

## AVALIAÇÃO CITOGENÉTICA DA MICROSPOROGÊNESE DE UMA NOVA VARIEDADE DE MILHO (BRS 4150)

CAETANO-PEREIRA C.M.<sup>1</sup>, SILVA P.R., SILVA N.<sup>2</sup>,  
MEIRELLES W.F.<sup>3</sup>, BRASIL E.M.<sup>4</sup> E PAGLIARINI M.S.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>creuci@hotmail.com, caixa postal 271, CEFET-PR Campo Mourão;  
<sup>2</sup>mspagliarini@uem.br; <sup>3</sup>walter@cnpms.embrapa.br; ebrasil@agro.ufg.br

Palavras-chave: *Zea*, meiose, BRS 4150, genoma.

### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A meiose é um evento altamente integrado, caracterizando-se pela ocorrência de complexos fenômenos bioquímicos e mecânicos que se processam ordenadamente. É fundamental para os organismos que apresentam reprodução sexuada, pois garante a formação de células haplóides que, após a fecundação, restituem o número de cromossomos da espécie. Anormalidades que ocorram durante a meiose podem levar à formação de gametas com um número de cromossomos não balanceado e, em geral, inviáveis. No caso de plantas, tais anormalidades podem resultar em baixa produtividade tornando-se seu estudo, portanto, interessante do ponto de vista econômico. Embora todos os seus eventos estejam sob intenso controle genético (veja Golubovskaya, 1979, 1989), a meiose é particularmente sensível a estresses ambientais. De acordo com Darlington (1956), os genes mutantes seriam mais sensíveis a flutuações ambientais. Entre os fatores do ambiente capazes de influenciar o processo meiótico destacam-se os climáticos e as condições do solo. Estes estresses podem resultar em grandes perdas para muitas culturas. Redução na produção de grãos devido o estresse climático foi observada em *Sorghum* (Downes e Marshall, 1971) e em trigo (Zanettini, 1979; Moraes-Fernandes, 1982; Moraes-Fernandes *et al.*, 1984; Demotes-Mainard *et al.*, 1996). O estudo entre condições meteorológicas e anormalidades citológicas em trigo cultivado no Sul do Brasil mostrou valores do coeficiente de correlação baixos, embora significativos, para precipitação, temperaturas extremas, umidade e insolação, indicando sua influência no comportamento meiótico em pequena escala (Zanettini, 1979; Moraes-Fernandes, 1982; Moraes-Fernandes *et al.*, 1984). Em plantas sujeitas a estresse climático, a fertilidade masculina foi afetada, sendo produzidas anteras de formas anormais e sem deiscência. Uma vez que a liberação do pólen foi limitada, a taxa de fertilização foi reduzida e, por conseqüência, também a produção de grãos. Deste modo, altas temperaturas e déficit de água na meiose podem reduzir a quantidade de grãos por induzir macho-esterilidade e, em certos casos, comprometer também a fertilidade feminina (Demotes-Mainard *et al.*, 1996). Por outro lado, a meiose pode ser alterada pelo nível dos elementos minerais disponíveis para a planta. Tratando-se do efeito do pH no crescimento das plantas deve-se considerar, além da ação direta dos íons hidrogênio, o seu efeito indireto, evidenciado através das mudanças que provocam na disponibilidade de elementos essenciais e não essenciais existentes no solo (veja Moraes-Fernandes, 1982). Baixos índices de pH do solo foram considerados ao menos parcialmente responsáveis pelas altas taxas de anormalidades meióticas encontradas em algumas cultivares de trigo crescidos no Rio Grande do Sul (Zanella *et al.*, 1991) e em diferentes genótipos de milho cultivados no Planalto

Central Brasileiro e na Região Sul (Caetano-Pereira *et al.*, 1995a, Caetano-Pereira *et al.*, 1995b; Caetano-Pereira e Pagliarini, 1996). Tais anormalidades foram intensa fragmentação cromatínica, aderências cromossômicas e formas aberrantes de microsporócitos. As primeiras comprometem seriamente a viabilidade dos gametas. Além da constituição genotípica e dos fatores ambientais, interações genético-ambientais também podem influenciar o processo meiótico. Kato e Yamagata (1982) mostraram efeitos da interação genótipo-temperatura sobre a frequência de quiasmas em plantas de *Triticale* onde alterações estruturais não estavam envolvidas. Em geral, redução de temperatura tendeu a reduzir o pareamento e o número de quiasmas, dependendo da constituição genética da planta. Em híbridos de *Glycine max* e *Glycine soja* foram observadas diferenças marcantes no comportamento cromossômico e na fertilidade. A meiose em algumas plantas híbridas F1 foi aparentemente regular, enquanto outras mostraram frequência de irregularidades em torno de 50%, esterilidade acima de 58% e mais de 56% de sementes não desenvolvidas. No mínimo três fatores podem ter influenciado o comportamento cromossômico e a fertilidade destas plantas. Estes fatores foram o genótipo, a temperatura e a interação genótipo-temperatura (Ahmad *et al.* 1984). Todo processo de autofecundação em planta alógama pode levar à formação de genótipos que definham rapidamente em função do grau de endogamia alcançado. Este definhamento pode ser resultante de instabilidade no processo meiótico. Love (1949) admitiu que o uso, em cruzamentos, de material com meiose instável é problemático tanto para a seleção, reduzindo a eficiência, bem como para a uniformidade e a pureza da futura cultivar. Deste modo, plantas com meiose estável facilitam o trabalho de seleção (Love, 1951). De acordo com Jensen (1965) a instabilidade meiótica pode ser responsável pela decadência da cultivar no campo. Devido a sua natureza alógama, o milho possibilita o desenvolvimento de genótipos de base ampla capazes de se adaptar à diversidade de ambientes, a exemplo da variedade BRS 4150, lançada recentemente pela Embrapa Milho e Sorgo, adaptada às condições da Região Sul do Brasil. Esta variedade foi formada através do trabalho de melhoramento no Composto Vega Precoce (CMS 50), originalmente obtido no ano de 1980, e acumulou sete ciclos de seleção até 1997. A Região Sul, importante produtora de milho, apresenta em sua maioria clima subtropical e solos com problemas de acidez excessiva. Apesar de os programas de melhoramento de milho procurarem disponibilizar genótipos mais produtivos e tolerantes a estresses múltiplos, nem sempre o desempenho dos mesmos é satisfatório. Uma vez que tal desempenho depende, em parte, da normalidade da meiose para produção de gametas viáveis, este trabalho teve como objetivo a avaliação citogenética da microsporogênese da variedade BRS 4150. (Material e Métodos) Para tanto, análise citológica foi realizada em 20 plantas de BRS 4150, cultivadas em campo experimental na Escola de Agronomia da Universidade Federal de Goiás. As inflorescências masculinas foram coletadas em estágio ideal para estudos meióticos e fixadas em solução de álcool acético 3:1 por 24 horas. Após, foram transferidas para nova solução e conservadas sob baixas temperaturas. As lâminas foram preparadas por esmagamento e os microsporócitos corados com carmim propiônico a 1%. Foram avaliadas 1000 células por planta, considerando-se todas as fases da meiose. Utilizou-se o número de quartetos de pólen observado para estimar o índice meiótico (IM), de acordo com Love (1951). (Resultados e Discussão) A frequência de anormalidades meióticas foi reduzida, compreendendo 2.3% do total de células analisadas (ver Tabela 1). A maioria dos grãos de pólen observada mostrou-se fértil. Resultados semelhantes foram obtidos por Stefani e Colonna (1996) em *Dasyphyrum villosum*, embora a duração da meiose tenha sido influenciada por diferenças de temperatura. Esta gramínea alógama é nativa nas regiões do Mediterrâneo e tem habilidade para desenvolver-se em áreas marginais sob diferentes condições pedoclimáticas. A fertilidade das plantas aqui analisadas pode ser também considerada em função do índice meiótico (IM). De acordo com Love

(1949), plantas com índice meiótico inferiores a 90 trazem problemas quando usadas em cruzamento. Em trigo, Zanettini *et al.* (1979) observaram que largas flutuações de temperatura e a alta incidência de doenças causam muitos problemas para a cultura do trigo no Rio Grande do Sul. Durante o período normal de florescimento para o trigo a temperatura no campo pode variar de -3 °C a 32 °C em aproximadamente 24 horas, levando à redução do índice meiótico. De 97 cultivares de trigo avaliadas quanto ao índice meiótico por Moraes-Fernandes (1982), 54% apresentaram de 5 a 80% de plantas com índices meióticos abaixo do valor indicado como limite de normal. No presente estudo, todas as plantas de BRS 4150 avaliadas apresentaram índice meiótico entre 96 e 100.

Tabela 1. Frequência (%) de microsporócitos e produtos meióticos apresentando anormalidades meióticas em geral (AM), fracionamento genômico (FG) e índice meiótico (IM) por planta avaliada de BRS 4150.

Planta	AM	FG	IM
01	1.9	1.3	
98			
02	2.8	1.7	
97			
03	1.4	0.0	
100			
04	1.2	0.3	
100			
05	5.9	5.0	
99			
06	0.1	0.0	
100			
07	5.4	4.0	
100			
08	0.4	0.3	
100			
09	4.0	1.0	
96			
10	2.8	0.9	
100			
11	4.1	1.4	
99			
12	0.9	0.0	
100			
13	1.4	1.2	
99			
14	0.5	0.0	
100			
15	0.2	0.0	
100			
16	0.9	0.0	
100			
17	0.0	0.0	

100		
18	3.3	0.0
100		
19	1.2	0.0
100		
20	6.7	6.4
100		

Entre as anormalidades observadas, destaca-se a presença de cromossomos univalentes. Estes ocorreram em algumas plantas desta variedade, determinados possivelmente por redução na frequência de quiasmas. Autofecundação em algamas pode colocar em homozigose alguns genes para baixa frequência de quiasmas. Uma vez que os univalentes não apresentam segregação normal na meiose, micrósporos com um número não balanceado de cromossomos são formados, resultando pólen abortivo e baixa fertilidade, bem como perda de vigor pela planta (Pagliarini e Aguiar-Perecin 1979). Fatores ambientais também podem influenciar o índice de quiasmas. A temperatura (Moraes-Fernandes *et al.*, 1984) e a umidade e temperatura (Moraes-Fernandes, 1982) afetaram a frequência de quiasmas em trigo, reduzindo-a drasticamente. Na variedade de milho em estudo, entretanto, a frequência de cromossomos univalentes foi inexpressiva, não chegando a comprometer a fertilidade. É possível, neste caso, que tenha havido a fixação de genes para alta frequência de quiasmas. A anormalidade mais significativa foi observada em maior frequência nas plantas 05, 07 e 20 (Tabela 1). A mesma relaciona-se à distribuição espacial dos bivalentes. Estes obedeciam a um fracionamento genômico, encontrando-se divididos em dois grupos contendo cada um cinco pares de cromossomos. Evidências citogenéticas e moleculares têm estabelecido um número básico de cromossomos de  $x=5$  para o gênero *Zea* (Molina e Naranjo 1987, Naranjo *et al.* 1994, Poggio *et al.* 1990, 1997, Ahn e Tanksley 1993, Moore *et al.* 1995). Deste modo, cada grupo de cinco bivalentes pode ter uma origem diferente, correspondendo cada a um genoma ancestral diplóide. O milho e espécies relacionadas com  $2n=20$  cromossomos são, portanto, tetraplóides cripticos (alotetraplóides). A expressão da NOR permanece inativa no milho normal devido sua condição híbrida, porém cada genoma de cinco bivalentes possui um cromossomo organizador do nucléolo, que expressa-se em determinadas condições. Fusões entre dois meiócitos também ocorreram. De acordo com Beadle (1932) a falta de formação de parede durante a meiose de milho seria geneticamente controlada. Entretanto, para Peeters *et al.* (1985), mudanças nas condições ambientais foram responsáveis pela ausência de formação da parede celular no início da prófase I. No presente estudo, a fusão celular pareceu estar associada ao fracionamento genômico. Células com 10 e 20 bivalentes apresentaram dois e quatro nucléolos, respectivamente. Dois nucléolos por conjunto de 10 bivalentes sugerem que ambos os reorganizadores de nucléolo dos genomas ancestrais encontram-se ativos. Considerando-se a baixa frequência de anormalidades e o elevado índice meiótico, a microsporogênese das plantas de BRS 4150 apresentou alta estabilidade meiótica. Embora não seja o único, esta é um dos fatores relacionados à adaptabilidade de uma cultivar, que garante um desempenho estável nas diferentes condições ambientais. Segundo Moraes-Fernandes (1982), é o fator necessário para que a transmissão regular das características agronômicas desejáveis seja mantida.

## LITERATURA CITADA

Ahmad, Q.N., Britten, E.J., Byth, D.E. Effects of interacting genetic factors and temperature

- on meiosis and fertility in soybean x *Glycine soja* hybrids. *Can. J. Genet. Cytol.* 26: 50-56, 1984.
- Ahn, S., Tanksley, S.D. 1993. Comparative linkage maps of the rice and maize genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 7980-7984.
- Beadle, G.W. A gene in *Zea mays* for failure of cytokinesis during meiosis. *Cytologia* 3: 142-155, 1932.
- Caetano-Pereira, C.M., Taschetto, O.M., Defani-Scoarize, M.A., Pagliarini, M.S. 1995a. Spontaneous chromosome fragmentation in maize microsporocytes. *Cytologia* 60: 297-301.
- Caetano-Pereira, C.M., Pagliarini, M.S., Brasil, E.M., Martins, E.N. 1995b. Influence of aluminum in causing chromosome stickiness in maize microsporocytes. *Maydica* 40: 325-330.
- Caetano-Pereira, C.M., Pagliarini, M.S. 1996. Unusual shapes of maize microsporocytes. *Nucleus* 39: 107-110.
- Demotes-Mainard, S., Doussinault G., Meynard, J.M. Abnormalities in the male developmental programme of winter wheat induced by climatic stress at meiosis. *Agronomie* 16: 505-515, 1996.
- Downes, R.W., Marshall, D.R. Low temperature induced male sterility in *Sorghum bicolor*. *Aust. J. Exp. Agri. & Anim. Husb.* 11: 352-356, 1971.
- Golubovskaya, I.N. 1979. Genetic control of meiosis. *Int. Rev. Cytol.* 58: 247-290.
- Golubovskaya, I.N. 1989. Meiosis in maize: *mei* genes and conception of genetic control of meiosis. *Adv. Genet.* 26: 149-192.
- Kato, T., Yamagata, H. Stage dependency of high temperature effect on homeologous chromosome pairing in wheat-rye F1 plants. *Jpn. J. Genet.* 57: 155-162, 1982.
- Jensen, N.F. Population variability in small grains. *Agron. J.* 57: 153-162, 1965.
- Love, R.M. La citologia como ayuda práctica al mejoramiento de los cereales. *Rev. Argent. Agron.* 16: 1-13, 1949.
- Love, R.M. Varietal differences in meiotic behavior of Brazilian wheats. *Agron. J.* 43: 2-6, 1951.
- Molina, M.C., Naranjo, C.A. 1987. Cytogenetic studies in the genus *Zea*. 1. Evidence for five as the basic chromosome number. *Theor. Appl. Genet.* 73: 542-550.
- Moore, G., Devos, K.M., Wang, Z., Gale, M.D. 1995. Grasses, line up and form a circle. *Curr. Biol.* 5: 737-741.
- Moraes-Fernandes, M.I.B. Estudo da instabilidade meiótica em cultivares de trigo: efeito genotípico, relação com fertilidade e seleção de plantas estáveis. *Pesq. Agropec. Bras.* 17: 1177-1191, 1982.
- Moraes-Fernandes, M.I.B., Zanettini, M.H.B., Guerra, M., Del Duca, L.J.A., Sereno, M.J.C., Zanella, C.C. Instabilidade cromossômica e adaptação do trigo. I Colóquio Internacional sobre Citogenética e Evolução de Plantas, ESALQ/USP. Piracicaba, São Paulo, pp. 69-110, 1984.
- Naranjo, C.A., Poggio, L., Molina, M., Bernatene, E. 1994. Increase in multivalent frequency in F1 hybrids of *Z. diploperennis* x *Z. perennis* by colchicine treatment. *Hereditas* 120: 241-244.
- Pagliarini, M.S., Aguiar-Perecin, M.L.R. Controle genético da frequência de quiasmas em milho (*Zea mays* L.). Relatório Científico do Instituto de Genética – ESALQ/USP 13: 190-201, 1979.
- Peeters, J.P., Griffiths, J.F., Wilkes, G. "In vivo" karyotypic modifications following spontaneous cell fusion in maize (*Zea mays* L.) *Can. J. Genet. Cytol.* 27: 580-585, 1985.
- Poggio, L., Molina, M.C., Naranjo, C.A. 1990. Cytogenetic studies in the genus *Zea*. 2.

- Colchicine induced multivalents. *Theor. Appl. Genet.* 79: 461-464.
- Poggio, L., Rosato, M., Naranjo, C.A. 1997. Meiotic behavior and DNA content in alloplasmic lines of maize. *Genome* 40: 723-729.
- Stefani, A., Colonna, N. The influence of temperature on meiosis and microspores development in *Dasyphyrum villosum* (L.) P. Candargy. *Cytologia* 61: 277-283, 1996.
- Zanella, C.C., Zanettini, M.H.B., Moraes-Fernandes, M.I.B., Zinn, D.M. Differential effect of soil acidity and lime treatment on the chromosomes of two wheat cultivars. *Rev. Brasil. Genet.* 14: 1021-1032.
- Zanettini, M.H.B., Moraes-Fernandes, M.I.B., Salzano, F.M. Cytogenetic studies in two Brazilian wheat cultivars under natural and controlled temperature conditions. *Rev. Brasil. Biol.* 39: 551-557, 1979.