração de alguns tipos de esterilidade masculina citoplasmática dos tipos C e T, como descrito na Tabela 17. Como resultado, foram obtidas 100% de plantas macho-estéreis nos cruzamentos com a linhagem Cat 100-1 e 100% de plantas férteis nos cruzamentos com todas as linhagens testadoras, que restauram citoplasma C e/ou T.

Somaclone CT-565(Cat 100-1) - A planta regenerada CT-565(Cat 100-1) apresentou desenvolvimento de estilo-estigma na panícula e produção tardia de pólen e em pequena quantidade. Este somaclone foi então cruzado com a linhagem Cat 100-1 original. Um total de 37 plantas foram desenvolvidas no campo, das quais 24 eram machos-estéreis e 14 eram férteis apresentando, portanto, segregação 1,7:1. A panícula das plantas macho-estéreis eram morfologicamente normais, porém as anteras não produziram grãos de pólen. Estas plantas foram cruzadas com plantas-irmãs férteis, com a linhagem original e com três linhagens testadoras para esterilidade masculina citoplasmática.

As plantas férteis foram autofecundadas e cruzadas com a linhagem original. Os resultados mostrados na Tabela 17 apresentam diferentes padrões de segregação para macho esterilidade nas diferentes progênes e uma das progênes 100% macho-estéril. O cruzamento de plantas macho-estéreis com os testadores L 16-b-8 e L 903 produziu progênes 100% férteis. Entretanto, o cruzamento com o testador L 1038 produziu 38 plantas férteis e 5 plantas macho-estéreis (7,6:1).

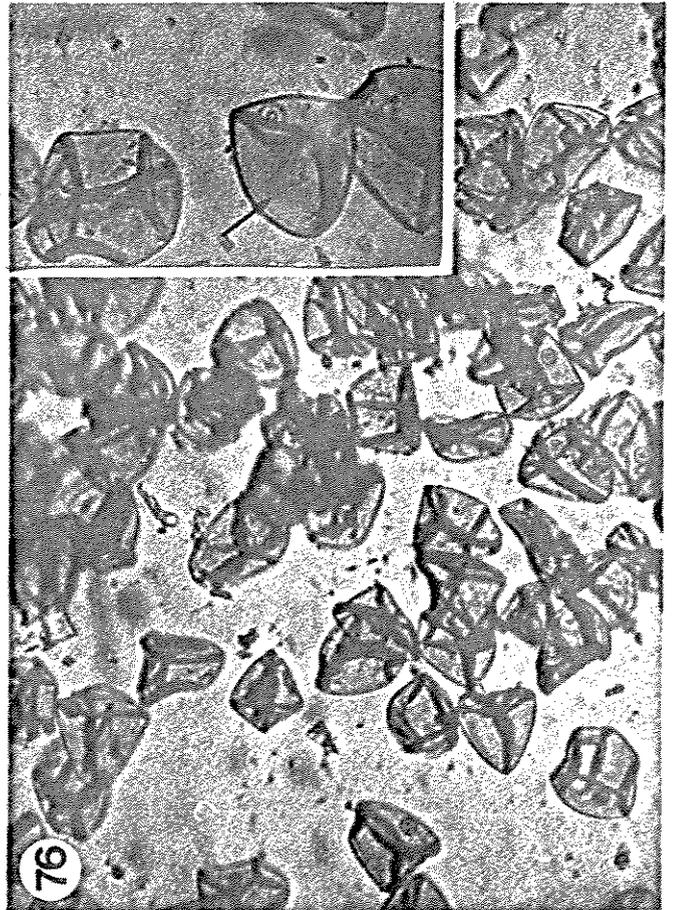
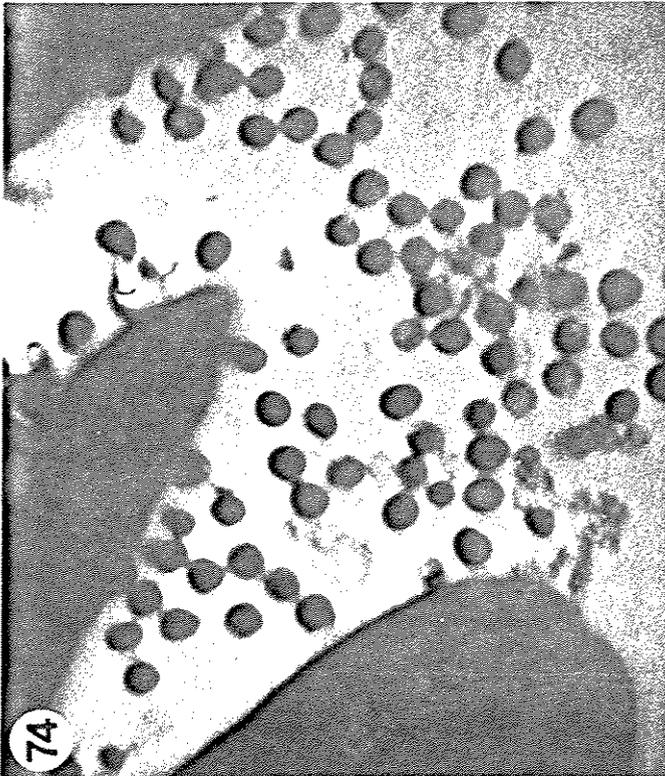
Somaclone CT-127(Cat 100-1) - O somaclone CT-127(Cat 100-1) produziu pólen e foi autofecundado. A progênie resultante dessa autofecundação consistiu de 26 plantas com produção normal de pólen e 7 plantas com produção de pólen sem amido. Estas últimas plantas tinham panícula aparentemente normal, porém, as espiguetas não se abriram para que as anteras fossem expostas. Os grãos de pólen, por sua vez, eram enrugados e quando foram corados com lugol não adquiriram a coloração roxa a que caracteriza a presença de amido (Figura 76). Esses grãos de pólen permaneceram dentro da antera e, aparentemente, não completaram o seu desenvolvimento. Conseqüentemente essas plantas eram machos-estéreis. Progênes resultantes de cruzamentos entre somaclones R1 CT-127 macho-estéreis com plantas férteis da linhagem Cat 100-1 produziram 100% dos grãos de pólen normal.

Figura 74. Fotomicrografia de anteras e grãos de pólen da linhagem Cat 100-1 corados com solução de iodina 0,05 N. Notar a presença de numerosos grãos de pólen (seta). 350X.

Figura 75. Fotomicrografia de anteras de plantas macho-estéreis da progênie R1 do somaclone CT-550(Cat 100-1). Notar a ausência de grãos de pólen. 350X.

Figura 76. Fotomicrografia de grãos de pólen de plantas macho-estéreis da progênie R2 do somaclone CT-127(Cat 100-1). Notar a presença de citoplasma e núcleo (seta). 560X.

Figura 77. Fotografia de uma planta estriada da progênie R2 do somaclone CT-621(Ast-1).



4.4.2.3. Mutantes deficientes em clorofila.

Folhas estriadas - O somaclone CT-469(Cat 100-1) e dois somaclones CT-621(Ast-1) e CT-457(Ast-1) apresentaram folhas estriadas. Foi possível obter-se sementes apenas para o somaclone CT-621, que foi autofecundado e sua progênie desenvolvida no campo. Entre 38 plantas da progênie R1, ocorreram apenas 4 plantas com estrias nas folhas. As plantas restantes tinham folhas normais. Como mostrado na Tabela 17, as três plantas R1 estriadas autofecundadas produziram plantas normais e estriadas, enquanto que plantas R1 normais produziram progênies normais e progênies segregantes. Cruzamentos recíprocos entre somaclones R2 com plantas normais da linhagem Ast-1 produziram plantas R3 100% normais. A progênie segregante foi obtida a partir de um cruzamento de somaclone R2 estriado com normal. A figura 77 mostra folhas de uma planta estriada da progênie R2 do somaclone CT-621(Ast-1)

Somoclone CT-45(Cat 100-1) - O somaclone R0 CT-45(Cat100-1) foi autofecundado e produziu progênie R1 100% normal. Da autofecundação de plantas R1 foram obtidas 23 espigas com sementes 100% normais e 5 espigas segregantes para cor da semente (Figura 78). A segregação dentro das espigas seguiu a proporção 3:1 para sementes normais e sementes amarelo-limão, respectivamente. As sementes amarelo-limão produziram plantas albinas (Figura 79).

Plantas albinas desenvolvidas em condições de campo e de baixa intensidade luminosa (aproximadamente 30 lux) apresentaram folhas com a mesma coloração. O conteúdo de clorofila total das folhas dessas plantas albinas foi 0,026 e 0,030 mg/g peso fresco, respectivamente. As plantas normais desenvolvidas em condições de campo e de baixa intensidade luminosa apresentaram conteúdo de clorofila total de 0,910 e 0,226 mg/g peso fresco, respectivamente.

O conteúdo de carotenóides totais das plantas normais desenvolvidas em condições de campo e de baixa intensidade luminosa foi de 56,4 e 14,1 ug/g peso fresco, respectivamente. Não foram detectados carotenóides na leitura espectrofotométrica dos extratos de folhas do mutante albino desenvolvido em ambas condições de crescimento.

4.4.2.4. Mutantes para cor do endosperma.

Somaclone CT-114(Cat 100-1) - O somaclone Ro CT-114(Cat 100-1) foi autofecundado e produziu sementes 100% normais. Da autofecundação de plantas R1 desenvolvidas a partir dessas sementes foram obtidas 28 espigas com sementes R2 100% normais e apenas uma espiga com segregação 3:1 para sementes normais e amarelo-limão, respectivamente (Figura 80). A coloração dessas sementes é bastante semelhante àquela obtida para o mutante amarelo-limão do somaclone CT-114(Cat 100-1) (Figura 78).

As sementes R2 normais de espigas segregantes e não-segregantes, bem como as sementes amarelo-limão produziram plantas verdes. As plantas provenientes de sementes amarelo-limão, no entanto, eram menos vigorosas e, cerca de 5-8 dias antes da exposição da panícula, ocorreu secamento de cerca da metade ou um terço das folhas do terço terminal das plantas (Figura 81). Este fenômeno não foi observado para as plantas provenientes de sementes normais. Os resultados de autofecundação dos mutantes R2, cruzamentos com plantas provenientes das sementes R2 verdes de espigas segregantes e cruzamentos com a linhagem original estão apresentados na Tabela 17 e Figura 82. Como pode ser observado, os resultados seguiram o modelo de segregação monogênica.

Somaclone CT-158(Cat 100-1) - O somaclone R0 CT-158(Cat 100-1) foi autofecundado. Não foi possível determinar se as sementes produzidas eram normais ou não, porque houve problemas com o desenvolvimento e enchimento dos grãos. Isto foi devido ao fato de que este somaclone era pequeno e pouco vigoroso. Plantas R1 eram aparentemente normais e foram autofecundadas. Como resultado, foram produzidas espigas com sementes 100% normais, espigas com sementes segregantes para cor clara e aspecto mais opaco e com sementes 100% claras e mais opacas (Figura 83). Como mostrado na Tabela 17, a segregação para esta característica seguiu o padrão de herança monogênica.

Análises de polipeptídeos de zeína deste somaclone através de focalização isoelétrica em gel de agarose fo-

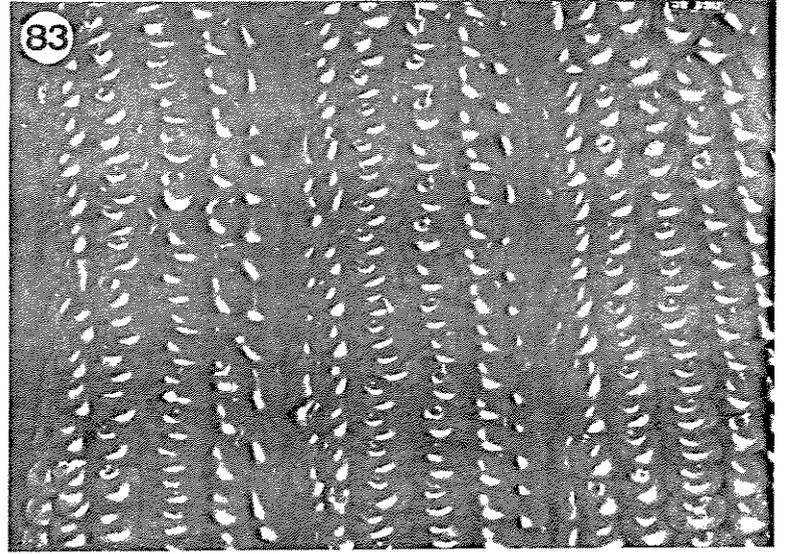
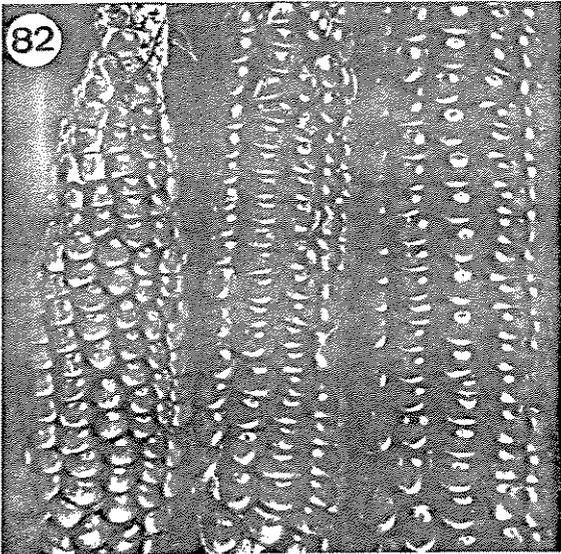
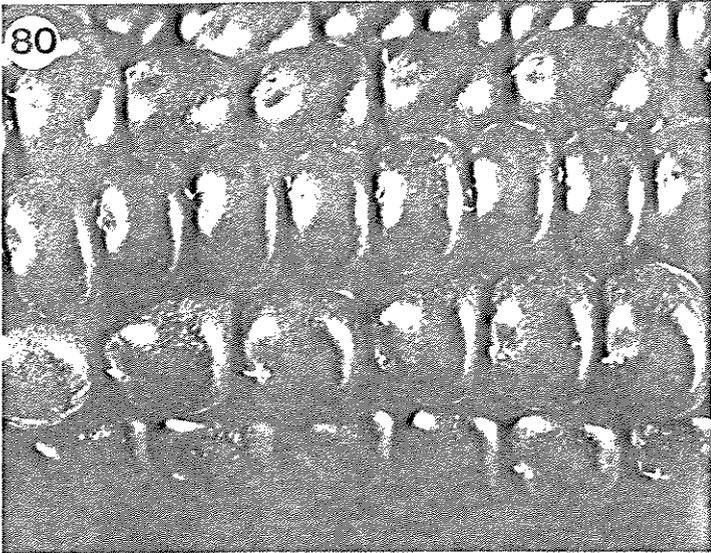
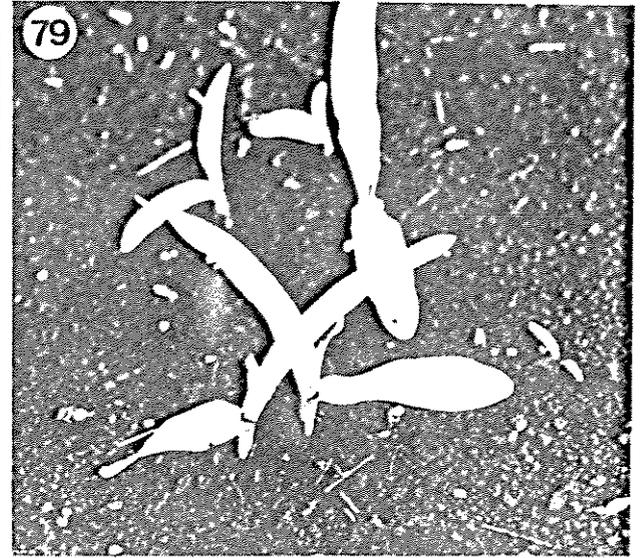
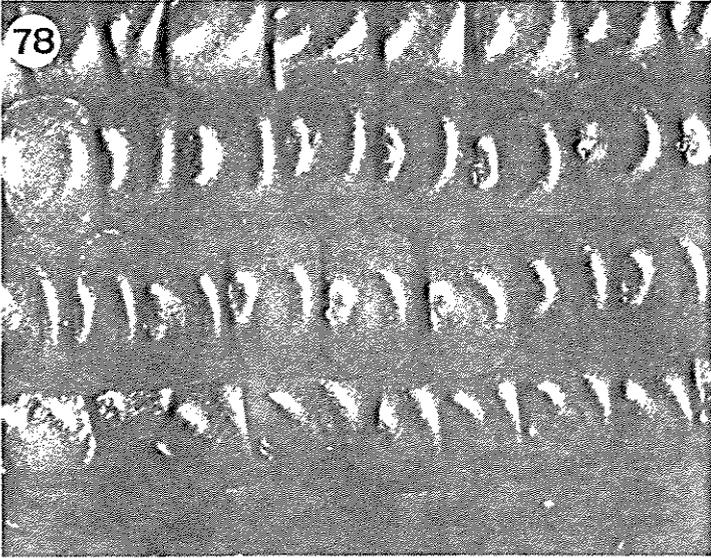


Figura 78. Fotografia mostrando parte de uma espiga segregante para cor das sementes, proveniente da autofecundação de uma planta R1 do somaclone CT-45(Cat 100-1).

Figura 79. Fotografia de plântulas R2 provenientes de sementes amarelo-limão de progênie do somaclone CT-45(Cat 100-1)

Figura 80. Fotografia mostrando parte da única espiga segregante para cor das sementes, obtida entre 29 espigas de plantas R1 do somaclone CT-114(Cat 100-1). Notar a semelhança de cor com o mutante CT-45(Cat 100-1).

Figura 81. Plantas provenientes de sementes amarelo-limão (no centro) e de sementes normais (à direita) do somaclone CT-114 (Cat 100-1). Notar folhas com pontas queimadas nas plantas provenientes das sementes mutantes.

Figura 82. Espigas do somaclone CT-114(Cat 100-1) provenientes de autofecundação de plantas R2 mutantes (centro), retrocruzamento de plantas R2 mutantes com a linhagem original (à direita) e cruzamento com uma planta R2 normal heterozigota (à esquerda).

Figura 83. Espigas de plantas R2 do somaclone CT-158(Cat 100-1) autofecundadas. Espiga contendo sementes 100% semelhantes à linhagem Cat 100-1 original (à esquerda), espiga contendo 100% de sementes mutantes (à direita) e espiga segregante (centro). Notar a cor mais clara e o aspecto mais opaco do mutante (seta).

ram realizadas. Como mostrado na Figura 85, o padrão de bandas de zeína obtidas para amostras consistindo de mistura de endosperma 7 sementes R0 foi idêntico ao obtido para a linhagem original Cat 100-1. Este resultado se repetiu para as análises de amostra de endosperma de sementes R2 normais e mutantes. Também não foi encontrada variação para aminoácidos livres presentes em espiguetas de plantas normais e mutantes.

4.4.2.5. Heterose

Foi observado aumento de vigor em cruzamentos de somaclones R1 e R2 da Cat 100-1 com plantas da linhagem original Cat 100-1. Estas plantas floresceram cerca de uma semana antes das plantas da linhagem original. A maioria dos cruzamentos entre os somaclones R0 ou R1 e a linhagem original deram progênie mais vigorosas do que os pais. Este fato pode ser visualizado na Figura 73, que mostra duas linhas F1 provenientes do cruzamento entre 2 plantas R1 do somaclone CT-127 (Cat 100-1) e a linhagem Cat 100-1, bem como uma linha da linhagem Cat 100-1.

4.4.2.6. Aminoácidos livres

Não foram detectadas variações para aminoácidos livres presentes nos extratos de espiguetas dos somaclones e linhagens originais analisados.

Tabela 17. Variação genotípica em somaclones de linhagens isogênicas de milho. Foram avaliados 125 somaclones da linhagem Cat 100-1, 28 da linhagem Cat 100-8 e 23 da linhagem Ast-1.

Somacloone	Planta R0	Plantas R1	Plantas R2
CT-129(Cat 100-1)	S.O.;(A)	36 N : 13 Br	Cat 100-1 x Br = 100% N(V) Br (A) = 100% Br Br x N = 100% N; 21 N : 23 Br 15 N : 09 Br N (A) = 100% N; 25 N : 09 Br 28 N : 08 Br
CT-338(Cat 100-1)	F.E.;(A)	43 F.E. : 07 N	-----
CT-338(Cat 100-8)	S.O.;(A)	36 N : 10 F.E.	Cat 100-8 x F.E.) = 100% N F.E. x F.E. = 100% F.E. F.E. x N = 100% N; 16 N : 17 F.E.
CT-550(Cat 100-1)	MS; X Cat 100-1	100% MS	X 902(T ⁺ C ⁻) = 100% Rest X 214(C ⁺) = 95% Rest X 28-a-7(C ⁺) = 100% Rest X 16-a-b(C ⁺) = 100% Rest X 903(T ⁻ C ⁺) = 100% Rest X 1038(T ⁻ C ⁺) = 100% Rest X Cat 100-1 = 100% MS (V)
CT-565(Cat 100-1)	F.P.;pouco pólen X Cat 100-1	24 MS : 14 F	(A)= 32F : 05 MS 3F : 25 MS 36F : 10 MS 14F : 12 MS 9F : 05 MS 100% F X Cat 100-1 = 8 N : 19 MS(V) 100% MS(V) X 16-b-8 = 100% F X 1038 = 38N : 5 MS X 903 = 100% F
CT-127(Cat 100-1)	S.O.;(A)	26 N : 07 MS	A = 22 N : 06 MS 26 N : 10 MS 08 N : 02 MS 100% N MS x Cat 100-1 = 100% N (V)
CT-621(Ast-1)	F.Estr.;(A)	34 N : 04 F.Estr.	(A)F.Estr. = 30 N : 25 F.Estr. 42 N : 18 F.Estr. 27 N : 30 F.Estr. (A) N = 100% N F.Estr. x N = 100% N

continua ...

cont. Tabela 17.

Somaclone	Planta R0	Plantas R1	Plantas R2
CT-457(Ast-1)	F.Estr.		
CT-469(Ast-1)	F.Estr.		
CT-45(Cat 100-1)	S.D.; A	23 N : 05 segr. sts Al, pl. Alb.	N x Cat 100-1 = 100% N (V)
CT-114(Cat 100-1)	S.D.; A	28 N : 01 sts Al (3:1)	(A) N = segr.sts AL (3:1) 100%N (A) sts AL = 100% sts AL sts AL x Cat 100-1 = 100N sts AL x N segr. = segr.stsAL(1:1)
CT-158(Cat 100-1)	A	08 N : 17segr. : 09 sts Opc	(A) sts Opc = 100% sts Opc. (A) sts N = 100% sts Opc. (A) sts N segr. = 100% sts N 12N : 20segr.:11stsOpc
CT-263(Cat 100-1)	Alt. zeína	-----	-----
CT-439(Cat 100-1)	Alt. zeína	-----	-----
CT-513(Cat 100-1)	Alt. zeína	-----	-----
CT-542(Cat 100-1)	Alt. zeína	-----	-----
CT-390(Cat 100-1)	Alt. zeína	-----	-----
CT-508(Cat 100-1)	Alt. zeína	-----	-----
CT-280(Cat 100-1)	Alt. zeína	-----	-----
CT-356(Cat 100-1)	Alt. zeína	-----	-----

(A) Autofecundação
 Alb Plantas albinas
 AL Endosperma amarelo-limão
 Alt. zeína Alteração em bandas IEF de polipeptídeos de zeína
 Br. Braquíticos
 C⁺ Restaura citoplasma C
 F Fértil
 F.E. Folhas enrugadas
 F.Er. Folhas erectas
 F.Estr. Folhas estriadas
 C⁻ Não restaura C

F.P. Feminilização da panícula
 MS Esterilidade masculina
 N Normal
 Opc Sementes um pouco opacas
 pl Plantas
 Rest Restauração
 segr Segregante
 S.D. Características semelhantes ao observado para a linhagem original
 sts Sementes
 T⁺ Restaura citoplasma T
 (H) Heterose
 T⁻ Não restaura citoplasma T

O padrão de bandas de aminoácidos das amostras analisadas foi bastante uniforme dentro de cada grupo de somaclones (Cat 100-1, Cat 100-8 e Ast-1).

4.4.2.7. Polipeptídeos de zeína

Amostras de endosperma da linhagem Cat 100-1 e sementes de 104 somaclones R0 derivados dessa linhagem foram avaliadas quanto à ocorrência de alterações em polipeptídeos de zeína através de focalização isoelétrica (IEF) em gel de agarose. Para facilitar a denominação das bandas de IEF e possibilitar uma comparação com trabalhos já existentes na literatura, amostras de endosperma das linhagens americanas OH43 e W23 foram utilizadas como padrões (Figura 84).

A zeína extraída da linhagem original e da maioria dos somaclones apresentou um padrão homogêneo de bandas em géis de IEF, como representado na Figura 85. As bandas de polipeptídeos foram numeradas de acordo com sua distância (mm) do cátodo do gel (WILSON, 1984). Assim, a banda mais básica, que situou-se a 10mm do cátodo, foi denominada banda 10 e assim por diante. Esta banda 10 ocorreu apenas para a linhagem OH43 (Figura 85). Embora os géis de agarose apresentem resultados reproduzíveis e invariáveis para os padrões de linhagens de uma corrida para outra, a posição das bandas pode variar levemente de um gel para outro (WILSON, 1984). Para evitar discrepâncias na nomenclatura das bandas de IEF, um único gel contendo as 11-

nhagens OH43, W23 e Cat 100-1 foi escolhido e as bandas numeradas (Figura 84). O padrão de bandas dos polipeptídeos de zeína dessas três linhagens foi bastante distinto. A OH43 deu um total de 11 bandas detectáveis, das quais 9 eram mais intensas. A W23 apresentou 10 bandas detectáveis das quais 8 eram mais intensas. A linhagem Cat 100-1 apresentou 11 bandas detectáveis, das quais 8 eram mais intensas.

O sistema de focalização isoelétrica de zeína em gel de agarose pH 5,8 + 3,5-9,5 permitiu uma excelente uniformidade e repetibilidade no padrão de bandas, como pode ser observado nas Figuras 84-92. Géis contendo 14 ou 44 amostras foram inicialmente testados para se detectar variações nos padrões de bandas. Como mostrado nas Figuras 85 e 86, foi obtida uma boa resolução das bandas em ambos os géis. Assim, nas análises preliminares, em que os 104 somaclones e a linhagem Cat 100-1 foram amostradas na forma de mistura de sementes, utilizou-se, por conveniência, principalmente géis com 44 amostras. Usando-se esse procedimento foi possível detectar variações para bandas de zeína, como representando na Figura 85. Nas amostras consistindo de mistura de endosperma de 7 sementes foram encontradas variações para as duas bandas principais mais básicas 14 e 16. Essas variações ocorreram para 8 somaclones (Figura 88 e 89) e consistiram de: (1) Ausência de banda 14 nos somaclones CT-439, CT-542, CT-513 e CT-280. (2) Redução da intensidade de banda 14 associada com aumento da intensidade da banda 16 nos somaclones CT-390, CT-263, CT-508 e CT-356. Não foram observadas alterações para os outros polipeptídeos de zeína nos géis

de IEF para os somaclones da linhagem Cat 100-1.

As Figuras 88-92 mostram os resultados obtidos para focalização isoelétrica de zeína de amostras de 7-8 sementes individuais da linhagem Cat 100-1 e dos 8 somaclones que apresentaram variações no padrão de bandas. Amostras de sementes individuais, representando essas variações para polipeptídeos de zeína estão apresentados na Figura 88. Como pode ser observado, o padrão de bandas foi constante para todos os indivíduos, com exceção do somaclone CT-390. Este somaclone apresentou quatro padrões para as bandas 14 e 16 (Figuras 88 e 92), ou seja: Padrão 1. Banda 14 mais intensa ($\overset{14}{\text{---}} / \underset{16}{\text{---}}$), semelhante ao padrão normal da linhagem Cat 100-1; Padrão 2. Bandas 14 e 16 com mesma intensidade ($\overset{14}{\text{---}} / \underset{16}{\text{---}}$); Padrão 3. Banda 16 mais intensa que a Banda 14 ($\overset{14}{\text{---}} / \underset{16}{\text{---}}$); Padrão 4. Ausência da Banda 14 ($\overset{14}{\text{---}} / \underset{16}{\text{---}}$). A análise de amostras de endosperma de 37 sementes R1 do somaclone CT-390 mostrou segregação 9:8:10:9 para os padrões 1, 2, 3 e 4, respectivamente.

Não foram encontradas variações para o padrão de bandas IEF de zeína na análise de amostras de endosperma da linhagem Cat 100-1, provenientes de aproximadamente 100 sementes. Essas sementes foram coletadas de 10 diferentes espigas e foram utilizadas, individualmente ou em amostras de misturas de 7 sementes, como controle nos géis de IEF deste estudo.

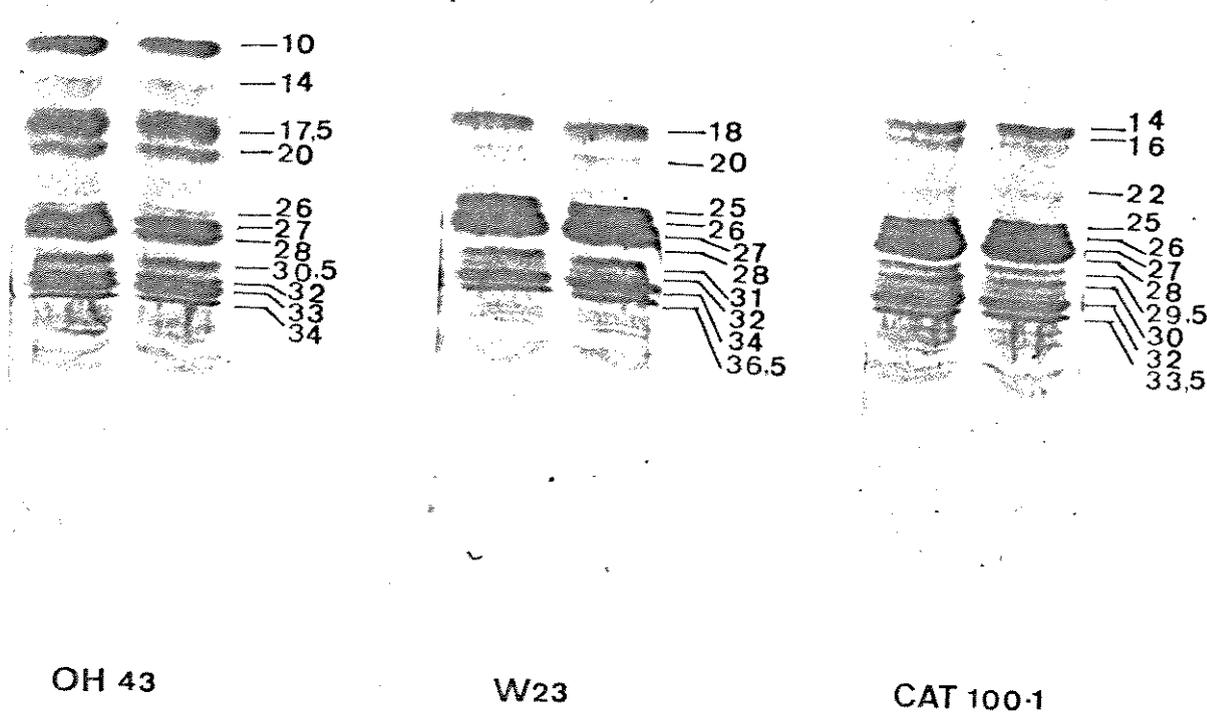
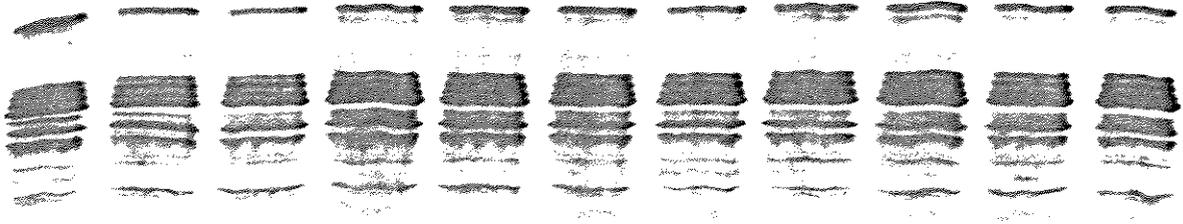


Figura 84. Bandas principais de polipeptídeos de zeína das linhagens americanas de milho OH43 e W23 e da linhagem brasileira Cat 100-1, obtidas em géis de agarose pH 5,8 + 3,5-9,5. Os números representam a distância em mm de cada banda de zeína do cátodo do gel.

Figura 85 e 86. Bandas IEF de polipeptídeos de zeína obtidos de amostras consistindo de mistura de endosperma de 7 sementes da linhagem Cat 100-1 e alguns somaclones desta linhagem, em géis de agarose pH 5,8 + 3,5-9,5. Figura 85. Parte de um gel que comporta 14 amostras. Notar a alta uniformidade e repetibilidade no padrão de bandas de zeína dentro do gel no sistema de focalização isoelétrica utilizado. Figura 86. Parte de um gel de focalização isoelétrica que comporta 44 amostras. Como pode ser observado, este sistema, conveniente por causa do número relativamente grande de amostras, permitiu uma boa resolução e identificação de variações nas bandas.



CT-158 —

CT-125 —

CT-121 —

CT-88 —

CT-50 —

CT-48 —

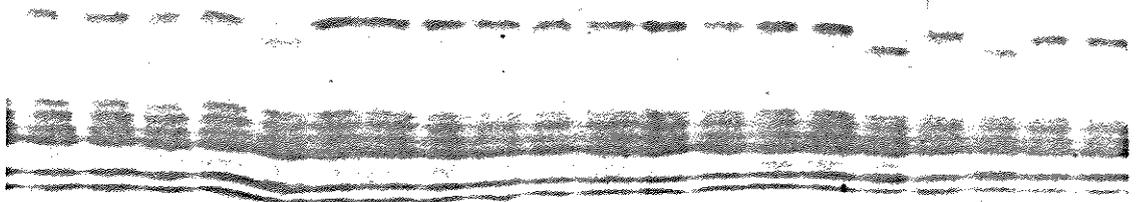
CAT100-1 —

CAT100-1 —

CT-47 —

CT-136 —

CT-450 —



CT-263 —

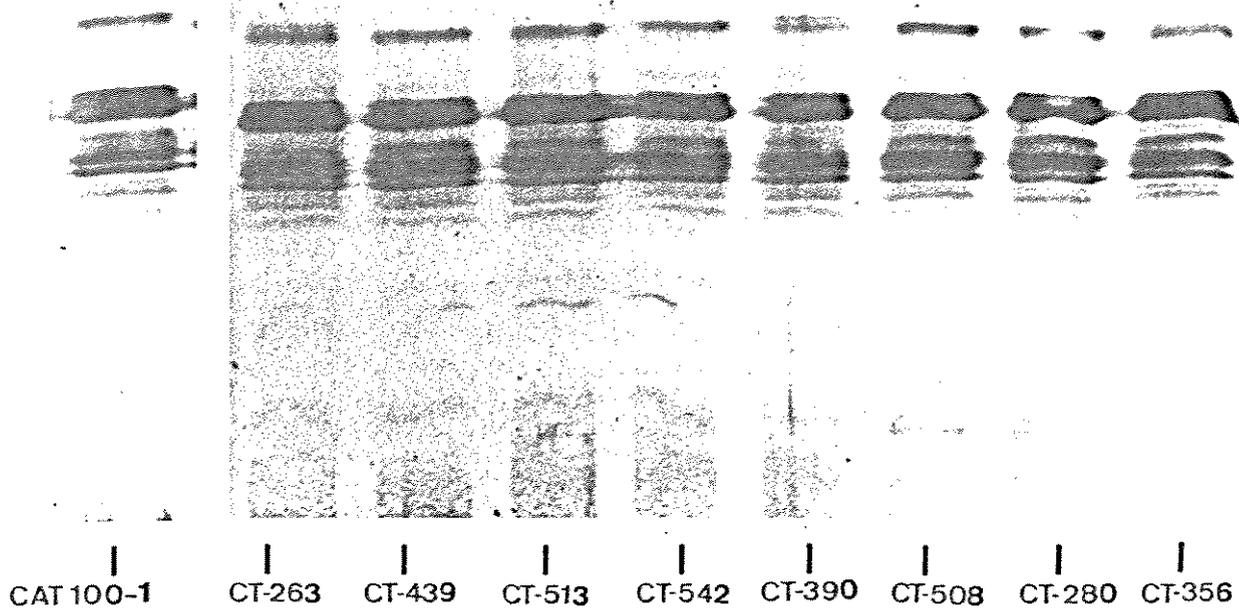
CT-439 —

CT-356 —

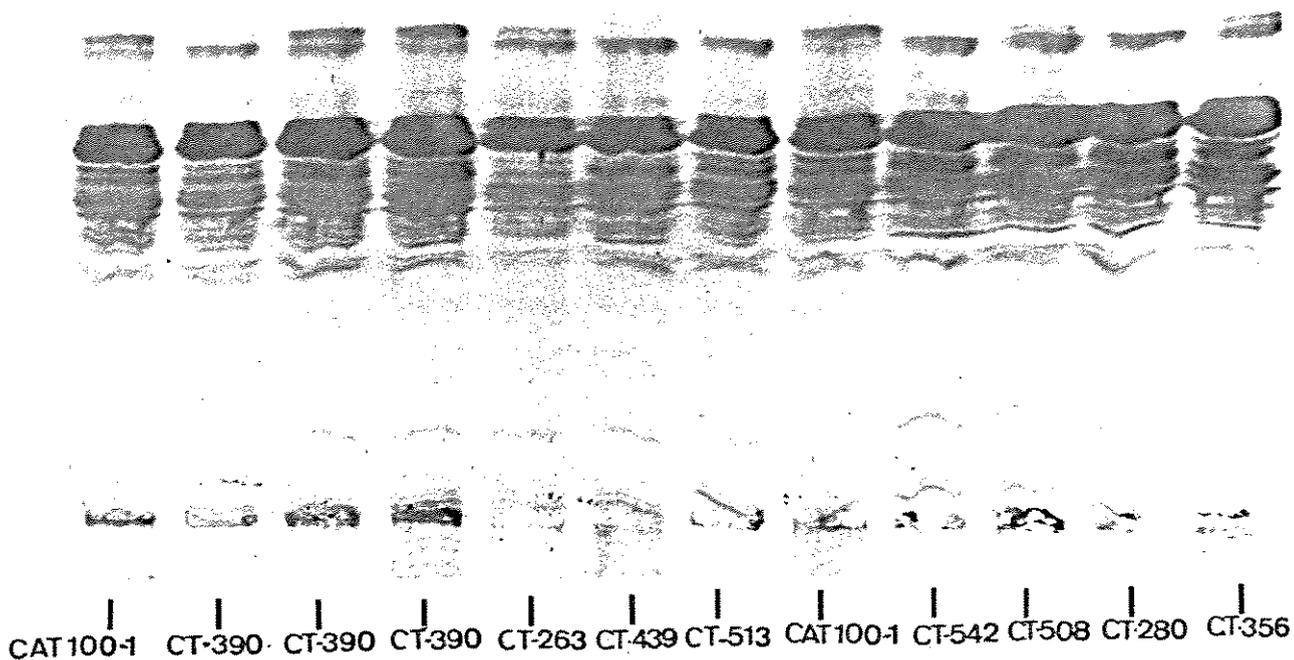
CAT100-1 —

Figuras 87 e 88 . Bandas IEF de polipeptídeos de zeína da linhagem Cat 100-1 e dos somaclones derivados desta linhagem que apresentaram variações para polipeptídeos dessa classe de proteínas. Notar os padrões das bandas 14 e 16. Figura 87. Padrões de banda obtidas para amostras de mistura de 7 sementes. Figura 88. Padrões de bandas obtidas para amostras de sementes individuais. Notar os padrões de variação dos indivíduos do somaclone CT-390 para as sementes analisadas.

87

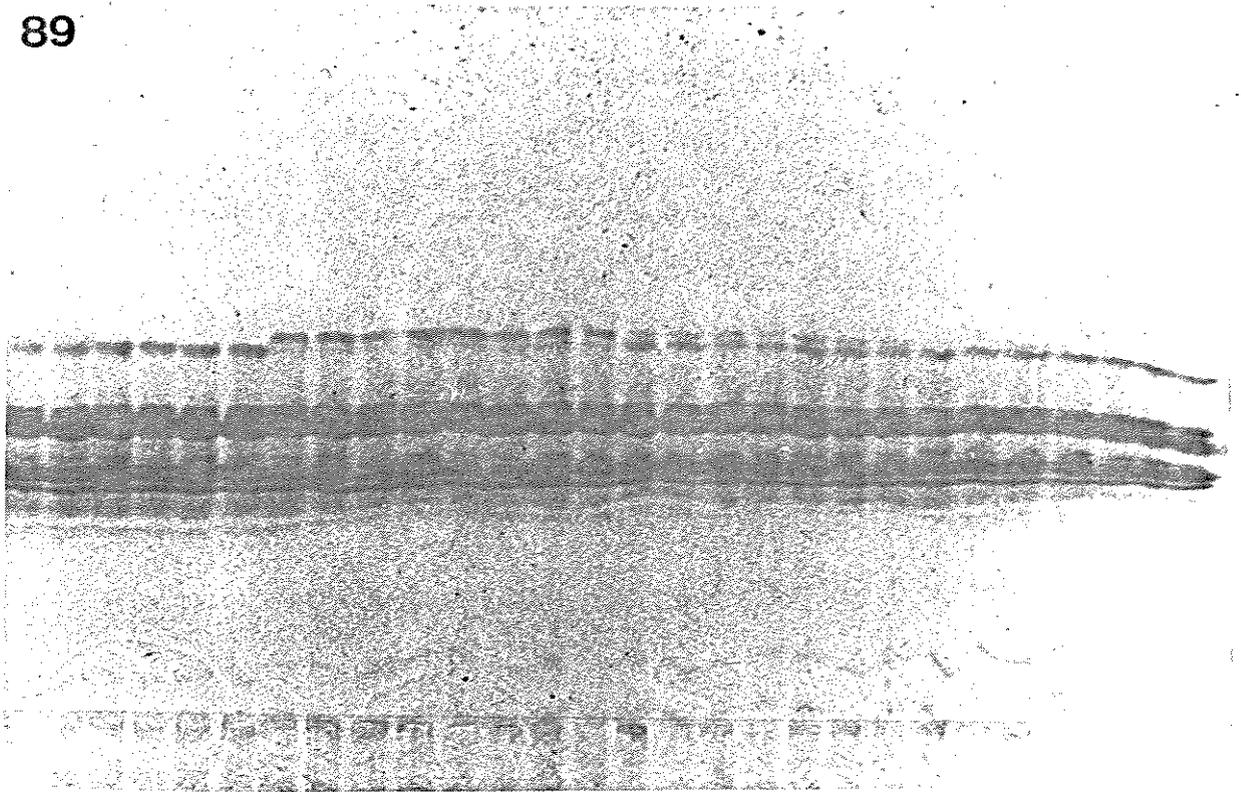


88



Figuras 89-91. Bandas IEF de polipeptídeos de zeína obtidos de amostras de sementes individuais da linhagem Cat 100-1 dos somaclones que apresentaram variação para essa classe de proteínas. Notar a uniformidade dos padrões de banda dentro da linhagem Cat 100-1 e de cada somaclone e a segregação para as bandas 14 e 16 no somaclone CT-390.

89



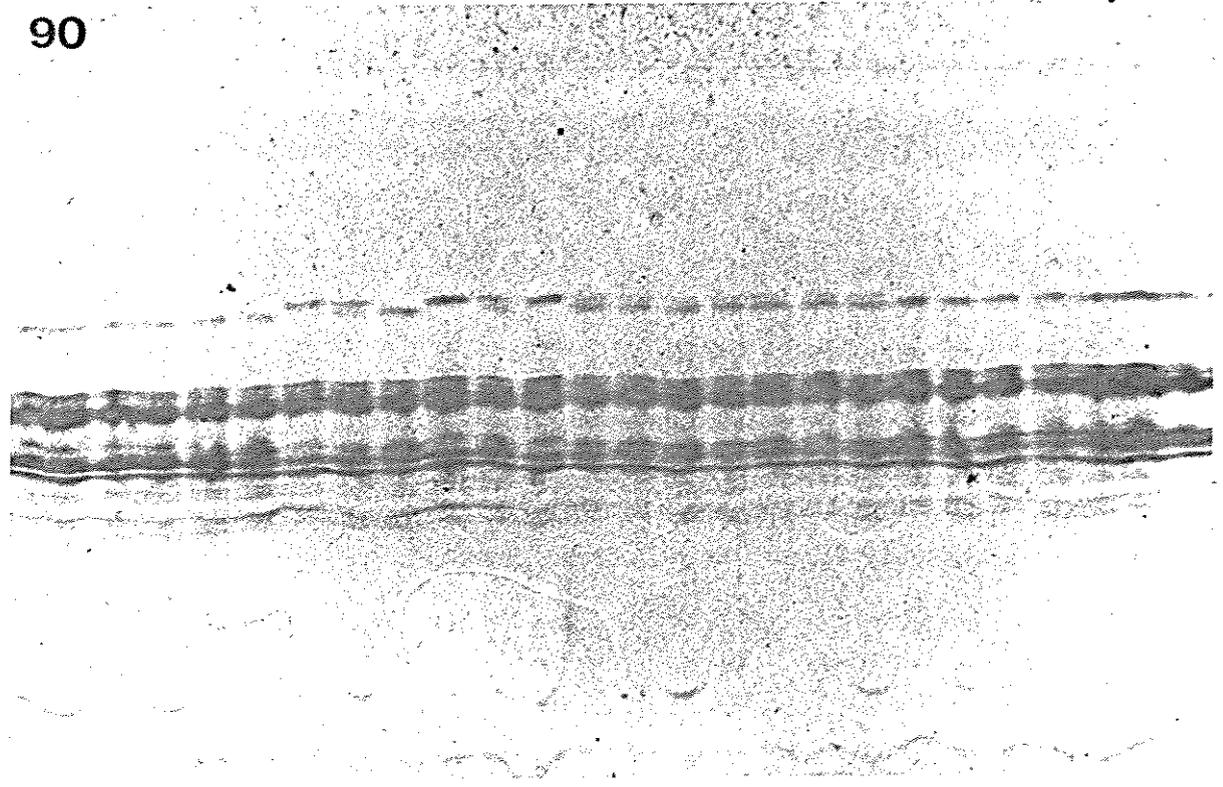
CT-508

CAT100-1

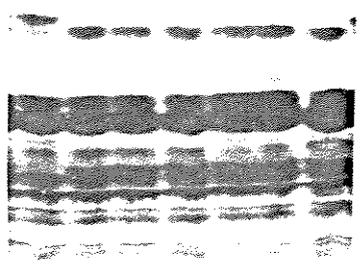
CT-356

CT-542

90



91



CAT100-1 CT-439

92

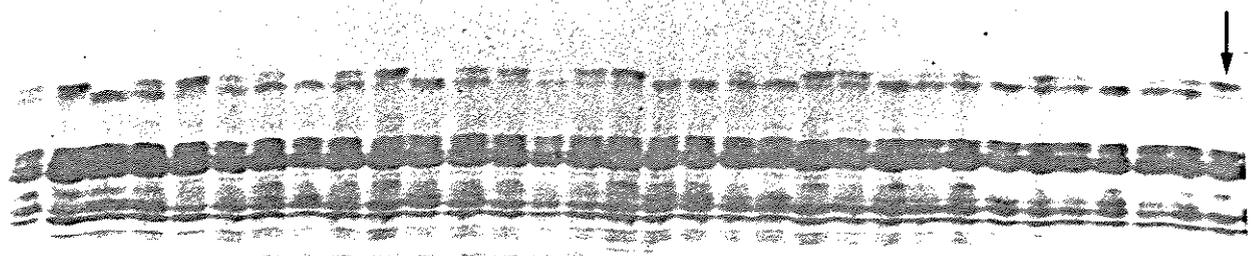


Figura 92. Padrões de bandas IEF de polipeptídeos de zeína obtidas de 31 sementes do somaclone Ro CT-390(Cat 100-1). Notar a variação obtida para as bandas 14 e 16, nos padrões: ¹⁴ ——— , ¹⁴ ——— , ¹⁴ --- e ¹⁶ ——— . (→) CAT-100-1.

5. DISCUSSÃO

No presente trabalho são reportados resultados relativos ao desenvolvimento e aplicação de técnicas de cultura de tecidos em milho, utilizando-se linhagens homozigóticas adaptadas a condições de clima tropical. Esses resultados incluem obtenção de calos a partir de embriões imaturos, regeneração de plantas a partir de calos e células em suspensão, herança da capacidade de regeneração, obtenção de linhagens de calos embriogênicos altamente friáveis e sua manutenção em culturas de longa duração, isolamento de protoplastos, alguns aspectos histológicos e citológicos de calos friáveis e avaliação de ocorrência de variabilidade genética em duzentos e três somaclones.

5.1. Cultura de tecidos, células e protoplastos

Os calos obtidos a partir de embriões imaturos em culturas iniciais de vinte, das trinta e quatro linhagens de milho utilizadas, são muito semelhantes aos calos embriogênicos previamente descritos por LU *et al.* (1982, 1983) e NOVAK *et al.* (1983). São calos compactos, opacos, nodulares, com organização complexa e com capacidade de produzir numerosos embriões somáticos logo após o início da cultura. Este tipo de calo, denominado embriogênico Tipo I, é o que tem sido obtido, com raras exceções, para todas as culturas de milho de diferentes genótipos com capacidade de regeneração descritos na literatura (LU *et al.*, 1982, 1983; NOVAK *et al.*, 1983; ARMSTRONG & GREEN, 1985; DUNCAN *et al.*, 1985; LOWE *et al.*, 1985; RAPELA, 1985; TOMES & SMITH, 1985; PRIOLI *et al.*, 1985a; FAHEY *et al.*, 1986; HODGES *et al.*, 1985, 1986; PRIOLI & SONDAHL, 1987). Apesar de produzirem rapidamente numerosos embriões somáticos com capacidade de germinação e produção de plantas adultas, os calos embriogênicos Tipo I apresentaram o inconveniente de serem de difícil manutenção além de algumas poucas subculturas. Este fenômeno parece ser comum para este tipo de calo, como já discutido na literatura (LU *et al.*, 1984; VASIL, 1985; VASIL & VASIL, 1986). Calos semelhantes são obtidos para gramíneas de um modo geral (VASIL, 1985). Nos calos Tipo I de gramíneas, os embriões somáticos parecem se originar inicialmente de uma população de células embriogênicas e, depois, da proliferação de pró-embriões (WILLIAMS & MAHESWARAN, 1986).

Setores com desenvolvimento de gemas apicais não associadas a estruturas embrionárias não foram encontrados nos calos Tipo I analisados. Obviamente, baseando-se apenas em avaliações ao microscópio estereoscópico não se pode descartar totalmente a possibilidade de ocorrerem ocasionalmente setores organogênicos nesses calos. É preciso que se considere que, após alguns dias em cultura, esses calos adquiriram uma organização mais complexa, acompanhada, muitas vezes, por germinação de embriões somáticos, o que poderia dificultar o reconhecimento de gemas apicais. Por outro lado, o desenvolvimento de numerosos embriões somáticos distribuídos por toda a superfície dos calos analisados para as vinte linhagens com capacidade de regeneração não deixa dúvidas que esses calos têm capacidade de embriogênese somática.

Os embriões somáticos da maioria dos calos apresentaram capacidade de maturação, germinação e produção de plantas. Este fato é comprovado pela alta correlação significativa (0,936 xx) obtida entre calos Tipo I de todas as linhagens, avaliados como embriogênicos ao microscópio estereoscópico (magnificação 8x), em meios com 2,4-D, e calos que produziram plântulas em meio sem este regulador de crescimento, nos três experimentos realizados. Este resultado permite também afirmar que a avaliação visual de calos realizada com o auxílio de um microscópio estereoscópico (magnificação 8x), é adequada para o reconhecimento de calos embriogênicos em culturas de milho. Os cuidados de transferência dos embriões somáticos para meio sem 2,4-D no estágio apropriado pode ter sido um fator importante para se garantir esta alta correlação obtida.

Esses resultados de embriogênese somática em calos Tipo I, associados àqueles obtidos para os calos Tipo II nas linhagens de milho adaptadas a clima tropical utilizadas neste trabalho corroboram o conceito que vem sendo desenvolvido recentemente de que embriogênese somática é a principal via de regeneração de plantas em culturas de tecido de milho (LU *et al.*, 1982, 1983; GREEN, 1982; NOVAK *et al.*, 1983; DUNCAN, 1985; PRIOLI *et al.*, 1985a; VASIL, 1985; VASIL *et al.*, 1985; HODGES *et al.*, 1986; PRIOLI & SONDAHL, 1987). Gemas apicais sugerindo organogênese foram observadas por SPRINGER *et al.* (1979) em cortes histológicos de calos Tipo I da linhagem de milho A188. Em culturas da linhagem de milho americana B73, LOWE *et al.* (1985) selecionaram uma linhagem de calos com alta capacidade de organogênese. Em culturas de longa duração de uma linhagem americana de milho pipoca foi observado o desenvolvimento de algumas gemas apicais, sugerindo ocorrência de organogênese (PRIOLI & SONDAHL, 1987). O conceito de que embriogênese somática em milho é a principal via de morfogênese tem se baseado não apenas nas numerosas observações visuais de calos com capacidade de regeneração, mas também em estudos histológicos, como os realizados para desenvolvimento de calos Tipo I de quatro híbridos comerciais de milho (VASIL *et al.*, 1985). Embriões imaturos e calos Tipo I foram amostrados diariamente durante uma semana a partir do primeiro dia de cultura e com intervalos de 2-5 dias para as próximas três semanas. Os resultados mostraram que a embriogênese somática foi a principal via de morfogênese nos calos estudados por esses autores. Apenas ocasionalmente foram observadas, na

superfície de alguns desses calos, gemas apicais circundadas por um ou mais primórdios foliares, apresentando sistema vascular aberto conectado com o restante do calo, e não associadas com escutelo, coleorriza ou coleoptilo.

Calos embriogênicos friáveis e semi-friáveis foram isolados para cinco linhagens homozigóticas de milho. A alta friabilidade e capacidade de regeneração de plantas desses calos vêm se mantendo em culturas de longa duração. Calos embriogênicos do tipo friável foram descritos pela primeira vez em milho para culturas da linhagem A188 (GREEN, 1982; GREEN *et al.*, 1983). As características dos calos Tipo II produzidos pelas linhagens brasileiras assemelham-se muito ao descrito para a linhagem A188. Observações de ambas as culturas ao microscópio estereoscópico confirmaram essas semelhanças (PRIOLI, observações não publicadas). Entretanto, as observações feitas por ARMSTRONG e GREEN (1985), de que o número de embriões somáticos é aumentado em calos Tipo II da linhagem A188 mantidos em meio com L-prolina, não se repetiram para os calos obtidos em nosso laboratório. O efeito da L-prolina em calos friáveis de milho não é ainda bem conhecido (GREEN *et al.*, 1983; ARMSTRONG & GREEN, 1985). Sabe-se que esta substância também estimula a produção de embriões somáticos em cultura de anteras de triticales (SOZINOV *et al.*, citado por GREEN *et al.*, 1983). Aparentemente, os calos friáveis da linhagem A188 e os selecionados para as linhagens brasileiras, embora semelhantes em características morfológicas, diferem quanto à resposta para L-prolina.

A seleção de calos embriogênicos friáveis tem sido um fenômeno bastante raro em milho. Além da linhagem A188, seleção de calos Tipo II em milho foi reportada apenas para os híbridos A188 x B73 (KAMO & HODGES, 1986), B73 x G35 (TOMES & SMITH, 1985) e Dekalb XL82 (VASIL & VASIL, 1986). Evidências para a existência de um controle genético para a produção de calos embriogênicos Tipo II foram encontradas por TOMES (1985). Essas evidências sugerem que a produção de calos embriogênicos Tipo I e Tipo II seria controlada por determinantes genéticos separados. Aparentemente algumas das linhagens utilizadas em nosso trabalho apresentam maior tendência de produzir calos embriogênicos friáveis, o que sugere diferenças genotípicas para esta característica. Além disso, nossos resultados mostram a possibilidade de se selecionar calos embriogênicos altamente friáveis em culturas de longa duração de calos Tipo I ou semi-friáveis de genótipos recalcitrantes para esta característica nas condições experimentais de rotina, como ocorreu para a linhagem Cat 100-1.

Grande variedade de tipos celulares pode ser observada nos calos friáveis e semi-friáveis analisados. Os estudos ao microscópio óptico e microscópio eletrônico de transmissão mostram aspectos de diferenciação celular variados, tais como forma e tamanho das células, diferenças em número e tamanho dos vacúolos, densidade da matriz citoplasmática, forma e tamanho dos núcleos, densidade cromatínica e estrutura nucleolar. O padrão de organização histológica dos diferentes tipos celulares sugere a presença de numerosos pró-embriões. Os centros meris-

temáticos desses pró-embriões são constituídos por células com características de alta atividade de divisão. As células mais externas, que possuem um grande vacúolo central e citoplasma e núcleos deslocados para a região periférica, podem ser consideradas células mais diferenciadas (YEOMAN & STREET, 1977). As diferenças na densidade cromatínica, observadas em núcleos submetidos à Reação de Feulgen, corroboram estas evidências. Os pró-embriões podem ou não estar conectados entre si, porém não possuem conexão com sistema vascular. Portanto, essas informações associadas às observações de maturação e germinação de embriões somáticos são evidências da natureza embriogênica dos calos friáveis e semi-friáveis das linhagens de milho analisados. Gemas apicais sugerindo organogênese não foram observadas. Estudos histológicos posteriores serão de interesse para se obter informações sobre os padrões de multiplicação e maturação desses embriões somáticos. A conexão encontrada entre os pró-embriões sugere que o centro meristemático é capaz de se dividir e formar duas ou mais regiões meristemáticas. Entretanto, a origem desses novos centros meristemáticos não foi determinada precisamente. Em calos Tipo I de milho os embriões somáticos têm origem multicelular (VASIL & VASIL, 1985). A estrutura macroscópica e microscópica e, possivelmente, a fisiologia dos calos Tipo II é diferente do Tipo I. Assim, os padrões da origem e maturação dos embriões somáticos podem não ser os mesmos para os dois tipos de calos.

As observações ao microscópio estereoscópico e microscópio óptico sugerem que o grau de friabilidade dos ca-

los Tipo II é diretamente dependente do tamanho dos pró-embriões e grau de conexão entre eles. Pode-se supor que um grau de desenvolvimento maior do pró-embrião é atingido quando o centro meristemático está circundado por células maiores e mais diferenciadas e o pró-embrião como um todo desconectado do restante do calo. Aparentemente as células maiores e mais alongadas que circundam o pró-embrião nesta fase de desenvolvimento não crescem ativamente e nem estão diretamente associadas a ele. Estas células talvez constituam o tecido de suporte dos embriões somáticos, como sugerido na Figura 24. Esta característica deve ser importante para manter a friabilidade do calo. A velocidade de crescimento dos calos friáveis parece estar associada à alta frequência de centros meristemáticos que possuem células com alta capacidade de divisão.

As células vegetais mantidas em cultura "in vitro" encontram-se em um estágio de desenvolvimento que não exhibe, necessariamente, os padrões de desenvolvimento observados em plantas inteiras (LUNDDEN & CARLSON, 1980). A indução de divisão celular em explantes é acompanhada por alterações ultraestruturais que refletem o metabolismo da célula. Essas alterações têm sido estudadas em células de cenoura e incluem o desenvolvimento de características ultraestruturais que se assemelham às células meristemáticas de plantas inteiras, tais como, aumento do número de polissomos, desaparecimento de produtos de armazenamento característicos de células diferenciadas, aparente aumento do número de mitocôndrias, o núcleo assume forma arredondada e se posiciona na região central da célula e o nucléolo

torna-se menos compacto (YEOMAN & STREET, 1977). A ultraestrutura das células dos centros considerados meristemáticos nos calos friáveis e semi-friáveis das linhagens Cat 100-1 e TuxMo-1 assemelha-se à células meristemáticas de plantas superiores de um modo geral e àquelas descritas para células em cultura (YEOMAN & STREET, 1977). Um aspecto interessante a ser destacado nos calos estudados no presente trabalho é a presença de numerosas estruturas que se assemelham aos corpos lipídicos (TOLBERT, 1980). Os corpos lipídicos parecem ter a função de reserva de lipídios (TOLBERT, 1980). São encontrados em associação com glioxissomos em células em que os lipídios são rapidamente utilizados, tais como células de cotilédones de sementes em germinação e esporos de fungos em germinação (MAXWELL *et al.*, 1977). Os glioxissomos contêm enzimas que participam da conversão de lipídios em carboidratos (TOLBERT, 1980) e não foram observados nas células analisadas, sugerindo que as células dos calos Tipo II de milho acumulam lipídios. Análises ultraestruturais de calos friáveis de milho não têm sido reportadas na literatura e calos de outras espécies não têm sido intensivamente estudados ao microscópio eletrônico. Assim, é difícil dizer se esta é uma característica comum de células vegetais cultivadas "in vitro". Células de cenoura em cultura são consideradas boas fontes para o isolamento de esferossomos contendo triglicerídeos, não associados com atividade enzimática (KLEINIG *et al.*, 1978 - citado por TOBERT, 1980), o que sugere que acumulam estas substâncias. Pequenos grãos de amido foram observados em alguns amiloplastos, indicando um pequeno acúmulo desse carboidrato nas células

dos calos Tipo I. Talvez a quantidade relativamente pequena de grãos de amido nos calos Tipo II, comparando-se aos calos do Tipo I, bem como a ausência de tecidos vasculares sejam também fatores importantes para determinar a friabilidade dos calos embriogênicos Tipo II. A concentração de membranas de retículo endoplasmático próximo à parede celular indica alta atividade de síntese e transporte de substâncias nesta região.

As pequenas áreas densas e escuras observadas com frequência em núcleos de células com alta atividade de divisão (Figura 50) foram intensamente impregnadas com prata (Figura 52). As regiões heterocromáticas, como evidenciadas pela Reação de Feulgen, eram relativamente pequenas e semelhantes às observadas por AGUIAR-PERECIN (1979) e VIDAL *et al.* (1984). Considerando-se a especificidade do método de impregnação com prata utilizado e os resultados de Reação de Feulgen, estas áreas poderiam ser consideradas como correspondentes a agregações de corpos pré-nucleolares que se formam durante a reorganização do nucléolo, como observado em células de ponta de raízes de *Allium cepa* (STOCKERT *et al.*, 1970) e *Zea mays mexicana* (CORTELAZZO & VIDAL, 1983).

Os calos selecionados neste trabalho para as linhagens Cat 100-1, Cat 100-6, Cat 100-8 e TuxMo-1 possuem características adequadas para a seleção "in vitro" de mutantes bioquímicos. Estas características são: alta friabilidade, homogeneidade, não maturação dos embriões somáticos em meio 2,4-D, crescimento rápido e alta eficiência para regenerar plantas. Mutantes resistentes a doses letais de 2-S-aminoetilcisteína (A-

ZEVEDO & ARRUDA, 1987), lisina e treonina (KINJO & ARRUDA, 1987), 5-metilriptofano (ARRUDA, dados não publicados), DL-C-propargilglicina e L-etionina (PRIOLI *et al.*, 1987), herbicida glifosato (SAKATA & ARRUDA, 1987), NaCl e manitol (MELLO & ARRUDA, dados não publicados) vêm sendo obtidos a partir desses calos em nosso laboratório. Resultados semelhantes também têm sido obtidos para os calos Tipo II da linhagem A188 (HIBBERD, 1984; HIBBERD *et al.*, 1986).

Além de serem adequados para produção de plantas em culturas de longa duração e seleção de mutantes bioquímicos, os calos embriogênicos friáveis das linhagens TuxMo-1 e Cat 100-1 também foram utilizados com sucesso para o estabelecimento de culturas de células totipotentes em suspensão. Essas culturas diferiram quanto às características de qualidade e dispersão de células, indicando que deve existir um efeito genotípico e/ou de friabilidade do calo utilizado na iniciação e estabelecimento de culturas de células em suspensão de milho. Calos Tipo I têm sido utilizados com algum sucesso para o estabelecimento de culturas em suspensão totipotentes de *Pennisetum americanum* (VASIL & VASIL, 1981a, 1982), *Panicum maximum* (LU & VASIL, 1981b), *Pennisetum purpureum* (VASIL *et al.*, 1983) e *Saccharum officinarum* (HO & VASIL, 1983). Calos Tipo I de milho, entretanto, têm comprovadamente se mostrado inadequados para o estabelecimento dessas culturas. Raramente em cereais têm sido estabelecidas culturas em suspensão típicas, com populações de células não diferenciadas, não organizadas, com alta capacidade de divisão e agregadas em pequenos grupos (HARMS, 1982; VASIL & VA-

SIL, 1985). Em milho, culturas com essas características foram descritas apenas para a variedade Black Mexican Sweet (SHERIDAN, 1975, 1982) e para a linhagem B73 (POTRYKUS *et al.*, 1977). Essas culturas, entretanto, não possuem capacidade de regenerar plantas. Culturas de células em suspensão de milho com capacidade de produzir calos e regenerar plantas quando transferidas para meio sólido foram descritas para a linhagem A188 (GREEN *et al.*, 1983; KAMO & HODGES, 1986). Como mostrado por GREEN *et al.* (1983), essas culturas caracterizaram-se pela presença de massas celulares com 1,0 mm de diâmetro em média, frequentemente exibindo em certo padrão de organização. Vários pequenos agregados celulares de células meristemáticas e vacuoladas também foram observados. Pró-embriões ocorreram raramente nessas culturas. Como pode ser notado, a descrição desses resultados sugere muitas semelhanças com aqueles obtidos para as culturas em suspensão da linhagem TuxMo-1 em diferentes meios de cultura. Aparentemente as culturas das linhagens A188 e TuxMo-1, embora finalmente dispersas em seu aspecto macroscópico, são heterogêneas e apresentam relativamente poucos agregados contendo 30-50 células não diferenciadas, não organizadas e com alta capacidade de divisão. Agregados celulares semelhantes aos que caracterizam uma cultura em suspensão típica, como descrito anteriormente, constituem as culturas da linhagem Cat 100-1 (Figuras 35-36), além de algumas células vacuoladas pouco frequentes. Resultados semelhantes para culturas de células em suspensão totipotentes não foram reportados na literatura para nenhuma outra linhagem de milho. É possível que a tendência apresentada pelos calos em-

briogênicos friáveis da linhagem Cat 100-1 de produzirem grupos discretos de células meristemáticas não associados a estruturas globulares em graus adiantados de organização, como observado ao microscópio óptico, favoreçam a formação e dispersão desses agregados em meio líquido. Fotomicrografia de um único grupo de células em suspensão e descrições feitas para as culturas em suspensão iniciadas a partir de uma linhagem de calos friáveis do híbrido Dekalb XL82 (VASIL & VASIL, 1986) sugerem superficialmente algumas semelhanças com as culturas da linhagem Cat 100-1.

Células em suspensão de culturas relativamente novas (2-5 meses de idade) das linhagens TuxMo-1 e Cat 100-1, filtradas (filtro 350 um) e colocadas sobre meio sólido contendo 2,4-D, produziram calos embriogênicos. Portanto, os calos obtidos em meio sólido devem ser provenientes de pequenos agregados celulares e não de pequenos pedaços de calos ainda presentes na cultura. Isto significa que, embora as culturas da linhagem TuxMo-1 sejam relativamente mais heterogêneas comparadas com as culturas da linhagem Cat 100-1, elas possuem pequenos agregados celulares totipotentes. Provavelmente, estas células não são aquelas provenientes de sistema radicular ativo dos embriões globulares presentes nessas culturas. Como discutido por KING *et al.*, (1978), culturas heterogêneas com meristema radicular ativo podem liberar numerosas células para o meio líquido. Essas células são descritas como vacuoladas e não embriogênicas.

Os resultados obtidos para as culturas de células em suspensão de ambos os genótipos sugerem que essas culturas apresentam ca-

racterísticas que deverão permitir sua utilização para trabalhos de seleção de mutantes bioquímicos. As culturas de células em suspensão da linhagem Cat 100-1 sugerem grande potencial para isolamento de protoplastos viáveis.

Protoplastos foram isolados a partir de alguns calos embriogênicos altamente friáveis e células em suspensão das linhagens TuxMo-1 e calos friáveis da linhagem Cat 100-6. As dificuldades encontradas assemelham-se àquelas descritas na literatura para milho e gramíneas de um modo geral (KING *et al.*, 1978; HARMS, 1982; VASIL, 1985). Provavelmente, a heterogeneidade das células dos calos friáveis e das culturas em suspensão da linhagem TuxMo-1, como constatado em estudos de microscopia óptica, foram os mais importantes fatores responsáveis pelas dificuldades encontradas. Aparentemente, as células vacuoladas que geralmente circundam os grupos de células com alta capacidade de divisão, possuem parede celular de difícil digestão pelas enzimas utilizadas. Assim a penetração da solução enzimática nos tecidos seria dificultada por essas células. Isolamento de protoplastos a partir de calos embriogênicos friáveis de milho foi reportado para a linhagem A188 por IMBRIE-MILLIGAN & HODGES (1986). Cerca de 25% desses protoplastos mostraram capacidade de divisão celular. Esses autores observaram que o tipo, marca e concentração das enzimas afetaram bastante o número de protoplastos viáveis obtidos. Resultados semelhantes foram encontrados em experimentos de isolamento de protoplastos a partir de calos semi-friáveis de *Zea diploperennis* (PRIOLI *et al.*, 1985b).

A maturação e germinação dos embriões somáticos de calos Tipo I e Tipo II provenientes de embriões imaturos e de células em suspensão das linhagens utilizadas neste estudo parece ocorrer de modo semelhante aos embriões zigóticos. Este parece ser um fenômeno geral e tem sido observado para outras culturas de milho (GREEN, 1982; LU *et al.*, 1982, 1983; NOVAK, 1983; VASIL & VASIL, 1985; PRIOLI *et al.*, 1985a) e gramíneas de um modo geral (VASIL, 1985). Entretanto, variabilidade nos padrões de maturação e germinação de embriões somáticos com formação de embriões atípicos também foi encontrada. Novamente, este parece ser um fenômeno comum em calos embriogênicos de diferentes espécies (HALPERIN & WETHERELL, 1964; AMMIRATO & STEWARD, 1971; KONAR *et al.*, 1972), incluindo-se o milho (LU *et al.*, 1982, 1983; NOVAK *et al.*, 1983). Foi observado em nosso trabalho que, embriões somáticos aparentemente normais de calos Tipo I, iniciam a germinação ainda em meio com 2,4-D. Com retirada do 2,4-D do meio de cultura, a germinação desses embriões geralmente se processa de modo semelhante aos embriões zigóticos. Entretanto, a manutenção desses embriões por mais de uma semana em meio contendo este regulador de crescimento, induz malformações e germinação anormal. Assim, parece que a redução do teor endógeno de 2,4-D nos embriões somáticos a níveis adequados e no estágio adequado deve ser importante para permitir sua maturação e germinação normal. Além do fator ambiental, tem-se também que considerar a ocorrência de variabilidade genética em células cultivadas "in vitro". Mutações genéticas em vias metabólicas importantes para os processos de diferenciação, desenvolvimento, maturação e germinação dos embriões somáticos

poderiam ser, em parte, responsáveis pela formação desses embriões atípicos.

5.2. Capacidade de regeneração em linhagens homozigóticas de milho

A frequência de indução de calos embriogênicos a partir de embriões imaturos variou de zero a 100% entre as trinta e quatro linhagens homozigóticas de milho utilizadas. A capacidade de regeneração foi observada em vinte linhagens, para as quais foram encontradas diferenças significativas para capacidade de indução de calos embriogênicos. Estes resultados sugerem a existência de diferenças genotípicas para a capacidade de regeneração de plantas em milho. Indicações de que diferentes genótipos de milho podem apresentar diferentes respostas para as condições de cultura "in vitro" foram encontradas já nos trabalhos pioneiros nesta área (GREEN & PHILLIPS, 1975; GREEN, 1977, 1978). Entretanto, a descoberta da embriogênese somática, obtida em culturas de 12 híbridos comerciais de milho com polinização aberta, escolhidos ao acaso, levou alguns pesquisadores a considerarem que esses resultados não sustentavam a hipótese de que genótipo é um fator importante na determinação da resposta "in vitro" em milho (LU *et al.*, 1983). Estudos mais recentes têm evidenciado a existência deste controle genético em vários genótipos de milho (BECKERT & QING, 1984; DUNCAN *et al.*, 1985; TOMES & SMITH, 1985; PRIOLI *et al.*, 1985a; HODGES *et al.*, 1985,

1986; PRIOLI & SONDAHL, 1987). A avaliação da capacidade de regeneração de numerosas linhagens americanas de milho mostrou variação de zero a 100% para a frequência de indução de calos embriogênicos a partir de embriões imaturos DUNCAN *et al.*, 1985; TOMES & SMITH, 1985; HODGES *et al.*, 1986; PRIOLI & SONDAHL, 1987).

Praticamente todas as linhagens flints apresentaram capacidade de regeneração, sendo que as linhagens Cateto tiveram uma tendência de se posicionarem como as que melhor respondem às condições de cultura utilizadas nos três experimentos. Um fato que se destaca nos resultados é o contraste entre a capacidade de regeneração das linhagens derivadas de germoplasma Cateto e aquelas derivadas de germoplasma Tuxpeño. Dentre as linhagens Tuxpeño apenas duas apresentaram capacidade de indução de calos embriogênicos diretamente a partir de embriões imaturos. Maior frequência de indução de calos embriogênicos, a partir de cerca de 8000 embriões imaturos, foi também encontrada para a variedade SRR Duro, homozigota para o gene "shrunken 2" e derivada da raça Cateto, comparada com a variedade SRR Dentado, também homozigota para o gene "shrunken 2" e derivada da raça Tuxpeño (PRIOLI *et al.*, dados não publicados). De modo semelhante ao observado para as linhagens brasileiras estudadas, DUNCAN *et al.* encontraram diferenças distintas de resposta para produção de calos regeneráveis entre duas populações diferentes de milho americano, ou seja: População RSSSC = 9%; População RSL x South African Composite = 30%. Sabe-se que existem três populações South African, que são formadas principalmente por germo-

plasmas com endosperma flint e meio-dente tropical. Além disso, algumas linhagens de milho homozigotas para o gene "**shrunken 2**", derivadas de milho flint testadas por esses autores produziram calos regeneráveis em abundância. DUNCAN *et al.* (1985) sugerem a possibilidade da mutação **sh2** ser benéfica para regeneração de plantas. As linhagens flint com alta capacidade de regeneração de plantas utilizadas no presente trabalho e a variedade SRR Duro de tipo flint, **sh2sh2**, utilizada por PRIOLI *et al.* (dados não publicados) são derivadas de germoplasma Cateto. Ambas apresentaram alta capacidade de regeneração de plantas. Além disso, as linhagens altamente aparentadas TuxPc-1 normal e TuxPc-1 **sulo2** apresentaram respostas bastante semelhantes entre si. Assim, esses dados, parecem sugerir que não se deve atribuir a esses mutantes que bloqueiam a síntese de amido, uma melhor resposta para capacidade de regeneração. Da mesma maneira, o fato do endosperma ser flint não seria também o fator limitante para a resposta *in vitro*, uma vez que a variedade flint, quando homozigota para o gene "**shrunken 2**" ainda apresenta uma alta capacidade de regeneração apesar das mudanças físicas químicas drásticas que ocorrem no endosperma. Assim parece razoável supor que a alta capacidade de regeneração das linhagens derivadas de germoplasma Cateto deve estar relacionada com uma maior frequência de genes para esta característica dentro desta raça comparada com a raça Tuxpeño.

Embora as concentrações de 2,4-D e sacarose utilizadas não tenham se mostrado como fatores críticos para a indução de calos embriogênicos, o meio contendo 10 M de 2,4-D e

6% de sacarose foi o que, em geral, mostrou melhor resposta para a indução de calos embriogênicos a partir de embriões imaturos. A interação genótipo x meio ocorrida no experimento realizado em fevereiro/86 sugere que a resposta para os diferentes meios de cultura variou em diferentes linhagens, naquelas condições. Resultados sugerindo que a utilização de 6% de sacarose em meios de cultura favorece a indução de calos embriogênicos foram obtidos por outros pesquisadores (LU *et al.*, 1982, 1983). Observações de culturas de longa duração de algumas das linhagens utilizadas neste estudo sugerem que a manutenção dos calos embriogênicos Tipo I em meio contendo 6% de sacarose em culturas de longa duração provocam maior endurecimento desses calos e prejudicam a produção de embriões somáticos. Além disso, a alta concentração de sacarose parece dificultar a seleção de setores para obtenção de calos friáveis, aparentemente porque o calo fica mais compacto. O endurecimento de calos embriogênicos friáveis, com tendência de maturação dos embriões globulares foi também observada em meios contendo sacarose 6%. Considerando-se essas observações, o procedimento recentemente adotado em nosso laboratório é a iniciação de calos em meio contendo 2,4-D 5uM-10uM e sacarose 6%, seguida de transferência, após 15 dias, para meio contendo 3% deste açúcar. Os calos friáveis têm sido mantidos em meio contendo sacarose 2% ou 3%.

Outra constatação feita nesses experimentos foi que as respostas das linhagens homozigóticas de milho utilizadas não são, necessariamente, constantes entre épocas. Estes resultados sugerem que condições ambientais têm efeito signifi-

cativo distinto nas respostas dos diferentes genótipos para a indução de calos embriogênicos. Assim, pode-se concluir que é importante considerar as condições de crescimento e estado fisiológico da planta doadora e do próprio embrião imaturo antes de se iniciar a cultura, confirmando as observações anteriores de LU *et al.* (1983), DUNCAN *et al.* (1985) e TOMES (1985).

Os coeficientes de variação dos experimentos realizados em fevereiro/1985, maio/1985 e fevereiro/1986 foram relativamente altos, apesar do grande número de embriões utilizados. Entretanto, eles se mantiveram dentro dos limites de 20-29%. Fatores como condições de crescimento da planta doadora, estado fisiológico do embrião imaturo, posição correta do embrião no momento da inoculação no meio de cultura e interações hormonais entre células do explante e o meio de cultura são possíveis efeitos que causam modificação na penetrância e expressividade dos genes envolvidos na capacidade de indução de calos embriogênicos.

5.3. Herança da capacidade de regeneração

Nos três experimentos realizados, algumas linhagens mantiveram alta frequência de indução de calos embriogênicos Tipo I, enquanto que outras não produziram calos regeneráveis. Estes resultados sugerem diferenças genéticas contrastantes para a capacidade de regeneração nesses genótipos. A existência de um controle genético para a capacidade de indução

de calos embriogênicos Tipo I a partir de embriões imaturos nessas linhagens homozigóticas de milho foi confirmada pelos resultados obtidos para os conjuntos familiares utilizados. Como discutido anteriormente, a penetrância e expressividade dos genes que condicionam indução de calos embriogênicos a partir de embriões imaturos de milho estão sujeitas a modificações que podem levar a uma certa variação de resposta. Esta variação constatada no presente trabalho tem sido comumente observada também por outros pesquisadores. Assim, tratando-se de uma característica variável, a análise genética é dificultada, mesmo quando se utiliza um grande número de observações. Apesar dessas dificuldades, os resultados obtidos para os quatro conjuntos familiares mostraram herança qualitativa para os genes que controlam a indução de calos embriogênicos, herança esta, possível de ser analisada. O contraste entre os resultados das três famílias em que a linhagem Cat 100-8 foi um dos parentais e da família Cat 100-1 x Tux100-8, sugere o envolvimento de diferentes genes no controle da característica em estudo. A ausência de efeito citoplasmático nos cruzamentos recíprocos sugere que esses genes são nucleares. Uma primeira avaliação geral dos dados obtidos para os três conjuntos familiares em que a linhagem Cat 100-8 foi um dos parentais, mostra claramente que a capacidade de indução de calos embriogênicos comportou-se como característica dominante. Entretanto, esta característica comportou-se como recessiva no conjunto familiar Cat 100-1 x Tux 100-8. Esta mudança na direção de dominância, bem como os resultados obtidos nas gerações F1, F2 e retrocruzamentos mostram que existe interação entre os

diferentes genes envolvidos no controle da indução de calos embriogênicos. Evidências sugerindo o envolvimento de genes nucleares no controle da indução de calos embriogênicos a partir de embriões imaturos de milho já haviam sido encontradas por HODGES *et al.* (1985, 1986). A avaliação qualitativa de um conjunto familiar estudado por esses pesquisadores, envolvendo as linhagens B73 e Mo17 sugeriu a existência de dois genes nucleares na formação de calos Tipo I e regeneração de plantas. Embora os resultados dos testes de qui-quadrado para as linhagens, híbridos e retrocruzamentos tenham sido variáveis para esta família, os resultados se aproximaram bastante do esperado para dois genes independentes dominantes com interação (HODGES *et al.*, 1985). Evidências sugerindo a existência de dois locos dominantes independentes com interação envolvidos no controle da capacidade de regeneração de plantas a partir de regeneração de plantas a partir de calos em alfafa também já haviam sido reportadas por REISCH & BINGHAM (1980). Um fato também bastante evidente é que, embora com alguns desvios, a segregação dentro de cada híbrido ou retrocruzamento e entre as três famílias variou pouco, como mostrado pelo teste de homogeneidade. Além disso, o padrão de segregação, onde se destaca o acentuado decréscimo da capacidade de regeneração no retrocruzamento para a linhagem que não regenera, sugere o envolvimento de poucos genes no controle dessa característica. As proporções observadas entre calos embriogênicos e não embriogênicos são bastante próximas nas três gerações dos conjuntos familiares e sugerem o envolvimento de dois pares de genes independentes com interação. Essas propor-

ções, entretanto, não se ajustaram ao modelo de dois pares de genes independentes dominantes com interação, como sugerido por HODGES *et al.* (1985).

Sabe-se que a relação citocinina/auxina é importante para a indução de calos e regeneração de plantas em cultura de tecidos vegetais e que esses hormônios estão sujeitos a interações entre si, com outras substâncias produzidas pela célula e substâncias fornecidas pelo meio de cultura (FUKUDA & KOMAMINE, 1985). Os resultados obtidos mostram interação entre os genes estudados, como seria de se esperar para genes que condicionariam a produção de hormônios e/ou de outras substâncias celulares importantes para uma interação com o meio de cultura no processo de embriogênese somática. Assim, os resultados levam a pensar em um sistema com três locos envolvidos no controle da indução de calos embriogênicos a partir de embriões imaturos, dentro das condições utilizadas, como proposto no modelo hipotético apresentado nas Tabelas 14-16. Considerando-se as respostas dos três conjuntos familiares em que a linhagem Cat 100-8 foi um dos parentais (Tabelas 6-8), pode-se supor a existência de um loco, possuindo dois alelos, um dominante (**Se1**) e um recessivo (**se1**), como o principal responsável pela capacidade de regeneração. Este loco interage com um segundo, localizado em outro cromossomo ou em regiões distantes do mesmo cromossomo, que possui dois alelos (**Se2, se2**), onde ocorre ausência de dominância. O alelo **Se2** produziria uma substância que dificultaria a indução de calos embriogênicos a partir de embriões imaturos, enquanto que o alelo **se2** favoreceria a indução desses calos, uma vez que

o seu produto gênico seria inativo ou menos ativo. Ocorreria um efeito de dosagem do produto do gene **Se2** dentro da célula no sentido de dificultar ou até mesmo impedir a ação de 2,4-D. Assim, a presença do alelo **Se1** seria essencial para que a indução dos calos embriogênicos ocorresse. Porém, a sua expressão ou ação do seu produto gênico, no momento e na intensidade correta para o desenvolvimento do calo no sentido de produzir embriões somáticos, seria influenciada pelo produto do alelo **Se2**. Condições ambientais poderiam favorecer ou não a ação do produto do gene **Se2**. Este ambiente, aqui considerado, poderia ser, entre outras coisas, o estado fisiológico da planta doadora e do próprio embrião somático, assim como "background" genético. Assim, como mostrado nas Tabelas 9 e 10, genótipos **Se1-se2se2** apresentariam uma alta capacidade para indução de calos embriogênicos. O genótipo **Se1-Se2se2** poderia apresentar variação de resposta por causa da presença do alelo **Se2**, porém ela não se desviaria muito dos resultados obtidos para o genótipo **Se1-se2se2**. O genótipo **Se1-Se2Se2**, por sua vez, teria a tendência de reduzir bastante a eficiência de ação do 2,4-D, de modo que a resposta estaria dentro de limites desde zero até o valor esperado máximo, por estar mais sujeito a interações com as condições ambientais do momento. Talvez seja esse o caso de algumas linhagens homozigóticas testadas neste trabalho, cuja frequência de indução de calos embriogênicos foi bastante variável. Os genótipos **se1se1** não apresentariam capacidade de indução de calos embriogênicos a partir de embriões imaturos, assim como a maioria das linhagens Tux-100. Obviamente não estamos considerando que o

loco **Se2** seria o único responsável pela variação de resposta de diferentes genótipos. Entretanto, é um gene que poderia interferir diretamente na ação do loco **Se1**. Assim, considerando-se esse modelo, a linhagem com alta tendência de indução de calos embriogênicos a partir de embriões imaturos teria genótipo **Se1 Se1se2se2**. A linhagem incapaz de produzir calos embriogênicos seria **se1se1Se2Se2**. As variações encontradas para esses genótipos em diferentes experimentos, principalmente para a linhagem com capacidade de regeneração seriam consideradas ambientais. Os indivíduos da geração F1, e 50% dos indivíduos resultantes do retrocruzamento para a linhagem **Se1Se1se2se2** heterozigotos para o loco **Se2** poderiam sofrer um leve decréscimo na frequência de indução de calos embriogênicos comparados com a linhagem com capacidade de regeneração. Isto seria devido à ação do alelo **Se2** e foi observado nas três famílias estudadas. Os indivíduos da geração F2 apresentariam segregação para calos embriogênicos e não embriogênicos variável entre as proporções de 9:7 e 3:1, como ocorreu para as três famílias, sem desvio significativo, ao nível de 5%, pelo teste de qui-quadrado (Tabela 6-8). Os indivíduos resultantes do retrocruzamento para a linhagem sem capacidade de regeneração são homozigotos ou heterozigotos para o loco **Se2**. Assim, a tendência seria ficar dentro de limites de 1:3 ou 1:2, como aconteceu para quase todos os retrocruzamentos nas famílias estudadas e comprovado pelo teste do qui-quadrado (Tabelas 6-8).

Os resultados obtidos para o conjunto familiar envolvendo as linhagens Cat 100-1 e Tux 100-8 aproximaram-

se muito do esperado para segregação monogênica, com recessividade para a capacidade de indução de calos embriogênicos a partir de embriões imaturos. Este é, portanto, um resultado bem contrastante com o obtido para os outros conjuntos familiares e sugere a existência de um terceiro loco, possuindo um alelo dominante (**Se3**), que seria capaz de inibir a ação dos dois locos **Se1** e **Se2**. A linhagem Tux 100-8 seria homozigota (**Se3Se3**) enquanto que todas as outras linhagens utilizadas nos conjuntos familiares seriam homozigotas para o alelo recessivo (**se3se3**). Dentro deste modelo hipotético, seria de se esperar que a transmissão da capacidade de indução de calos embriogênicos a partir de embriões imaturos se aproximaria da esperada para uma característica recessiva monogênica quando uma linhagem **Se3Se3** fosse usada como um dos parentais, do mesmo modo que ocorreu para a linhagem Tux100-8. HODGES *et al.* (1986) observaram que alguns híbridos F1, para os quais a linhagem A188 foi um dos parentais, apresentaram baixos níveis de regeneração e também sugeriram a presença de supressores da expressão de genes que controlam a regeneração em algumas linhagens. Um programa de retrocruzamentos sucessivos de híbridos F1 (Tux100-8 x Cat 100-1) com a linhagem Tux100-8, foi iniciado com algumas plantas regeneradas a partir de calos de um primeiro retrocruzamento (PRIOLI, dados não publicados). Estas plantas regeneradas foram autofecundadas e, a seguir, retrocruzadas novamente com a linhagem Tux100-8. A partir de aproximadamente 4000 embriões imaturos inoculados, foram obtidos apenas 42 calos com capacidade de regeneração. Uma baixa frequência de regeneração nos indivíduos

resultantes deste retrocruzamento seria esperada, em função da existência de um loco inibidor para indução de calos embriogênicos na linhagem Tux100-B. Assim, essas evidências reforçam a idéia da existência de um loco dominante para não indução de calos embriogênicos em milho. Além disso, mostra a possibilidade de se transferir a capacidade de regeneração para linhagens recalcitrantes, mesmo quando esta característica comportou-se como recessiva. A obtenção de linhagens isogênicas, com segregação apenas para os locos diretamente relacionados com o controle da capacidade de indução de calos embriogênicos, será de fundamental importância em trabalhos futuros de estudos dos mecanismos de controle desta característica a nível genético, fisiológico e molecular.

Os modelos hipotéticos propostos explicariam, obviamente com certas limitações, os resultados obtidos para os quatro conjuntos familiares de milho utilizados neste estudo. A ação fisiológica dos três locos gênicos propostos nestes modelos poderia estar diretamente correlacionada com a relação auxina/citocinina dentro das células do embrião imaturo utilizado como explante para induzir calos em meio com 2,4-D. É conhecido, que a relação desses dois hormônios em uma ação cooperativa é de fundamental importância na indução e manutenção de calos, bem como diferenciação celular e regeneração de plantas "in vitro" (SKOOG & MILLER, 1957; FUKUDA & KOMAMINE, 1980, 1985). Além disso, outras substâncias produzidas pelas células do embrião imaturo poderiam interferir diretamente na ação das auxinas e citocininas estimulando ou limitando a sua ação.

Como descrito na literatura, o 2,4-D é um herbicida do tipo clorofenóxi, que possui ação auxínica semelhante ao IAA (MOORE, 1979; HATZIOS & PENNER, 1982; FEDTKE, 1982; BANDURSKI & NONHEBEL, 1984). É efetivo para dicotiledôneas em concentrações inofensivas para as monocotiledôneas. Como discutido por FEDTKE (1982), um primeiro efeito da ação de herbicidas com atividade auxínica, como é o caso do 2,4-D é o metabolismo aberrante de ácidos nucléicos. Um acentuado aumento de produção de ácidos nucléicos é, aparentemente, causado pelo desbalanço hormonal no tecido tratado. Em consequência, muitos processos bioquímicos são estimulados, assim como divisões celulares e desenvolvimento de novos primórdios cambiais. Seguem-se, então, fenômenos de alongação celular. Fenômenos semelhantes parecem ocorrer em sistemas de cultura de tecidos vegetais (FUKUDA & KOMAMINE, 1985), quando essas substâncias são utilizadas como reguladores de crescimento.

Para que uma substância mostre atividade de auxina ela deve ser permeável à parede celular e membrana plasmática, ser transportada do sítio de aplicação ao sítio de ação, ter estabilidade razoável e ter forma correta e propriedades de atividade biológica (FEDTKE, 1982). A tolerância aos herbicidas com atividade de auxina talvez esteja relacionada principalmente com sua conjugação com proteínas citoplasmáticas. Existem estudos sugerindo que imobilização e perda de fitotoxicidade ocorre quando o 2,4-D é conjugado com essas proteínas (ZEMSKAYA *et al.*, 1977). Distribuição e transformação diferencial de 2,4-D ocorre em tecidos de várias monocotiledôneas (ZEMSKAYA *et al.*, 1977).

Assim, aparentemente existem proteínas que podem transformar o 2,4-D em diferentes níveis em células de diferentes tecidos de monocotiledôneas. Como discutido por HATZIOS & PENNER (1982), reações de conjugação parecem ser muito importantes no metabolismo do herbicida, sendo frequentemente responsáveis por garantir proteção seletiva em plantas. Entretanto, algumas vezes a conjugação com proteínas ou aminoácidos dentro da célula significa uma ativação do herbicida. Para o 2,4-D, o composto formado pela conjugação com as proteínas citoplasmáticas parece significar a inativação desse herbicida (ZEMSKAYA *et al.*, 1977). Uma substância com capacidade de conjugação com o 2,4-D, imobilizando-o e impedindo ou dificultando sua ação auxínica poderia ser produzida pelo gene *Se2*, de acordo com o modelo hipotético proposto para explicar o controle genético para a indução de calos embriogênicos nos conjuntos familiares de milho estudados. A constatação de que existe uma transformação diferencial de 2,4-D em diferentes tecidos de monocotiledôneas (ZEMSKAYA *et al.*, 1977) sugere que a expressão do gene responsável por essa proteína ou a ação dessa proteína varia de acordo com o estado de diferenciação e/ou fisiológico do tecido, de modo semelhante ao proposto para o gene *Se2*.

Embora o papel fisiológico de proteínas com afinidade por compostos com atividade auxínica ainda não tenha sido esclarecido, existem evidências de que algumas proteínas poderiam ter um papel de inibição, enquanto que outras teriam papel de regulação da atividade (FEDTKE, 1982). RIZZO *et al.* (1980 - citado por FEDTKE, 1982) isolaram uma proteína de extra-

to de soja com alta afinidade pelo 2,4-D que estimulou a síntese de RNA "in vitro". Assim, parece razoável supor que o mecanismo de ação do gene *Sa2* poderia estar diretamente relacionado com a estabilidade do 2,4-D ou, então, com o transporte e/ou ativação deste herbicida dentro da célula.

Um outro fator importante para a ação do 2,4-D nos tecidos "in vitro" é a permeabilidade das células no sentido de permitir a entrada deste composto. O conceito de sítios receptores para hormônios específicos foi introduzido por analogia com animais, para os quais complexos receptores-hormônios específicos têm sido bem caracterizados (KENDE & GARDNER, 1976). A existência de receptores ligados a membranas tem sido demonstrada para auxinas naturais, como o IAA, e para herbicidas tipo auxina, como o 2,4-D (DOHRMANN *et al.*, 1978; VENIS, 1978, 1979; VENIS & WATSON, 1978; STODDARD & VENIS, 1980 - citado por FEDTKE, 1982). Uma substância com a propriedade de modificar a afinidade de auxinas pelos sítios receptores foi isolada em coleoptilo de milho e caracterizada como uma mistura de dois tipos de benzoxazolinonas (RAY *et al.*, 1977a). Foi reportado por RAY *et al.* (1977b) que alguns análogos de auxina, como por exemplo o 2,4-D, tem sua afinidade de ligação aos sítios receptores aumentada na presença dessas benzoxazolinonas. Além disso, a atividade dessas substâncias está correlacionada com inibição de crescimento induzido por auxina em coleoptilo de milho (VENIS & WATSON, 1978). Precursores de benzoxazolinonas foram encontrados em certas gramíneas, tais como milho, trigo, centeio e Coix, mas não em aveia, sorgo, cevada e arroz (TANG *et al.*, 1975). Ou seja, parece não ter distribuição universal.

Uma proteína com afinidade por 2,4-D, presente na fração de membranas plasmáticas de coleoptilo de milho, foi isolada por STODDARD & VENIS em 1980 (citados por FEDTKE, 1982). Esta proteína, com peso molecular de 90000, apresentou afinidade pelo 2,4-D em concentrações dentro de limites fisiológicos. O papel fisiológico desta proteína não está ainda esclarecido, mas não se pode descartar a possibilidade de estar envolvida no transporte unidirecional do 2,4-D para dentro da célula (FEDTKE, 1982). Uma mutação no gene que condiciona esta proteína ou em um gene que regula sua expressão levando ao não reconhecimento do 2,4-D poderia impedir ou limitar a entrada desse herbicida na célula. Esta mutação teria um efeito de inibição da expressão dos genes *Se1* e *Se2* ou inibição da ação de seus produtos, devido à ausência ou baixo teor de 2,4-D na célula. É conhecido que na ausência ou em concentrações muito baixas de 2,4-D no meio de cultura a indução de calos embriogênicos não é estimulada mesmo em linhagens com alta capacidade de regeneração, como é o caso da Cat 100-1 (PRIOLI *et al.*, 1985). O efeito atribuído ao loco *Se3* nos modelos hipotéticos propostos poderia ser devido à inibição ou limitação da entrada do 2,4-D na célula.

Um fato interessante a ser considerado é o limite estreito de tempo que o embrião imaturo de milho encontra-se em estado fisiológico adequado para a indução de calos embriogênicos. Este limite é ao redor de 24 horas, no período de 10-13 dias após a polinização, quando o embrião imaturo tem um comprimento variando entre 1.0-2.0 mm. A frequência de indu-

ção de calos embriogênicos a partir de embriões com comprimento abaixo ou acima desses limites é extremamente baixa e, muitas vezes, inexistente. O critério para se determinar o estado fisiológico do embrião no momento da inoculação é apenas o seu comprimento. Observações e estudos preliminares mostraram que este parece ser um bom critério para as linhagens que respondem favoravelmente às condições experimentais de rotina utilizadas, apesar de não terem sido realizadas caracterizações bioquímicas que definam melhor os limites para a resposta favorável à indução de calos embriogênicos. Testes utilizando-se embriões imaturos das linhagens sem capacidade de regeneração, com comprimento variável entre 0,5-4,0mm deram resultados negativos para a indução de calos embriogênicos. É possível que o estado fisiológico do embrião imaturo, adequado para as condições de cultura comumente utilizadas, seja determinado pela produção de algum inibidor natural de processos de divisão e/ou diferenciação celular. Este inibidor poderia também determinar a incapacidade comprovada de se obter calos embriogênicos a partir de tecidos vegetativos mais velhos de milho, tais como folhas, raízes, caules, etc. Assim, este inibidor, que poderia ser condicionado pelo gene *Se3*, impediria a ação dos genes *Se1* e *Se2*. Nos genótipos com capacidade de regeneração, esta substância poderia ser produzida no embrião imaturo quando este estivesse no estado fisiológico determinado pelo comprimento acima de 2,0 mm. Nos genótipos sem capacidade de regeneração ela poderia ser produzida muito cedo e já estaria presente em níveis relativamente elevados no estágio adequado de maturidade do embrião para se iniciar as culturas.

Existem vários inibidores sintéticos de atividade auxínica, cujos mecanismos de ação não são ainda conhecidos (FEDTKE, 1982). Sabe-se que o ABA e talvez alguns compostos fenólicos podem atuar como inibidores naturais de crescimento. Não se conhece o mecanismo de ação desses inibidores, mas supõe-se que pode estar relacionado com os hormônios vegetais (MILBORROW, 1984). O ABA está presente em todos tecidos de plantas vasculares e parece estar envolvido em vários processos fisiológicos, incluindo-se a dormência de sementes (MILBORROW, 1984). Poder-se-ia supor que o ABA estivesse, de alguma maneira, relacionado com a ação do gene *Se3*. Cultura de tecidos de mutantes vivíparos de milho, que apresentam germinação precoce que pode ser prevenida por ABA (SMITH *et al.*, 1978), não forneceram evidências de que esta mutação possa favorecer a indução de calos embriogênicos a partir de embrião imaturo de milho (DUNCAN *et al.*, 1985). Entretanto, maiores estudos neste sentido se fazem necessários.

O loco *Se1* representa, no modelo proposto o determinante genético responsável pela resposta de dominância encontrada para a indução de calos embriogênicos nos conjuntos familiares em que a linhagem Cat 100-8 foi um dos parentais. Este loco parece condicionar uma condição fisiológica importante para a resposta de indução de calos embriogênicos. Sabe-se que a relação auxina/citocinina é fundamental para a indução de calos, bem como para a diferenciação celular e regeneração de plantas "in vitro" (SKOOG & MILLER, 1957; FUKUDA & KOMAMINE, 1980, 1985). Se considerarmos que os locos *Se2* e *Se3* estão diretamen-

te relacionados com a auxina exógena, ou seja, o 2,4-D, o loco **Se1** poderia ser o responsável pela produção de uma substância com atividade de citocinina. A expressão desse gene seria fundamental para garantir um teor adequado de citocinina para a ação cooperativa com o 2,4-D. O mutante **se1** não seria capaz de garantir esse teor de citocinina necessário para estimular a embriogênese. É interessante notar que nas gramíneas de um modo geral apenas substâncias com atividade auxínica, como o 2,4-D, são necessárias para a indução e manutenção de calos. A regeneração de plantas é obtida com a redução ou a retirada do 2,4-D do meio, sem a necessidade de se utilizar citocinina, que é exigida por outros grupos vegetais. Assim, é possível que as gramíneas produzam citocinina em níveis adequados e no momento correto para interagir com a auxina nas culturas de células somáticas. Em milho, dentro do modelo proposto neste trabalho, esta condição seria garantida pelo alelo **Se1**.

Assim, seriam vários os fatores fisiológicos conhecidos que poderiam interferir no controle da indução de calos embriogênicos a partir de embriões imaturos de milho. Embora esses fatores não sejam bem estudados ainda, alguns deles parecem ter efeitos que se assemelham àqueles atribuídos para os locos **Se1**, **Se2** e **Se3** do modelo hipotético proposto para explicar a capacidade de indução de calos embriogênicos a partir de embriões imaturos de milho.

As análises dos resultados obtidos para os quatro conjuntos familiares estudados mostram um certo desvio para os resultados esperados de acordo com o modelo hipotético

proposto. Como discutido anteriormente, os experimentos de cultura de tecidos de milho estão sujeitos a uma variação que pode ser alta, mesmo quando se utiliza um grande número de embriões imaturos para a iniciação de calos. Vários fatores ambientais, tais como estado fisiológico da planta doadora, estado fisiológico do embrião imaturo e posição do embrião imaturo no meio de cultura poderiam contribuir para a variação da penetrância e expressividade dos genes envolvidos no controle da indução de calos embriogênicos em milho. Além dessas variações, outras de ordem genética tais como o "background" genético e o próprio mecanismo de ação dos genes envolvidos no controle desta característica seriam, em parte, responsáveis pela variação de resposta nos experimentos de cultura de tecidos de milho. Assim, uma parte da variação seria, ela própria, um componente natural deste sistema genético, considerando-se a complexidade das interações hormonais na determinação dos processos de diferenciação celular.

Considerando-se, portanto, que a indução de calos embriogênicos em milho é uma característica variável, as proporções esperadas podem também variar, de modo que, em alguns casos, o teste do qui-quadrado fica prejudicado. Assim, na geração F2 e retrocruzamentos, procurou-se as proporções esperadas dentro dos limites que o modelo propõe. Em certos casos o teste do qui-quadrado não foi realizado por causa da dificuldade de se prever os limites da variação, quando o valor esperado era zero. Os testes de homogeneidade, por sua vez, deixam bem claro que as respostas são pouco variáveis dentro de cada geração. A varia-

ção maior ocorreu dentro da geração F2, porém permaneceu dentro dos limites (3:1-9:7) propostos pelo modelo hipotético.

A partir dos resultados obtidos para os quatro conjuntos familiares estudados parece ser possível detectar alguns pontos importantes do controle genético da capacidade de indução de calos embriogênicos a partir de embriões imaturos de milho. Apesar da possibilidade de um coeficiente de variação alto, que parece ser próprio deste tipo de experimento, a variação observada para as quatro famílias genéticas parece ter permanecido dentro de limites mais ou menos definidos para cada híbrido ou retrocruzamento dentro de cada família e entre famílias neste experimento. Este fato assegurou a possibilidade de se estabelecer um modelo hipotético na tentativa de se explicar os resultados obtidos, modelo este que prevê uma flexibilidade de resposta própria do sistema genético envolvido. Experimentos posteriores envolvendo as linhagens utilizadas neste estudo e estendendo-se também para outras linhagens de milho, bem como o desenvolvimento de métodos mais precisos para a avaliação do estado fisiológico do embrião imaturo no momento de se iniciar a cultura, o conhecimento de marcadores bioquímicos para se quantificar a resposta de embriogênese dos calos induzidos e a avaliação da resposta dos diferentes genótipos a diferentes meios de cultura serão de grande importância para se compreender melhor o controle genético da capacidade de regeneração de plantas de milho "in vitro".

A melhor compreensão do controle genético para a indução de calos embriogênicos em cultura de tecidos de

milho permitirá, conseqüentemente, uma melhor compreensão do controle genético da diferenciação celular e da embriogênese nesta espécie. Esta é uma área ainda pouco desenvolvida para vegetais de um modo geral. Além disso, esclareceria muitos aspectos da relativa importância de reguladores de crescimentos exógenos em contraposição ao estado fisiológico das células ou tecidos do explante no processo de indução de calos e regeneração de plantas. Observações conflitantes em várias espécies têm sido feitas nesta área (WILLIAMS & MAHESHWARAN, 1986). Uma hipótese para se explicar a indução de embriogênese foi inicialmente proposta por SHARP *et al.* (1980) e posteriormente elaborada por EVANS *et al.* (1981) e SHARP *et al.* (1982). Foi sugerido que a embriogênese direta, ou seja, sem formação de calo, pode ocorrer a partir de células que já estariam pré-determinadas para o desenvolvimento embriogênico antes da cultura. Estas células requerem apenas reguladores de crescimento ou condições favoráveis para expressar a embriogênese. Em contraste, a embriogênese indireta, ou seja, com proliferação de calos, requer a rediferenciação de células já diferenciadas, proliferação de calos e o desenvolvimento de um estado embriogênico. Para estas células os reguladores de crescimento seriam necessários não apenas para a reiniciação da mitose, mas também para determinar o estágio embriogênico. Assim, segundo esses autores, o estado interno do explante seria de primeira importância na expressão da embriogênese somática. As outras condições, tais como os reguladores de crescimento exógenos, seriam simplesmente "permissivas" para a expressão desse padrão de desenvolvimento intrin-

sicamente determinado. O modelo hipotético proposto no presente trabalho para explicar o controle genético da indução de calos embriogênicos a partir de embriões imaturos de milho pressupõe não apenas um estado fisiológico, mas também genético do explante, como os fatores mais importantes para a determinação desta característica. O regulador de crescimento, no caso o 2,4-D, somente exercerá sua ação quando o estado genético-fisiológico das células do explante for apropriado. Assim, este modelo sugere que a determinação das condições internas do explante apropriadas para a expressão da embriogênese somática, é, em grande parte, também condicionada por fatores genéticos que apresentam herança bastante simples e efeitos aparentemente possíveis de serem avaliados em estudos posteriores. Talvez este controle genético proposto no presente trabalho se aplique a outros tecidos, além de embriões imaturos, que poderiam apresentar células em estado fisiológico adequado para a indução de calos embriogênicos. Recentemente, RHODES *et al.* (1986) contataram a existência de um controle genético para a indução de calos embriogênicos a partir de panícula jovem de milho. Esses autores utilizaram quatro linhagens homozigóticas e progênie F1 e obtiveram evidências de que genes nucleares com diferentes graus de dominância parecem estar envolvidos no controle desta característica. Os resultados sugerem que as respostas para a indução de calos embriogênicos a partir de panícula jovem e embrião imaturo está sob o mesmo controle genético.

5.4. Variação somaclonal

A variabilidade observada para as plantas regeneradas a partir de cultura de tecidos das três linhagens homozigóticas de milho incluiu variações genéticas e não genéticas. Pouco menos de 10% da variação obtida para os somaclones R0 foi transmitida aos descendentes. As razões para a redução da altura e feminilização das plantas regeneradas R0 não são muito claras. Observações semelhantes foram feitas por BRETTEL *et al.* (1980) e por GRACEN & EARLE (1985). Essas alterações não são genéticas, considerando-se que não foram transmitidas para as progênies R1 e R2. Do mesmo modo que o observado por GRACEN & EARLE, essas características ocorreram também em somaclones recuperados de calos Tipo I de culturas novas, portanto não deve ser consequência de exposição prolongada ao 2,4-D ou outro componente do meio. Comparações foram feitas por esses autores entre os somaclones da linhagem W182BN e 30 plantas recuperadas diretamente de embriões imaturos (1,5-2,0 mm) isolados e colocados para germinar em meio MS sem 2,4-D. Estas últimas apresentaram características semelhantes aos somaclones R0, no que se refere à altura e feminilização das plantas. O mesmo não ocorreu para plantas desenvolvidas a partir de sementes. Assim, é possível que fatores, tais como a germinação precoce do embrião imaturo, ausência de endosperma e componentes não-hormonais do meio de cultura possam estar envolvidos na determinação das alterações observadas para os somaclones R0.

Variantes genéticas encontrados em aproximadamente 10% do total de somaclones e incluiu características qualitativas, quantitativas e citoplasmáticas. Resultados semelhantes têm sido descritos para variação somaclonal em várias espécies vegetais (LARKIN *et al.*, 1985), incluindo-se o milho (EARLE & GRACEN, 1985; WILLIAMS & WINDHOLM, 1986; PRIOLI & SONDHAL, 1987). Mutantes morfológicos (braquítico e folhas enrugadas), com produção de grãos de pólen sem amido, para alterações na cor do endosperma e para alteração em um polipeptídeo de zeína segregaram como características aparentemente monogênicas. O mutante braquítico, condicionado por uma mutação recessiva, apresentou redução em todos os internódios e, aparentemente, não apresentou redução para o tamanho da espiga. Mutações espontâneas condicionando plantas braquíticas são bem conhecidas em milho (NEUFFER *et al.*, 1968). Testes de alelismo com mutantes já mapeados auxiliarão a melhor identificação desta variação somaclonal.

Mutantes com alterações para a enzima álcool desidrogenase podem apresentar enrugamento nas folhas de modo semelhante ao apresentado por indivíduos da progênie R1 e R2 do somaclone CT-338(Ast-1). Assim, avaliações eletroforéticas da enzima álcool desidrogenase deste somaclone serão interessantes em trabalhos de caracterização desta mutação. Em estudos recentes de variação somaclonal para álcool desidrogenase-1 em trigo, DAVIES (citado por LARKIN *et al.*, 1985) encontrou progênies de somaclones com alterações para esta enzima. As alterações encontradas parecem ter ocorrido como consequência de transloca-

ções e trocas de cromátides-irmãs. Mutação em um único par de bases do exon 6 do gene Adh-1 foi encontrada em um somaclone da linhagem de milho A188 (BRETTEL *et al.*, 1986). Esses autores não mencionaram alterações para a forma das folhas nesse somaclone.

Mutações genéticas condicionando grãos de pólen sem amido não têm sido descritas na literatura. Essa mutação recessiva, observada no somaclone CT-127 (Cat 100-1) parece ser responsável por um bloqueio na biossíntese de amido nos grãos de pólen, os quais possuem citoplasma e núcleo que puderam ser observados ao microscópio óptico. Aparentemente trata-se de um bloqueio a nível esporofítico, considerando-se que os grãos de pólen de indivíduos heterozigotos são 100% normais. Estudos bioquímicos de enzimas envolvidas na biossíntese de amido, associados a estudos ultraestruturais de tecidos esporofíticos e grãos de pólen deste somaclone contribuirão para uma melhor caracterização desta mutação e melhor compreensão do controle genético da biossíntese de amido nesses tecidos e células.

As três mutações para alteração de cor do endosperma comportaram-se como recessivas e, em dois casos, estavam correlacionadas com alterações na planta. O mutante que condiciona endosperma amarelo-limão e plantas albinas assemelham-se ao mutante lemon-white (*lw*) descrito na literatura. São conhecidos quatro mutantes *lw*, os quais já estão mapeados. Resultados de determinações de clorofila e carotenóides realizadas para o mutante *lw2*, em condições de alta e baixa intensidades luminosas (ROBERTSON *et al.*, 1978), foram semelhantes aos encon-

trados para o somaclone CT-45(Cat 100-1). A característica endosperma amarelo-limão correlacionada com a produção de plantas menos vigorosas e com secamento de folhas na época do florescimento também segregou como mutação monogênica recessiva. Considerando-se a possibilidade de que a cor amarelo-limão do endosperma seja resultante de algum bloqueio na síntese de carotenóides, determinação de pigmentos fotossintéticos e precursores destes pigmentos poderão fornecer informações importantes para a caracterização deste variante somaclonal. É bem conhecido que os carotenóides têm um papel de fundamental importância na proteção contra fotooxidação da clorofila (ANDERSON & ROBERTSON, 1960; FAULDI-DANIEL, 1975; MORELAND, 1980). Assim, é possível que as plantas provenientes de sementes amarelo-limão tenham alterações na biossíntese de pigmentos fotossintéticos, resultando em alterações no desenvolvimento. Um fato interessante foi a identificação desses dois mutantes apenas nas espigas das plantas R1, ou seja, nas sementes R2. As sementes R1 eram 100% normais. Além disso, a frequência das espigas segregantes não está de acordo com o esperado para uma mutação recessiva. Este resultado poderia ser obtido com a ocorrência de quimera no somaclone R0 ou indução da mutação na geração R1. Recuperação de mutantes em frequências muito baixas foi reportada por GRACEN & EARLE (1985). Estes mutantes geralmente apareciam nas gerações R1 ou R2, porém, ocasionalmente, se manifestaram em gerações mais avançadas (R3-R6).

Alterações no padrão de bandas de focalização isoelétrica de zeína foram encontradas para oito somaclones

da linhagem Cat 100-1. Estas alterações caracterizam-se pelo aumento de intensidade da banda 16 e desaparecimento ou redução da intensidade da banda 14. Alterações no padrão de bandas IEF representam alterações isoelétricas para os respectivos polipeptídeos. Assim, o polipeptídeo 14, mais rico em aminoácidos básicos, aparentemente sofreu uma alteração que provocou seu deslocamento para a mesma posição da banda 16. A análise de um grande número de linhagens de milho têm mostrado que o padrão de distribuição das bandas de zeína em IEF é específico para cada genótipo e, além disso, a heterogeneidade para zeína tem uma base genética (SOAVE *et al.*, 1978; OTTOBONI & STEFFENSEN, 1987). Quando linhagens com diferentes padrões de IEF para zeína são cruzadas, bandas individuais segregam de modo a indicar que cada uma é codificada por um único gene (SOAVE *et al.*, 1978; OTTOBONI & STEFFENSEN, 1987). Aparentemente, a segregação observada para o somaclone CT-390 (Cat 100-1) seguiu o modelo monogênico. Considerando-se o somaclone RO como heterozigoto para o polipeptídeo correspondente à banda 14, a sua autofecundação produziria quatro diferentes genótipos para o endosperma, que é triplóide. A segregação esperada para esses genótipos é 1:1:1:1. Denominando-se o gene que condiciona o polipeptídeo 14 como **A**, e o alterado para posição 16 como **A'**, temos: **AAA** --- , **AAA'** --- , **AA'A'** --- , e **A'A'A'** --- . Este foi o resultado obtido para as bandas de zeína de sementes do somaclone CT-390 (Cat 100-1), em proporções próximas do esperado. Portanto, a mutação encontrada para o polipeptídeo 14 se comportou como monogênica. Por outro lado, os somaclones que apresentaram ausência da banda 14 foram autofe-

cundados e outros com redução da intensidade da banda 14 foram cruzados com a linhagem Cat 100-1 original. Entretanto, nas avaliações de 7 sementes individuais dos outros somaclones não foi encontrada segregação para esta característica nos géis analisados. Análises de progênies desses somaclones poderão auxiliar o esclarecimento desta questão. Interessante ressaltar também que análises de zeína de numerosos genótipos em IEF têm mostrado que algumas bandas de zeína são muito estáveis, enquanto que outras, incluindo-se as mais básicas, são bastante variáveis. Estudos de cinco grupos de linhagens brasileiras, agrupadas de acordo com o grau de parentesco, mostraram que bandas mais básicas, correspondentes às de número 14 e 16 da linhagem Cat 100-1, encontram-se entre aquelas que geralmente apresentam alta frequência de variação (OTTOBONI & SILVA, dados não publicados). Assim parece que mesmo entre linhagens os genes para as bandas mais básicas têm uma maior susceptibilidade para alterações decorrentes de mutações genéticas. A baixa qualidade nutritiva das proteínas da semente do milho resulta do conteúdo de aminoácidos dos polipeptídeos e zeína, que possuem baixo teor de lisina e triptofano (NELSON, 1969). Esta família de polipeptídeos constitui aproximadamente 50% das proteínas de uma semente de milho. Assim, mutações genéticas que resultem na alteração da composição química de polipeptídeos de zeína são de grande interesse do ponto de vista genético e de melhoramento da qualidade nutritiva das proteínas do endosperma desta espécie.

Variantes aparentemente resultantes de mutações nucleares, com segregações que se desviaram muito do espe-

rado dentro dos modelos mendelianos de herança, foram também encontrados. Este fenômeno ocorreu para o mutante com folhas erectas, mutante estriado e para o somaclone CT-565(Cat 100-1) com esterilidade masculina. Maiores estudos se fazem necessários para que essas variações sejam esclarecidas.

A característica esterilidade masculina citoplasmática do somaclone CT-550(Cat 100-1) mostrou-se estável durante as três gerações analisadas. Em milho são conhecidos três principais grupos de esterilidade masculina citoplasmática que são denominados **C** (Charrua), **T** (Texas) e **S** (USDA). Eles diferem em vários pontos, incluindo-se a estabilidade em diferentes linhagens e ambientes, aspectos citológicos do aborto do pólen, restauração da fertilidade após cruzamentos com linhagens que possuem genes restauradores específicos e grau de resposta aos genes restauradores. É possível distinguir-se esses três grupos e, algumas vezes, sub-grupos através de análises de padrões de bandas de DNA mitocondrial tratado com enzimas de restrição (PRING & LEVINGS, 1978; LEAVER & GRAY, 1982). O tipo **S** pode ser reconhecido pela presença de dois epissomos (S-1 e S-2) mesmo em géis de DNA não tratado com endonucleases. Cruzamentos com linhagens que possuem genes restauradores também auxiliam a identificação dos grupos. Os resultados dos cruzamentos do somaclone CT-550(Cat 100-1) com as linhagens que restauram citoplasma **C** ou **T**, mostraram 100% de restauração em ambos os casos. Duas dessas linhagens restauram a fertilidade do citoplasma **T** ou **C**, da linhagem original Cat 100-1. Entretanto, o somaclone macho-estéril teve sua fertilidade restaurada por ambas as linha-

gens, ou seja, tanto pela que restaura **T** como pela que restaura **C**. Estes resultados sugerem que trata-se de um tipo ou sub-grupo de esterilidade masculina citoplasmática diferente daqueles já existentes nos estoques da linhagem Cat 100-1 do Banco de Germoplasmas. Cruzamentos com outras linhagens testadoras e estudos a nível molecular deverão auxiliar a identificação deste variante somaclonal. A esterilidade masculina citoplasmática representa uma característica de grande importância agrônômica, uma vez que evita o trabalho de despendoamento para a produção de híbridos de milho. Além disso, esta é uma das poucas características codificadas pelo DNA mitocondrial com fácil reconhecimento a nível fenotípico e que pode ser usada como marcador genético em trabalhos com esta organela. Portanto, novos variantes para esterilidade masculina citoplasmática têm interesse tanto do ponto de vista agrônômico, como genético-fisiológico e molecular. Um fato muito interessante a ser destacado é a constatação de que cruzamentos entre somaclones e a linhagem original podem resultar em híbridos com certo grau de heterose. Foi observado que os somaclones são, quase sempre, fenotipicamente semelhantes ou idênticos à linhagem original no que se refere às suas características fenotípicas básicas. Assim, é possível que esses somaclones não tenham sofrido alterações para um número de genes significativamente grande, comparado ao genoma como um todo. Portanto, esses somaclones, a linhagem original e os híbridos representam um material genético extremamente valioso para o estudo dos mecanismos genéticos e bioquímicos envolvidos na determinação da heterose. A utilização de técnicas de RFLP (Res-

triction Fragment Length Polymorphism) (BECKMAN & SOLLER, 1984) auxiliarão esses estudos no sentido de quantificar e identificar os genes alterados nesses genótipos e, portanto, responsáveis pela heterose observada. Além disso, a alta uniformidade desses somaclones e híbridos e a ocorrência de heterose, constituem resultados bastante promissores do ponto de vista de melhoramento, principalmente no que se refere à produção de linhagens-irmãs ("sister lines"). Essas linhagens são de grande interesse para a produção de híbridos de alta uniformidade. Portanto, a cultura de tecidos poderia ser recomendada como um método rápido e eficiente para a obtenção de sub-linhagens utilizadas na produção de linhagens irmãs e híbridos mais uniformemente produtivos.

GRACEN & EARLE (1985) reportaram variações para a capacidade de combinação de sub-linhagens derivadas de somaclones da linhagem de milho americana W182BN. Vários híbridos envolvendo essas novas linhagens apresentaram produtividade significativamente maior do que os híbridos envolvendo a linhagem original, em um experimento realizado em 1984. Somaclones das linhagens Cat 100-1, Cat 100-8, e Ast-1 estão sendo avaliados quanto à capacidade de combinação para produção de híbridos (SILVA & PRIOLI, dados não publicados).

Os resultados obtidos para variação somaclonal nas linhagens homozigóticas estudadas no presente trabalho sugerem que esta é uma excelente fonte de variabilidade para ser utilizada em trabalhos de genética básica e melhoramento. Características qualitativas, quantitativas e citoplasmáticas foram observadas entre os duzentos e três somaclones analisados.

Entre essas características encontram-se várias de interesse agrônomo, tais como esterilidade masculina citoplasmática, folhas erectas, mutante braquítico, alteração da cor do endosperma, alterações em polipeptídeos de zeína e alterações resultando em aumento de heterose. Variações genéticas para características agrônomicas importantes foram também reportadas por GRACEN & EARLE (1985). Esses autores observaram aumento de vigor, florescimento tardio, aumento e diminuição da altura da planta, perfilhamento acompanhado de aumento do número de espigas, folhas verdes mais escuras e indução e reversão de esterilidade masculina citoplasmática em somaclones da linhagem americana W182BN. Ocorrência de variação somaclonal para esterilidade masculina, diminuição do número de fileiras na espiga, alterações de cor no endosperma e diminuição da altura de plantas foram também observadas na linhagem FR27rhm, que é um derivado da linhagem B73 (WILLIAMS & WIDHOLM, 1986). Variantes somaclonais para altura de plantas, alterações em época de florescimento, aumento de vigor e esterilidade masculina foram obtidos para uma linhagem americana de milho pipoca (PRIOLI & SONDHAL, 1987). Assim, a variação somaclonal para características de interesse agrônomo tem sido observada em diferentes germoplasmas.

A taxa de mutação relativamente alta observada para as linhagens homozigóticas de milho utilizadas (aprox. 10%) e reportada na literatura (GRACEN & EARLE, 1985; WOODMAN & KRAMER, 1986; WILLIAMS & WIDHOLM, 1986; PRIOLI & SONDHAL, 1987), bem como a uniformidade dos somaclones no que se refere às características fenotípicas que caracterizam a linhagem, reforçam

a idéia de que a variação somaclonal representa uma fonte de variabilidade genética com grande potencial para programas de melhoramento. Através desta metodologia, variações genéticas nucleares e citoplasmáticas para apenas um loco ou um número relativamente pequeno de locos podem ser introduzidas e fixadas rapidamente em linhagens homozigóticas elites. Novas sub-linhagens derivadas de cultura de tecidos após seleção podem ser ainda mais modificadas e, conseqüentemente, ainda mais melhoradas através de sua reintrodução em cultura de tecidos. Como discutido por EVANS & SHARP (1986), a variação somaclonal pode ser uma fonte valiosa de germoplasma para se isolar genes específicos de interesse genético e/ou agronômico. Esses autores também se referem à possível utilização de somaclones e seus parentais para a comparação e identificação de mRNAs poderiam ser usados para preparar clones de cDNA para genes de interesse agronômico.

Assim, os resultados obtidos no presente trabalho, bem como os reportados na literatura para milho (EARLE & GRACEN, 1985; WOODMAN & KRAMER, 1986; PRIOLI & SONDAHL, 1987) e outras espécies (EVANS *et al.*, 1984; LARKIN *et al.*, 1985), mostram evidências que tornam a oportunidade de recuperação de mutações naturais e/ou induzidas pelo meio de cultura em genes nucleares e de organelas bastante atrativa para aplicações atuais e futuras em trabalhos básicos e de melhoramento.

Os recentes progressos para o desenvolvimento das metodologias de cultura "in vitro" de milho, incluindo-se os reportados no presente trabalho para diferentes genótipos, calos friáveis e cultura em suspensão, abrem novas perspectivas

para a aplicação desta metodologia visando a aquisição de conhecimentos nas áreas de genética básica, fisiológica e molecular, bem como para a aplicação prática desses conhecimentos em programas atuais e futuros melhoramentos desta espécie.

6. CONCLUSÕES

- Os resultados mostram claramente que existe um controle genético para a indução de calos embriogênicos a partir de embriões imaturos de milho, o que reforça algumas evidências descritas na literatura. Essa característica apresenta herança bastante simples e é, aparentemente, condicionada por dois locos independentes com interação e por um terceiro loco que estaria envolvido em um processo de inibição da expressão dos genes que condicionam a embriogênese somática. Esses fatores genéticos parecem determinar algumas condições internas no explante, apropriadas para responder ao meio e expressar a embriogênese somática. O envolvimento de pequeno número de genes condicionando a regeneração "in vitro" sugere ser possível a transferência desses genes em linhagens de difícil regeneração nas condições utilizadas.

- A frequência de mutação observada entre as plantas regeneradas a partir de cultura de tecidos de linhagens isogênicas de milho foi bastante alta (aprox. 10%), muito além da frequência de mutações espontâneas (aprox. $1 \cdot 10^{-6}$). Essas mutações ocorreram em características qualitativas, quantitativas e citoplasmáticas. A variação somaclonal encontrada tem importância tanto em estudos de genética básica, fisiológica e molecular, como para aplicação prática no melhoramento de plantas.
- As mutações genéticas nucleares e citoplasmáticas encontradas nos somaclones devem ter ocorrido em um número relativamente pequeno de locos, comparado ao genoma como um todo. Isso é evidenciado pela uniformidade das progênies dos somaclones, no que se refere às características fenotípicas que caracterizam a linhagem. Entretanto, a variação genética foi, em alguns casos, suficientemente grande para permitir a manifestação de heterose em cruzamentos de somaclones com a linhagem original. Desse modo, a variação somaclonal pode ser recomendada para a introdução e fixação de pequenas alterações genéticas, modificando características agronômicas importantes, em linhagens elites de milho, em um tempo relativamente curto, de 1-2 anos após a indução de calos "in vitro".

- A técnica de cultura de tecidos tem um grande potencial para a produção rápida de linhagens-irmãs ("sister lines") A' e A'', que são utilizadas na produção de híbridos mais uniformemente produtivos (A' x A'') x (B' x B''). Esta conclusão é dada pela observação de heterose em vários híbridos F1 provenientes de cruzamentos entre somaclones e a linhagem original. Este procedimento, sem dúvida, reduziria o custo de um híbrido simples.
- O sucesso obtido no presente trabalho para a seleção de calos embriogênicos friáveis e cultura de células em suspensão representa um grande avanço no desenvolvimento das técnicas de cultura "in vitro" desta espécie. A obtenção de linhagens de calos embriogênicos friáveis em genótipos de milho responsivos e recalcitrantes para esta característica abre novas perspectivas para trabalhos futuros envolvendo culturas de calos de longa duração, seleção de mutantes bioquímicos, cultura de células em suspensão e protoplastos.
- Os estudos histológicos e ultraestruturais dos calos friáveis de milho sugerem que a característica de friabilidade é devida à não maturação dos embriões somáticos enquanto em meio com 2,4-D, bem como a tendência desses embriões de permanecerem desconectados um do outro. A constatação de que apenas alguns genótipos têm facilidade para produzir este tipo de calo sugere um controle genético condicionando esta característica.

- A constatação de um controle genético para a determinação da embriogênese somática em condições de cultura "in vitro" abre novas perspectivas para estudos dos mecanismos genético-fisiológicos envolvidos na regulação dos processos de diferenciação celular e embriogênese.

7. RESUMO/ABSTRACT

Cultura de tecidos, controle genético da embriogênese somática e variação somaclonal em milho (*Zea mays* L.).

Trinta e quatro linhagens homozigóticas de milho foram avaliadas quanto à capacidade de regeneração de plantas "in vitro". A maioria dessas linhagens é originada a partir de três germoplasmas: Cateto, uma raça de milho flint adaptada à Costa Atlântica da região sul da América do Sul, Tux-

peño, uma raça de milho dente adaptada a baixas altitudes do Golfo do México e uma população de geração avançada de milho Tuxpeño x Teosinte. Foram realizados três experimentos independentes, iniciados em fevereiro e maio de 1985 e fevereiro de 1986. Embriões imaturos foram utilizados para a indução de calos em meio N6 suplementado com 2,4-D (2,5 μ M e 10 μ M) e sacarose (3% e 6%). Regeneração de plantas a partir de calos embriogênicos compactos (Tipo I) foi obtida para vinte linhagens. A frequência de indução de calos embriogênicos foi significativamente diferente entre os genótipos utilizados. As linhagens Cateto foram as que melhor responderam para a capacidade de regeneração em todos os experimentos. Diferenças significativas para efeito de época na frequência de produção de calos embriogênicos foram também encontradas. O meio contendo 2,4-D (10 μ M) e sacarose (6%) foi o melhor para a indução de calos embriogênicos compactos. Por outro lado, o meio contendo 2,4-D (10 μ M) e sacarose (3%) foi o mais adequado para a manutenção dos calos. Plântulas foram regeneradas a partir dos calos em meio sem 2,4-D, transferidas para vaso e, posteriormente, para o campo ou casa de vegetação. Calos embriogênicos friáveis (Tipo II) foram obtidos para cinco linhagens e mantidos em cultura, sem perder a capacidade de regeneração, por mais de dois anos. Diferenças quanto à morfologia, friabilidade, cor e capacidade de regeneração foram observadas entre esses calos. Estudos de microscopia óptica e eletrônica mostraram que os pró-embriões dos calos embriogênicos friáveis têm a tendência de não-maturação em meio contendo 2,4-D. Alta frequência de germinação de embriões somá-

ticos ocorreu em meio N6 contendo 6% de sacarose, em presença de luz. Culturas de células totipotentes em suspensão foram estabelecidas a partir de calos embriogênicos altamente friáveis de duas linhagens. Calos embriogênicos foram obtidos quando essas culturas foram plaqueadas em meio sólido N6 ou MS suplementado com 2,4-D. Regeneração de plantas foi obtida transferindo-se esses calos para meio sem 2,4-D.

A herança para a indução de calos embriogênicos a partir de embriões imaturos foi estudada em quatro famílias nas quais linhagens com e sem capacidade de regeneração foram utilizadas como parentais. Em três famílias a segregação da indução de calos embriogênicos foi bastante próxima do esperado para uma característica dominante condicionada por dois genes independentes com interação. A outra família apresentou segregação do tipo monogênica com recessividade para a capacidade de regeneração.

Variação genotípica foi encontrada em 10% de duzentos e três somaclones R1 e R2 de três linhagens homozigóticas. As características mais frequentes foram alterações na morfologia da planta (braquítico, folhas erectas e folhas enrugadas), esterilidade masculina citoplasmática e nuclear, deficiência em clorofila (albinismo e estriado), alterações para cor do endosperma (amarelo-claro e amarelo-limão), alterações em polipeptídeos de zeína e aumento de vigor.

O sucesso para o estabelecimento de calos embriogênicos friáveis e cultura de células totipotentes em suspensão em milho é, ainda, pouco frequente na literatura e repre-

senta em grande avanço no desenvolvimento das técnicas de cultura "in vitro" desta espécie. O controle genético para a indução de calos embriogênicos a partir de embriões imaturos de milho mostrou-se bastante simples, o que sugere ser possível a transferência desses genes em linhagens de difícil regeneração. A frequência das mutações genéticas observada entre as plantas regeneradas foi bastante alta. A variação somaclonal encontrada tem importância tanto em estudos de genética básica, fisiológica e molecular, como para aplicação prática no melhoramento de plantas. A variação somaclonal pode ser recomendada para a rápida introdução e fixação de pequenas alterações genéticas, modificando características agronômicas importantes em linhagens elites de milho. As técnicas de cultura de tecidos têm um grande potencial para a produção rápida de linhagens-irmãs para obtenção de híbridos mais uniformemente produtivos.

ABSTRACT. Tissue culture, genetic control of somatic embryogenesis and somaclonal variation in maize (Zea mays L.)

Thirty-four Brazilian maize inbred lines were tested for "in vitro" plant regeneration capacity. Most inbreds were derived from three gene pools: Cateto, a flint autochthonous race adapted to Southern Atlantic Coast of South America, Tuxpeño a dent race adapted to low altitude of Gulf of Mexico, and a Tuxpeño x Teosinte advanced generation population.

Three independent experiments, initiated in February 1985, May 1985, and February 1986 were made. Immature embryos were used for callus induction on N6 medium supplemented with 2,4-D (2,5 uM and 10 uM) and sucrose (3% and 6%). Plant regeneration from compact embryogenic callus (Type I) was obtained for twenty inbreds. Frequency of embryogenic callus induction was significantly different among the genotypes. The Cateto inbreds were the most responsive in yielding embryogenic callus in all experiments. Significant effect of growth seasons on the production frequency of embryogenic callus was also observed. The medium containing higher levels of 2,4-D (10 uM) and sucrose (6%) was the best for embryogenic callus (Type I) induction. On the other hand, the medium containing 2,4-D (10uM) and sucrose (3%) was the most appropriate for callus maintenance. Plantlets were obtained from embryogenic calli on medium without 2,4-D and transferred to greenhouse or to the field.

Embryogenic friable calli (Type II) were obtained for five maize inbreds and have been maintained in culture, with regeneration capacity, for more than two years. Differences in morphology, friability, color and somatic embryogenesis capacity were observed among these calli. High germination frequency of somatic embryos occurred on N6 medium containing 6% sucrose, in presence of light.

Totipotent cell suspension cultures were established from highly friable embryogenic calli of two inbreds. Cultures were placed in N6 or M5 solid medium containing 2,4-D (5uM or 10uM) for callus production. The calli were transferred to medium without 2,4-D for plant regeneration.

The inheritance of embryogenic callus induction from immature embryos was studied in four families using inbreds with and without regeneration capacity as parents. In three families the segregation of embryogenic callus induction was similar to the pattern expected for a dominant characteristic conditioned by two independent genes with interaction. The other family showed a monogenic segregation with recessivity for embryogenic callus induction.

Genotypic variation was found among two-hundred and three regenerated plants from Type I and Type II callus of inbreds Cat 100-1 and Cat 100-8, and Type I callus of inbred Ast-1. The most frequent traits occurring among R1 and R2 progenies of somaclones were alterations in plant morphology (brachytic; erect leaves; wrinkle leaves), nuclear and cytoplasmic male sterility, chlorophyll deficiency (albino and striped), endosperm color changes (light-yellow and lemon), alterations of zein polypeptides, as analysed by isoelectrical focusing, and increased vigor and earliness.

The success for the establishment of embryogenic friable callus and totipotent cell suspension culture in maize is rare in the literature and represents an important step for the development of "in vitro" culture techniques in this species. The genetic control for embryogenic callus induction from immature embryos of maize is very simple and suggests that the transference of these genes to recalcitrant genotypes is possible. The genotypic variation frequency found among regenerated plants was relatively high. The somaclonal variation

observed is important for genetics and breeding. Somaclonal variation can be recommended for rapid introduction and fixation of small genetics alterations, to modify agronomic characteristics in elite maize inbreds. The tissue culture techniques could also be used for rapid production of sister lines to obtain hybrids more uniformly productives.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDULLAH, R., THOMPSON, J.A., WARBURTON, J., and COCKING, E.C. 1986. Somatic embryogenesis of protoplast-derived callus of rice (*Oriza sativa*). In: VI International Congress of Plant, Tissue and Cell Culture-Abstracts. (D.A. Somers et al., eds.) University of Minnesota, USA . pp. 54.
- ABE, T., and FUTSUHARA, Y. 1985. Efficient plant regeneration by somatic embryogenesis from root callus tissues of rice (*Oriza sativa* L.). *J. Plant Physiol.* 121:111-118.
- ABE, T. and FUTSUHARA, Y. 1986. Genotypic variation for callus formation and plant regeneration in rice (*Oriza sativa* L.) *Theor. Appl. Genet.* 72:3-10.
- AGUIAR-PERECIN, M.L.R. 1979. Estudo dos cromossomos somáticos de milho (*Zea mays* L.) e de suas regiões heterocromáticas. Tese Livre-Docente, ESALQ/USP.
- AGUIAR-PERECIN, M.L.R. e FLUMINHAN Jr., A. 1985. Embriogênese somática a partir de calos de diversos tipos de explantes de milho. *Ciência e Cultura* (supl.) 37:719.
- AGUIAR-PERECIN, M.L.R. e FLUMINHAN Jr., A. 1987. Regeneração de plantas "in vitro" de diferentes variedades de milho e avaliação de sua estabilidade cromossômica. Anais do 5º Encontro de Geneticistas Paulistas. Sociedade Brasileira de Genética, Piracicaba, pp. 32.
- ABELES, F.B. 1973. Ethylene in Plant Biology. Academic Press, New York. pp. 302.

- AMMIRATO, P.V. 1974. The effects of abscisic acid on the development of somatic embryos from cells of caraway (*Carum carvi* L.). *Bot. Gaz.* 135:328-337
- AMMIRATO, P.V. 1985. Patterns of development in culture. In: *Tissue Culture in Forestry and Agriculture*. (R.R. Henke et al eds.) Plenum Press, N.York. pp. 9-29.
- AMMIRATO, P.V. and STEWARD, F.C. 1971. Some effects of the environment on the development of embryos from cultured free cells. *Bot. Gaz.* 132:149-158.
- ANDERSON, I.C., and ROBERTSON, D.S. 1960. Role of carotenoides in protecting chlorophyll from photodestruction. *Plant Physiol.* 35:531:534.
- ANDERSON; P.C., and GEORGESON, M. 1986. Selection of an imidazolinone tolerant mutant of corn. VI International Congress of Plant Tissue and Cell Culture-Abstracts. (D.A. Somers et al., eds.) University of Minnesota, USA. pp.437.
- ARMSTRONG, C.L., and GREEN, C.E. 1985. Establishment and maintenance of friable, embryogenic maize callus and the involvement of L-proline. *Planta* 164:207-214.
- ARNON, D.I. 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol.* 24:1-15.
- AZEVEDO, R.A. e ARRUDA, P. 1985. Identificação do gene LTr-19 em milho através de cromatografia de extratos de anteras. *Ciência e Cultura* (suplemento) 37(7):752.
- AZEVEDO, R.A. e ARRUDA, P. 1987. Seleção de calos e plantas resistentes a aminoetilcictetina. II Simpósio da Associação Brasileira de Cultura de Tecidos de Plantas/Sociedade Botânica do Brasil. USP. pp. 10.
- BANDURSKI, R.S., and NONHEBEL, H.M. 1984. Auxins. In: *Advanced Plant Physiology* (Wilkins, M.B., ed.). Pitman Publishing Inc. London. pp. 1-20.
- BECKERT, M., and QING, C.M. 1984. Results of a diallel trial and a breeding experiment for in vitro aptitude in maize. *Theor. Appl. Genet.* 68:247-251.
- BECKMAN, I.S., and SOLLER, M. 1984. Restriction fragment length polymorphisms in genetic improvement: Metodologies, Mapping and costs. *Theor. Appl. Genet.* 67:35-43.
- BENZION, G., PHILLIPS, R.L., and RINES, H.W. 1986. Case histories of genetic variability "in vitro": Oats and maize. In: *Plant Regeneration and Genetic Variability*. (I.K. VASIL, ed.) Academic Press, N.York (in press).

- BEYER Jr., E.M., MORGAN, P.W., and YANG, S.F. 1984. Ethylene. In: Advanced Plant Physiol. (M.B. WILKINS, ed.). Pitman Publishing, Inc. pp. 11-126.
- BOTTL, C., and VASIL, I.K. 1984. The ontogeny of somatic embryos of Pennisetum americanum (L.) K. Schum. II. In immature inflorescences. Can.J.Bot. 62:1629-1635.
- BOYES, C.J., and VASIL, I.K.. 1984. Plant regeneration by somatic embryogenesis from cultured young inflorescences of Sorghum arundinaceum (Desv.) Stapf. var. sunadense (Sudan grass). Plant Sci. Lett. 35: 153-157.
- BRAR, D.S., RAMBOLD, S., GAMBORG, O.L., and CONSTABEL, F.. 1979. Tissue culture of corn and Sorghum. Z. Pflanzenphysiol. 95:377-338.
- BRETTEL, R.I.S., DENNIS, E.S., SCOWCROFT, W.R., and PEACOCK, W.J. 1986. Molecular analysis of a somaclonal mutant of maize alcohol dehydrogenase. Molec. Gen. Genet. 202:235-239.
- BRETTEL, R.I.S., THOMAS, R., and INGRAM, D.S. 1980. Reversion of texas male-sterile cytoplasm maize in culture to give fertile T-toxin resistant plants. Theor. Appl. Genet. 58:55-58.
- BROERTJES, C., and KEEN, A. 1980. Adventitious shoots: Do they develop from one cell ? Euphytica 29:73-87.
- BROWN, P.T.H., and LORZ, H. 1986. Methylation changes in the progeny of tissue culture derived plants. In: VI International Congress of Plant Tissue and Cell Culture Abstracts. University of Minnesota, USA. p.261.
- BURROWS, M.T. and CARREL, A. 1912. On the permanent life of tissues outside of the organism. J.Exp.Med. 15:516-528.
- CHALLEF, R.S., and MAUVAIS, C.J. 1984. Acetolactate synthase is the site of action of two sulfonylurea herbicides in higher plants. Science 224:1443-1445.
- CHOUREY, P.S., and ZURAWSKI, D.B. 1981. Callus formation from protoplasts of a maize cell culture. Theor. Appl. Genet. 59:341-344.
- CHU, C.C., WANG, C.G., SUN, C.S., HSU, C., YIN, K.C., CHU, C.Y. 1975. Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on nitrogen sources. Sci.Sin. 16:659-688.
- COCKING, E.C. 1978. Protoplast culture and somatic hybridization. In: Proceedings of Symposium on Plant Tissue Culture. Science Press, Pekin. pp. 255-263.
- CONGER, B.V., HANNING, G.E., GRAY, D.J., and McDANIEL, J.K. 1983. Direct embryogenesis from mesophyll cells of orchard-

- grass. *Science* 221:850-851.
- CONSTABEL, F. 1984. Callus culture: Induction and maintenance. In: *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants* (I.K. VASIL ed.) Vol. 1. Academic Press, N.Y. pp. 27-35.
- COOPER, D.B., SEARS, R.G., LOOKHART, G.L., and JONES, B.L. 1986. Heritable somaclonal variation in gliadin proteins of wheat plants derived from immature embryo callus culture. *Theor. Appl. Genet.* 71:784-790.
- CORTELAZZO, A.L. e VIDAL, B.C. 1983. Cariograma e nucleograma em *Zea mays*. *Ciência e Cultura* (Supl.) 35(7):600.
- DALE, P.J. 1983. Protoplast culture and plant regeneration of cereals and other recalcitrant crops. *Experientia Suppl.* 46:31-41.
- D'AMATO, F. 1977. Cytogenetics of differentiation in Tissue and cell culture. In: *Applied and Fundamental Aspects of Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. (J. Reinherth and Y.P.S. Bajaj, eds.). Springer, N.York. pp. 343-357.
- D'AMATO, F. 1978. Chromosome number variation in cultured cells and regenerated plants. In: *Frontiers of Plant Tissue Culture* (T.A. Thorpe, ed.). IAPTC/University of Calgary, Calgary. pp.
- D'AMATO, F. 1986. Spontaneous mutations and somaclonal variation. In: *Nuclear Techniques and In Vitro Culture for Plant Improvement*. Proceedings of an International Symposium on Nuclear Techniques and In Vitro Culture for Plant Improvement. International Atomic Energy Agency, Vienna pp. 3-9.
- DAVIES, B.H. 1976. Carotenoids. In: *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments* (T.W. GOODWIN ed.) Vol.II. 2a.ed. Academic Press, New York, London, pp. 38-165.
- DE PAEPE, R., BLETON, D., and GNANGBE, F. 1981. Basis and extent of genetic variability among doubled haploid plants obtained by pollen culture in *Nicotiana glauca*. *Theor. Appl. Genet.* 59:177-184.
- DIEDRICH, T. 1984. PhD Thesis-University of Minnesota.
- DOHRMAN, R., HERTEL, R., and KOWALIK, H. 1978. Properties of auxin binding sites in different subcellular fractions from maize coleoptiles. *Planta* 140:97-106.
- DUNCAN, D.R., WILLIAMS, M.E., ZEHR, B.E., and WIDHOLM, J.M. 1985. The production of callus capable of plant regeneration from immature embryos of numerous *Zea mays* genotypes. *Planta* 165:322-332.
- DUNSTAN, D.I., SHORT, K.C., MERICK, M.A., and COLLIN, H.A. 1982. Origin and early growth of celery embryoids. *New Phytol.*

91:121-128.

- DUNSTAN, D.I., SHORT, K.C., and THOMAS, E. 1978. The anatomy of secondary morphogenesis in cultured scutellum tissues of *Sorghum bicolor*. *Protoplasma* 97:251-260.
- EARLE, D.E., and GRACEN, V.E. 1985. Somaclonal variation in progeny of plants corn tissue cultures. In: *Tissue Culture in Forestry and Agriculture* (R.R. Henke et al, eds). Plenum Press, N.York. pp. 139-152.
- EDALLO, S. ZUCCHINALI, C., PERENZIN, M., and SALAMINI, F. 1981. Chromosomal variation and frequency of spontaneous mutation associated with "in vitro" culture and plant regeneration in maize. *Maydica* 26:39-56.
- ENGLER, D.E., and GROGAN, R.G. 1984. Variation in lettuce plants regenerated from protoplasts. *J.Hered.* 75:426-430.
- EVANS, D.A., BRAVO, J.E., KUT, S.A., and FLICK, C.E. 1983. Genetic behavior of somatic hybrids in the gems *Nicotiana*: *N. glauca* + *N. tabacum* and *N. sylvestris* + *tabacum* *Theor. Appl. Genet.* 65:93-101.
- EVANS, D.A., and SHARP, W.R. 1983. Single gene mutations in tomato plants regenerated from tissue culture. *Science* 221: 949-951.
- EVANS, D.A., and SHARP, W.R. 1986. Applications of somaclonal variation. *Bio/technology* 4:528-532.
- EVANS, D.A., SHARP, W.R., and FLICK, C.E. 1981. Growth and behavior of cell cultures. Embryogenesis and Organogenesis. In: *Plant Tissue Culture: Methods and Applications in Agriculture*. (T.A. THORPE, ed.). Proceedings of UNESCO Symposium, São Paulo, Brazil, 1978. Academic Press, N. York.
- EVANS, D.A., SHARP, W.R., and MEDINA-FILHO, H.P. 1984. Somaclonal and gametoclonal variation. *Amer.J.Bot.* 71(6):759-774.
- FAHEY, J.W., REED, J.N., READDY, T.L., and PACE, G.M. 1986. Somatic embryogenesis from three commercially important inbreds of *Zea mays*. *Plant Cell Reports* 5:35-38.
- FALUDI-DANIEL, A. 1975. Pigment synthesis and photosynthetic activity in carotenoid deficient mutants in maize. In: *Genetics aspects of Photosynthesis*. (Yu. E. NASYROV and A. SESTAK, eds). Dr. Junk: pp. 239-245.
- FEDTKE, C. 1982. *Biochemistry and Physiology of Herbicide Action*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- FLADUNG, M., and HESSELBACH, J. 1986. Callus induction and plant regeneration in *Panicum bisulcatum* and *Panicum milioides*. *Plant Cell Reports* 3:169-173.

- FLUMINHAN Jr., A e AGUIAR-PERECIN, M.L.R. 1986. Avaliação da regeneração de plantas "in vitro" de algumas variedades de milho (*Zea mays* L.) *Ciência e Cultura* (Supl.) 38:929.
- FUJIMURA, T., SAKURAI, M., AKAGI, H., NEGISHI, T., and HIROSE, A. 1986. Regeneration of rice plants from protoplasts. In: *VI International Congress of Plant, Tissue and Cell Culture-Abstracts* (D.A. Somers et al eds.) University of Minnesota, USA. pp. 161.
- FUKUDA, H., and KOMAMINE, A. 1980. Establishment of an experimental system for the study of tracheary element differentiation from single cells isolated from the mesophyll of *Zinnia elegans*. *Plant Physiol.* 65:57-60.
- FUKUDA, H., and KOMAMINE, A. 1983. Changes in the synthesis of RNA and protein during tracheary element differentiation in single cells isolated from the mesophyll of *Zinnia elegans*. *Plant Cell Physiol.* 24:609-614.
- FUKUDA, H., and KOMAMINE, A. 1985. Cytodifferentiation. In: *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*. (I.K. Vasil ed.) Vol.2. Academic Press, N.York pp. 150-212.
- GAMBORG, O.L., and EVELEIGH, D.E. 1968. Culture methods and detection of glucanases in suspension cultures of wheat and barley. *Can. J. Biochem.* 46:417-421.
- GAMBORG, O.L., MILLER, R.A., OJIMA, K. (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.* 50:151-158.
- GAUTHERET, R.J. 1939. Sur la possibilité de réaliser la culture indéfinie des tissus de tubercules de carotte. *C.R. Hebd. Seances Acad. Sc.* 208:118-120.
- GAUTHERET, R.J. 1985. History of plant tissue and cell culture: A personal account. In: *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*. (I.K. Vasil ed.) Vol.2. Academic Press, N.Y. pp. 2-59.
- GENGENBACH, B.G., CONNELLY, J.A., PRING, D.R., and CONDE, M.F. 1981. Mitochondrial DNA variation in maize plants regenerated during tissue culture selection. *Theor. Appl. Genet.* 59:161-167
- GENGENBACH, B.G., GREEN, C.E., and DONAVAN, C.M. 1977. Inheritance of selected pathotoxin resistance in maize plants regenerated from cell cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 74:5113-5117.
- GENOVESI, A.D., and MAGILL, C.W. 1982. Embryogenesis in callus derived from rice micropores. *Plant Cell Reports.* 1:257-260.

- GOBEL, E., BROWN, P.T.H., and LORZ, H. 1986. In vitro culture of *Zea mays* L. and analysis of regenerated plants. In: Nuclear Techniques and In Vitro Culture for Plant Improvement. Proceeding of IAEA-SM Proceedings. Vienna pp. 21-27.
- GOBEL, E., and LORZ, H. 1986. Somaclonal variation in tissue culture derived maize plants and their selfed progeny. In: VI International Congress of Plant Tissue and Cell Culture Abstracts. University of Minnesota, USA. pp.
- GRACEN, V.E., and EARLE, E.D., 1985. Somaclonal variation in progeny of plants from corn tissue culture. 21st Annual Meeting of Illinois corn Breeders School, March 5,6. University of Illinois, USA.
- GREEN, C.E. 1977. Prospects for crop improvement in the field of cell culture. Hortscience 12(2):7-131-134.
- GREEN, C.E. 1978. In vitro plant regeneration in cereals and grasses. In: Frontiers of Plant Tissue Culture. (T.A. Thorpe ed.). University of Calgary Press, Calgary. pp. 411-418.
- GREEN, C.E. 1978, Cell and tissue culture of maize. In: Maize Breeding and Genetics. (D.B. Walden). John Wiley & Sons, Inc. N. York. pp. 495-515.
- GREEN, C.E. 1982. Somatic embryogenesis and plant regeneration from friable callus cultures of maize. In: Tissue Culture 1982. (A. Fujiwara ed.). Maruzen, Tokyo. pp. 107-108.
- GREEN, C.E., ARMSTRONG, C.L. and ANDERSON, P.C. 1983. Somatic cell genetic systems in corn. In: Advances in Gene Technology: Molecular Genetics of Plants and Animals (K. Downey et al., eds.) Academic Press, New York. pp. 147-157.
- GREEN, C.E. and PHILLIPS, R.L. 1975. Plant regeneration from tissue culture of maize. Crop Sci. 15:417-421.
- GREEN, C. E. and RHODES, C.A. 1982. Plant regeneration in tissue cultures of maize. In: Maize for Biological Research. (W.F. Sheridan ed.). Plant Molecular Biology Association. University Press, N. pp. 367-372.
- GROOSE, R.W., and BINGHAM, E.T. 1986a. An unstable anthocyanin mutation recovered from tissue culture of alfalfa (Medicago sativa). L. High frequency of reversion upon reculture. Plant Cell Report. 5:104-107.
- GROOSE, R., and BINGHAM, E.T. 1986b. An unstable anthocyanin mutation recovered from tissue culture of alfalfa (Medicago sativa). Plant Cell Report. 5:108-110.
- HACCIUS, B. 1978. Question of unicellular origin of non-zigotic embryos in callus cultures. Phytomorphology. 28:74-81.

- HALPERIN, W. 1966. Alternative morphogenetic events in cell suspensions. *Am. J. Bot.* 53:443-453.
- HALPERIN, W., and WETHERELL, D.F. 1964. Adventive embryony in tissue cultures of the wild carrot, *Daucus carrot*. *Am. J. Bot.* 51:274-283.
- HARMS, C.T., LORZ, H., and POTRYKUS, I. 1976. Regeneration of plantlets from callus cultures of *Zea mays* L. *Z. Pflanzenzuchtg.* 22:347-351.
- HARMS, C.T. 1982. Maize and cereal protoplasts-Facts and perspectives. In: *Maize for Biological Research*. (W.F. Sheridan, ed.). Plant Molecular Biology Association. University Press, ND. pp. 367-372.
- HARTMAN, C.L., KNOUS, T.R., and MCCOY, T.J. 1984. Field testing and preliminary progeny evaluation of alfalfa regenerated from cell lines resistant to the toxins produced by *Fusarium oxysporum* F.S.P. *Medicinalings. Phytopath.* 74:818.
- HATZIOS, K.K., and PENNER, D. 1982. Metabolism of herbicides in higher plants - CEPCO Division Burgess Publishing Co., Minneapolis, Minnesota.
- HAYDU, Z., and VASIL, I.K. 1981. Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf tissues and anthers of *Pennisetum purpureum* Schum. *Theor. Appl. Genet.* 59: 269-273.
- HIBBERD, K.A. 1984. Induction, selection and characterization of mutants in maize cell cultures. In: *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*. vol.1. (I.K.Vasil, ed.). Academic Press, N. York. pp. 152-158.
- HIBBERD, K.A., BARKER, M., ANDERSON, P.C., and LINDER, L. 1986. Selections for high tryptophan maize. *VI International Congress of Plant Tissue and Cell Culture*. University of Minnesota, USA. pp. 440.
- HIBBERD, K.A., and GREEN, C.E. 1982. Inheritance and expression of lysine plus threonine resistance selected in maize tissue. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* . 79: 559-563.
- HIBBERD, K.A., WALTER, T., GREEN, C.E., and GENGENBACK, B.G. 1980. Selection and characterization of a feedback-insensitive tissue culture of maize. *Planta* 148: 183-187.
- HO, W., and VASIL, I.K. 1983. Somatic embryogenesis in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). I. The morphology and physiology of callus formation and the ontogeny of somatic embryos. *Protoplasma* 118: 169-180.
- HODGES, T.K., KAMO, K.K., BECWAR, M.R. and SCHROLL, S. 1985. Regeneration of maize. In: *Biotechnology in Plant Science: Relevance to Agriculture in the Eighties* (M. ZAITLIN et al., eds.) Academic Press, New York. pp. 15-33.

- HODGES, T.K., KAMO, K.K., IMBRIE, C., and BECWAR, M.R. 1986. Genotype specificity of somatic embryogenesis and regeneration in maize. *Bio/Technology* 4:219-223.
- HORGAN, R. 1984 Cytokinins. In: *Advanced Plant Physiology* (M.B. WILKINS, ed.). Pitman Publishing, Inc. pp. 53-75.
- IMBRIE-MILLIGAN & HODGES, T.K. 1986. Microcallus formation from maize protoplasts prepared from embryogenic callus. *Planta* 168:395-401.
- IZHAR, S., and POWER, J.B. 1977. Genetical studies with petunia leaf protoplasts. I. Genetic variation to specific growth hormones and possible genetic control on stages of protoplast development in culture. *Plant Sci. Letters* 8:375-383.
- JONES R.L., and MACMILLAN, J. 1984. Gibberellins. In: *Advanced Plant Physiology* (M.B. WILKINS, ed.). Pitman Publishing, Inc. pp. 21-52.
- KAMO, K.K., and HODGES, T.K. 1986. Establishment and characterization of long-term embryogenic maize callus and cell suspension cultures. *Plant Science* 45: 111-117.
- KARNOVSKY, M.J. 1967. The ultrastructural basis of capillary permeability studied with peroxidase as a tracer. *J. Cell. Biol.* 35: 213-236.
- KARP, A., and MADDOCK, S.E. 1984. Chromosome variation in wheat plants regenerated from cultured immature embryos. *Theor. Appl. Genet.* 67:249-255.
- KEMBLE, R.J., and SHEPPARD, J.F. 1984. Cytoplasmic DNA variation in a potato protoclinal population. *Theor. Appl. Genet.* 69: 211-216.
- KENDE, A., and GARDNER, G. 1976. Hormone binding in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 27: 267-290.
- KEYES, G.J., and BINGHAM, E.T. 1979. Heterosis and ploidy effects on the growth of alfalfa callus. *Crop. Sci.* 19:473-476.
- KING, P.J. (1980). Cell proliferation and growth in suspension culture. *Int. Rev. Cytol. Suppl.* 11: 25-53.
- KING, P.J., POTRYKUS, I., and THOMAS, S. 1978, In vitro genetics of cereals. Problems and perspectives *Physiol. Veg.* 16: 381-399.
- KINJO, S. e ARRUDA, P. 1987. Resistência a lisina e treonina em calos embriogênicos de milho (*Zea mays* L.). II Simpósio da Associação Brasileira de Cultura de Tecidos de Plantas/Sociedade Botânica do Brasil. USP. pp.7.

- KOEL, F., and HAAGEN-SMIT, A.J. 1931. Uber die chemie des wuchsstoffs, K. Akod. Wetenschap. Amsterdam. Proc. Sect. Sci. 34:1411-1416.
- KONAR, R.N., THOMAS, E., and STREET, H.E. 1972. The diversity of morphogenesis in suspension cultures of *Atropa belladonna* L. Ann. Bot. 36:249-258.
- LAEMMLI, V.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227:680.
- LANDSMANN, J., and VHRIG, H. 1985. Somaclonal variation in *Solanum tuberosum* detected at the molecular level. Theor. Appl. Genet. 71:500-505.
- LAPITAN, N.L.V., SEARS, R.G., and GILL, B.S. 1984. Translocations and other kariotypic structural changes in wheat x rye hybrids regenerated from tissue culture. Theor. Appl. Genet. 68: 547-
- LARKIN, P.J., BRETTELL, R.I.S., RYAN, S.S.A., DAVIES, P.A., PALLOTA, M.A., and SCOWCROFT, W.R. 1985. Somaclonal variation: Impact on Plant Biology and Breeding strategies. In: Biotechnology in Plant Science (M.Zaitlin et al., eds). Academic Press, N.Y. pp 83-101.
- LARKIN, P.J., RYAN, S.A., BRETTELL, R.I.S., and SCOWCROFT, W.R. 1984. Heritable somaclonal variation in wheat. Theor. Appl. Genet. 67: 443-445.
- LARKIN, P.J., and SCOWCROFT, W.R. 1981. Somaclonal variation - a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. Theor. Appl. Genet. 60:197-214.
- LA RUE, C.D. 1947. Growth and regeneration of the endosperm of maize in culture. Am. J. Bot. 34: 585-586.
- LA RUE, C.D. 1949. Culture of the endosperm of maize. Am. J. Bot. 36: 798.
- LEAVER, C.J., and GRAY, M.W. 1982. Mitochondrial genome organization and expression in higher plants. Ann. Rev. Plant Physiol. 33:373-402.
- LETHAM, D.S., SHANNON, J.C., and MACDONALD, I.R.C. 1964. The structure of zeatin, a (kinetin-like) factor inducing cell division. Proc. Chem. Soc. London 230:1.
- LIEBERMAN, M., and MAPSON, L.W. 1964. Genesis and biogenesis of ethylene. Nature 204:343-345.
- LORZ, H., BRETTELL, R.I.S., and POTRYKUS, I. 1981. Protoplast culture of *Pennisetum americanum*. XIII Int. Bot. Congr. (Poster Section 12), Sydney, Australia.

- LORZ, H., and SCOWCROFT, W.R. 1983. Variability among plants and their progeny regenerated from protoplasts of Su/su heterozygotes of *Nicotiana tabacum*. *Theor. Appl. Genet.* 66: 67-75.
- LOWE, K., D.B. TAYLOR, P. RYAN, and K.E. PATERSON. 1985. Plant regeneration via organogenesis and embryogenesis in the maize inbred line B73. *Plant Sci.* 41:125-132.
- LU, C.V. VASIL, and I.K. VASIL. 1983. Improved efficiency of somatic embryogenesis and plant regeneration in tissue cultures of maize (*Zea mays* L). *Theor. Appl. Genet.* 66:285-289.
- LU, C. and VASIL, I.K., 1981a. Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf tissues of *Panicum maximum* Jacq. *Theor. Appl. Genet.* 59: 275-280.
- LU, C., and VASIL, I.K. 1981b. Somatic embryogenesis and plant regeneration from freely suspended cells and cell groups of *Panicum maximum* in vitro. *Ann. Bot.* 47:543-548.
- LU, C., VASIL, I.K., and OZIAS-AKINS, P. 1982. Somatic embryogenesis in *Zea mays* L. *Theor. Appl. Genet.* 62:109-112.
- LU, C., VASIL, V. and VASIL, I.K. 1981. Isolation and culture of protoplasts of *Panicum maximum* Jacq. (Guineas grass): Somatic embryogenesis and plantlet formation. *Z. Pflanzenphysiol.* 104: 311-318.
- LUDWIG, S.R., SOMERS, D.A., PETERSEN, W.L., POHLMAN, R.F., ZAROWITS, M.A., GENGENBACH, B.G., and MESSING, J. 1985. High frequency callus formation from maize protoplasts. *Theor. Appl. Genet.* 71:344-350.
- LUNDDEN, P., and CARLSON, P.S. 1980. Use of Plant Cell Cultures in Biochemistry. In: *The Biochemistry of Plants. Vol.1. The Plant Cell.* (N.E. TOLBERT, ed.). Academic Press, N. York, pp.55-90.
- MADDOCK, S.E., LANCASTER, V.A., RISSIOTT, R., and FRANKLIN, R. 1983. Plant regeneration from cultured immature embryos and inflorescences of 25 cultivars of wheat (*Triticum aestivum*). *J. Exp. Bot.* 34:915-926.
- MAXWELL, D.P., ARMENTROUT, V.N., and GRAVES, Jr., L.B. 1977. Microbodies in plant pathogenic fungi. *Annu. Rev. Phytopathol.* 15:119-134.
- MCCOY, T.J., and PHILLIPS, R.L. 1982. Chromosomal instability in maize (*Zea mays* L.) tissue cultures and sectoring in some regenerated plants. *Can. J. Genet. Cytol.* 24:59-565.
- MCCOY, T.J., PHILLIPS, R.L., and RINES, H.W. 1982. Cytogenetic analysis of plants regenerated from oat (*Avena sativa*) tissue cultures. High frequency of partial chromosome loss. *Can. J. Genet. Cytol.* 24:37-50.

- MCCORMICK, S. 1980. Friable maize callus and suspension cultures using IAA-amino acid conjugates. Maize Genet. Coop. News Lett. 54:45-46.
- McHUGHEN, A., and SWARTZ, M. 1984. Tissue culture derived salt-tolerant line of flax (Linum usitatissimum). J. Plant Physiol. 117:109.
- McNAY, J.W., CHOUREY, P.S., and PRING, D.R. 1984. Molecular analysis of genomic stability of mitochondrial DNA in tissue cultured cells of maize. Theor. Appl. Genet. 67:433-437.
- McWILLIAM, A.A., SMITH, S.M., and STREET, H.E. 1974. The origin and development of embryoids in suspension cultures of carrot (Daucus carota). Ann. Bot. 38: 243-250.
- MIAH, M.A.A., EARLE, E.D., and KHUSH, G.S. 1985. Inheritance of callus formation ability in anther cultures of rice Oryza sativa L. Theor. Appl. Genet. 70:113-116.
- MINOCHA, S.C., and HALPERIN, W. 1974. Hormones and metabolites which control tracheid differentiation, with or without concomitant effects on growth, in cultured tuber tissue of Helianthus tuberosus L. Planta 116: 319-331.
- MILBORROW, B.V. 1984. Inhibitors. In: Advanced Plant Physiol. (M.B.WILKINS, ed.). Pitman Publishing, Inc. pp 76-110.
- MILLER, C.O. 1963. Kinetin and kinetin like compounds. In: Modern Methods of Plant Analysis. (H.F.Linskens, ed.). Vol.6. Springer - Verlag, Berlin. pp. 194-202.
- MILLER, C.O.; SKOOG, F.; OKOMURA, F.S.; SALTZA, M.H. von, and STRONG, F.M. 1956. Isolation, structure and synthesis of kinetin, a substance promoting cell division. J. Am. Chem. Soc. 78:1345-1350.
- MIZUNO, K., KOMAMINE, A., and SHIMOKORIYAMA, M. 1971. Vessel element formation in cultured carrot-root phloem. Plant Cell Physiol. 12:823-830.
- MOLLENHAUER, H.H. 1964. Plastic embedding mixture for use in electron microscopy. Stain Technol. 39: 111-114.
- MOLNAR, S.J., GORDON, P.N., and RICE, T.B. 1980. Initiation of totipotent tissue cultures from underdeveloped axillary and secondary ears. Maize Genet. Coop. News Lett. 54: 52-53.
- MOORE, T.C. 1979. Biochemistry and physiology of plant hormones. Springer-Verlag, New York.
- MORELAND, D.E. 1980. Mechanisms of action of herbicides. Ann. Rev. Plant. Physiol. 31:597-638.

- MORO, J.R. e GUERREIRO, L.E. 1984. Embriogênese somática e regeneração de plantas de milho (*Zea mays* L.). *Ciência e Cultura* (supl.) 36(7):859.
- MURASHIGE, T. and F. SKOOG. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-479.
- NABORS, M.W., HEYSER, J.W., DYKES, T.A. and DeMOTT, K.J. 1983. Long-duration, high-frequency plant regeneration from cereal tissue cultures. *Planta* 157:385-391.
- NAKANO, H., and MAEDA, E. 1979. Shoot differentiation in callus of *Oryza sativa* L. *J. Pflanzenphysiol.* 93: 449-458.
- NESSLER, C.L. 1982. Somatic embryogenesis in the opium poppy, *Papaver somniferum*, *Physiol. Plant.* 55: 453-458.
- NEUFFER, M.G., JONES, L., and ZUBER, M.S. 1968. The mutants of maize. The Crop Science Society of America, Matison, 74 pp.
- NITSCH, J.P., and NITSCH, C. 1962. Composés phenolique et croissance végétale. *Ann. Physiol. Vég.* 4:221-225.
- NOBECOURT, P. 1939a. Sur la perennité et l'argumentation de volume des cultures de tissus végétaux. *C. R. Seances Soc. Biol. Ses. Ell.* 130: 1270-1271.
- NOBECOURT, P. 1939b. Sur les radicules naissant des cultures de tissus de tubercule de carotte. *Compt. Rend. Soc. Biol.* 130:1271-1272.
- NORSTOG, K. 1970. Induction of embryo-like structures by kinetin in cultures barley embryos. *Dev. Biol.* 23:665-670.
- NOVAK, F.J., M. DOLEZELOVA, M. NESTICKY, and A. PIOVARCI. 1983. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Zea mays* L. *Maydica* XXVIII:381-390.
- OONO, K. 1981. In vitro methods applied to rice. In: *Plant Tissue Culture* (T.A. THORPE, ed.). Academic Press, N. York. pp. 273-298.
- ORTON, T.J. 1983. Experimental approaches to the study of somaclonal variation. *Plant Molec. Biol. Rep.* 1:67-76.
- ORTON, T.J. 1984. Genetic Variation in somatic tissues: Methods or Madness. *Adv. Plant. Pathol.* 2:153-189.
- OTTOBONI, L.M.M. 1985. Mapping zein polypeptides. M.S. Thesis. University of Illinois, Urbana-Champaign, USA.
- OTTOBONI, L.M.M., and STEFFENSEN, D.M. 1987. Localization of zein genes in maize. *Biochemical Genetics* 25(1/2):123-141.

- OSWALD, T.H., NICHOLSON, R.L., and BAUMAN, L.F. 1977. Cell suspension and callus culture from somatic tissue of maize. *Physiol. Plant.* 41:45-50.
- OZIAS-AKINS, P., and VASIL, I.K. 1982. Plant regeneration from cultured imature embryos and inflorescences of *Triticum aestivum* L. (wheat): Evidence for somatic embryogenesis. *Protolasma* 110: 95-105.
- PESCHKE, V.M., PHILLIPS, R.L., and GENGENBACH, B.G. 1986. Transposable element activity in progeny of regenerated maize plants. In: *VI International Congress of Plant, Tissue and Cell Culture-Abstracts* (D.A. Somers et al., eds.). University of Minnesota, USA. pp. 285.
- PHILLIPS, R., and DODDS, J.H. 1977. Rapid differentiation of tracheary elements in cultured explants of Jerusalem artichoke. *Plant* 135: 207-212.
- POLIKARPOCHKINA, R.T., GAMBURG, K.Z., and KHAVKIN, E.E. 1979. Cell-suspension culture of maize (*Zea mays* L.). *Z. Pflanzenphysiol.* 95:57-67.
- POTRYKUS, I., HARMS, C.T., and LORZ, H. 1979. Callus formation from cell culture protoplasts of corn (*zea mays* L.). *Theor. Appl. Genet.* 54:209-214.
- POTRYKUS, I., HARMS, C.T., LORZ, H., and THOMAS, E. 1977. Callus formation from stem protoplasts of corn (*Zea mays* L.) *Molec. Gen. Genet.* 156:347-350.
- PRAT, D. Genetic variability induced in *Nicotiana glauca* by protoplast culture. *Theor. Appl. Genet.* 64:223-230.
- PRING, D.R., and LEVINGS III, C.S. 1978. Heterogeneity of maize cytoplasmic genomes among male-sterile cytoplasms. *Genetics* 89:121-136.
- PRIOLI, L.M., ARRUDA, P. e SILVA, W.J. 1985a. Otimização da indução de calos e regeneração de plantas "in vitro" em uma linhagem com alta frequência de embriogênese somática. *Ciência e Cultura* (supl.) 37:787.
- PRIOLI, L.M., SONDAHL, M.R., and EVANS, D.A. 1985b. Isolamento de protoplastos em *Zea diploperennis*. *Ciência e Cultura* (supl.) 37:787.
- PRIOLI, L.M., SILVA, W.J. e ARRUDA, P. 1987. Cultura de Tecidos e variação somaclonal em milho. II Simpósio da Associação Brasileira de Cultura de Tecidos de Plantas/Sociedade Botânica do Brasil. USP. pp.8.
- PRIOLI, L.M., SILVA, W.J., ARRUDA, P. and SONDAHL, M.R. 1985. "In vitro" regeneration capacity of corn and teosinte genotypes. In: *Tissue Culture in Forestry and Agriculture*. (R.R. HENKE, et al., eds). Plenum Press, N. York. pp. 342-343.

- PRIOLI, L.M., SILVA, W.J., and SONDAHL, M.R. 1984. Tissue culture and plant regeneration in diploid perennial teosinte. *J. Plant Physiol.* 117: 185-190.
- PRIOLI, L.M., and SONDAHL, M.R. 1987. Somatic embryogenesis, organogenesis, and somaclonal variation in popcorn inbreds. *J. Plant. Physiol.* (in press).
- RADOLA, B.J. 1980. Ultrathin-layer isoelectric focusing in 50-100 μ m polyacrylamide gels on silanized glass plates or polyester films. *Electrophoresis* 1: 43.
- RANGAN, T.S. 1974. Morphogenetic investigations on tissues cultures of *Panicum miliaceum* Z. J. *Pflanzenphysiol.* 72: 456-459.
- RANGAN, T.S., and VASIL, I.K. 1983. Somatic embryogenesis and plant regeneration in tissues cultures of *Panicum miliaceum* L. and *Panicum miliare* Lamk. *Z. Pflanzenphysiol.* 109: 49-53.
- RAPELA, M.A. 1985. Organogenesis and somatic embryogenesis in tissue cultures of argentine maize (*Zea mays* L). *J. Plant Physiol.* 121:119-122.
- RAY, P.M., DOHRMANN, V., and HERTEL, R. 1977a. Characterization of naphthaleneacetic acid binding to receptor sites on cellular membranes of maize coleoptile tissue. *Plant Physiol.* 59:357-364.
- RAY, P.M., DOHRMANN, V., and HERTEL, R. 1977b. Specificity of auxin-binding sites on maize coleoptile membranes as possible receptor sites for auxin action. *Plant. Physiol.* 60:585-591.
- REISCH, B., and BINGHAM, 1980. The genetic control of bud formation from callus cultures of diploid alfafa. *Plant Sci. Lett.* 20:71-77.
- REINERT, J. 1958. Morphogenese und ihre kontrolle an gewebeulturen aus karotten. *Naturwissenschaften* 45: 344-345.
- REINERT, J. 1959. Uber die kontrolle der morphogenese und die induktion von adventiveembryonhen an gewebeulturen aus karotten. *Planta* 58: 318-333.
- RHODES, C.A., GREEN, C.E., and PHILLIPS, R.L. 1982. Regenerable maize tissue cultures derived from immature tassels. *Maize Genet. Coop. News Lett.* 54: 52-53.
- RHODES, C.A., GREEN, C.E., and PHILLIPS, R.L. 1986. Factors affecting tissue culture initiation from maize tassels. *Plant Science* 46: 225-232.
- RICE, D.B. 1982. Tissue culture induced genetic variation in regenerated maize inbreds. *Proc. Annual Corn & Sorghum Research Conf.* 37: 148-162.

- RIGHETTI, P.G. 1983. Isoelectric focusing: Theory, methodology and applications. Elsevier, New York.
- RISUENO, M.C., FERNANDEZ-GOMES, M.E., and GIMENEZ-MARTIN, G. 1973. Nucleoli under the electron microscope by silver impregnation. *Mikroskopie* 29:292:298.
- ROBERTS, L., and BABA, S. 1968. Effect of proline on wound vessel member formation. *Plant Cell Physiol* 9: 353-360.
- ROBERTSON, D.S., ANDERSON, I.C., and BACHMANN, M.D. 1978. Pigment-deficient mutants: Genetic, biochemical, and developmental studies. In: *Maize Breeding and Genetics*. (D.B. WALDEN, ed.) John Wiley & Sons, New York. pp.461-494.
- RODRIGUEZ, D.B., RAYMONDO, L.C., LEE, T-C, SIMPSON, K.L. and CHIECHESTER, C.O. 1976. Carotenoid pigment changes in ripening *Mimordica charantia* fruits. *Ann. Bot.* 40: 615-624.
- SANCHEZ de JIMENEZ, G., FERNANDES, L. and LOYOLA, V.M. 1978. Biochemical studies on maize cell cultures. Abstr. nº 1810. 4th Intern. Congr. Plant Tissue and Cell Culture. Calgary.
- SAKATA, R.T., e ARRUDA, P. 1987. Seleção de calos embriogênicos de milho resistentes ao herbicida glifosato. II Simpósio da Associação Brasileira de Cultura de Tecidos de Plantas/Sociedade Botânica do Brasil. USP. pp.11.
- SARAVIS, C.A., and COOK, R.B. 1979. Agarose isoelectrofocusing with IsoGel agarose and GelBond film. Marine Colloids Div., Bioproducts Dept., FMC Corp., Rockland, ME.
- SCARPULLA, R.C., AGNE, K., and WU, R. 1982. Cytochrome c gene-related sequences in mammalian genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 79:739-743.
- SCHAEFFER, G.W., SHARPE, F.T., and CREGAN, P.B. 1984. Variation for improved protein and yield from rice anther culture. *Theor. Appl. Genet.* 67:383-
- SCHIMKE, R.T., ALT, F.W., KELLEMS, R.E., KAUFMAN, N., and BERTINO, J.R. 1977. Amplification of dihydrofolate reductase genes in methotrexate-resistant cultured mouse cells. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 42: 649-657.
- SCHLEIDEN, M.J. 1838. Beitrage zur Phytogenesis. *Mullers Arch. Anat. Physiol.* pp. 137-176.
- SCHWANN, T. 1839. Mikroskopische untersuchungen unber die ubereininstimmung in der struktur und dem wachstum der thiere und pflanzen. nº 176. Oswalds, Berlin.
- SCOSSIROLI, R.E. 1962. Manuale de Statistica per ricercatori. Ino. c. Olivetti C.S.p.A. Pavia.

- SHANNON, J.C., and LIU, J.W. 1977. A simplified medium for the growth of maize (*Zea mays*) endosperm tissue in suspension culture. *Physiol. Plant.* 40:285-291.
- SHARP, W.R., CALDAS, L.S., and MARAFFA, S.B. 1980. The physiology of "in vitro" asexual embryogenesis. *Horticultural Reviews* 2:268-310.
- SHARP, W.R., EVANS, D.A., and SONDHAL, M.R. 1982. Application of somatic embryogenesis to crop improvement. In: *Proceedings 5th International Congress of Plant Tissue and Cell Culture*. (A. FUJIWARA, ed.). Japan. Japanese Association for Plant Tissue Culture. pp. 759-762.
- SHERIDAN, W.F. 1975. Tissue cultures of maize. I. Callus induction and growth. *Physiol. Plant.* 33:151-156.
- SHERIDAN, W.F. 1982. Black mexican sweet corn: its use for tissue cultures. In: *Maize for Biological Research*. (W.F. Sheridan, ed.). Plant Molecular Biology Association. University Press. N. pp. 385-396.
- SHIMADA, T. 1978. Plant regeneration from the callus induced from wheat embryo. *Jpn. J. Genet.* 54: 379-385.
- SHIMADA, T., and YAMADA, Y. 1979. Wheat plants regenerated from embryo cell cultures. *Jpn. J. Genet.* 54: 379-385.
- SHIMAMOTO, K., HAYASHI, Y., and KYOZUKA, J. 1986. High frequency plant regeneration from protoplasts of rice (*Oryza sativa*). In: *VI International Congress of Plant, Tissue and Cell Culture-Abstracts* (D.A. Somers et al eds). University of Minnesota, USA. pp. 161.
- SHININGER, T.L. 1979. Quantitative analysis of temperature effects on xylem and metaxylem cell formation in cytotinin-stimulated root tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76: 1921-1923.
- SIBI, M., BIGLARY, M., and DEMARLY, Y. 1984. Increase in the rate of recombinants in tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) after in vitro regeneration. *Theor. Appl. Genet.* 68:317-321.
- SKIRVIN, R.M., and JANICK, J. 1976. Tissue culture-induced variation in scented *Pelargonium* spp. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 101: 281-290.
- SKOOG, F., and MILLER, C.O. 1957. Chemical regulation of growth and organ formation in plants cultured "in vitro". *Symp. Soc. Exp. Biol. Med.* 11:118-131.
- SMITH, J.D., McDaniel, S., and CHERRY, J.H. 1977. Regulation of embryo growth by abscisic acid "in vitro". *Maize Genet. Newslett.* 52:107-108.

- SOAVE, C., SUMAN, N., VIOTTI, A., and SALAMINI, F. 1978. Linkage relationships between regulatory and structural gene loci involved in zein biosynthesis in maize. *Theor. Appl. Genet.* 52:263.
- SPRINGER, W.D., GREEN, C.E., and KOHN, K. A. 1979. A histological examination of tissue culture initiation from immature embryos of maize. *Protoplasma* 101: 269-281.1.
- STEEL, R.G.D., and TORRIE, J.H. 1980. Principles and procedures of statistics. 2a. Ed. McGraw Hill, New York. 633 pp.
- STEWART, F.C., KENT, A.E., and MAPES, M.O. 1966. The Culture of free plants and its signification for embryology and. morphogenesis. In: *Current Topics in Developmental Biology*. (A.A. MOSCONA and A. MONROY, eds.). pp. 113-154. Academic Press, N. York.
- STEWART, F.C., MAPES, M.O., and MEARS, K. 1958. Growth and organized development of cultured cells. II. Organization in cultures grown from freely suspended cells. *Am. J. Bot.* 45: 705-708.
- STEWART, R.N. 1978. Ontogeny of the primary body in chimeral forms of higher plants. In: *The Clonal Basis of Development*. (S. Subtelny and I.M. Sussex, eds). Academic Press, N. York. pp. 131-160.
- STOCKERT, J.C., FERNANDEZ-GÓMEZ, M.E., GIMÉNEZ-MARTIN, G., and LOPEZ-SAEZ, J.F. 1970. Organization of argyrophilic nucleolar material throughout the division cycle of meristematic cells. *Protoplasma*. 69:265-278.
- SUN, C.S., and CHU, C.C. 1986. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature inflorescence segments of *Coix lacrimajobii*. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 5: 175-178.
- SUN, Z.-X., ZHAO, C.-Z., ZHENG, K.-L., QI, X.-F., and FU, Y.-P. 1983. Somaclonal genetics of rice, *Oryza sativa* L. *Theor. Appl. Genet.* 67:67-
- SUPRASANNA, P., RAO, K.V., and REDDY, G.M. 1986. Plantlet regeneration from glume calli of maize (*Zea mays* L.). *Theor. Appl. Genet.* 72: 120-122.
- TANG, C.S., CHANG, S.W., HOO, D., and YANAHIGARA, K.H. 1975. Gas chromatographic determination of 2(3)-benzoxazolinones from cereal plants. *Phytochemistry* 14:1077-2079.
- THANUTONG, P., FURUSAMA, I., and YAMAMOTO, M. 1983. Resistant tobacco plants from protoplast-derived calluses selected for their resistance to *Pseudomonas* and *Alternaria* toxins. *Theor. Appl. Genet.* 66: 209.

- TISSERAT, B., and DeMason, D.A. 1980. A histological study of development of adventive embryos in organ culture of *Phoenix dactylifera* L. *Ann. Bot.* 46:465-472.
- TOLBERT, N.E. 1980. Microbodies - Peroxisomes and Glyoxisomes. In: *The biochemistry of Plants: A Comprehensive Treatise - The Plant Cell*. Vol. 1. (N.E. Tolbert, ed.) Academic Press, New York, London. pp. 359-388.
- TOMES, D.T. 1985. Opportunities and limitations of the genotypic influences on establishment and plant regeneration from callus and cell cultures of crop species. In: *Biotechnology in Plant Science: Relevance to Agriculture in the Eighties* (M. Zaitlin et al. eds.). Academic Press, Inc., N. York, pp. 3-14.
- TORIYAMA, K., and HINATA, K. 1986. Plant regeneration from protoplasts of anther callus in rice. In: *International Congress of Plant, Tissue and Cell Culture-Abstracts* (D.A. Somers et al eds). University of Minnesota, USA. pp. 160.
- TORNE, J.M., SANTOS, M.A., PONS, A., and BLANCO, M. 1980. Regeneration of plants from mesocotyl tissue cultures of immature embryos of *Zea mays* L. *Plant Science Letters*. 17:339-344.
- TREWAVAS, A. 1981. How do plant growth substances work? *Plant Cell Envir.* 4: 203-228.
- UMBECK, P.R., and GENGENBACH, B.G. 1983. Reversion of male-sterile T-cytoplasm maize to male fertility in tissue culture *Crop Sci.* 23: 584.
- VASIL, I.K. 1982a. Cell culture and somatic cell genetics of cereal and grasses. In: *Plant Improvement and Somatic Cell Genetics*. (I.K. VASIL et al., eds). Academic Press, N. York. pp. 179-203.
- VASIL, I.K. 1982b. Somatic embryogenesis and plant regeneration in cereals and grasses. In: *Plant Tissue Culture 1982* (A Fujiwara, ed.). Maruzen, Tokyo. pp. 101-104.
- VASIL, I.K. 1983. Isolation and culture of protoplasts of grasses. In: *Plant Protoplasts* (I.K. Giles ed.). *Int.Rev. Cytol. Suppl.* 14:79-88.
- VASIL, I.K. 1983. Regeneration of plants from single cells of cereals and grasses. In: *Genetic Engineering in Eukaryotes* (P. Lurquin and A. Kleinhops, eds.). Plenum Press, N. York. pp. 233-252.
- VASIL, I.K. 1985. Somatic embryogenesis and its consequence in the Gramineae. In: *Tissue Culture in Forestry and Agriculture*. (R.R. Henke. et al eds.). Plenum Press, N. York. pp. 31-47.
- VASIL, I.K., AHUJA, M.R., and VASIL, V. 1979. Plant tissue cultures in genetics and plant breeding. *Adv. Genet.* 20: 127-215.

- VASIL, V., LU, C., and VASIL, I.K. 1985. Histology of somatic embryogenesis in cultured immature embryos of maize (*Zea mays* L.). *Protoplasma* 122: 1-8.
- VASIL, I.K., SRINIVASAN, C., and VASIL, V. 1986. Culture of protoplasts isolated from embryogenic cell suspension cultures of sugarcane and maize In: *VI International Congress of Plant, Tissue and Cell Culture-Abstracts* (D.A. Somers et al, eds.). University of Minnesota, USA. pp. 443.
- VASIL, V., and VASIL, I.K. 1980. Isolation and culture of cereal protoplasts. II Embryogenesis and plantlet formation from protoplasts of *Pennisetum americanum*. *Theor. Appl. Genet.* 56: 97-99.
- VASIL, V. and VASIL, I.K. 1981a. Somatic embryogenesis and plant regeneration from tissue cultures of *Pennisetum americanum* and *P. americanum* × *P. purpureum* hybrid. *Am. J. Bot.* 68: 864-872.
- VASIL, V., and VASIL, I.K. 1981b. Somatic embryogenesis and plant regeneration from suspension cultures of Pearl Millet (*Pennisetum americanum*). *Ann. Bot.* 47: 669-678.
- VASIL, V. and VASIL, I.K. 1982. The ontogeny of somatic embryos of *Pennisetum americanum* (L.) K. Schum. I. in cultured immature embryos. *Bot. Gaz.*, 143: 454-465.
- VASIL, V., and VASIL, I.K. 1984. Induction and maintenance of embryogenic callus cultures of Gramineae. In: *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*. (I.K. VASIL, ed.) vol. 1. Academic Press, N. York. pp. 36-48).
- VASIL, V. and VASIL, I.K. 1986. Plant Regeneration from friable embryogenic callus and cell suspension cultures of *Zea mays* L. *J. Plant. Physiol.* 124: 399-408.
- VASIL, V., WANG, D., and VASIL, I.K. 1983. Plant regeneration from protoplasts of *Pennisetum purpureum* Schum. (Napier Grass). *Z. Pflanzenphysiol.* 111: 319-325.
- VENIS, M.A. 1978. Auxins receptors. Background and current research. *Biochem. Soc. Trans.* 6: 325-333.
- VENIS, M.A. 1979. Receptors for plant growth regulators. In: *IUPAC: Advances in Pesticide Science*. (H. Geissbuhler, ed.). Part. 3. Oxford, Pergamon Press. pp. 487-493.
- VENIS, M.A., and WATSON, P.J. 1978. Naturally occurring modifiers of auxin-receptor interaction in corn: Identification as benzoxazolinas. *Planta* 142: 103-107.
- VIDAL, B.C., SILVA, W.J., and STRIKIS, P.C. 1984. Nuclear phenotypes and DNA content of root cells of *Zea mays*, *Zea diploperennis*, and of a mazoid hybrid. *Cell Molec. Biol.* 30(1):11-22.

- WANG, D., and YAN, K. 1984. Somatic embryogenesis in *Echinochloa crusgalli*. *Plant Cell Reports* 3:88-90.
- WAHL, G.M., PADGETT, R.A., and STARCK, G.R. 1979. Gene amplification causes over production of the first three enzymes of UMP synthesis in N-(Phosphonacetyl-L-aspartate-resistant hamster cells. *J. Biol. Chem.* 254 (10): 8679-8689.
- WEILER, E.W., and SPANIER, K. 1981. Phytohormones in the formation of crown gall tumors. *Planta* 153:326-337.
- WERNICKE, W. and BRETTELL, R. 1980. Somatic embryogenesis from *sorghum bicolor* leaves. *Nature* 287: 138-39.
- WERNICKE, W., BRETTELL, R., WAKIZUKA, T., and POTRYKUS, I. 1981. Adventitious embryoid and root formation from rice leaves. *Z. Pflanzenphysiol.* 103: 361-365.
- WENT, F.W. 1928. Wuchstoff und Wachstum. *Rec. Trav. Bot. Néer.* 25:1-116.
- WETMORE, R.H., and RIER, J.P. 1963. Experimental induction of vascular tissues in callus of angiosperms. *Am. J. Bot.* 50: 418-430.
- WHITE, P.R. 1939a. Potentially unlimited growth of excised plant callus in an artificial nutrient. *Am. J. Bot.* 26: 59-64.
- WHITE, P.R. 1939b. Controlled differentiation in a plant tissue culture. *Bull. Torrey Bot. Club.* 66: 505-513.
- WILLIAMS, E.G., and MAHESWARAN, G. 1986. Somatic embryogenesis: Factors influencing coordinated behavior of cells as an embryogenic group. *Ann. Bot.* 57:443-462.
- WILLIAMS, M.E., and WIDHOLM, J.M. 1986. Somaclonal variation in progeny of plants regenerated from *Zea mays* L. tissue cultures and possible involvement of transposable elements. In: *VI International Congress of Plant Tissue and Cell Culture Abstracts*. University of Minnesota, USA. p. 285.
- WILSON, C.M. 1984. Isoelectric focusing of zein in agarose. *Cereal Chemistry* 61(2) 198-200.
- WOODMAN, J.C., KRAMER, D.A. 1986. The recovery of somaclonal variants from tissue cultures of B73, an elite inbred line of maize. In: *VI International Congress of Plant Tissue and Cell Culture*. University of Minnesota, USA. pp. 215.
- YAMADA, Y. 1977. Tissue culture studies on cereals. In: *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. (J. Reinert and Y.P.S. Bajaj, eds). Springer-Verlag, New York. pp. 144-159.

- YAMADA, Y., ZHI-QI, Y., and DING-TAI, T. 1986. Plant regeneration from protoplast-derived callus of rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Cell Reports* 5: 85-88.
- YEOMAN, M.M., and STREET, H.E. 1977. General Cytology of Cultured Cells. In: *Plant Cell and Tissue Culture* (H.E. STREET, ed.). Botanical Monograph Series. Vol. 11, 2nd ed. Blackwell, Oxford. pp.137-176.
- ZEMSKAYA, Y.A., RAKITIN, Y.V., CHERNIKOVA, Z.V. 1977. Distribution and transformation of 2,4-D in tissues of gramineous plants. *Soviet. Plant Physiol.* 24: 994-999.
- ZHI-HONG, X., WANG, D., LI-JUN, Y., and ZHI-MING, W. 1984. Somatic embryogenesis and plant regeneration in cultured immature inflorescences of *Setaria italica*. *Plant Cell Reports* 3: 149-150.
- ZURFLUH, L.L., and GUILFOYLE, T.J. 1982. Auxin-induced changes in the population of translatable messenger RNA in elongating maize coleoptile sections. *Planta* 156: 525-527.