

DANIEL PEREIRA MIRANDA

**OTIMIZAÇÃO DE PROTOCOLO PARA OBTENÇÃO DE CROMOSSOMOS  
METAFÁSICOS DE ALTA QUALIDADE CITOGENÉTICA EM  
MERISTEMAS RADICULARES DE MILHO (*Zea mays*)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2017

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da  
Universidade Federal de Viçosa - Campus Viçosa

T

Miranda, Daniel Pereira, 1991-  
M672o Otimização de protocolo para obtenção de cromossomos  
2017 metafásicos de alta qualidade citogenética em meristemas radiculares  
de Milho (*Zea mays*) / Daniel Pereira Miranda. - VIÇOSA, MG, 2017.  
x, 60f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexos.

Orientador: Carlos Roberto de Carvalho.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Milho - Melhoramento genético. 2. Pressão. 3. Vácuo. 4.  
Amiprophos-Methyl. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento  
de Biologia Geral. Programa de Pós-graduação em Genética e  
Melhoramento. II. Título.

CDD 22 ed. 633.152

DANIEL PEREIRA MIRANDA

**OTIMIZAÇÃO DE PROTOCOLO PARA OBTENÇÃO DE CROMOSSOMOS  
METAFÁSICOS DE ALTA QUALIDADE CITOGENÉTICA EM  
MERISTEMAS RADICULARES DE MILHO (*Zea mays*)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do Título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 31 de março de 2017.

---

Wellington Ronildo Clarindo  
(Coorientador)

---

Milene Miranda Praça Fontes

---

Carlos Roberto de Carvalho  
(Orientador)

Aos meus pais Helena e Wilton. Às minhas  
irmãs Rafaela e Gabriela e ao meu sobrinho  
Matheus.

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa pelo recebimento, oportunidade concedida e pela infraestrutura.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento pela oportunidade e aprendizado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) e à Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo suporte financeiro durante esses dois anos em especial ao CNPq pela concessão da bolsa.

Ao Prof<sup>o</sup> Carlos Roberto de Carvalho pela orientação, conselhos e ensinamentos fornecidos.

Ao Prof<sup>o</sup> Cosme Damião Cruz pela montagem das análises estatísticas.

Aos professores Wellington Clarindo e Milene Miranda pelas contribuições.

À secretaria do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento (Marco Túlio e Odilon) pela ajuda e esclarecimentos acadêmicos.

Aos meus pais Helena Pereira A. Miranda e Wilton A. Miranda por toda ajuda e conselhos durante toda minha vida, sem isso não chegaria até onde cheguei.

À minha amiga e orientadora da graduação Isane Vera Karsburg pelos primeiros ensinamentos em genética, trabalhos científicos e estímulo a cursar a Pós-Graduação.

A Tallita Rocha (Taty) e Anderson Rabello muito obrigado pela amizade, conselhos e pelos excelentes momentos vividos ao lado de vocês.

Aos amigos que estiveram juntos comigo nessa caminhada: Alex Junior, André Rodrigues e Gercione Dionizio, obrigado pelos grandes e inesquecíveis momentos em Viçosa.

Aos amigos e colegas do laboratório de Citogenética e Citometria da UFV: Fernanda Soares, Nathalia, Mariana Sattler, Ana Paula (Mitikis), Jéssica Coutinho, Paulo, muito obrigado pela amizade e momentos únicos; em especial a Mariana Sattler pela imensa ajuda, a qual me possibilitou escrever a dissertação e a Jéssica Coutinho pela ajuda na citogenética de milho.

Aos amigos da República “osBartira”, Nico, Renato, Givan e Túlio pelo recebimento e amizade durante esses anos de convivência.

## SUMÁRIO

|                                                                      |     |
|----------------------------------------------------------------------|-----|
| LISTA DE FIGURAS .....                                               | v   |
| LISTA DE TABELAS .....                                               | vi  |
| RESUMO .....                                                         | vii |
| ABSTRACT .....                                                       | ix  |
| 1. INTRODUÇÃO .....                                                  | 1   |
| 1.1 Citogenética Clássica .....                                      | 1   |
| 1.2 Aspectos citogenéticos em <i>Zea mays</i> .....                  | 3   |
| 1.3 Sincronização de meristemas radiculares .....                    | 4   |
| 1.4 Obtenção de metáfases mitóticas .....                            | 5   |
| 1.5 Agente bloqueador do ciclo celular: Amiprofos-methyl (APM) ..... | 6   |
| 2. OBJETIVOS .....                                                   | 8   |
| 2.1 Objetivo geral .....                                             | 8   |
| 2.2 Objetivos específicos .....                                      | 8   |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS .....                                          | 9   |
| 3.1 Material biológico .....                                         | 9   |
| 3.2 Preparo das lâminas .....                                        | 9   |
| 3.2.1 Experimento I sem sincronização celular .....                  | 9   |
| 3.2.2 Experimentos II e III com sincronização celular .....          | 11  |
| 3.3 Contagem de células .....                                        | 12  |
| 3.4 Análises estatísticas .....                                      | 12  |
| 4. RESULTADOS .....                                                  | 14  |
| 4.1 Germinação de sementes .....                                     | 14  |
| 4.2 Análise de células e cromossomos .....                           | 14  |
| 4.3 Experimentos conduzidos .....                                    | 17  |
| 4.3.1 Experimento I .....                                            | 17  |
| 4.3.2 Experimento II .....                                           | 20  |
| 4.2.3 Experimento III .....                                          | 22  |
| 5. DISCUSSÃO .....                                                   | 25  |
| 5.1 Análise e diferenciação de metáfases .....                       | 25  |
| 5.2 Experimentos I, II e III .....                                   | 27  |
| 6. CONCLUSÃO .....                                                   | 31  |
| 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....                                  | 32  |
| 8. ANEXOS .....                                                      | 40  |

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Células do meristema radicular de *Z. mays* tratado com 1,75 mM de HU durante 18 horas. Observar o efeito do aumento do índice de prófases após a sincronização celular. Barra: 10  $\mu$ m. .... 14
- Figura 2** - Meristema radicular de *Z. mays* tratado após a sincronização celular (1,75 mM de HU durante 18 horas) com 1,75 $\mu$ M de APM sob a pressão de vácuo por 32 minutos. Note o maior número de metáfases sobre o de interfases. Barra: 10  $\mu$ m.... 15
- Figura 3** - Metáfases agrupadas em meristema radicular de *Z. mays* após sincronização celular com 1,75 mM de HU durante 18 horas e ação de APM sob a pressão de vácuo por 32 minutos. Barra: 10  $\mu$ m..... 16
- Figura 4** - Diferentes classes de metáfases mitóticas encontradas nos meristemas radiculares sincronizados de *Z. mays* com aumento em objetiva de 100X: a- metáfase não bloqueada; b- metáfase agrupada e c- metáfase bloqueada com 1,75  $\mu$ M de APM. Barra: 10  $\mu$ m..... 17
- Figura 5** - Comportamento da média do número de células analisadas dos meristemas radiculares de *Z. mays* em cada variável do experimento I. .... 18
- Figura 6** - Comportamento médio do número de células analisadas dos meristemas radiculares de *Z. mays* em diferentes intervalos de tempo de recuperação após 32 minutos sob ação dos tratamentos do experimento II. .... 20
- Figura 7** - Comportamento médio do número de células analisadas dos meristemas radiculares de *Z. mays* em diferentes intervalos de tempo de recuperação após 40 minutos sob ação dos tratamentos do experimento III. .... 23

## LISTA DE TABELAS

|                                                                                |    |
|--------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 1</b> - Tratamentos do experimento I. ....                           | 9  |
| <b>Tabela 2</b> - Tratamentos dos experimentos II e III com 1,75 mM de HU..... | 11 |

## RESUMO

MIRANDA, Daniel Pereira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2017. **Otimização de protocolo para obtenção de cromossomos metafásicos de alta qualidade citogenética em meristemas radiculares de milho (*Zea mays*).** Orientador: Carlos Roberto de Carvalho. Coorientadores: Wellington Ronildo Clarindo e Leonardo Lopes Bhering.

O milho (*Zea mays*) é considerado uma espécie modelo nos estudos citogenéticos de plantas. Contudo, existem dificuldades em se obter cromossomos metafásicos de qualidade e em quantidade. A sincronização celular com hidroxiaurea (HU) seguida da utilização de agentes bloqueadores do ciclo celular sob pressão negativa de vácuo podem ser eficazes para alcançar um alto índice metafásico. Além disso, diferenciar metáfases com cromossomos bloqueados dos não bloqueados é uma prática essencial para se obter cromossomos com morfologia delimitada para a montagem do cariograma. O objetivo do presente trabalho foi desenvolver um protocolo para obtenção de alto índice metafásico apresentando cromossomos bem distendidos e de qualidade citogenética em quantidades suficientes para serem disponibilizados em aplicações que envolvam técnicas moleculares e genômicas em *Zea mays*. As raízes de milho foram tratadas no experimento I sem sincronização celular, que consistiu de 4 tratamentos: T1: sem APM e sem pressão negativa de vácuo; T2: sem APM com pressão negativa de vácuo (-570 mmHg); T3: com APM e com pressão negativa de vácuo e T4: com APM sem pressão negativa de vácuo. Os períodos de tempo de cada tratamento foram: 1, 2, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36 e 40 min. As raízes foram tratadas com Feulgen e em seguida realizou-se a digestão enzimática, esmagamento celular e análise de imagens do material sobre a lâmina. Os experimentos II e III consistiram de células sincronizadas com ação da HU. Após as análises das contagens de células do experimento I, os tempos de 32 minutos com APM com vácuo e 40 minutos com APM sem vácuo foram selecionados para dar continuidade conforme seus índices mitóticos e metafásicos. Os experimentos II e III consistiram no tempo de recuperação das raízes, porém com a utilização de 1,75mM de HU. Os tempos de recuperação variaram em períodos de 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270 e 300 minutos com 3 raízes retiradas a cada intervalo de tempo. Os procedimentos de fixação, visualização do DNA, digestão enzimática e esmagamento, captura e análise das imagens seguiram os mesmos passos do experimento I. As raízes absorveram APM suficiente para

bloquear o ciclo celular no período de tempo máximo de 40 minutos. Após a sincronização do ciclo celular, a porcentagem média de metáfases aumentou principalmente no tratamento T1 (32 min. com APM e vácuo) do experimento II após 4 horas de recuperação com 33,15 % de metáfases. Foi possível discriminar metáfases bloqueadas das não bloqueadas, com base na morfologia dos cromossomos, constrições bem visíveis e níveis de compactação cromossômica. A pressão negativa de vácuo permitiu obter metáfases em quantidade e qualidade suficientes para serem aplicados em técnicas de bandeamento, análises genômicas e citomoleculares.

## ABSTRACT

MIRANDA, Daniel Pereira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, March, 2017. **Optimization of protocol for obtaining high cytogenetic metaphase chromosomes in corn root meristems (*Zea mays*)**. Adviser: Carlos Roberto de Carvalho. Co-advisers: Wellington Ronildo Clarindo and Leonardo Lopes Bhering.

Corn (*Zea mays*) is considered a model species in cytogenetic studies of plants. However, there are difficulties in obtaining metaphasic chromosomes of quality and quantity. The cell synchronization with hydroxyurea (HU) followed using cell cycle blocking agents under negative vacuum pressure may be effective to achieve a high metaphase index. In addition, differentiating metaphases with blocked chromosomes from unlocked chromosomes is an essential practice for obtaining chromosomes with delimited morphology for a kariogram montage. The objective of the present work was to develop a protocol to obtain a high metaphase index presenting well distended and cytogenetic chromosomes in sufficient quantity to be available in applications that involve molecular and genomic techniques in *Zea mays*. The maize roots were treated without experiment I without cell synchronization, which consisted of 4 treatments: T1: without APM and without negative vacuum pressure; T2: no APM with negative vacuum pressure (-570 mmHg); T3: with APM and with vacuum negative pressure and T4: with APM without negative vacuum pressure. The time periods of each treatment were: 1, 2, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36 and 40 min. The roots were treated with Feulgen and instead enzymatic digestion, cellular crushing and image analysis of the material on a slide were performed. Experiments II and III consisted of cells synchronized with HU action. After analysis of the cell counts of experiment I, the 32 minute times with APM with vacuum and 40 minutes with APM without vacuum were selected to give continuity according to their mitotic and metaphase indices. Experiments II and III consisted in root recovery time, but with a use of 1.75 mM of HU. The recovery times varied in periods of 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270 and 300 minutes with 3 roots removed at each time interval. The procedures of fixation, DNA visualization, enzymatic digestion and crushing, capture and analysis of the images were the same as the synchronization. The roots absorbed sufficient APM to block the cell cycle in the maximum time period of 40 minutes After a cell cycle synchronization, a mean percentage of metaphases increased without T1 treatment (32 min with APM and vacuum) from experiment II after 4 hours of recovery

with 33.15% of metaphases. It was possible to discriminate blocked metaphases from unlocked ones, based on chromosome morphology, conspicuous constrictions and levels of chromosome compaction. Negative vacuum pressure allowed to obtain metaphases in sufficient quantity and quality to be applied in banding techniques, genomic and cytological analyzes.

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Citogenética Clássica

A citogenética corresponde ao estudo dos cromossomos, bem como a descrição da estrutura dos mesmos, quanto ao seu estudo funcional, variação e evolução, aproximando-se mais da análise do genoma em comparação com a genética típica (Schulz-Schaeffer, 1980; Speicher e Carter, 2005, Bass e Birchler, 2012), partindo da análise básica do número cromossômico, estendendo-se para análise citomolecular (Stace, 2000).

Segundo Kato et al., (2005), a citogenética se consagrou como uma importante ferramenta na área da biologia vegetal, pois possui componentes necessários para o estudo do genoma associado à cromatina em nível citológico. Uma das principais particularidades citadas, está no fato de estudos citogenéticos participarem de projetos de mapeamento de genomas, análise do comportamento dos cromossomos mitóticos, meióticos e, também de importância agrônômica, via engenharia cromossômica (Gill e Frieb, 1998). Andres e Kuraparthi (2013) citaram que tanto a análise citogenética como a manipulação de cromossomos são importantes nas análises genéticas, genômicas e de fluxo gênico.

O cariótipo tem sido representado pelo kariograma que corresponde a montagem de imagens capturadas ao microscópio, sendo os cromossomos arranjados em pares e em ordem decrescente (Singh, 2002), o qual facilita a análise das características cromossômicas, tais como número, morfologia, tamanho dos braços e constrições secundárias (Grabowska-Joachimiak e Joachimiak, 2002; Freitas et al. 2007; Karsburg et al., 2009). Algumas informações podem ser aplicadas para estudo de aberrações cromossômicas, funções celulares, estudos citotaxonômicos e evolução de espécies (Bennet e Leitch, 2005; Samaddar et al. 2012; Baeza et al., 2015).

Os dados a respeito da morfologia dos cromossomos foram referidos por Schulz-Schaeffer (1980) como dependentes da razão entre braços e a clara posição centromérica. Marques et al., (2016) enfatizaram que a escolha das metáfases com constrição secundárias bem definidas, cromatina não danificada e livres de detritos citoplasmáticos facilita a contagem, caracterização morfométrica e montagem do kariograma.

O nível de compactação dos cromossomos pode influenciar tanto o tamanho quanto a morfologia dos cromossomos, como visto em *Dorstenia alata* (Amaral-Silva et al., 2016) e *Eucalyptus citriodora* (Carvalho e Carvalho, 2016).

Os cromossomos metafásicos podem ser obtidos de meristemas radiculares com crescimento proliferativo, cujas raízes passam pelo processo de digestão enzimática para facilitar o espalhamento das células por meio de técnicas de esmagamento (Anamthawat-Jónsson, 2003) ou dissociação e secagem ao ar (Carvalho e Saraiva, 1993). De acordo com Carvalho et al., (2007) a técnica de esmagamento não é viável para se obter cromossomos com morfologia adequada para análise, pois pode haver sobreposições de cromossomos, detritos e deformações do próprio cromossomo.

Griffor et al., (1991) citaram que a dificuldade para se obter lâminas com cromossomos mitóticos e meióticos em plantas, comparados aos obtidos em animais, é devido à presença de parede celular nas células vegetais. Tanto a parede celular quanto os detritos celulares em plantas dificultam obter cromossomos mitóticos sem sobreposição (Kirov et al., 2014; Rodríguez-Domínguez et al., 2017). De acordo com Wang e Yu (2016), a digestão enzimática pode eliminar a parede celular vegetal, podendo conseguir desta forma, cromossomos espalhados e sem sobreposição. Como ressaltado por Mirzagharderi (2010), uma das formas de se evitar células com parede celular mais firme se dá pela exclusão do tecido meristemático acima da região do meristema apical radicular, pois este contém células em certo grau de diferenciação ou mesmo diferenciadas, como também células mais velhas.

A utilização de meristemas radiculares como fonte de material para análises citogenéticas levou à formulações de metodologias que induzissem a proliferação celular e o bloqueio desta na fase de metáfase (Pan et al., 1993). Como descrito por Dolezel et al., (2014), os meristemas radiculares são utilizados em citogenética vegetal, devido à alta taxa de divisão celular encontrada neste órgão, já as células do tecido foliar não apresentam essa característica. Também, Shen et al., (2015) ressaltaram que o cariótipo dos meristemas radiculares é estável em relação a outros órgãos da planta e também, pode-se estimular o aumento do número de células em uma mesma fase do ciclo celular por meio da sincronização destas com o uso de compostos químicos.

## 1.2 Aspectos citogenéticos em *Zea mays*

As primeiras abordagens citogenéticas em milho datam de 1929, com estudos de Barbara McClintock. A partir de seus resultados, a autora demonstrou que o milho em seu complemento haploide possui 10 cromossomos. Ela representou as características cromossômicas, tais como constrições primárias e secundárias em um idiograma (McClintock, 1929).

Em 1931, as Knobs, foram identificadas por Crighton e McClintock. Essas regiões coram-se mais que outras do cromossomo e ocorrem em certos pontos em determinados cromossomos (Brown, 1948). Em 1933, foram representadas em idiograma 12 knobs nos cromossomos mitóticos de milho. O número de Knobs em milho pode variar entre pesquisadores, pois, 31 foram encontradas distribuídas nos 10 cromossomos na fase de paquíteno em milho (Bianchi et al., 1963), 21 knobs encontradas por McClintock et al., (1981) e 7 knobs distribuídos entre os 10 cromossomos de paquíteno de milho (Caixeta, et al., 2011). Nos cromossomos de *Z. mays* existem blocos de heterocromatina em diferentes regiões, principalmente nas regiões que flanqueiam o centrômero, região organizadora do nucléolo (NOR) e em Knobs (Peacock et al., 1981; Ananiev et al., 1998).

Outras características podem ser encontradas nos cromossomos de milho, como a região organizadora do nucléolo (NOR) no par cromossômico 6 (Givens et al., 1976; Khuong e Schubert, 1985; Caixeta e Carvalho, 2000; Mondin et al., 2014). A NOR é rica em sequências repetitivas em tandem de genes ribossomais (rRNA) (Britton-Davidian et al., 2012), podendo ser encontradas em apenas um par cromossômico, como no milho ou em mais de um par como em outras espécies de plantas (Besendorfer et al., 2002; Scaldaferrro et al., 2013; Nascimento et al., 2014; Miguel et al., 2012).

O cariótipo de milho foi classificado quanto a sua morfologia, sendo observadas algumas variações no tamanho dos cromossomos. Como evidenciado por Sadler e Weber (2001), os cromossomos de *Z. mays* foram classificados da seguinte maneira: metacêntricos (cromossomos 1, 2 e 5); submetacêntricos (cromossomos 3, 4, 6, 7, 9, 10) e acrocêntrico (cromossomo 8). A mesma classificação foi observada por Rosado et al., (2009). Algumas variações podem ser encontradas a respeito da razão de braços, como observado por Mondin et al., (2014) os quais classificaram o

cromossomo 4 como metacêntrico e o par cromossômico 2 como submetacêntrico. Carvalho e Carvalho (2016) verificaram em cromossomos de eucalipto que o nível de compactação dos cromossomos pode afetar a classificação dos mesmos, alterando assim, o comprimento dos braços.

### **1.3 Sincronização de meristemas radiculares**

O ciclo celular é um dos processos fundamentais e mais elaborados no crescimento de organismos vivos (Kumagai-Samo et al., 2006), cujas células filhas formadas dão continuidade ao ciclo e possuem a capacidade de diferenciarem-se em outros órgãos (Pathirana e Eason, 2004).

De acordo com Dewitte e Murray (2003), técnicas podem ser utilizadas para obter células progredindo em uma mesma taxa de divisão por meio da paralização reversível do ciclo celular e conseqüentemente obter células em uma mesma fase. Segundo Lucretti e Dolezel (1995), esse acúmulo de células em uma mesma fase é denominado sincronização celular, cujas células paralisam-se na fase G1/S.

A sincronização celular pode ocorrer naturalmente em alguns tecidos de plantas, ou serem induzidas por meio da utilização de agentes químicos (Planchais et al., 2000). Como citado por Kumagai-samo et al., (2006), na etapa da indução à sincronização celular através da utilização de agentes químicos, os reagentes inibidores reversíveis da síntese de DNA são os mais utilizados para bloquear a divisão celular na fase G1/S, como por exemplo, a hidroxihureia (HU) e a afidicolina. Futcher (1999) ressalta que devesse fazer a análise cuidadosa de agentes químicos que promovem essa acumulação de células em um mesmo estágio, pois cada um pode agir em uma determinada fase do ciclo celular.

Uma das primeiras análises da ação da HU feitas por Young e Hodas (1964) revelaram que este composto inibe produção de desoxiribonucleotídeos, por meio da inativação reversível da enzima ribonucleotídeo redutase, causando a parada no ciclo celular. Segundo Hoshi et al., (2004), em altas concentrações, a HU pode não ser favorável para a sincronização celular, pois possui efeito citotóxico, causando alterações na cromatina.

Segundo Lucretti e Dolezel (1995), após o tratamento com a HU, deve-se adicionar um agente antimetabólico para bloquear o ciclo celular e conseqüentemente

aumentar o índice metafásico. Em plantas, foram obtidos grandes porcentagem de células em metáfase com a sincronização seguida do bloqueio do ciclo celular com agente (s) antimitótico (s), como trigo (Pan et al., 1993; Lee et al., 1997), milho (Lee et al., 1996), pepino (Hoshi et al., 2004) e cevada (Pan et al., 1993; Temel e Gozukirmizi, 2015).

#### **1.4 Obtenção de metáfases mitóticas**

Nas células, os microtúbulos são estruturas conservadas em organismos eucariotos, desempenhando papéis essenciais como morfogênese, movimento celular, transdução de sinal e divisão celular (Koo et al., 2009). Cabral e Barlow (1991) mencionaram que a organização dos microtúbulos é equilibrada nas células e caso haja alguma perturbação na sua polimerização, limita a capacidade de realizarem suas funções vitais como a progressão do ciclo celular.

Como descrito por Planchais et al., (2000) na mitose, a organização e formação do fuso mitótico é fundamental para o movimento cromossômico, o qual se dá pela ação de microtúbulos formados pelas proteínas tubulinas e, quando sofrem alguma injúria causada por algum componente químico antimitótico, pode não ocorrer a transição metáfase/anáfase. A polimerização dos microtúbulos é uma etapa crítica durante a mitose, pois deve haver a reorganização correta dos centrossomos e a distribuição correta das cromátides irmãs para cada célula filha (Marzo e Naval, 2013).

Muitos agentes químicos podem ser utilizados para bloquear o ciclo celular em plantas (Carpeta et al., 2006), assim, paralisam a proliferação, crescimento celular, como também fazem com que haja deposição aleatória das microfibrilas de celulose na parede celular, na qual as células se assemelham com as de raízes tumorais (Murthy et al., 1994). Tais substâncias antimitóticas são valiosas em estudos da função e organização dos microtúbulos em células vegetais (Cleary e Rardhan, 1987).

Como exemplo de reagentes antimitóticos potentes na ação sobre os microtúbulos de plantas, destacam-se os herbicidas dinitroanilina, como amiprofos-methyl, orizalina e trifluralina. As dinitroanilinas provocam várias anormalidades em plantas, principalmente em regiões com grande capacidade proliferativa como os meristemas radiculares (Morejohn et al., 1987; Hansen et al., 1996). Além de causarem

a paralização do ciclo celular, podem ter efeitos colaterais, como mutações genéticas e aneuploidia (Pintos et al., 2007).

Como ressaltado Kato e Birchler (2006) o gás óxido nitroso (N<sub>2</sub>O) também é eficaz no bloqueio do ciclo celular. O N<sub>2</sub>O acumulou metáfases em células somáticas e germinativas de milho e, conforme aumentava o tempo de exposição ao gás, os cromossomos apresentavam maior grau de compactação, o que ocasionou a diminuição da razão de braços cromossômicos (Danilova e Birchler, 2008).

A colchicina é comumente utilizada para a obtenção de metáfases mitóticas (Carpeta et al., 2006). Essa substância é extraída das sementes e bulbos de uma planta denominada *Conchicum autumnale*, cuja função ocorre na fase de metáfase, acarretando a despolimerização dos microtúbulos, inibindo assim a formação do fuso e o bloqueio das células nesta fase (Faria e Destro, 1999).

Devida à alta toxicidade da colchicina e o inferior rendimento em comparação a outros antimitóticos, houve uma substituição da colchicina por estes agentes, tais como APM e orizalina (Sree Ramulu et al., 1991; Thao et al., 2003). A utilização do APM em concentrações micromolares facilita a sua retirada da célula e diminui a ocorrência de mitoses anormais e formação de micronúcleos (Planchais et al., 2000).

Para aumentar a eficiência da absorção da solução antimitótica pelas raízes, a pressão a vácuo negativa pode ser uma alternativa, pois conforme ressaltado por Ahmad et al., (2017), a pressão negativa irá criar uma pressão atmosférica que diminuirá a quantidade de ar dentro dos espaços entre as células, sendo essa saída de ar crescente conforme o aumento do tempo. Com base nisto, a pressão a vácuo negativa irá possibilitar a maior absorção e entrada dos agentes antimitóticos nas células, permitindo o acúmulo de células na fase de metáfase.

### **1.5 Agente bloqueador do ciclo celular: Amiprofos-methyl (APM)**

O agente químico APM é um herbicida utilizado na agricultura e é rapidamente degradado acarretando poucos danos ao meio ambiente (Brahma e Umesh, 1985). Em baixas concentrações, o APM pode inibir a polimerização de microtúbulos de células impedindo a formação do fuso mitótico, bloqueando a progressão do ciclo celular para a fase de anáfase (Rodrigues et al., 2011).

O efeito de agir na despolimerização dos microtúbulos é uma característica secundária do APM (Falconer e Seagull, 1987). Foi verificado que o APM além de ser eficiente na paralização do fuso, também tem característica de ação rápida e reversível (Falconer e Seagull, 1987).

Sree Ramulu et al., (1991) reportaram que em concentrações milimolares o APM tem alta afinidade com os microtúbulos, despolimerizando-os eficientemente e bloqueando células na fase de metáfase. Contudo, em baixas concentrações, não ocorre essa despolimerização, sendo possível encontrar células em fase de anáfase e em altas concentrações os cromossomos metafásicos ficam agrupados com sobreposição. Conseqüentemente a duração do tempo e concentração do reagente são etapas importantes no processo (Dolezel et al., 1999; Carvalho et al., 2008).

Em leguminosas existe uma sensibilidade diferente do APM na despolimerização da tubulina, na qual, existe doses de APM para cada espécie (Gualbert et al., 1996). Em *Zea mays*, o aumento da concentração de APM aumentou o índice metafásico, porém houve o aumento de aberrações cromossômicas, tais como formação de micronúcleos, fusos multipolares e pontes de cromatina (Wang et al., 2006). Häntzschel e Weber (2010) destacaram que o APM pode ser considerado uma alternativa à utilização da colchicina pelo fato do mesmo bloquear eficientemente o ciclo celular, ser utilizado em concentrações micromolares, possuir menor toxicidade e ser um agente químico menos oneroso.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Desenvolver protocolo para obtenção de alto índice metafásico apresentando cromossomos bem distendidos e de qualidade citogenética em quantidades suficientes para serem disponibilizados em aplicações que envolvam técnicas genômicas e moleculares em *Zea mays*.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Testar diferentes intervalos de tempos nos meristemas radiculares de milho na presença e ausência de agente bloqueador APM, com e sem pressão negativa de vácuo.
- Associar o agente sincronizante HU, de ciclo celular, aos tratamentos com o agente bloqueador com e sem pressão negativa de vácuo.
- Analisar o comportamento do índice mitótico e metafásico entre os tratamentos;
- Identificar o melhor tratamento quanto à quantidade e qualidade morfológica dos cromossomos.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Material biológico

Para o desenvolvimento dos experimentos foram utilizadas raízes de sementes germinadas de *Zea mays* var. “Al Bandeirante”. A escolha da variedade baseou-se em resultados laboratoriais, apresentando alto percentual de germinação de sementes e meristema radicular proliferativo.

#### 3.2 Preparo das lâminas

Para testes de obtenção de cromossomos metafásicos, foram utilizados meristemas de raízes germinadas em placa de Petri a 30°C. Considerou-se sincronizadas as células dos meristemas radiculares tratados com HU (Sigma®) e células bloqueadas com a utilização do agente bloqueador APM (Sigma®) e 0,3% de dimethylsulphoxide (DMSO) (Sigma®). Ao atingir comprimento de 1,0 a 1,5 cm, os meristemas passaram pelos procedimentos apresentados abaixo:

##### 3.2.1 Experimento I sem sincronização celular

Nesta etapa foi realizada a análise do tempo de ação do agente bloqueador do ciclo celular APM em meristemas radiculares de *Z. mays* não sincronizados com HU. Essa etapa consistiu em 4 tratamentos:

**Tabela 1** - Tratamentos do experimento I.

| Tratamentos | 1,75 µM de APM +<br>0,3% DMSO | Pressão negativa de<br>vácuo (-570 mmHg.) |
|-------------|-------------------------------|-------------------------------------------|
| T1          | -                             | -                                         |
| T2          | -                             | +                                         |
| T3          | +                             | +                                         |
| T4          | +                             | -                                         |

+: presença -: ausência

Para realizar a pressão de vácuo negativa a -570 mmHg, a bomba de vácuo BUSCH (Motor EBSR63K2 do tipo 5010005C) foi acoplada a torneira de escape de um dessecador à vácuo (recipiente de 25 cm com base em polipropileno e tampa em poliestireno) com vacuômetro AGATEC com medidas de 0 à - 760 mmHg.

Os tempos de exposição das raízes dos tratamentos do experimento I foram os seguintes: 1, 2, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36 e 40 minutos. Três raízes foram retiradas em cada um destes intervalos de tempo para cada tratamento, totalizando 36 raízes por tratamento.

O restante do experimento foi conduzido conforme especificado por Silva (2016): após a retirada das raízes, foram lavadas rapidamente em H<sub>2</sub>O destilada e colocadas em placas de petri com papel germitest úmido para iniciar o processo de recuperação dentro de estufa de germinação à 30°C durante o período de 4 horas. Após o período de 4 horas, as raízes foram fixadas em metanol/ácido acético, três partes de metanol para cada parte de ácido acético, durante aproximadamente 16 horas a -20°C.

Após esse procedimento, as raízes foram tratadas com a reação de Feulgen que consiste das seguintes etapas: remoção do fixador com três lavagens de 5 minutos cada em água destilada, posteriormente hidrolisadas em HCl (ácido clorídrico) 5N (cinco normal) durante 18 minutos e lavadas em água sulfurosa 2:1 (2 partes de metabissulfito de potássio para 1 de HCl 1N) durante 13 minutos, seguidas por 3 lavagens em água destilada de 5 minutos cada. Ao final do procedimento, as raízes foram tratadas com reativo de Schiff durante 1 hora e após esse período foram realizadas 3 lavagens de H<sub>2</sub>O destilada de 5 minutos cada.

Em cada tubo eppendorf<sup>®</sup> de 1,5 ml contendo uma raiz, 50 µl do pool enzimático (0,5% celulase Yakult + 2% celulase Sigma<sup>®</sup>, C1184 + 0,5% hemicelulase Sigma<sup>®</sup>, H0771 + 0,5% macerozyme orozuka R10 Yakult) diluído em 25 µl de tampão citrato (10 mM de ácido cítrico e 10 mM de citrato de sódio tribásico) e, após, acrescentado 0,5 µL de pectinase (Sigma<sup>®</sup>, P2736). As raízes foram lavadas em H<sub>2</sub>O destilada por 30 min, com trocas a cada 10 min, e submetidas à maceração enzimática por 40 minutos a 35° C. A solução enzimática foi removida, as raízes foram novamente fixadas como descrito acima e armazenadas a -20 °C.

Após essa etapa, a extremidade apical de cada meristema radicular foi cortada sobre uma lâmina de microscopia com auxílio de um bisturi (após a retirada da coifa)

e 1 gota de ácido acético à 45% foi utilizada para o manuseio do material. Em seguida, uma lamínula de vidro foi colocada sobre o material e pressionada para que o material sobre a lâmina se espalhe.

A técnica de dissociação e secagem ao ar (Carvalho e Saraiva, 1993) foi utilizada para a captura das imagens de metáfases agrupadas, bloqueadas e não bloqueadas.

As lâminas foram observadas em microscópio Olympus™, modelo BX60, equipado com acessórios de análise de imagem e iluminação de campo claro, com objetiva de aumento em 40X e 100X. As imagens foram capturadas diretamente por uma vídeo-câmera com CCD (Olympus™ DP71) acoplada ao microscópio e a um computador equipado com placa digitalizadora.

### 3.2.2 Experimentos II e III com sincronização celular

Os experimentos II e III consistiram na variação do tempo de recuperação das raízes conforme o período mais apropriado de exposição ao APM que foi obtido no experimento I. Os experimentos II e III foram acrescidos de 1,75 mM de HU (Silva, 2016) em solução de 80 mL contendo H<sub>2</sub>O destilada e 1,72 gL<sup>-1</sup> da mistura sais MS Sigma® com meia força durante 18 horas à 30° C para induzir a sincronização celular.

**Tabela 2** - Tratamentos dos experimentos II e III com 1,75 mM de HU.

| <b>Experimento II</b>  | <b>1,75 µM de APM +<br/>0,3% DMSO</b> | <b>Pressão negativa de<br/>vácuo (-570 mmHg.)</b> |
|------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------------------|
| T1 (32 minutos)        | +                                     | +                                                 |
| T2 (32 minutos)        | +                                     | -                                                 |
| T3 (32 minutos)        | -                                     | -                                                 |
| <b>Experimento III</b> | <b>1,75 µM de APM +<br/>0,3% DMSO</b> | <b>Pressão negativa de<br/>vácuo (-570 mmHg.)</b> |
| T1 (40 minutos)        | +                                     | +                                                 |
| T2 (40 minutos)        | +                                     | -                                                 |

+: presença; -: ausência

Os tempos de recuperação nos experimentos II e III variaram em períodos de 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 4,5; 5,0 horas, com 3 raízes retiradas a cada intervalo de tempo, totalizando 30 raízes por tratamento.

Os procedimentos de fixação, reação de Feulgen, digestão enzimática e esmagamento, captura e análise das imagens seguiram os mesmos processos do experimento I.

### 3.3 Contagem de células

A partir das imagens capturadas, foi realizada a contagem dos eventos de todas as fases do ciclo celular: interfase, prófase, metáfase, anáfase e telófase. De acordo com a morfologia e a forma com a qual os cromossomos metafásicos estão agrupados, foram subdivididos em três tipos:

1º- Metáfases com cromossomos bloqueados, aquelas que apresentarem a morfologia com constrições e regiões teloméricas bem definidas, estando agrupados ou não;

2º- metáfases com cromossomos agrupados, não apresentaram regiões cromossômicas visíveis para distinção entre metáfases;

3º- metáfases com cromossomos não bloqueados, mas apresentando regiões centroméricas e teloméricas pouco definidas.

Para cada lâmina, 5 imagens foram capturadas em regiões sem sobreposições celulares, totalizando 15 imagens por período de tempo. As anáfases e telófases não foram analisadas por não apresentarem significância nos experimentos, porém seus valores foram adicionados para o cálculo do índice mitótico.

O índice mitótico foi calculado a partir da seguinte fórmula: (número de células em mitose/ total de células) x 100. O índice metafásico foi calculado pela fórmula: (número de células na fase de metáfase/ total de células) x 100.

### 3.4 Análises estatísticas

Os dados avaliados foram divididos em dois fatores: **tratamentos e tempos**, com análise de teste F a 5% de significância, teste de Tukey para valores qualitativos e regressão linear para valores quantitativos com base nos dados calculados pelo

programa de análise estatística Genes (Cruz et al., 2006). Cada experimento foi avaliado separadamente.

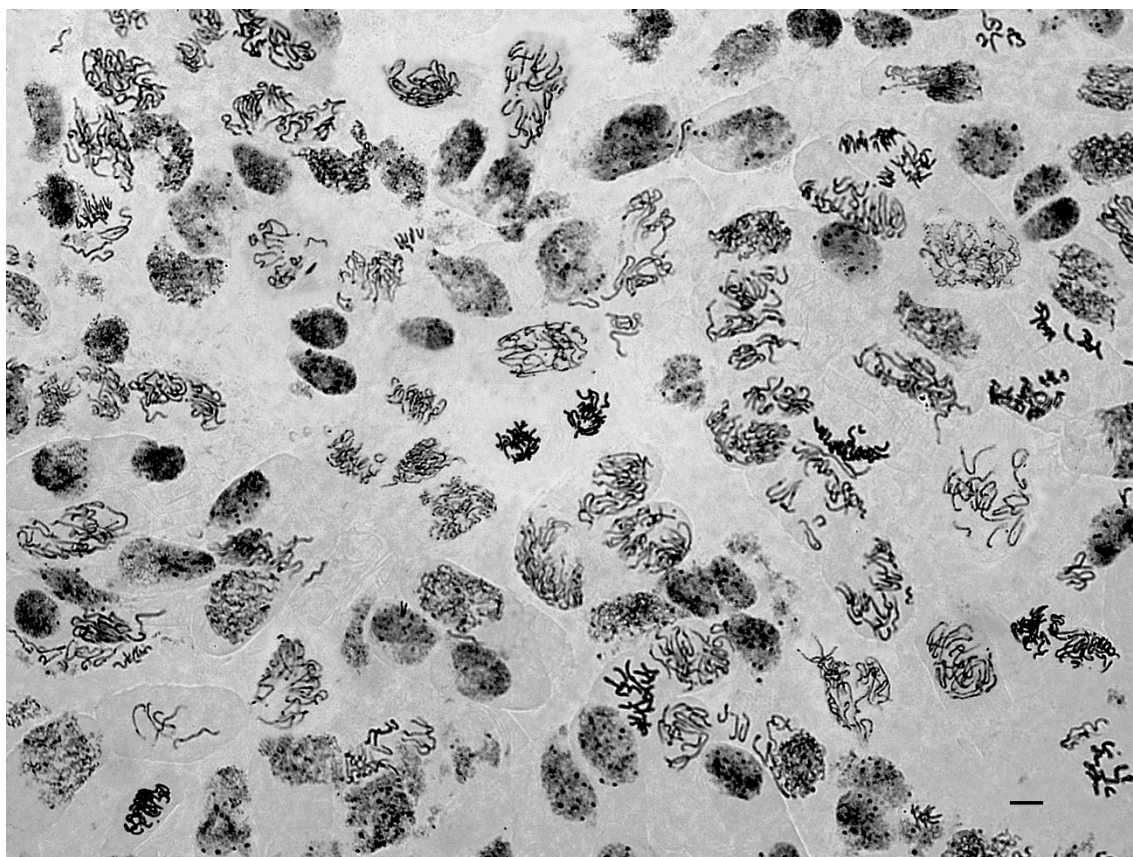
## 4. RESULTADOS

### 4.1 Germinação de sementes

As sementes de *Zea mays* apresentaram capacidade germinativa e crescimento radicular homogêneo 3 dias após terem sido colocadas em placas de Petri, apresentando comprimento da raiz principal variando de 1,0 a 1,5 cm.

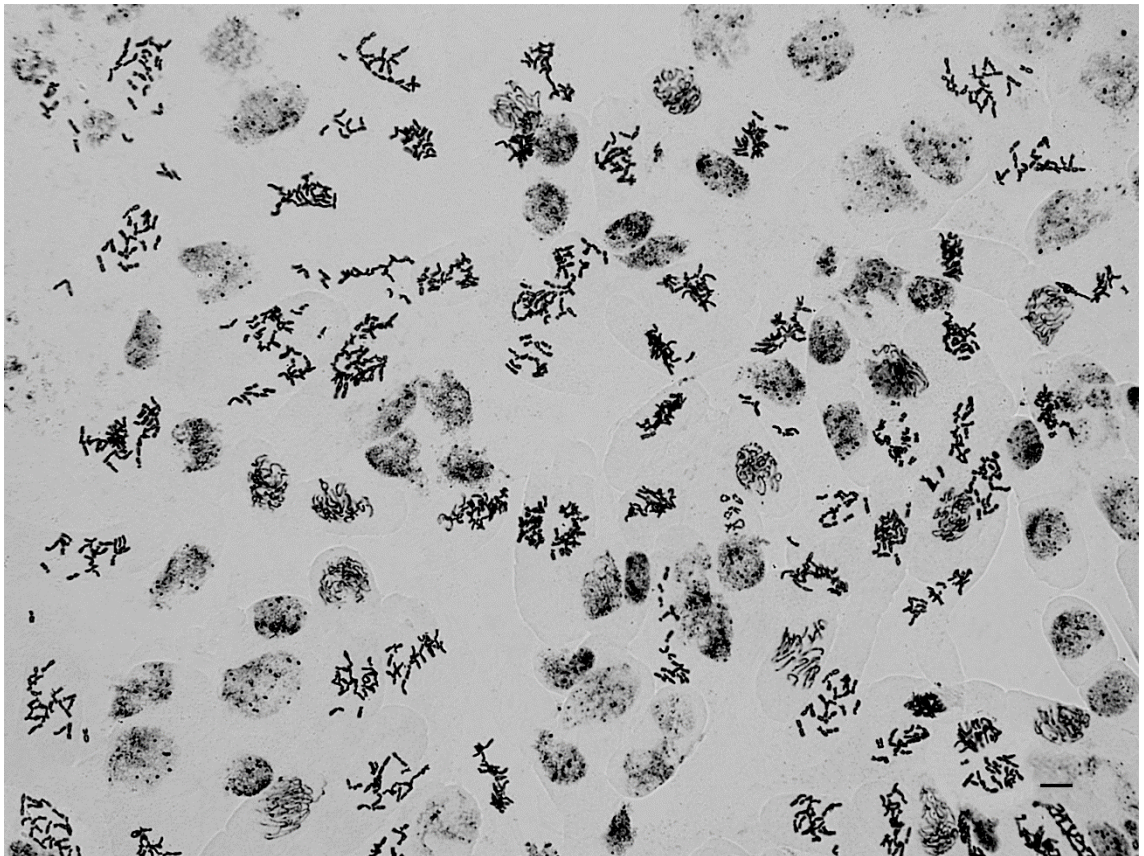
### 4.2 Análise de células e cromossomos

As raízes não tratadas com HU apresentaram baixos índices mitóticos e metafásicos (Tabela 3). A Figura 1 representa o acúmulo de células na fase de prófase em um meristema radicular de milho após sincronização do ciclo celular com 1,75 mM de HU durante o período de 18 horas.



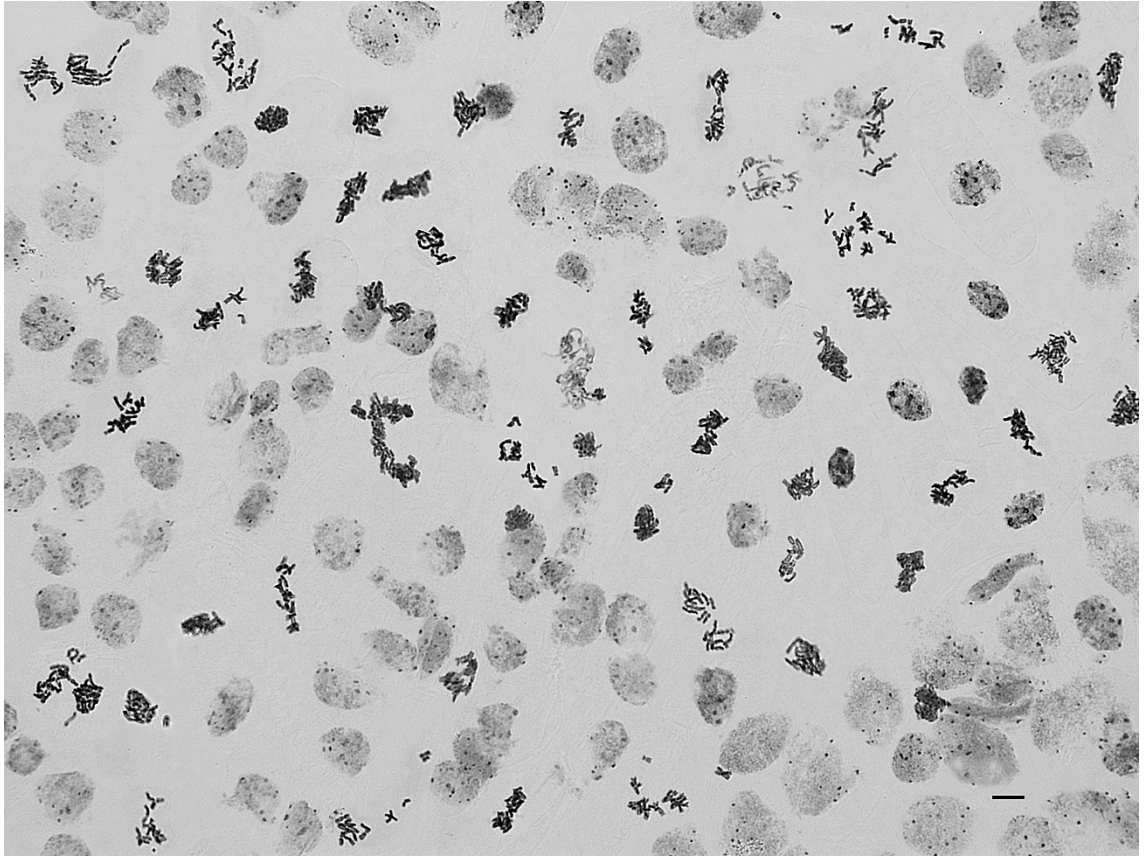
**Figura 1** - Células do meristema radicular de *Z. mays* tratado com 1,75 mM de HU durante 18 horas. Observar o efeito do aumento do índice de prófases após a sincronização celular. Barra: 10  $\mu$ m.

No tratamento das raízes de milho com APM após a sincronização e retirada do HU das células favoreceu o acúmulo de metáfases no decorrer dos intervalos de tempos de recuperação celular. Metáfases com cromossomos separados foram obtidas conforme demonstrado pela Figura 2.



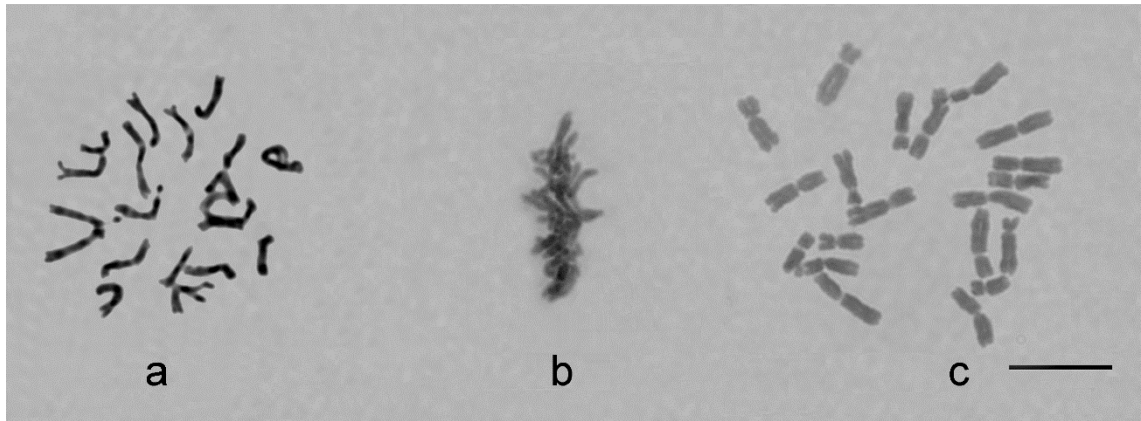
**Figura 2** - Meristema radicular de *Z. mays* tratado após a sincronização celular (1,75 mM de HU durante 18 horas) com 1,75 $\mu$ M de APM sob a pressão de vácuo por 32 minutos. Nota-se o maior número de metáfases sobre o de interfases. Barra: 10  $\mu$ m.

Metáfases agrupadas foram encontradas em todos experimentos (I, II e II). A Figura 3 demonstra inúmeras metáfases agrupadas com cromossomos totalmente sobrepostos e algumas metáfases não bloqueadas.



**Figura 3** - Metáfases agrupadas em meristema radicular de *Z. mays* após sincronização celular com 1,75 mM de HU durante 18 horas e ação de APM sob a pressão de vácuo por 32 minutos. Barra: 10  $\mu$ m.

Os três tipos de metáfases analisadas no experimento estão representados na Figura 4. As três imagens foram utilizadas para diferenciar cromossomos bloqueados de não bloqueados. A Figura 4a representa uma metáfase com cromossomos não bloqueados, os quais apresentam-se grandes e sem compactação e delimitação dos cromossomos, com centrômero pouco aparente. A Figura 4b representa uma metáfase com cromossomos totalmente agrupados, sem nenhuma região cromossômica detectável. A Figura 4c representa uma metáfase bloqueada, os cromossomos apresentaram-se menores sem sobreposições e regiões teloméricas com terminações definidas, além aparente região centromérica e das duas cromátides irmãs em cada cromossomo.

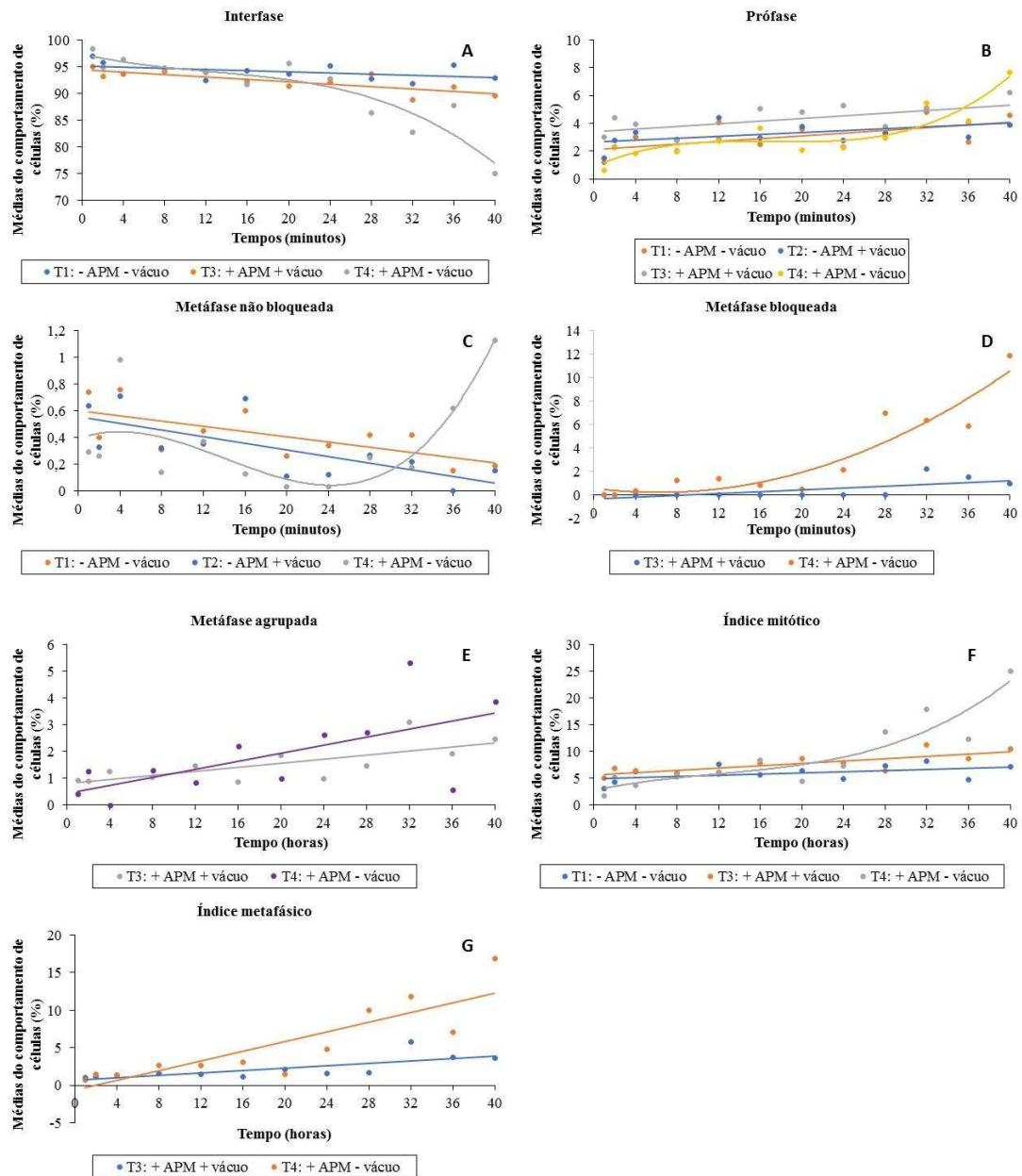


**Figura 4** - Diferentes classes de metáfases mitóticas encontradas nos meristemas radiculares sincronizados de *Z. mays* com aumento em objetiva de 100X: a- metáfase não bloqueada; b- metáfase agrupada e c- metáfase bloqueada com 1,75  $\mu\text{M}$  de APM. Barra: 10  $\mu\text{m}$ .

### 4.3 Experimentos conduzidos

#### 4.3.1 Experimento I

O experimento I (Figura 5 e Tabela 3 - anexos) demonstrou a variação do comportamento médio de células analisadas em meristemas radiculares de milho sem adição de HU, na presença e ausência de APM com e sem a pressão negativa de vácuo, cujo tempo de recuperação foi fixo em 4 horas para todos os quatro tratamentos. Foi avaliado apenas o tempo de entrada do agente bloqueador APM nas células das raízes de milho com e sem ação do vácuo.



**Figura 5** - Comportamento da média do número de células analisadas dos meristemas radiculares de *Z. mays* em cada variável do experimento I.

Na análise dos núcleos interfásicos (Tabela 3 - anexos) entre os 4 tratamentos, houve diferença significativa apenas nas médias do tratamento T4 (APM sem vácuo), o mesmo apresentou as menores porcentagem entre as médias nos tempos de 28 a 40 minutos. Ocorreu diminuição linear da porcentagem média de interfases com o decorrer do tempo nos experimentos T1 e T3 e uma grande diminuição desta variável no tratamento 4, sendo o tempo de 40 minutos aquele que apresentou a menor porcentagem média de células em interfase (75,4%) (Figura 5A).

A porcentagem média de prófases entre os quatro tratamentos não apresentaram diferenças significativas nos períodos de 8, 12, 28, 32 e 36 minutos (Tabela 3 - anexos). A Figura 5B demonstra a distribuição das médias até o tempo máximo de 40 minutos, cujos tratamentos T1, T2 e T3 sofreram aumento linear até 40 minutos, já T4 demonstrou pequenas variações da porcentagem entre os períodos de tempo com aumento evidente a partir de 24 minutos.

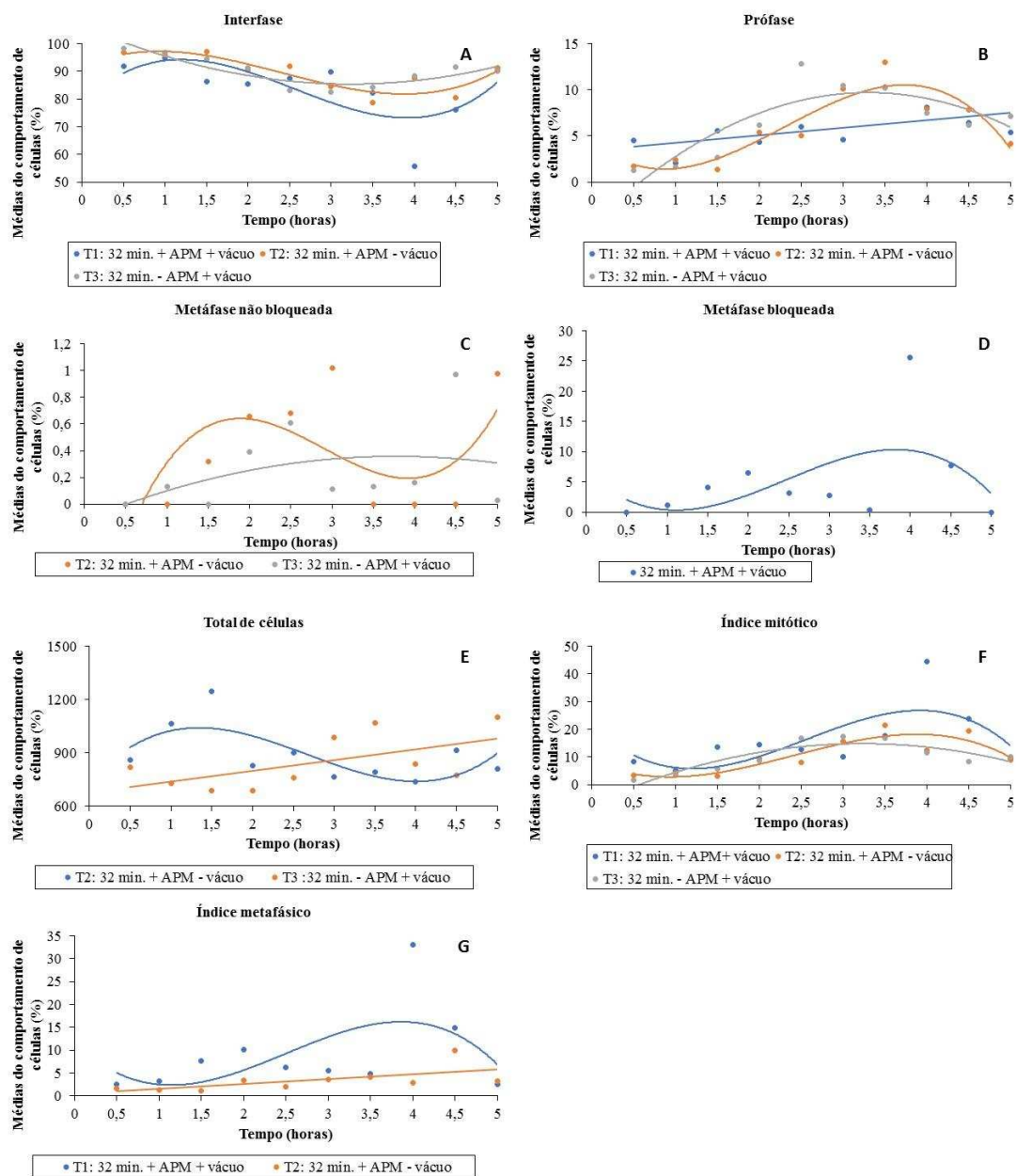
Todos os 4 tratamentos demonstraram metáfases não bloqueadas (Tabela 3 - anexos), porém com médias baixas e sem significância dentro dos distintos intervalos de tempo, com exceção do tratamento 4 no período de 40 minutos com APM e sem vácuo, o mesmo proporcionou o aumento desta variável de 24 a 40 minutos, enquanto que T1 e T2 apresentaram redução linear (Figura 5C). Entre os quatro tratamentos, o T4 se sobressaiu aos demais em relação ao número de metáfases bloqueadas a partir de 28 minutos (Tabela 3 - anexos). As células das raízes do tratamento T3 apresentaram metáfases bloqueadas após o período de 32 minutos (Figura 5D), sendo esse o de maior média no T3; as raízes do tratamento T4 apresentaram cromossomos bloqueados em um curto período de exposição (4 minutos). Os períodos de tempos de 28 a 40 minutos foram os que apresentaram maiores porcentagens significativas de metáfases, com ponto máximo aos 40 minutos. Metáfases agrupadas foram observadas em todos tratamentos e períodos de tempos, com crescimento até 40 minutos em T3 e T4 (Figura 5E) e significância entre médias apenas nos períodos de 24, 32 e 40 minutos (Tabela 3 - anexos).

O Índice mitótico (IM) do tratamento T4 nos períodos de 28 a 40 minutos apresentaram médias superiores com diferenças significativas entre T1, T2 e T3, com exceção do tratamento de 36 minutos cuja média não diferiu do tratamento T3 (Tabela 3 - anexos). Os tratamentos T2 e T3 apresentaram crescimento linear até o período de 40 minutos, sendo este o ponto máximo tratamento T4 (Figura 5F). O índice metafásico (IMet) demonstrou similaridade no comportamento das médias ao IM, porém com significância do tratamento T4 a partir de 24 minutos, sendo que esse índice aumentou linearmente nos tratamentos T3 e T4 com maior média nos tempos de 32 e 40 minutos respectivamente (Tabela 3 - anexos e Figura 5G).

Não houve interação entre tratamentos x tempos na variável total de células, também não houve diferença significativa entre os quatro tratamentos, com o tratamento T4 apresentando a maior média de células totais analisadas (Tabela 4 - anexos).

### 4.3.2 Experimento II

O experimento II (Figura 6 e Tabela 5 - anexos) demonstra a variação da porcentagem média de células analisadas em meristemas radiculares de milho com adição de HU. O tratamento de 32 minutos sob ação de APM e pressão negativa de vácuo do **experimento I** foi selecionado por possuir a maior média de porcentagem do IMet sob ação do vácuo.



**Figura 6** - Comportamento médio do número de células analisadas dos meristemas radiculares de *Z. mays* em diferentes intervalos de tempo de recuperação após 32 minutos sob ação dos tratamentos do experimento II.

Os núcleos interfásicos analisados apresentaram diferença significativa a partir de 4 horas de recuperação até 4,5 horas, com maior visibilidade entre os tratamentos T1 e T3, cujas médias de interfase foram muito inferiores após a ação do APM sob as células dos meristemas radiculares, com maior efeito no período de 4 horas cujo valor médio foi discrepante em relação aos demais (Tabela 5 - anexos e Figura 6A).

Quanto ao número de prófases, diferenças significativas foram encontradas nos tempos de 2,5 e 3 horas de recuperação entre os três tratamentos, cujos valores médios de T1 no decorrer do período de recuperação foi crescente. (Tabela 5 - anexos e Figura 6B).

Os três tratamentos apresentaram metáfases não bloqueadas em pequenas quantidades e em alguns pontos do período de recuperação com diferenças significativas pouco evidentes com base nos valores das médias (Tabela 5 - anexos). A Figura 6C demonstra grandes alterações nas porcentagens médias de metáfases não bloqueadas com grande redução após 3 horas de recuperação no tratamento T2 encontrando seu ponto mínimo entre 3,5 a 4,5 horas. As metáfases bloqueadas demonstraram-se evidentes no tratamento T1 com diferenças entre médias nos tempos de 2, 4 e 4,5 horas (Tabela 5 - anexos). A Figura 6D demonstra a variação das médias no decorrer do período de recuperação, com aumento e diminuição da porcentagem média, cuja regressão cubica pode retratar essas grandes variações, com ponto máximo entre 3,5 e 4 horas de recuperação.

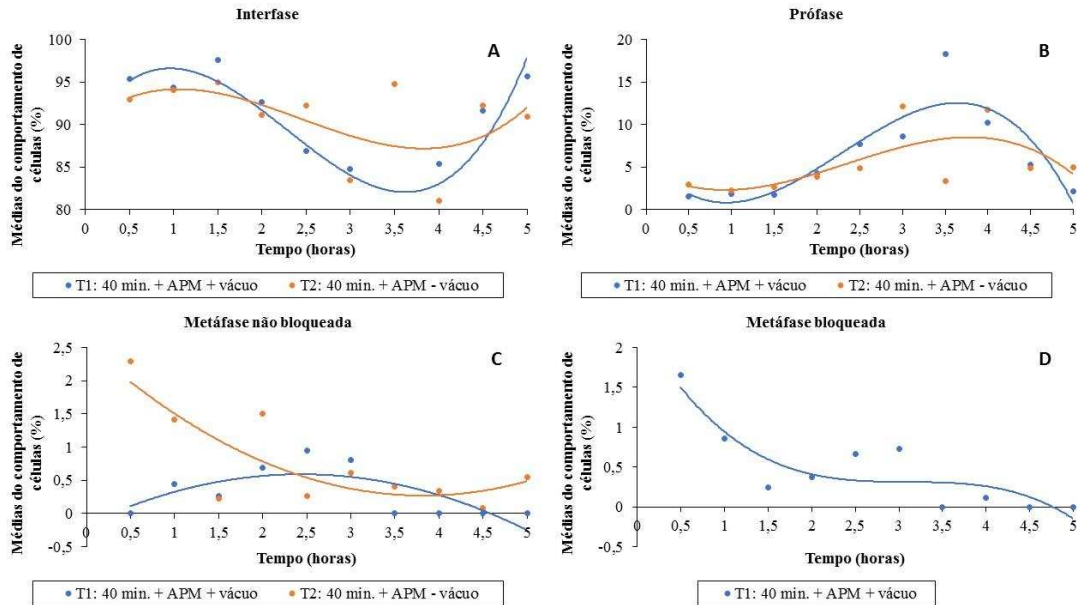
Não houve interação entre os fatores tratamentos x tempos para a análise de metáfases agrupadas e também não houve diferença entre as médias dos três tratamentos (Tabela 6 - anexos). A média da porcentagem de núcleos analisados com o decorrer do período de tempo foi reduzido com picos nas primeiras horas de recuperação no tratamento T2 com aumento linear até 5 horas no tratamento T3 (Figura 6E).

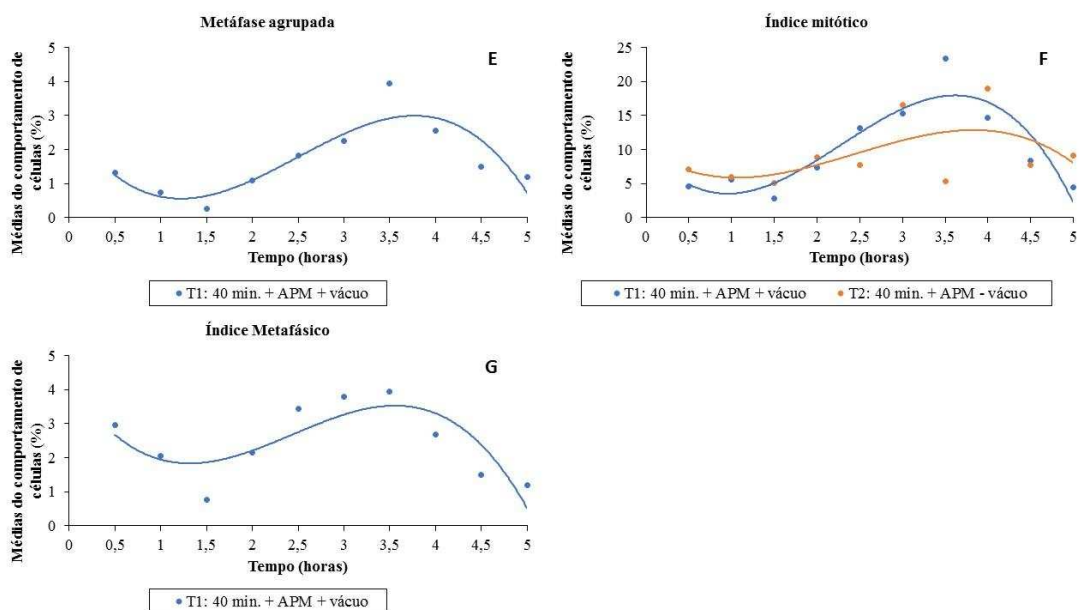
O IM apresentou diferença entre médias nos períodos de tempos de 4 e 4,5 horas e o IMet nos tempos de 2, 4 e 4,5 horas. Para ambas variáveis, o período de 4 horas de recuperação apresentou-se superior aos demais com médias duas vezes acima da segunda maior média nas duas variáveis. A regressão cúbica do índice mitótico nos tratamentos T1 e T3 mostraram-se semelhantes no decorrer dos períodos de tempo (Figura 6F). Assim como as regressões das variáveis metáfase bloqueada e IM, a variável IMet do tratamento T1 demonstrou variações nas médias, a qual pode ser explicada apenas pela regressão cúbica, devido aos pontos de mínimo e máximo nas

primeiras e últimas horas de recuperação, enquanto T2 mostrou crescimento linear e poucas variações da média ao longo do tempo de recuperação celular (Figura 6G).

### 4.2.3 Experimento III

O experimento III (Tabela 7 - anexos) demonstra a variação da porcentagem de núcleos analisados em meristemas radiculares de milho com adição de HU. O tratamento de 40 minutos sob ação de APM sem vácuo do **experimento I** foi selecionado por possuir a maior média de porcentagem do IM e IMet dos 4 tratamentos.





**Figura 7** - Comportamento médio do número de células analisadas dos meristemas radiculares de *Z. mays* em diferentes intervalos de tempo de recuperação após 40 minutos sob ação dos tratamentos do experimento III.

Tanto a variável interfase quanto a prófase não apresentaram médias com diferenças significativas entre si (Tabela 7 - anexos). As Figuras 7A e 7B demonstram regressões cúbicas para os tratamentos T1 e T2, com ponto de máximo e mínimo, os quais demonstram ser variáveis inversamente proporcionais, onde nas primeiras horas ocorre ponto máximo na fase de interfase e ponto mínimo na prófase.

Metáfases não bloqueadas foram mais frequentes no tratamento T2 e apresentaram no tratamento T1 aumento nas primeiras 0,5 horas com total redução após 3 horas. O tratamento T2 apresentou diminuição após as 0,5 horas (Figura 7C) com diferença significativa nas primeiras 2,5 horas, com exceção do tempo de 1,5 horas (Tabela 7 - anexos). Pequenas porcentagens de metáfases bloqueadas foram encontradas nos tratamentos T1, sendo o tempo de 0,5 horas aquele que apresentou maior porcentagem média desta variável com redução após esse período (Tabela 7 - anexos e Figura 7D). A média da porcentagem de metáfases agrupadas foi significativa apenas no período de 3,5 horas entre os tratamentos T1 e T2 (Tabela 7 - anexos). A variável é explicada pela regressão cúbica, com pontos de mínimo nas primeiras horas de recuperação e máximo ao final deste período (Figura 7E).

O IM apresentou significância entre as médias de T1 e T2 apenas no período de 3,5 horas, com grande diferença entre ambas (Tabela 7). A regressão cúbica demonstra pontos de máximo e mínimo, cujo ponto máximo de T1 supera o de T2

(Figura 7F). Com base nas porcentagens médias do IMet, os tempos de 2, 2,5 e 3,5 horas apresentaram diferença significativa entre as médias, cuja maior média da variável foi encontrada no mesmo período da maior média do índice mitótico e das porcentagens médias da prófase e metáfase agrupada (Tabela 7 - anexos e Figura 7G).

A variável total de células não demonstrou interação entre os fatores tratamento x tempo, cuja comparação entre médias não diferiram significativamente entre si (Tabela 8).

## 5. DISCUSSÃO

### 5.1 Análise e diferenciação de metáfases

A metodologia utilizada de sincronização, hidrólise, tratamento com Feulgen seguida da maceração enzimática nos meristemas radiculares de milho possibilitou a contagem e análise dos núcleos, com lâminas apresentando células integras com cromossomos bem definidos e grande acúmulo de células na fase de prófase, constatando a eficiência da metodologia (Figuras 1, 2 e 3). O elevado índice de prófases sobre o de interfases demonstra que a concentração de 1,75 mM pode ser utilizada para dar continuidade aos experimentos (Figura 1).

A digestão enzimática dos meristemas radiculares de milho foi eficiente, fato comprovado pela dissociação espontânea das células após cobrir o material com lamínula e a pequena pressão manual utilizada para facilitar o espalhamento celular; caso a pressão fosse elevada, as células eram parcialmente ou totalmente destruídas. Além da digestão, a subdivisão do material seccionado em 3 a 5 partes sobre a lâmina contribuiu para o espalhamento celular.

Os meristemas radiculares de milho sincronizados com HU sob ação do agente bloqueador APM na presença e ausência da pressão negativa de vácuo (Experimentos II e III) apresentaram alguns cromossomos com sobreposição ou em aglomeração. Tais características são inviáveis para técnicas citogenéticas como bandeamentos, micromanipulação e marcações fluorescentes, pois conforme especificado por Chen e Li (2005), para tais testes deve haver resolução espacial dos cromossomos, sendo esta diminuída conforme aumenta a compactação dos cromossomos. Cromossomos muito condensados tornam-se menores e simples de serem contados, porém análises citomoleculares como mapeamento de genes não são apropriadas, pelo fato da marcação torna-se menos exequível nestes tipos de cromossomos (Anamthawat-Jónsson, 2003).

Em plantas, uma das dificuldades em se obter cromossomos metafásicos de qualidade e sem sobreposições é dificultada pela presença da parede celular (Kirov et al., 2014). A técnica de dissociação e secagem ao ar (Carvalho e Saraiva, 1993) pode favorecer o espalhamento cromossômico sobre a lâmina, permitindo que apenas núcleos e cromossomos estejam sobre a lâmina, o que facilita a separação dos mesmos

com a retirada da limitação citoplasmática e a aglomeração de células em um único ponto da lâmina.

Em plantas, a utilização de raízes ou outros tecidos sólidos podem não fornecer metáfases espalhadas e com cromossomos bem delimitados, devido a variações que ocorre de célula para célula (Felip et al., 2009). Tais características foram observadas no presente trabalho, houveram variações entre metáfases na mesma raiz com diferentes graus de compactação dos cromossomos ou até mesmo metáfases não bloqueadas, mesmo após a utilização de APM, tornando-se um obstáculo nas análises de metáfases com cromossomos agrupados. Os resultados corroboram com Giorgi et al., (2016), os autores identificaram na mesma lâmina metáfases com diferentes graus de compactação de cromossomos, o que pode dificultar, em alguns casos, a identificação de constrições primárias e secundárias, além da obtenção correta da razão de braços cromossômicos.

Os três tipos de metáfases descritas (metáfases bloqueadas, não bloqueadas e com cromossomos agrupados) foram discriminadas com base na delimitação, compactação, resolução do centrômero e deformações na morfologia dos cromossomos. Agentes antimitóticos possuem ação sob a condensação dos cromossomos como demonstrado por Contin et al., (2005), após o tratamento das raízes de pau-rosa com orizalina, os cromossomos assemelhavam-se às c-metáfases, o que possibilitou classifica-los morfologicamente conforme a razão de braços. Nas células das raízes de mamão tratadas com APM, foram obtidos cromossomos metafásicos e prometafásicos com constrições primárias e secundárias bem definidas com base na condensação dos mesmos (Araújo et al., 2010).

Conforme relatado por Carvalho et al., (2008), para se obter preparações com cromossomos C-metafásicos bloqueados corretamente é necessário avaliar o tempo e concentração dos agentes antimitóticos. Peng et al., (2003) observaram variações cromossômicas das raízes de trigo tratadas com APM, essas alterações deformaram cromossomos metafásicos e foram mais frequentes com o aumento da concentração. Também, como analisado por Carvalho e Carvalho (2016) em *Eucalyptus citriodora*, houve diferenças na condensação dos cromossomos dentro da mesma espécie na mesma concentração do agente bloqueador APM. Em baixas concentrações, o APM pode não ser tão efetivo e algumas células podem escapar para fase de anáfase (Dolezel et al., 1999).

Em células meristemáticas de milho, o uso do agente bloqueador óxido nitroso (N<sub>2</sub>O) por períodos prolongadas ocasionou alta condensação dos cromossomos de milho (McCaw et al., 2016). Danilova e Birchler (2008) ressaltaram que o tamanho dos braços cromossômicos e metáfases separadas em meristemas radiculares de milho depende do tempo de exposição ao N<sub>2</sub>O. Ambos autores utilizaram pressão de vácuo para o experimento, porém não utilizaram pressão de vácuo negativa, o fator analisado foi a ação do gás N<sub>2</sub>O nas células meristemáticas de milho e não o efeito da pressão.

As análises do presente trabalho fornecem dados para a classificação de cada um dos três tipos de metáfases e também metodologias para obtenção de metáfases em quantidade e qualidade cromossômica sem sobreposição.

## **5.2 Experimentos I, II e III**

O experimento I demonstrou que as células meristemáticas das raízes de milho absorveram o APM dentro do período de tempo máximo de 40 minutos, tanto na presença quanto na ausência da pressão negativa do vácuo (Tabela 3 - anexos). Vários trabalhos optaram pelo bloqueio do ciclo celular por períodos prolongados entre 3 a 16 horas em diferentes espécies vegetais (Pan et al., 1993; Dolezel et al., 1999; Nascimento et al., 2014; Carvalho e Carvalho, 2016). O presente trabalho evidenciou que a absorção de APM pelas células das raízes de milho ocorre no período de 40 minutos, evidenciando que não é necessária a permanência dos meristemas radiculares por longos períodos de tempo em contato com a solução bloqueadora.

Em comparação aos 4 tratamentos, os tratamentos T1 (sem APM e sem pressão negativa de vácuo) e T2 (sem APM e com pressão negativa de vácuo) apresentaram similaridades entre as médias com IM e IMet baixo (Tabela 3 - anexos), pois são raízes com divisão celular natural, caracterizadas por não apresentarem grande número de células em divisão (Chen e Li, 2005).

O aumento do IM está relacionado ao aumento das médias de prófase e metáfases nos tratamentos com APM. No tratamento T4 (com APM sem vácuo) a partir do período de 28 minutos, mais de 50% das células em mitose estavam na fase de metáfase (Tabela 3 - anexos). O APM mostrou-se mais eficiente dentro dos períodos de (28 a 40 minutos) nos tratamentos com e sem pressão negativa de vácuo, pois de acordo com Falconer e Seagull (1987), o APM além de agir na despolimerização dos

microtúbulos do fuso mitótico, também tem característica de ação rápida no bloqueio do ciclo celular.

Após os meristemas radiculares serem tratados com HU, a concentração de 1,75 mM pode induzir a sincronização celular, com retorno do ciclo logo após a retirada da HU das células, constatando que a concentração utilizada não causou danos irreversíveis à divisão celular (Tabela 5 e 7). Em células da raiz de ervilha, Gualbert et al., (1996) demonstraram que em altas concentrações da HU (5 e 10 mM), as células pararam completamente seu ciclo, não retornando à divisão celular após a retirada do reagente. Polit (2008) demonstrou que os efeitos de altas concentrações de HU (2,5 mM) podem resultar em aberrações cromossômicas durante a recuperação do ciclo celular e também na condensação irregular da cromatina na prófase mitótica de feijão-fava.

Resultados encontrados por Neumann et al., (1998) em raízes de ervilha, demonstraram que ao aplicar APM na concentração de 10  $\mu$ M durante 2 horas após 6 horas de recuperação do ciclo celular, o número de metáfases encontradas foi cerca de 43%. Em raízes de feijão-fava (*Vicia faba* L.), foi obtida uma frequência metafásica de 53,9% em meristemas radiculares tratados durante 4 horas com APM na concentração de 2,5  $\mu$ M de APM após 6 horas da remoção da HU (Dolezel et al., 1992). De acordo com Gualbert et al., (1996), ao utilizar meristemas radiculares de ervilha, foi obtido cerca de 50% de metáfases após a sincronização celular e bloqueio das células com APM em concentração elevada de 10  $\mu$ M após duas horas de exposição. Em contrapartida, o presente trabalho obteve o tempo de retorno do índice mitótico inferior a 6 horas, também, o tempo de exposição das raízes no APM foi muito inferior como o relatado pelos autores, apresentando metáfases com cromossomos separados e sem alterações da morfologia.

As médias das variáveis dos experimentos II e III apresentaram grandes variações no decorrer do período de recuperação, com picos de aumentos e diminuições, sem seguir um padrão regular de crescimento linear até um ponto máximo e posterior decréscimo nas variáveis. Dolezel et al., (1999) verificaram que em concentração altas de HU o retorno ao ciclo celular é retardado, contudo, em baixas concentrações, algumas células retornam ao ciclo celular precocemente durante a fase da retirada do agente das raízes, sem afetar a sincronização celular total. A partir destes resultados, pode ter ocorrido no presente trabalho, o retorno do ciclo celular antes da retirada do HU em algumas populações de células. Com base nisto, essas células que

escaparam geraram picos de aumentos e diminuições no decorrer do período de recuperação até a chegada no pico máximo de células, tomando como exemplo os IMs e IMets dos experimentos II e III.

Com base no APM utilizado após a sincronização celular no experimento II, o tratamento T1 (APM com vácuo) e T2 (APM sem vácuo) apresentaram variações nas médias do IM em comparação ao tratamento T3 (sem APM com vácuo) (Figura 6F). Análises em meristemas radiculares de tomate (dados não mostrados) em laboratório demonstraram que após a utilização do APM em células sincronizadas ocorreram pequenas variações no ciclo celular e mudanças nos intervalos de picos da divisão celular.

No experimento I, as metáfases do tratamento com APM sem vácuo (T4) corresponderam mais de 50% do número de células em divisão a partir de 24 minutos. O tratamento T3 (APM com vácuo) obteve essa característica apenas no período de 32 minutos. Esses resultados demonstraram que no experimento I o tratamento sem vácuo foi mais eficiente. Contudo, como exemplo, no experimento II (com HU) o IM e IMet nos tratamentos com vácuo foram superiores aos tratamentos sem vácuo, como pode ser observado nas Tabelas 6 e 7.

Essa maior eficiência no bloqueio celular no tratamento T4 (APM sem vácuo) em relação ao T3 (APM com vácuo) ambos do experimento I, pode ter ocorrido pelo fato de, todas as raízes do tratamento T4 terem sido submersas ao mesmo tempo na solução bloqueadora, enquanto que no tratamento T3, as raízes não foram tratadas ao mesmo tempo, isto é, após a retirada das raízes do tempo de 1 minuto do dessecador com pressão de vácuo negativa, outras três raízes eram colocadas na solução após esse período, gerando um intervalo de tempo entre os períodos de tempos dos tratamentos (1, 2, 4, 8, 12, 26, 20, 24, 28, 32, 36 e 40 minutos). Com base nas informações, as raízes que não estavam no tratamento a vácuo, proliferaram ao mesmo tempo do que aquelas que estavam sob ação de APM com vácuo, porém sem a ação do APM.

Mudanças no período de divisão celular pode ter sido um fator para tais resultados. Como não houve esse intervalo de tempo no tratamento T4 as raízes foram mais homogêneas. Fato evidenciado no experimento II, demonstrando principalmente entre os tratamentos T1 (32 min. no APM com vácuo) e T2 (32 min. o APM sem vácuo), as raízes de ambos tratamentos foram tratadas ao mesmo tempo em solução bloqueadora, não houve intervalo de espera, assim, os resultados demonstraram a eficiência do vácuo, pois o tratamento T1 apresentou pico máximo do variável índice

metafásico 33,13 % após 4 horas de recuperação. O tratamento T4 na mesma variável apresentou pico máximo com valores abaixo da metade dos encontrados no T1 com 9,91% após 4,5 horas de recuperação.

O A pressão de vácuo negativa possibilitou acumular maior porcentagens de células na fase de metáfase (33,13%) com ação mais rápida do agente APM (4 horas de recuperação).

## 6. CONCLUSÃO

As raízes de milho absorvem com eficiência o APM da solução bloqueadora entre 28 e 40 minutos e necessitam de no máximo 4 horas para o APM absorvido agir e bloquear as células na fase de metáfase em meristemas não tratados com HU.

O efeito do vácuo sobre as células sincronizadas mostrou-se eficiente tomando como exemplo o tratamento com maior índice mitótico e metafásico: 32 minutos sob ação de APM após 4 horas de recuperação, com índice metafásico correspondendo a 33,13%.

A técnica de esmagamento foi adequada para a contagem de células e a de dissociação e secagem ao ar possibilitou obter cromossomos metafásicos com morfologia e delimitação dos braços cromossômicos, o que tornou possível a diferenciação dos três tipos de metáfases (bloqueadas, não bloqueadas e agrupadas).

De modo geral, a metodologia desenvolvida proporcionou alto índice metafásico, com cromossomos sem sobreposição, sendo úteis em futuras análises genômicas e citomoleculares.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMAD, M. M.; ALI, A.; SIDDIQUI, S.; KAMALUDDIN, ABDIN, M. Z. Methods in transgenic technology. *In: ABDIN, M. Z.; KIRAN, U.; ALI, A. Plant biotechnology: principles and applications. Singapore: Springer Nature Singapore, 2017, cap. 4, p. 93-115.*

AMARAL-SILVA, P. M.; CLARINDO, W. R.; CARRIJO, T. T.; CARVALHO, C. R.; PRAÇA-FONTES, M. M. The contribution of cytogenetics and flow cytometry for understanding the karyotype evolution in three *Dorstenia* (Linnaeus, 1753) species (Moraceae). **Comp. Cytogenet.**, v. 10, n. 1, p. 97-108, 2016.

ANAMTHAWAT-JÓNSSON, K. Preparation of chromosomes from plant leaf meristems for karyotype analysis and *in situ* hybridization. **Methods in Cell Science**, v. 25, p. 91-95, 2003.

ANANIEV, E. V.; PHILLIPS, R. L.; RINES, H. W. A knob-associated tandem repeat in maize capable of forming fold-back DNA segments: are chromosome knobs mega transposons? **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 95, p. 10785-10790, 1998.

ANDRES, R. J.; KURAPARTHY, V. Development of an improved method of mitotic metaphase chromosome preparation compatible for fluorescence *in situ* hybridization in cotton. **J Cotton Sci.**, v. 17, p.149–156, 2013.

ARAÚJO, F. S.; CARVALHO, C. R.; CLARINDO, W. R. Genome size, base composition and karyotype of *Carica papaya* L.. **Nucleus**, v. 53, p. 25-31, 2010.

BAEZA, C.; FINOT, V. L.; RUIZ, E. Comparative karyotype analysis of populations in the *Alstroemeria presliana* Herbert (Alstroemeriaceae) complex in Chile. **Genetic and Molecular Biology**, v. 38, n. 2, p. 199-204, 2015.

BASS, H.; BIRCHLER, J. Plant cytogenetics: genome structure and chromosome function. **Cytometry part A**, v. 81, p. 815-817, 2012.

BENNETT, M. D.; LEITCH, I. J. Nuclear DNA amounts in Angiosperms: progress, problems and prospects. **Annals of Botany**, v. 25, p. 45-90, 2005.

BESENDORFER, V.; SAMARDZIJA, M.; ZOLDOS, V.; SOLIC, M. E.; PAPES, D. Chromosomal organization of ribosomal genes and NOR-associated heterochromatin, and NOR activity in some populations of *Allium commutatum* Guss. (Alliaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 139, p. 99–108, 2002.

BIANCHI, A.; GHATNEKAR, M. V.; GHIDONI, A. Knobs in Italian maize. **Chromosoma**, v. 14, p. 601-617, 1963.

BRAHMA, B. P.; UMESH, K. S. Induction of abnormal spindle function and cytokinesis inhibition in mitotic cells of *Allium cepa* by the organophosphorus insecticide Fensulfothion. **Cytob.** v. 42, p. 147-155, 1985.

BRITTON-DAVIDIAN, J.; CAZAUX, B.; CATALAN J. Chromosomal dynamics of nucleolar organizer regions (NORs) in the house mouse: micro-evolutionary insights. **Heredy**, v. 108, p. 68-74, 2012.

BROWN, W. L. Numbers and distribution of chromosome knobs in United States maize. **Genetics**, v. 34, p. 524-536, 1948.

CABRAL, F.; BARLOW, S. B. Resistance to antimitotic agents as genetic probes of microtubule structure and function. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 52, p.159–171, 1991.

CAIXETA, E. T.; CARVALHO, C. R. Chromomeric pattern of maize pachytene chromosomes after trypsin treatment. **Hereditas**, v. 133, p. 183-187, 2000.

CAIXETA, E. T.; CARVALHO, C. R.; CLARINDO, W. R. Modified protocol for obtaining isolated and high-resolution pachytene chromosomes. **Nucleus**, v. 54, n. 1, p. 3–7, 2011.

CAPERTA, A. D.; DELGADO, M.; RESSURREIÇÃO, F.; MEISTER, A.; JONES, R. N.; VIEGAS, W.; HOUBEN, A. Colchicine-induced polyploidization depends on tubulin polymerization in c-metaphase cells. **Protoplasma**, v. 277, p. 147-153, 2006.

CARVALHO, C. R.; SARAIVA, L. S. An air-drying technique for maize chromosomes without enzymatic maceration. **Biotechnic e Histochemistry**, v. 68, n. 142-145, 1993.

CARVALHO, C. R.; CLARINDO, W. R.; ALMEIDA, P. M. Plant cytogenetics: still looking for the perfect mitotic chromosomes. **Nucleus**, v. 50, p. 453–462, 2007.

CARVALHO, C. R.; CLARINDO, W. R.; PRAÇA, M. M.; ARAÚJO, F. S.; CARELS, N. Genome size, base composition and karyotype of *Jatropha curcas* L., an important biofuel plant. **Plant Sci.**, v. 174, p. 613–617, 2008.

CARVALHO, G. M. A.; CARVALHO, C. R. The eucalypt karyogram resolved. **Botany**, v. 94, p.1–6, 2016.

CHEN, Q.; LI, H. Y. An improved technique for high resolution mitotic chromosome studies in *Solanum*. **Hort. Science**, cv. 40, n. 1, p. 54-56, 2005.

CLEARY, A. L.; HARDHAM, A. R. Depolymerization of microtubule arrays in root tip cells by oryzalin and their recovery with modified nucleation patterns. **Can. J. Bot.**, v. 66, p. 2353-2366, 1987.

CONTIN, L. A. S.; CARVALHO, C. R.; MARTINS, F. A.; FREITAS, D. D. Nuclear DNA content and karyotype of Rosewood (*Aniba rosaeodora*). **Genetics and Molecular Biology**, v. 28, n.4, p. 454-457, 2005.

CRUZ, C. D. **Programa Genes - Estatística Experimental e Matrizes**. 1. ed. Viçosa: Editora UFV, 2006. v. 1. 285 p.

DANILOVA, T. V.; BIRCHLER, J. A. Integrated cytogenetic map of mitotic metaphase chromosome 9 of maize: resolution, sensitivity, and banding paint development. **Chromosoma**, v. 117, p. 345–356, 2008.

DEWITTE, W.; MURRAY, J. A. H. The plant cell cycle. **Annual Review of Plant Biology**, v. 54, p. 235–264, 2003.

DOLEZEL, J.; ČÍHALÍKOVÁ, J.; LUCRETTI, S. A high-yield procedure for isolation of metaphase chromosomes from root tips of *Vicia faba* L. **Planta**, v. 188, p. 93-98, 1992.

DOLEZEL, J.; ČÍHALÍKOVÁ, J.; WEISEROVÁ, J.; LUCRETTI, S. Cell cycle synchronization in plant root meristems. **Methods in Cell Science**, v. 21, p. 95-107, 1999.

DOLEZEL, J.; VRÁNA, J.; CÁPAL, P.; KUBÁLAKOVÁ, M.; BURESOVÁ, V.; SIMKOVÁ, H. Advances in plant chromosome genomics. **Biotechnology Advances**, v. 32, p. 122-136, 2014.

FALCONER, M. M.; SEAGULL, R. W. Amiprophos-methyl (APM): a rapid, reversible, antimicrotubule agent for plant cell cultures. **Protoplasma**, v. 136, n. 2, p. 118-124, 1987.

FARIA, R. T.; DESTRO, D. Poliploidia. In: DESTRO, D.; MONTALVÁN, R. (Org.). **Melhoramento genético de plantas**. Londrina: UEL, 1999. v. 1, p. 57-68.

FREITAS, D. V.; CARVALHO, C. R.; FILHO, F. J. N.; ASTOLFI-FILHO, S. Karyotype with 210 chromosomes in guaraná (*Paullinia cupana* 'Sorbolis'). **J. Plant Res.**, v. 120, p. 399-404, 2007

FUTCHER, B. Cell cycle synchronization. **Methods in Cell Science**, v. 21, p. 79-86, 1999.

GILL, B. S.; FRIEB, B. Plant cytogenetics at the dawn of the 21st century. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 1, p. 109-115, 1998.

GIORGI, D.; PANDOZY, G.; FARINA, A.; GROSSO, V.; LUCRETTI, S.; GENNARO, A.; VRINÒ, P.; SACCARDO, F. First detailed karyo-morphological analysis and molecular cytological study of leaf cardoon and globe artichoke, two multi-use Asteraceae crops. **Comp. Cytogen.**, v. 10, n. 3, p. 447-463, 2016.

GIVENS, J. F.; PHILLIPS, R. The nucleolus organizer region of maize. **Chromosoma**, v. 57, p. 103-117, 1976.

GRABOWSKA-JOACHIMIAK, A.; JOACHIMIAK, A. C-banded karyotypes of to *Silene* species with heteromorphic sex chromosomes. **Genome**, v. 45, p. 243-252, 2002.

GRIFFOR, M. C.; VODKIN, L. O.; SINGH, R. J.; HYMOWITZ, T. Fluorescent *in situ* hybridization to soybean metafase chromosomes. **Plant Molecular Biology**, v. 17, p. 101-109, 1991.

GUALBERTI, G.; DOLEŽEL, J.; MACA, J.; LUCRETTI, S. Preparation of pea (*Pisum sativum* L.) chromosome and nucleus suspensions from single root tips. **Theor. Appl. Genet.**, v. 92, n. 6, p. 744-751, 1996.

HANSEN, A. L.; GERTZ, A.; JOERSBO, M.; ANDERSEN, S. B. Antimicrotubule herbicides for *in vitro* chromosome doubling in *Beta vulgaris* L. ovule culture. **Euphytica**, v. 101, p. 231–237, 1998.

HANSEN, N. J. P.; ANDERSEN, S. B. *In vitro* chromosome doubling potential of colchicine, oryzalin, trifluralin, and APM in *Brassica napus* microspore culture. **Euphytica**, v. 88, p. 159-164, 1996.

HÄNTZSCHEL, K. R.; WEBER, G. Blockage of mitosis in maize root tips using colchicine-alternatives. **Protoplasma**, v. 241, p. 99–104, 2010.

HOSHI, Y.; NAKAYAMA, T.; PLADER, W.; MALEPSZY, S.; DOLEZEL, J. The effects of DNA synthesis inhibitors on cell cycle synchronization in cucumber (*Cucumis sativus* L.) root meristems. **Cytologia**, v. 69, n. 3, 2004.

KARSBURG, I. V.; CARVALHO, C. R.; CLARINDO, W. R. Identification of chromosomal deficiency by flow cytometry and cytogenetics in mutante tomato (*Solanum lycopersicum*, Solanaceae) plants. **Australian Journal of Botany**, v. 57, p. 444-449, 2009.

KATO, A.; VEJA, J. M.; HAN, F.; LAMB, J. C.; BIRCHLER, A. J. Advances in plant chromosome identification and cytogenetic techniques. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 8, p. 148-154, 2005.

KATO, A.; BIRCHLER, A. J. Induction of tetraploid derivatives of maize inbred lines by nitrous oxide gas treatment. **J Hered.** v. 97, p. 39–44, 2006.

KHUONG, N. T.; SCHUBERT, I. Silver staining of nucleolus organizing regions in *Zea mays*. **Caryologia**, v. 38, n. 3-4, p. 331-334, 1985.

KIROV, I.; DIVASHUK, M.; VAN LAER, K.; SOLOVIEV, A.; KHRUSTALEVA, L. An easy “SteamDrop” method for high quality plant chromosome preparation. **Molecular Cytogenetics**, v. 7, n. 21, 2014.

KOO, B. S.; KALME, S.; YEO, S. H.; LEE, S. J.; YOO, M. Y. Molecular cloning and biochemical characterization of  $\alpha$ - and  $\beta$ -tubulin from potato plants (*Solanum tuberosum* L.). **Plant Physiol Biochem.**, v. 47, n. 9, p. 761-768, 2009.

KUMAGAI-SANO, F.; HAYASHI, T.; SANO, T.; HASEZAWA, S. Cell cycle synchronization of tobacco BY-2 cells. **Nat. Protoc.**, v. 1, n. 6, p. 2621-2627, 2006.

LEE, J. H.; ARUMUGANATHAN, K.; KAEPLER, S. M.; PAPA, C. M.; KAEPLER, H. F. Cell synchronization and isolation of metaphase chromosomes from maize (*Zea mays* L.) root tips for flow cytometric analysis and sorting. **Genome**, v. 39, n. 4, p. 697-903, 1996.

LEE, J. H.; ARUMUGANATHAN, K.; YEN, Y.; KAEPLER, H.; BAENZIGER, P. S. Root tip cell cycle synchronization and metaphase-chromosome isolation suitable for flow sorting in common wheat (*Triticum aestivum* L.). **Genome**, v. 40, n. 5, p. 633-638, 1997.

LUCRETTI, S.; DOLEZEL, J. Cell cycle synchronization, chromosome isolation, and flow-sorting in plants. In: GALBRAITH, D. W.; BOURQUE, D. P.; BOHNERT, H. J. **Methods in cell biology**. United Kingdom: Academic Press Limited, 1995, cap. 6, p. 61-83.

MARQUES, A.; TULER, A. C.; CARVALHO, C. R.; CARRIJO, T.; FERREIRA, M. F. S.; CLARINDO, W. R. Refinement of the karyological aspects of *Psidium guineense* (Swartz, 1788): a comparison with *Psidium guajava* (Linnaeus, 1753). **Comparative Cytogenetics**, v. 10, n. 1, p. 177-128, 2016.

MARZO, I.; NAVAL, J. Antimitotic drugs in cancer chemotherapy: promises and pitfalls. **Biochem. Pharmacol.** v. 86, p. 703–710, 2013.

McCAW, M.; SWYERS, N.; GRAHAM, N.; CODY, J.; ZHAO, C.; BIRCHLER, J. Preparation of chromosomes from *Zea mays*. **Curr. Protoc. Plant. Biol.**, v. 1, p. 501-509, 2016.

McCLINTOCK, B. Chromosome morphology in *Zea mays*. **Science**, v. 69:p. 629, 1929.

McCLINTOCK, B. The association of non-homologous parts of chromosomes in the mid-prophase of meiosis in *Zea mays*. **Z Zellforsch Mikrosk Anat**, v. 19, p. 191-237, 1933.

McCLINTOCK, B.; KATO, T. A.; BLUMENSCHNEIN, A. **Chromosome constitution of races of maize**. Colegio de Postgraduados, Chapingo, México, 1981,517p.

MIGUEL, V.; COSTA, M. C.; MOSCONE, E. A. Karyotype analysis in two species of *Solanum* (Solanaceae) Sect. *Cyphomandropsis* based on chromosome banding. **New Zealand Journal of Botany**, v. 50, n. 2, p. 217-225, 2012.

MIRZAGHADERI, G. A simple metaphase chromosome preparation from meristematic root tip cells of wheat for karyotyping or in situ hybridization. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 3, p. 314-318, 2010.

MONDIN, M.; SANTOS-SEREJO, J. A.; BERTÃO, M. R.; LABORDA, P.; PIZZAIA, D.; AGUIAR-PERECIN, M. L. R. Karyotype variability in tropical maize sister inbred lines and hybrids compared with KYS standard line. **Front Plant Sci.**, v. 5, p.1-12, 2014.

MOREIOHN, L. C.; BUREAU, T. E.; MOLKBAJER, J.; BAJER, A. S.; FOSKET, D. E. Oryzalin, a dinitroaniline herbicide, binds to plant tubulin and inhibits microtubule polymerization in vitro. **Planta**, v. 172, n. 2, p. 252-264, 1987.

MURTHY, J. V.; KIM, H. H.; HANESWORTH, V. R.; HUGDAHL, J. D.; MOREJOHN, L. C. Competitive inhibition of high-affinity oryzalin binding to plant tubulin by the phosphorus amide herbicide amiprofos-methyl. **Plant Physiol.**, v. 105, N. 1, P. 309-320, 1994.

NASCIMENTO, H. R.; GALLO, R.; KARSBURG, I. V.; OLIVEIRA, A. S. Cytogenetic and identification of the nucleolus organizer region in *Heliconia bihai* (L.) L. **Rev. Ceres**, v. 61, n. 4, p. 451-457, 2014.

NEUMANN, P.; LYSÁK, M.; DOLEZEL, J.; Isolation of chromosomes from *Pisum sativum* L. hairy root cultures and their analysis by flow cytometry. **Plant Science**, v. 137, p. 205-215, 1998.

PAN, W. H.; HOUBEN, A.; SCHLEGEL, R. Highly effective cell synchronization in plant roots by hydroxyurea and amiprofos-methyl or colchicine. **Genome**, v. 36, p. 387-390, 1993.

PATHIRANA, R.; EASON, J. R. Establishment and characterisation of a rapidly dividing diploid cell suspension culture of *Arabidopsis thaliana* suitable for cell cycle synchronization. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 85, p. 125-136, 2006.

PEACOCK, W. J.; DENNIS, E. S.; RHOADES, M. M.; PRYOR, A. J. Highly repeated DNA sequence limited knob heterochromatin in maize. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 78, n. 7, p. 4490-4494, 1981.

PENG, Y.; WANG, Z.; CHENG, L.; CHEN, H. Effect of phosphoric amine herbicide APM on the structure and protein composition of chromosome in *Triticum durum*. **Plant Prod. Sci.**, v. 6, n. 2, p. 134-138, 2003.

PINTOS, B.; MANZANERA, J. A.; BUENO, M. A. Antimitotic agents increase the production of doubled-haploid embryos from cork oak anther culture. **J. Plant Physiol.**, v. 164, p. 1595-1604, 2007.

PLANCHAIS, S.; GLAB, N.; INZÉ, D.; BERGOUNIOUX, C. Chemical inhibitors: a tool for plant cell cycle studies. **FEBS Lett.**, v. 476, p. 78-83, 2000.

POLIT, J. T. An improved method for the cell cycle synchronization of *Vicia faba* root meristem cell. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 30, n. 6, p. 315-324, 2008.

RODRIGUES, F. A.; SOARES, J. D. R.; SANTOS, R. R.; PASQUAL, M.; SILVA, S.O. Colchicine and amiprofos-methyl (APM) in polyploidy induction in banana plant. **Afr. J. Biotechnol.**, v. 10, p. 13476-13481, 2011.

RODRÍGUEZ-DOMÍNGUEZ, J. M.; RÍOS-LARA, L. L.; TAPIA-CAMPOS, E.; BARBA-GONZALES, R. Na improved technique for obtaining well-spread

metaphases from plants numerous large chromosomes. **Biotechnic & Histochemistry**, v. 92, p. 1-8, 2017.

ROSADO, T. B.; CLARINDO, W. R.; CARVALHO, C. R. An integrated cytogenetic, flow and image cytometry procedure used to measure the DNA content of *Zea mays* A and B chromosomes. **Plant Science**, v.176, p.154–158, 2009.

SADDER, M. T.; WEBER, G. Karyotype of maize (*Zea mays* L.) mitotic metafase chromosomes as revealed by fluorescence *in situ* hybridization (FISH) with cytogenetic DNA markers. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 19, p. 117-123, 2001.

SAMADAR, T.; NATH, S.; HALDER, M.; SIL, B.; ROYCHOWDHURY, D.; SEM, S.; JHA, S. Karyotype analylis of three importante traditional Indian medicinal plants, *Bacopa monnieri*, *Tylophora indica* and *Whithania somnifera*. **Nucleus**, v. 55, n. 1, p. 17-20, 2012.

SCALDAFERRO, M. A.; GABBIELE, M.; SEIJO, J. G.; DEBAT, H.; ROMERO, M. V.; DUCASSE, D. A.; PRINA, A. R.; MOSCONE, E. A. Efficiency of cytogenetic methods in detecting a chromosome rearrangement induced by ionizing radiation in a chili pepper line (*Capsicum baccatum* var. *pendulum* –Solanaceae). **International Journal of Radiation Biology**, v. 90, n. 1, p.104–112, 2013.

SCHULZ-SCHAEFFER, J. **Cytogenetics: plants, animals, humans**. New York: Ed. Springer, 1980, 446p.

SHEN, J.; XU, J.; CHEN, J.; ZHENG, R.; SHI, J. Cell synchronization and isolation of chromosomes from Chinese fir root tips for flow cytometric analysis. **Biotechnol. Lett.**, v. 37, p. 1309-1314, 2015.

SILVA, J. C. **Quantificação de DNA dos cromossomos e dos braços cromossômicos de *Zea mays* L.** 41f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa

SINGH, R. J. **Plant cytogenetics**. Boca Raton: CRC Press, 2002, 463p.

SPEICHER, M. R.; CARTER, N. P. The new cytogenetics: blurring the boundaries with molecular biology. **Nature**, v. 6, p. 782-792, 2005.

SREE RAMULU, K.; VERHOEVEN, H. A.; DIJKHUIS, P. Mitotic blocking, micronucleation, and chromosome doubling by oryzalin, amiprofos-methyl, and colchicine in potato. **Protoplasma**, v. 160, p. 65-73, 1991.

STACE, C. A. Cytology and cytogenetics as a fundamental taxonomic resource for the 20st and 21st centuries. **Taxon**, v.49, p. 451-476, 2000.

TEMEL, A.; GOZUKIRMIZI, N. Cytotoxic effects of metaphase-arresting methods in barley. **Tsitol Genet.**, v. 49, n. 6, p. 43-49, 2015.

THAO, N. T. P.; URESHINO, K.; MIYAJIMA, I.; OZAKI, Y.; OKUBO, H. Induction of tetraploids in ornamental *Alocasia* through colchicine and oryzalin treatments. **Plant Cell Tissue Organ Cult.** v. 72, p. 19–25, 2003.

WANG, Z.; ZOU, L.; FAN, B.; PENG, Y. Abnormal metaphase cell division induced by microtubules depolymerization and photosystem II inhibiting herbicides. **Cytologia**, v. 71, n. 3, p. 289-295.

YOUNG, C. W.; HODAS, S. Hydroxyurea: inhibitory effect on DNA metabolism. **Science**, v. 146, p. 1172-1174, 1964.

## 8. ANEXOS

**Tabela 3** - Teste comparativo do comportamento médio da contagem de células dos meristemas radiculares de *Zea mays* var. AL Bandeirante com interação tratamentos x tempos das variáveis analisadas no experimento I.

| Variável                  | Tratamento | Tempo (minutos) |        |        |        |        |        |        |        |        |        |         |        |
|---------------------------|------------|-----------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|---------|--------|
|                           |            | 1               | 2      | 4      | 8      | 12     | 16     | 20     | 24     | 28     | 32     | 36      | 40     |
| Interfase                 | T1         | 97,01a          | 95,78a | 93,71a | 94,74a | 92,47a | 94,3a  | 93,66a | 95,09a | 92,76a | 91,82a | 95,25a  | 92,82a |
|                           | T2         | 96,39a          | 95,16a | 92,72a | 93,85a | 92,33a | 93,54a | 94,04a | 94,91a | 93,34a | 91,88a | 94,81a  | 93,44a |
|                           | T3         | 95,00a          | 93,19a | 93,61a | 94,03a | 93,89a | 92,31a | 91,35a | 92,07a | 93,63a | 88,74a | 91,28ab | 89,48a |
|                           | T4         | 98,30a          | 94,83a | 96,41a | 94,57a | 94,19a | 91,71a | 95,61a | 92,70a | 86,33b | 82,67b | 87,77b  | 75,04b |
| Prófase                   | T1         | 1,22ab          | 2,29b  | 3,04ab | 2,05a  | 4,06a  | 2,46b  | 3,61ab | 2,32b  | 3,31a  | 4,81a  | 2,69a   | 4,58bc |
|                           | T2         | 1,47ab          | 2,76ab | 3,38ab | 2,85a  | 4,38a  | 2,95b  | 3,75ab | 2,79b  | 3,31a  | 5,08a  | 3,03a   | 3,86c  |
|                           | T3         | 3,02a           | 4,40a  | 3,92a  | 2,80a  | 2,91a  | 5,05a  | 4,81a  | 5,30a  | 3,75a  | 5,11a  | 4,08a   | 6,21ab |
|                           | T4         | 0,63b           | 2,25b  | 1,87b  | 1,98a  | 2,70a  | 3,67ab | 2,06b  | 2,23b  | 2,96a  | 5,44a  | 4,16a   | 7,67a  |
| Metáfase não<br>bloqueada | T1         | 0,74a           | 0,40a  | 0,76a  | 0,31a  | 0,45a  | 0,60a  | 0,26a  | 0,34   | 0,42a  | 0,42a  | 0,15a   | 0,19b  |
|                           | T2         | 0,64a           | 0,33a  | 0,71a  | 0,32a  | 0,35a  | 0,69a  | 0,11a  | 0,12a  | 0,27a  | 0,22a  | 0,0a    | 0,15b  |
|                           | T3         | 0,13a           | 0,30a  | 0,47a  | 0,53a  | 0,03a  | 0,29a  | 0,23a  | 0,60a  | 0,27a  | 0,46a  | 0,22a   | 0,20b  |
|                           | T4         | 0,29a           | 0,26a  | 0,98a  | 0,14a  | 0,37a  | 0,13a  | 0,03a  | 0,03a  | 0,25a  | 0,18a  | 0,62a   | 1,13a  |
| Metáfase<br>bloqueadas    | T1         | 0,0a            | 0,0a   | 0,0a   | 0,0a   | 0,0a   | 0,0a   | 0,0a   | 0,0a   | 0,0b   | 0,0b   | 0,0b    | 0,0b   |
|                           | T2         | 0,0a            | 0,0a   | 0,0a   | 0,0a   | 0,0a   | 0,0a   | 0,0a   | 0,0a   | 0,0b   | 0,0b   | 0,0b    | 0,0b   |

|                   |    |       |       |       |       |       |       |       |        |        |        |        |        |
|-------------------|----|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|
|                   | T3 | 0,0a  | 0,0a  | 0,0a  | 0,0a  | 0,0a  | 0,0a  | 0,0a  | 0,0a   | 0,0b   | 2,22b  | 1,55b  | 0,95b  |
|                   | T4 | 0,0a  | 0,0a  | 0,37a | 1,25a | 1,40a | 0,81a | 0,48a | 2,14a  | 6,99a  | 6,32a  | 5,86a  | 11,87a |
| Metáfase agrupada | T1 | 0,37a | 0,57a | 1,04a | 0,83a | 1,01a | 1,17a | 1,21a | 0,69b  | 1,58a  | 0,99c  | 0,53a  | 1,09b  |
|                   | T2 | 0,78a | 0,59a | 1,16a | 0,89a | 1,01a | 1,53a | 1,13a | 0,85b  | 1,61a  | 1,06c  | 0,92a  | 1,08b  |
|                   | T3 | 0,91a | 0,89a | 1,26a | 1,05a | 1,46a | 0,86a | 1,86a | 0,98b  | 1,45a  | 3,08b  | 1,91a  | 2,46ab |
|                   | T4 | 0,42a | 1,25a | 0,0a  | 1,28a | 0,85a | 2,19a | 0,99a | 2,63a  | 2,71a  | 5,33a  | 0,56a  | 3,85a  |
| Índice mitótico   | T1 | 2,99a | 4,22a | 6,29a | 5,26a | 7,53a | 5,7a  | 6,34a | 4,90a  | 7,24b  | 8,18b  | 4,75b  | 7,18b  |
|                   | T2 | 3,61a | 4,84a | 7,28a | 6,15a | 7,67a | 6,46a | 5,96a | 5,09a  | 6,66b  | 8,12b  | 5,19b  | 6,56b  |
|                   | T3 | 5,0a  | 6,81a | 6,39a | 5,97a | 6,11a | 7,68a | 8,65a | 7,93a  | 6,37b  | 11,26b | 8,72ab | 10,52b |
|                   | T4 | 1,70a | 5,17a | 3,59a | 5,43a | 5,81a | 8,29a | 4,39a | 7,30a  | 13,67a | 17,93a | 12,23a | 24,96a |
| Índice metafásico | T1 | 1,12a | 0,97a | 1,79a | 1,15a | 1,46a | 1,78a | 1,47a | 1,03b  | 1,99b  | 1,42c  | 0,68b  | 1,27b  |
|                   | T2 | 1,43a | 0,93a | 1,87a | 1,21a | 1,35a | 2,23a | 1,24a | 0,97b  | 1,88b  | 1,29c  | 0,92b  | 1,23b  |
|                   | T3 | 1,04a | 1,19a | 1,31a | 1,58a | 1,49a | 1,16a | 2,08a | 1,58ab | 1,72b  | 5,76b  | 3,68ab | 3,61b  |
|                   | T4 | 0,70a | 1,51a | 1,35a | 2,67a | 2,61a | 3,12a | 1,50a | 4,80a  | 9,95a  | 11,83a | 7,04a  | 16,83a |

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na VERTICAL não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

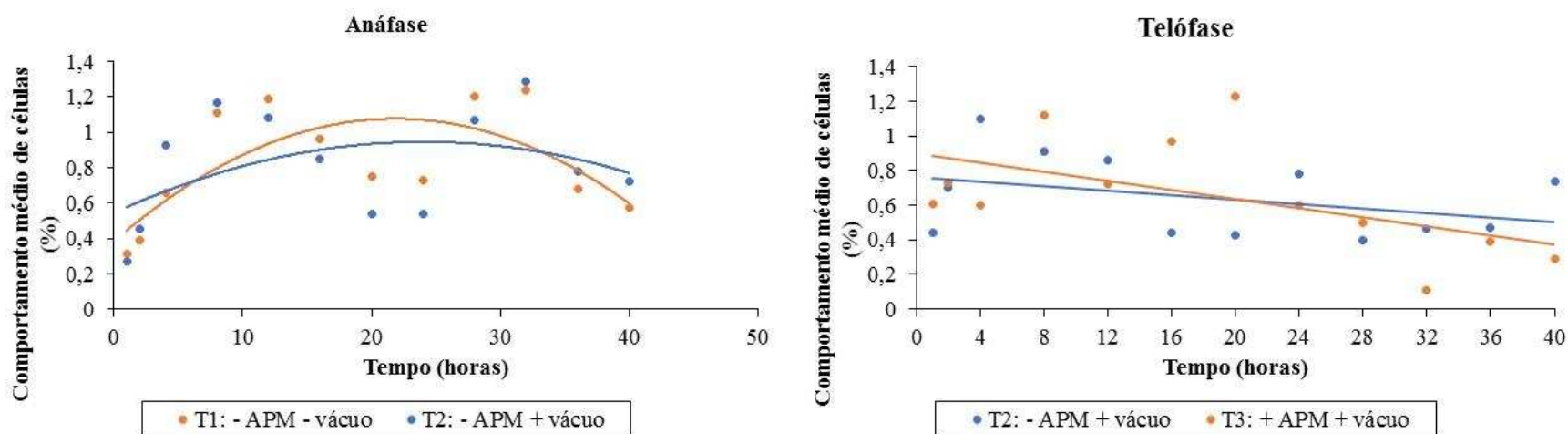
T1: tratamentos sem APM e sem vácuo; T2: tratamentos sem APM e com vácuo; T3: tratamentos com APM e com vácuo; T4: tratamentos com APM e sem vácuo.

**Tabela 4** - Teste comparativo de médias na variável total de células sem interação entre tratamentos x tempos do experimento I.

| Tratamento | Médias   |
|------------|----------|
| T1         | 948,80a  |
| T2         | 941,55a  |
| T3         | 852,44a  |
| T4         | 1051,25a |

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na VERTICAL não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

T1: tratamentos sem APM e sem vácuo; T2: tratamentos sem APM e com vácuo; T3: tratamentos com APM e com vácuo; T4: tratamentos com APM e sem vácuo.



**Figura 8** – Comportamento da média do número de células analisadas dos meristemas radiculares de *Zea mays* var. AL Bandeirante nas variáveis anáfase e telófase do experimento I.

**Tabela 5** - Teste comparativo do comportamento médio da contagem de células dos meristemas radiculares de *Zea mays* var. AL Bandeirante com interação tratamentos x tempos das variáveis analisadas no experimento II.

| Variável               | Tratamento | Tempo (horas) |          |          |          |         |          |         |          |         |          |
|------------------------|------------|---------------|----------|----------|----------|---------|----------|---------|----------|---------|----------|
|                        |            | 0,5           | 1        | 1,5      | 2        | 2,5     | 3        | 3,5     | 4        | 4,5     | 5        |
| Interfase              | T1         | 91,77a        | 94,74a   | 86,30a   | 85,56a   | 87,40a  | 89,78a   | 82,18a  | 55,61b   | 76,24b  | 90,34a   |
|                        | T2         | 96,66a        | 95,85a   | 97,00a   | 90,42a   | 91,89a  | 84,48a   | 78,67a  | 87,42a   | 80,54ab | 91,12a   |
|                        | T3         | 98,26a        | 96,70a   | 94,33a   | 91,32a   | 83,07a  | 82,48a   | 84,22a  | 88,45a   | 91,67a  | 89,99a   |
| Prófase                | T1         | 4,54a         | 2,09a    | 5,54a    | 4,31a    | 5,97b   | 4,58b    | 10,30a  | 8,11a    | 6,44a   | 5,39a    |
|                        | T2         | 1,72a         | 2,38a    | 1,41a    | 5,41a    | 5,00b   | 10,14a   | 12,97a  | 7,88a    | 7,85a   | 4,14a    |
|                        | T3         | 1,30a         | 1,60a    | 2,66a    | 6,20a    | 12,80a  | 10,47a   | 10,22a  | 7,48a    | 6,15a   | 7,18a    |
| Metáfase não bloqueada | T1         | 0,33a         | 0,0a     | 0,97ab   | 0,06b    | 0,3b    | 0,0b     | 0,1a    | 0,0a     | 0,0a    | 0,05b    |
|                        | T2         | 0,0b          | 0,0a     | 0,32a    | 0,66a    | 0,68a   | 1,02a    | 0,0a    | 0,0a     | 0,0a    | 0,98a    |
|                        | T3         | 0,0b          | 0,13a    | 0,0b     | 0,39a    | 0,61a   | 0,11b    | 0,13a   | 0,16a    | 0,97a   | 0,03b    |
| Metáfase bloqueada     | T1         | 0,0a          | 1,12a    | 4,15a    | 6,5a     | 3,15a   | 2,79a    | 0,34a   | 25,53a   | 7,64a   | 0,0a     |
|                        | T2         | 0,54a         | 0,59a    | 0,16a    | 0,70b    | 0,50a   | 0,71a    | 0,0a    | 0,37b    | 3,78ab  | 0,45a    |
|                        | T3         | 0,0a          | 0,0a     | 0,0a     | 0,14b    | 0,0a    | 0,0a     | 0,0a    | 0,0b     | 0,0b    | 0,0a     |
| Total de células       | T1         | 922,67a       | 796,67ab | 735,33b  | 985,22a  | 993,33a | 688,67b  | 923,0ab | 558,0b   | 917,0a  | 853,33ab |
|                        | T2         | 861,0a        | 1063,33a | 1247,33a | 829,67ab | 900,0a  | 763,33ab | 790,0b  | 739,33ab | 912,67a | 810,0b   |
|                        | T3         | 817,33a       | 728,67b  | 685,67b  | 687,0b   | 760,0a  | 988,67a  | 1070,0a | 835,33a  | 773,67a | 1102,0a  |

|                   |    |       |       |        |        |        |        |        |        |         |        |
|-------------------|----|-------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|---------|--------|
| Índice mitótico   | T1 | 8,23a | 5,26a | 13,70a | 14,44a | 12,60a | 10,22a | 17,82a | 44,39a | 23,76a  | 9,66a  |
|                   | T2 | 3,34a | 4,15a | 3,0a   | 9,58a  | 8,11a  | 15,52a | 21,33a | 12,58b | 19,46ab | 8,88a  |
|                   | T3 | 1,74a | 3,30a | 5,67a  | 8,68a  | 16,93a | 17,52a | 16,78a | 11,55b | 8,33b   | 10,01a |
| Índice metafásico | T1 | 2,43a | 3,17a | 7,64a  | 10,02a | 6,18a  | 5,60a  | 4,83a  | 33,15a | 14,8a   | 2,45a  |
|                   | T2 | 1,61a | 1,30a | 1,09a  | 3,44ab | 2,05a  | 3,64a  | 4,11a  | 2,85b  | 9,91a   | 3,25a  |
|                   | T3 | 0,16a | 0,65a | 1,50a  | 1,66b  | 2,70a  | 3,30a  | 2,49a  | 2,25b  | 1,14b   | 1,75a  |

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na VERTICAL não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

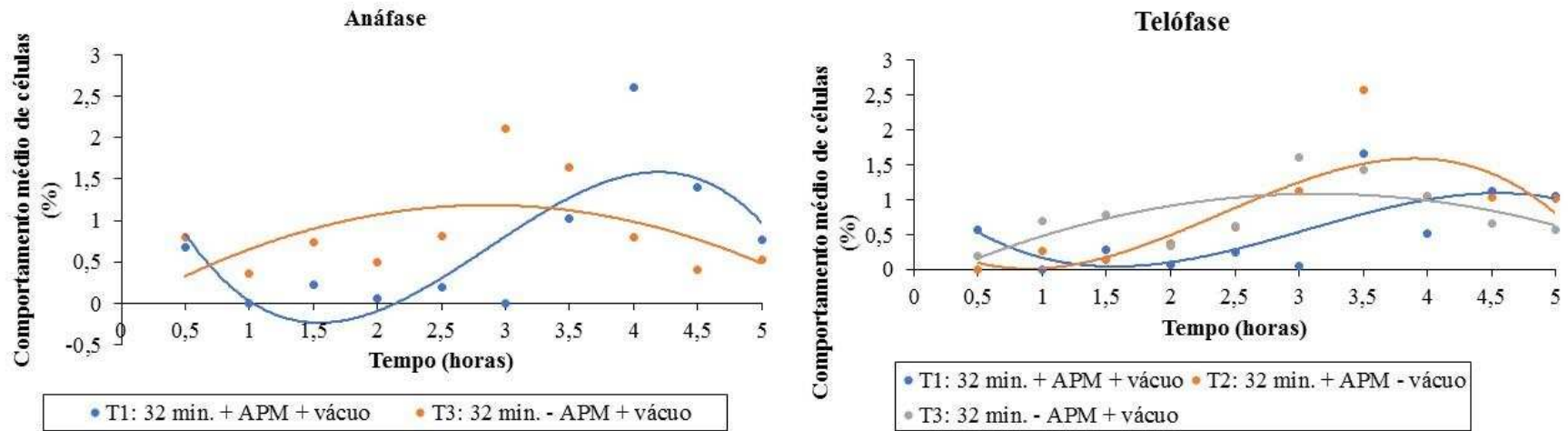
T1: tratamentos com 32 minutos em APM com vácuo; T2: tratamentos com 32 minutos em APM sem vácuo; T3: tratamentos com 32 minutos sem APM com vácuo.

**Tabela 6** - Teste comparativo de médias nas variáveis sem interação entre tratamentos x tempos.

| Tratamento | Metáfase agrupada |
|------------|-------------------|
| T1         | 3,83a             |
| T2         | 2,18a             |
| T3         | 1,58a             |

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na VERTICAL não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

T1: tratamentos com 32 minutos em APM com vácuo; T2: tratamentos com 32 minutos em APM sem vácuo; T3: tratamentos 32 minutos sem APM com vácuo.



**Figura 9** – Comportamento médio do número de células analisadas em anáfase e telófase dos meristemas radiculares de *Zea mays* var. AL Bandeirante em diferentes intervalos de tempo de recuperação após 32 minutos sob ação dos tratamentos do experimento II.

**Tabela 7** - Teste comparativo do comportamento médio da contagem de células dos meristemas radiculares de *Zea mays* var. AL Bandeirante com interação tratamentos x tempos das variáveis analisadas no experimento III.

| Variável  | Tratamento | Tempo (horas) |        |        |        |        |        |        |        |        |        |
|-----------|------------|---------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
|           |            | 0,5           | 1      | 1,5    | 2      | 2,5    | 3      | 3,5    | 4      | 4,5    | 5      |
| Interfase | T1         | 95,40a        | 94,39a | 97,60a | 92,60a | 86,89a | 84,77a | 76,67a | 85,35a | 91,62a | 95,62a |
|           | T2         | 92,90a        | 94,08a | 94,95a | 91,11a | 92,22a | 83,40a | 94,70a | 81,05a | 92,27a | 90,95a |
| Prófase   | T1         | 1,55a         | 1,79a  | 1,69a  | 4,30a  | 7,72a  | 8,60a  | 18,25a | 10,22a | 5,3a   | 2,18a  |
|           | T2         | 2,99a         | 2,21a  | 2,64a  | 3,88a  | 4,83a  | 12,08a | 3,33b  | 11,72a | 4,82a  | 4,95a  |

|                        |    |       |       |       |       |        |        |        |        |       |        |
|------------------------|----|-------|-------|-------|-------|--------|--------|--------|--------|-------|--------|
| Metáfase não bloqueada | T1 | 0,0b  | 0,44b | 0,26a | 0,69b | 0,95a  | 0,80a  | 0,0a   | 0,0a   | 0,0a  | 0,0a   |
|                        | T2 | 2,29a | 1,42a | 0,22a | 1,51a | 0,26b  | 0,61a  | 0,40a  | 0,34a  | 0,08a | 0,55a  |
| Metáfase bloqueada     | T1 | 1,66a | 0,86a | 0,24a | 0,37a | 0,66a  | 0,73a  | 0,0a   | 0,11a  | 0,0a  | 0,0, a |
|                        | T2 | 0,0b  | 0,0b  | 0,0a  | 0,0a  | 0,0b   | 0,0b   | 0,0a   | 0,0a   | 0,08a | 0,0a   |
| Metáfase agrupada      | T1 | 1,31a | 0,74a | 0,26a | 1,10a | 1,83a  | 2,26a  | 3,94a  | 2,56a  | 1,49a | 1,18a  |
|                        | T2 | 1,38a | 1,66a | 0,73a | 2,13a | 1,00a  | 2,65a  | 0,66b  | 3,44a  | 1,23a | 1,73a  |
| Anáfase                | T1 | 0,0a  | 0,92a | 0,31a | 0,39a | 1,39a  | 1,85a  | 0,51a  | 0,82b  | 0,62a | 0,58a  |
|                        | T2 | 0,04a | 0,21b | 0,70a | 0,71a | 0,91a  | 0,53b  | 0,32a  | 1,77a  | 0,56a | 0,65a  |
| Índice mitótico        | T1 | 4,60a | 5,61a | 2,75a | 7,40a | 13,11a | 15,23a | 23,33a | 14,65a | 8,38a | 4,38a  |
|                        | T2 | 7,10a | 5,92a | 5,05a | 8,89a | 7,78a  | 16,60a | 5,30b  | 18,95a | 7,73a | 9,05a  |
| Índice metafásico      | T1 | 2,97a | 2,04a | 0,76a | 2,15b | 3,44a  | 3,78a  | 3,94a  | 2,67a  | 1,49a | 1,18a  |
|                        | T2 | 3,68a | 3,08a | 0,94a | 3,64a | 1,26b  | 3,26a  | 1,05b  | 3,78a  | 1,38a | 2,29a  |

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na VERTICAL não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

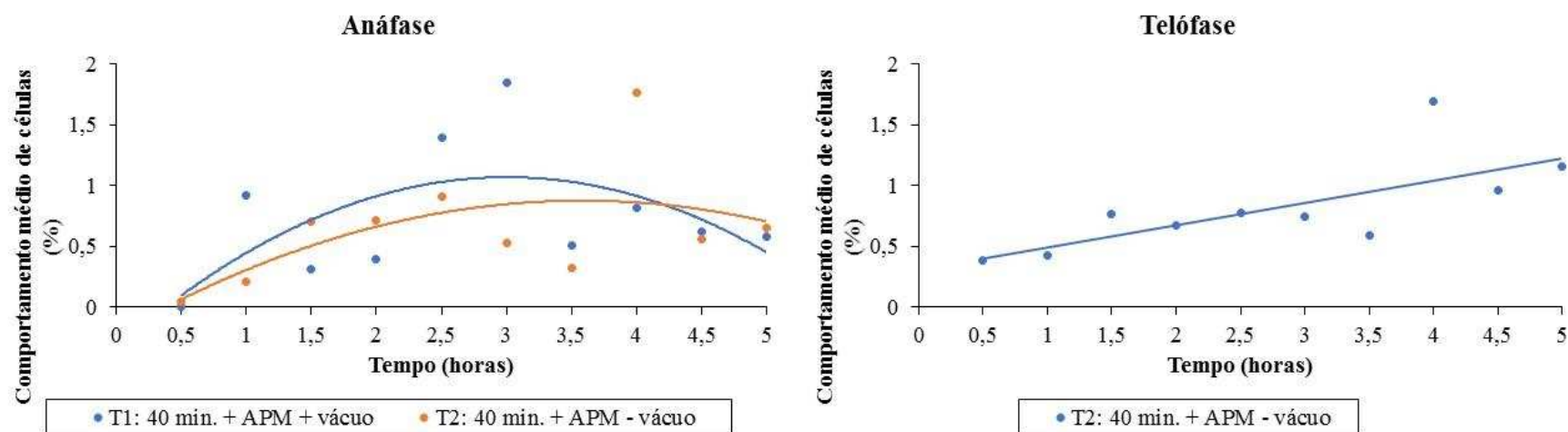
T1: tratamentos com 40 minutos em APM com vácuo; T2: tratamentos com 40 minutos em APM sem vácuo

**Tabela 8** - Teste comparativo de médias nas variáveis sem interação entre tratamentos x tempos do experimento III.

| Tratamento | Total de núcleos |
|------------|------------------|
| T1         | 945,83a          |
| T2         | 890,0a           |

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na VERTICAL não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

T1: tratamentos com 40 minutos em APM com vácuo T2: tratamentos com 40 minutos em APM sem vácuo.



**Figura 10** – Comportamento médio do número de células analisadas nas fases de anáfase e telófase dos meristemas radiculares de *Zea mays* var. AL Bandeirante em diferentes intervalos de tempo de recuperação após 40 minutos sob ação dos tratamentos do experimento III.

**Tabela 9.** Resultado da análise de variância da contagem do número de células em meristemas radiculares de *Zea mays* var. AL Bandeirante no experimento I. Experimentos conduzidos em delineamento inteiramente casualizado (DIC).

| QM          |    |        |        |                    |        |        |       |       |                        |        |         |
|-------------|----|--------|--------|--------------------|--------|--------|-------|-------|------------------------|--------|---------|
| FV          | GL | Int.   | Prof.  | Met.NB.            | Met.B. | Met.A. | Ana.  | Tel.  | Total Cel.             | IMit.  | IMet.   |
| Tratamento  | 3  | 84,90* | 11,74* | 0,13 <sup>ns</sup> | 81,78* | 6,43*  | 1,95* | 0,64* | 237990,6*              | 84,90* | 128,04* |
| Tempo       | 11 | 76,23* | 13,50* | 0,17 <sup>ns</sup> | 13,73* | 4,16*  | 0,36* | 0,23* | 88772,53*              | 76,23* | 28,96*  |
| Trat x Temp | 33 | 28,64* | 2,20*  | 0,19*              | 10,16* | 1,77*  | 0,16* | 0,17* | 38594,51 <sup>ns</sup> | 28,64* | 18,61*  |
| Resíduo     | 96 | 4,46   | 0,89   | 0,11               | 1,32   | 0,58   | 0,07  | 0,09  | 26298,41               | 4,46   | 3,0     |
| Média       |    | 92,79  | 3,44   | 0,35               | 0,88   | 1,33   | 0,62  | 0,59  | 948,51                 | 7,21   | 2,56    |
| CV (%)      |    | 2,28   | 27,46  | 94,17              | 130,72 | 57,42  | 43,45 | 50,26 | 17,10                  | 29,30  | 67,76   |

\*, ns: significativo e não significativo respectivamente ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F.

**Tabela 10.** Teste comparativo das porcentagens médias das contagens de células dos meristemas radiculares de *Zea mays* var. AL Bandeirante com interação tratamentos x tempos de anáfase e telófase do experimento I.

| Variável | Tratamentos | Tempo (minutos) |       |        |       |       |       |       |        |       |        |       |       |
|----------|-------------|-----------------|-------|--------|-------|-------|-------|-------|--------|-------|--------|-------|-------|
|          |             | 1               | 2     | 4      | 8     | 12    | 16    | 20    | 24     | 28    | 32     | 36    | 40    |
| Anáfase  | T1          | 0,31a           | 0,39a | 0,66ab | 1,11a | 1,19a | 0,96a | 0,75a | 0,73a  | 1,20a | 1,24a  | 0,68a | 0,57a |
|          | T2          | 0,27a           | 0,45a | 0,93a  | 0,17a | 1,08a | 0,85a | 0,54a | 0,54ab | 1,07a | 1,29a  | 0,78a | 0,72a |
|          | T3          | 0,33a           | 0,50a | 0,56ab | 0,46b | 0,99a | 0,50a | 0,51a | 0,45ab | 0,41b | 0,29bb | 0,57a | 0,40a |
|          | T4          | 0,15a           | 0,78a | 0,15b  | 0,25b | 0,27b | 0,64a | 0,27a | 0,10b  | 0,43b | 0,26b  | 0,56a | 0,33a |
| Telófase | T1          | 0,34a           | 0,57a | 0,80ab | 0,97a | 0,82a | 0,50a | 0,51b | 0,82a  | 0,73a | 0,70a  | 0,69a | 0,75a |

|    |       |       |       |       |       |       |       |        |       |       |       |       |
|----|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|-------|-------|-------|-------|
| T2 | 0,44a | 0,70a | 1,10a | 0,91a | 0,86a | 0,44a | 0,43b | 0,78ab | 0,40a | 0,46a | 0,47a | 0,74a |
| T3 | 0,61a | 0,73a | 0,6ab | 1,12a | 0,72a | 0,97a | 1,23a | 0,60ab | 0,50a | 0,11a | 0,39a | 0,29a |
| T4 | 0,22a | 0,62a | 0,22b | 0,52a | 0,23a | 0,87a | 0,57b | 0,17b  | 0,34a | 0,40a | 0,47a | 0,12a |

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na VERTICAL não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

T1: tratamentos sem APM e sem vácuo; T2: tratamentos sem APM e com vácuo; T3: tratamentos com APM e com vácuo; T4: tratamentos com APM e sem vácuo

**Tabela 11.** Resultado da análise de variância da regressão linear dos valores quantitativos da contagem do número de células em meristemas radiculares de *Zea mays* var. AL Bandeirante no experimento I.

| QM         |    |                     |                    |                       |                       |                      |                     |                     |                        |                    |                     |
|------------|----|---------------------|--------------------|-----------------------|-----------------------|----------------------|---------------------|---------------------|------------------------|--------------------|---------------------|
| FV         | GL | Int.                | Próf.              | Met.NB.               | Met.B.                | Met.A.               | Ana.                | Tel.                | T.Cel.                 | IMit.              | IMet.               |
| Tratamento | 3  | 84,90*              | 11,74*             | 0,13 <sup>ns</sup>    | 81,78*                | 6,43*                | 1,95*               | 0,64*               | 237990,6*              | 84,90*             | 128,04*             |
| Tempo      | 11 | 76,23*              | 13,50*             | 0,17 <sup>ns</sup>    | 13,73*                | 4,16*                | 0,36*               | 0,23*               | 88772,53*              | 76,23*             | 28,96*              |
| TratxTemp  | 33 | 28,64*              | 2,20*              | 0,19*                 | 10,16*                | 1,77*                | 0,16*               | 0,17*               | 38594,51 <sup>ns</sup> | 28,64*             | 18,61*              |
| Tempo/T1   |    |                     |                    |                       |                       |                      |                     |                     |                        |                    |                     |
| L          | 1  | 6,69 <sup>ns</sup>  | 7,94*              | 0,92*                 | 0,006 <sup>ns</sup>   | 0,36 <sup>ns</sup>   | 0,34*               | 0,19 <sup>ns</sup>  | 1921,83 <sup>ns</sup>  | 6,69 <sup>ns</sup> | 0,14 <sup>ns</sup>  |
| Q          | 1  | 9,67 <sup>ns</sup>  | 2,53 <sup>ns</sup> | 0,0004 <sup>ns</sup>  | 0,007 <sup>ns</sup>   | 0,57 <sup>ns</sup>   | 0,53*               | 0,005 <sup>ns</sup> | 46743,42 <sup>ns</sup> | 9,67 <sup>ns</sup> | 0,51 <sup>ns</sup>  |
| C          | 1  | 8,13 <sup>ns</sup>  | 1,79 <sup>ns</sup> | 0,01 <sup>ns</sup>    | 0,006 <sup>ns</sup>   | 0,0006 <sup>ns</sup> | 0,25 <sup>ns</sup>  | 0,85*               | 43414,87 <sup>ns</sup> | 8,13 <sup>ns</sup> | 0,005 <sup>ns</sup> |
| D          | 8  | 30,11 <sup>ns</sup> | 1,89*              | 0,12 <sup>ns</sup>    | 0,0009 <sup>ns</sup>  | 0,23 <sup>ns</sup>   | 0,27*               | 0,09 <sup>ns</sup>  | 16722,51 <sup>ns</sup> | 3,76 <sup>ns</sup> | 0,62 <sup>ns</sup>  |
| Tempo/T2   |    |                     |                    |                       |                       |                      |                     |                     |                        |                    |                     |
| L          | 1  | 23,33*              | 16,00*             | 0,62*                 | 0,004 <sup>ns</sup>   | 0,52 <sup>ns</sup>   | 0,38*               | 0,07 <sup>ns</sup>  | 110,27 <sup>ns</sup>   | 23,33*             | 0,004 <sup>ns</sup> |
| Q          | 1  | 9,62 <sup>ns</sup>  | 0,34 <sup>ns</sup> | 0,00008 <sup>ns</sup> | 0,001 <sup>ns</sup>   | 1,01 <sup>ns</sup>   | 1,51*               | 0,088 <sup>ns</sup> | 87294,69 <sup>ns</sup> | 9,62 <sup>ns</sup> | 0,99 <sup>ns</sup>  |
| C          | 1  | 5,04 <sup>ns</sup>  | 2,51 <sup>ns</sup> | 0,044 <sup>ns</sup>   | 0,00005 <sup>ns</sup> | 0,08 <sup>ns</sup>   | 0,007 <sup>ns</sup> | 0,26 <sup>ns</sup>  | 25310,3 <sup>ns</sup>  | 5,04 <sup>ns</sup> | 0,005 <sup>ns</sup> |

|          |   |                    |                    |                    |                     |                     |                     |                      |                        |                    |                    |
|----------|---|--------------------|--------------------|--------------------|---------------------|---------------------|---------------------|----------------------|------------------------|--------------------|--------------------|
| D        | 8 | 4,87 <sup>ns</sup> | 2,43*              | 0,07 <sup>ns</sup> | 0,002 <sup>ns</sup> | 0,27 <sup>ns</sup>  | 0,18\*              | 0,73 <sup>ns</sup>   | 25488,71 <sup>ns</sup> | 4,87 <sup>ns</sup> | 0,48 <sup>ns</sup> |
| Tempo/T3 |   |                    |                    |                    |                     |                     |                     |                      |                        |                    |                    |
| L        | 1 | 76,03*             | 14,27*             | 0,05 <sup>ns</sup> | 8,38*               | 8,64*               | 0,027 <sup>ns</sup> | 0,91*                | 47707,63 <sup>ns</sup> | 76,03*             | 36,80*             |
| Q        | 1 | 1,26 <sup>ns</sup> | 0,29 <sup>ns</sup> | 0,09 <sup>ns</sup> | 2,18 <sup>ns</sup>  | 0,65 <sup>ns</sup>  | 0,14 <sup>ns</sup>  | 1,05*                | 120191,46*             | 1,26 <sup>ns</sup> | 3,98 <sup>ns</sup> |
| C        | 1 | 0,31 <sup>ns</sup> | 0,11 <sup>ns</sup> | 0,06 <sup>ns</sup> | 0,23 <sup>ns</sup>  | 0,003 <sup>ns</sup> | 0,22 <sup>ns</sup>  | 0,16 <sup>ns</sup>   | 0,60 <sup>ns</sup>     | 0,31 <sup>ns</sup> | 0,45 <sup>ns</sup> |
| D        | 8 | 5,17 <sup>ns</sup> | 2,83*              | 0,11 <sup>ns</sup> | 1,04 <sup>ns</sup>  | 0,86 <sup>ns</sup>  | 0,08 <sup>ns</sup>  | 0,19*                | 39717,82 <sup>ns</sup> | 5,17 <sup>ns</sup> | 3,33 <sup>ns</sup> |
| Tempo/T4 |   |                    |                    |                    |                     |                     |                     |                      |                        |                    |                    |
| L        | 1 | 1117,38*           | 77,33*             | 0,21 <sup>ns</sup> | 341,91*             | 33,68*              | 0,004 <sup>ns</sup> | 0,033 <sup>ns</sup>  | 301689,4*              | 1117,37*           | 612,57*            |
| Q        | 1 | 149,51*            | 9,68*              | 1,48*              | 66,89*              | 0,006 <sup>ns</sup> | 0,01 <sup>ns</sup>  | 0,22 <sup>ns</sup>   | 22242,0 <sup>ns</sup>  | 149,51*            | 89,92*             |
| C        | 1 | 33,07*             | 12,67*             | 1,33*              | 5,12 <sup>ns</sup>  | 1,96 <sup>ns</sup>  | 0,02 <sup>ns</sup>  | 0,0008 <sup>ns</sup> | 124531,27*             | 33,07*             | 4,07 <sup>ns</sup> |
| D        | 8 | 29,14*             | 2,32*              | 0,15 <sup>ns</sup> | 6,66*               | 5,71*               | 0,18*               | 0,17 <sup>ns</sup>   | 96690,84*              | 29,14*             | 18,46*             |

\*, ns: significativo e não significativo respectivamente ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F.

**Tabela 12.** Equações de Regressão que expressa a resposta dos fatores tratamentos dentro de cada período de tempo analisado no experimento I.

| Variável               | Trat. | Equação                                                   | R <sup>2</sup> (%) |
|------------------------|-------|-----------------------------------------------------------|--------------------|
| Interfase              | T1    | Y= 95,633-0,223x                                          | 23,33              |
|                        | T2    | -                                                         | -                  |
|                        | T3    | Y= 95,118-0,420x                                          | 60,32              |
|                        | T4    | Y= 99,634-2,356x+0,408x <sup>2</sup> -0,031x <sup>3</sup> | 79,09              |
| Prófase                | T1    | Y= 1,783=0,193x                                           | 35,97              |
|                        | T2    | Y= 2,417 + 0,136x                                         | 21,85              |
|                        | T3    | Y= 3,094+0,182x                                           | 32,04              |
|                        | T4    | Y= -0,741+1,80x-0,323x <sup>2</sup> +0,019x <sup>3</sup>  | 78,43              |
| Metáfase não bloqueada | T1    | Y= 0,672-0,039x+0,0001x <sup>2</sup>                      | 36,98              |
|                        | T2    | Y= 0,628 – 0,046x                                         | 44,34              |
|                        | T3    | -                                                         | -                  |
|                        | T4    | Y= -0,035+0,424x-0,101x <sup>2</sup> +0,006x <sup>3</sup> | 60,20              |
| Metáfase bloqueada     | T1    | -                                                         | -                  |
|                        | T2    | -                                                         | -                  |
|                        | T3    | Y= -0,515+0,140x                                          | 38,22              |
|                        | T4    | Y= 1,241-0,787x+0,129x <sup>2</sup>                       | 84,72              |
| Metáfase agrupada      | T1    | -                                                         | -                  |
|                        | T2    | -                                                         | -                  |
|                        | T3    | Y=0,591+0,142x                                            | 48,81              |
|                        | T4    | Y= 0,017+0,280x                                           | 35,54              |
| Anáfase                | T1    | Y= 0,032+0,283x-0,019x <sup>2</sup>                       | 46,14              |
|                        | T2    | Y= 0,275+0,178x-0,011x <sup>2</sup>                       | -                  |
|                        | T3    | -                                                         | -                  |
|                        | T4    | -                                                         | -                  |
| Telófase               | T1    | -                                                         | -                  |
|                        | T2    | Y= 0,074+0,514x-0,097x <sup>2</sup> +0,005x <sup>3</sup>  | 41,08              |
|                        | T3    | Y= 0,466=0,164x-0,016x <sup>2</sup>                       | 43,80              |
|                        | T4    | -                                                         | -                  |
| Total de células       | T1    | -                                                         | -                  |
|                        | T2    | -                                                         | -                  |
|                        | T3    | Y= 1087,18-81,77x+5,48x <sup>2</sup>                      | 20,03              |
|                        | T4    | Y= 1295,113-57,158x+2,357x <sup>2</sup>                   | 10,18              |

|                   |    |                                            |       |
|-------------------|----|--------------------------------------------|-------|
| Índice mitótico   | T1 | $Y = 4,366 + 0,233x$                       | 30,09 |
|                   | T2 | -                                          | -     |
|                   | T3 | $Y = 4,882 + 0,421x$                       | 60,32 |
|                   | T4 | $Y = 0,366 + 2,356x - 0,408x^2 + 0,031x^3$ | 79,09 |
| Índice metafásico | T1 | -                                          | -     |
|                   | T2 | -                                          | -     |
|                   | T3 | $Y = 0,280 + 0,293x$                       | 49,61 |
|                   | T4 | $Y = 2,105 - 0,753x + 0,150x^2$            | 78,28 |

**Tabela 13.** Resultado da análise de variância da contagem do número de células em meristemas radiculares de *Zea mays* var. AL Bandeirante no experimento II. Experimentos conduzidos em delineamento inteiramente casualizado (DIC).

| QM         |    |         |                    |         |         |                    |                    |       |                        |         |         |
|------------|----|---------|--------------------|---------|---------|--------------------|--------------------|-------|------------------------|---------|---------|
| FV         | GL | Int.    | Prof.              | Met.NB. | Met.B.  | Met.A.             | Ana.               | Tel.  | Total Cel.             | IMit.   | IMet.   |
| Tratamento | 2  | 332,03* | 6,57 <sup>ns</sup> | 0,69*   | 227,71* | 40,85*             | 0,41 <sup>ns</sup> | 0,62* | 26008,61 <sup>ns</sup> | 332,02* | 438,59* |
| Tempo      | 9  | 335,57* | 76,44*             | 0,24*   | 61,41*  | 13,87*             | 1,84*              | 2,25* | 35002,57 <sup>ns</sup> | 335,55* | 108,82* |
| TratxTemp  | 18 | 132,04* | 13,72*             | 0,23*   | 58,76*  | 4,88 <sup>ns</sup> | 0,98 <sup>ns</sup> | 0,47* | 84492,76*              | 132,04* | 86,15*  |
| Resíduo    | 60 | 35,25   | 7,25               | 0,02    | 4,64    | 4,53               | 0,69               | 0,17  | 19680,51               | 35,25   | 15,12   |
| Média      |    | 87,81   | 6,07               | 0,20    | 1,97    | 2,53               | 0,68               | 0,72  | 857,94                 | 12,18   | 4,70    |
| CV (%)     |    | 6,76    | 44,34              | 77,25   | 109,24  | 84,01              | 121,56             | 57,16 | 16,35                  | 48,73   | 82,65   |

\*, ns: significativo e não significativo respectivamente ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F.

**Tabela 14.** Teste comparativo das porcentagens médias das contagens de núcleos dos meristemas radiculares de *Zea mays* var. AL Bandeirante com interação tratamentos x tempos de telófase do experimento II.

| Variável | Tratamento | Tempo (horas) |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
|----------|------------|---------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
|          |            | 0,5           | 1     | 1,5   | 2     | 2,5   | 3     | 3,5   | 4     | 4,5   | 5     |
| Telófase | T1         | 0,57a         | 0,0a  | 0,29a | 0,06a | 0,25a | 0,05b | 1,66b | 0,52a | 1,12a | 1,05a |
|          | T2         | 0,0a          | 0,27a | 0,13a | 0,37a | 0,60a | 1,12a | 2,57a | 1,06a | 1,04a | 1,02a |
|          | T3         | 0,20a         | 0,69a | 0,78a | 0,33a | 0,62a | 1,61a | 1,43b | 1,03a | 0,65a | 0,57a |

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na VERTICAL não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

T1: tratamentos com 32 minutos em APM com vácuo; T2: tratamentos com 32 minutos em APM sem vácuo; T3: tratamentos com 32 minutos sem APM com vácuo.

**Tabela 15.** Teste comparativo de médias da variável anáfase sem interação entre tratamento x tempo no experimento II.

| Tratamento | Médias |
|------------|--------|
| T1         | 0,70a  |
| T2         | 0,56a  |
| T3         | 0,79a  |

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na VERTICAL não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

T1: tratamentos com 32 minutos em APM com vácuo; T2: tratamentos com 32 minutos em APM sem vácuo; T3: tratamentos com 32 minutos sem APM com vácuo.

**Tabela 16.** Resultado da análise de variância da regressão linear dos valores quantitativos da contagem do número de células em meristemas radiculares de *Zea mays* var. AL Bandeirante no experimento II.

| QM         |    |         |                     |                    |                    |                    |                    |                    |                        |         |                    |
|------------|----|---------|---------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|------------------------|---------|--------------------|
| FV         | GL | Int.    | Próf.               | Met.NB.            | Met.B.             | Met.A.             | Ana.               | Tel.               | T.Cel.                 | IMit.   | IMet.              |
| Tratamento | 2  | 332,03* | 6,57 <sup>ns</sup>  | 0,69*              | 227,71*            | 40,85*             | 0,41 <sup>ns</sup> | 0,62*              | 26008,61 <sup>ns</sup> | 332,02* | 438,59*            |
| Tempo      | 9  | 335,57* | 76,44*              | 0,24*              | 61,41*             | 13,87*             | 1,84*              | 2,25*              | 35002,57 <sup>ns</sup> | 335,55* | 108,82*            |
| TratxTemp  | 18 | 132,04* | 13,72*              | 0,23*              | 58,76*             | 4,88 <sup>ns</sup> | 0,98 <sup>ns</sup> | 0,47*              | 84492,76*              | 132,04* | 86,15*             |
| Tempo/T1   |    |         |                     |                    |                    |                    |                    |                    |                        |         |                    |
| L          | 1  | 837,92* | 41,45*              | 0,08 <sup>ns</sup> | 162,42*            | 35,30*             | 5,73*              | 2,93*              | 12232,73 <sup>ns</sup> | 837,92* | 338,61*            |
| Q          | 1  | 148,11* | 12,08 <sup>ns</sup> | 0,06 <sup>ns</sup> | 72,44*             | 3,51 <sup>ns</sup> | 0,49 <sup>ns</sup> | 0,54 <sup>ns</sup> | 2581,11 <sup>ns</sup>  | 148,11* | 102,84*            |
| C          | 1  | 636,70* | 28,32 <sup>ns</sup> | 0,03 <sup>ns</sup> | 145,09*            | 19,07*             | 5,61*              | 0,91*              | 18117,48 <sup>ns</sup> | 636,70* | 275,09*            |
| D          | 6  | 298,64* | 9,01 <sup>ns</sup>  | 0,02 <sup>ns</sup> | 199,83*            | 8,46 <sup>ns</sup> | 1,07 <sup>ns</sup> | 0,66*              | 84336,44*              | 298,64* | 269,08*            |
| Tempo/T2   |    |         |                     |                    |                    |                    |                    |                    |                        |         |                    |
| L          | 1  | 557,47* | 131,34*             | 0,28*              | 3,90 <sup>ns</sup> | 33,85*             | 1,74 <sup>ns</sup> | 6,30*              | 168821,40*             | 557,37* | 69,32*             |
| Q          | 1  | 154,01* | 109,21*             | 0,23*              | 1,16 <sup>ns</sup> | 0,06 <sup>ns</sup> | 1,12 <sup>ns</sup> | 1,51*              | 5214,57 <sup>ns</sup>  | 153,99* | 0,11 <sup>ns</sup> |

|          |   |                     |                     |                     |                     |                     |                    |                    |                        |                     |                     |
|----------|---|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|--------------------|--------------------|------------------------|---------------------|---------------------|
| C        | 1 | 207,23*             | 86,56*              | 1,63*               | 0,47 <sup>ns</sup>  | 11,90 <sup>ns</sup> | 0,69 <sup>ns</sup> | 1,97*              | 148622,62*             | 207,21*             | 8,20 <sup>ns</sup>  |
| D        | 6 | 38,88 <sup>ns</sup> | 10,40 <sup>ns</sup> | 0,47*               | 4,32 <sup>ns</sup>  | 5,94 <sup>ns</sup>  | 0,33 <sup>ns</sup> | 0,87*              | 55195,35*              | 38,89 <sup>ns</sup> | 16,06 <sup>ns</sup> |
| Tempo/T3 |   |                     |                     |                     |                     |                     |                    |                    |                        |                     |                     |
| L        | 1 | 235,63*             | 127,82*             | 0,002 <sup>ns</sup> | 0,002 <sup>ns</sup> | 5,97 <sup>ns</sup>  | 0,78 <sup>ns</sup> | 0,66 <sup>ns</sup> | 227545,54*             | 235,63*             | 5,51 <sup>ns</sup>  |
| Q        | 1 | 411,83*             | 168,47*             | 0,36*               | 0,004 <sup>ns</sup> | 9,90 <sup>ns</sup>  | 4,76*              | 1,73*              | 12244,45 <sup>ns</sup> | 411,83*             | 14,50 <sup>ns</sup> |
| C        | 1 | 8,55 <sup>ns</sup>  | 2,37 <sup>ns</sup>  | 0,37 <sup>ns</sup>  | 0,006 <sup>ns</sup> | 0,07 <sup>ns</sup>  | 0,43 <sup>ns</sup> | 0,53 <sup>ns</sup> | 25436,90 <sup>ns</sup> | 8,55 <sup>ns</sup>  | 0,00 <sup>ns</sup>  |
| D        | 6 | 29,03 <sup>ns</sup> | 18,49*              | 0,10*               | 0,007 <sup>ns</sup> | 1,10 <sup>ns</sup>  | 0,74 <sup>ns</sup> | 0,42*              | 62980,88*              | 29,03 <sup>ns</sup> | 0,86 <sup>ns</sup>  |

\*, ns: significativo e não significativo respectivamente ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F.

**Tabela 17.** Equações de Regressão que expressa a resposta dos fatores tratamentos dentro de cada período de tempo analisado no experimento II.

| Variável                      | Trat. | Equação                                        | R <sup>2</sup> (%) |
|-------------------------------|-------|------------------------------------------------|--------------------|
| <b>Interfase</b>              | T1    | $Y = 78,349 + 14,774x - 0,019x^2 + 0,262x^3$   | 21,28              |
|                               | T2    | $Y = 104,519 - 4,93x + 0,311x^2$               | 50,83              |
|                               | T3    | $Y = 106,634 - 6,584x - 0,509x^2$              | 71,70              |
| <b>Prófase</b>                | T1    | $Y = 3,476 + 0,409x$                           | 21,80              |
|                               | T2    | $Y = 4,40 - 3,739x + 1,332x^2 - 0,096x^3$      | 75,97              |
|                               | T3    | $Y = -4,521 + 4,31x - 0,326x^2$                | 64,44              |
| <b>Metáfase não bloqueada</b> | T1    | $Y = 0,163 - 0,017x$                           | 18,55              |
|                               | T2    | $Y = -0,089 + 0,167x^2 - 0,012x^2$             | -15,15             |
|                               | T3    | $Y = -0,320 + 0,314x - 0,048x^2 + 0,002$       | 9,19               |
| <b>Metáfase bloqueada</b>     | T1    | $Y = 6,698 - 6,360x + 1,850x^2 - 0,125x^3$     | -13,90             |
|                               | T2    | -                                              | -                  |
|                               | T3    | -                                              | -                  |
| <b>Metáfase agrupada</b>      | T1    | $Y = 4,614 - 2,556x + 0,701x^2 - 0,045x^3$     | 29,93              |
|                               | T2    | $Y = 0,147 + 0,369x$                           | 34,26              |
|                               | T3    | -                                              | -                  |
| <b>Anáfase</b>                | T1    | $Y = 2,356 - 1,913x + 0,423x^2 - 0,025x^3$     | 47,15              |
|                               | T2    | -                                              | -                  |
|                               | T3    | $Y = -0,720 + 0,659x - 0,55x^2$                | 39,88              |
| <b>Telófase</b>               | T1    | $Y = 1,213 - 0,847x + 0,181x^2 - 0,009x^3$     | 28,63              |
|                               | T2    | $Y = 0,511 - 0,610x + 0,209x^2 - 0,014x^3$     | 47,57              |
|                               | T3    | $Y = -0,221 + 0,415x - 0,33x^2$                | 28,18              |
| <b>Total de células</b>       | T1    | -                                              | -                  |
|                               | T2    | $Y = 7314,611 + 258,69x - 64,266x^2 + 4,00x^3$ | 24,02              |
|                               | T3    | $Y = 678,066 + 30,321x$                        | 27,30              |
| <b>Índice mitótico</b>        | T1    | $Y = 21,651 - 14,744x + 4,019x^2 - 0,262x^3$   | 21,28              |
|                               | T2    | $Y = 8,312 - 6,449x + 2,155x^2 - 0,149x^3$     | 69,62              |
|                               | T3    | $Y = -6,634 + 6,584x - 0,510x^2$               | 71,70              |
| <b>Índice metafásico</b>      | T1    | $Y = 11,770 - 9,139x + 2,588x^2 - 0,172x^3$    | -3,89              |
|                               | T2    | $Y = 0,414 + 529x$                             | 32,33              |
|                               | T3    | -                                              | -                  |

**Tabela 18.** Resultado da análise de variância da contagem do número de células em meristemas radiculares de *Zea mays* var. AL Bandeirante no experimento III. Experimentos conduzidos em delineamento inteiramente casualizado (DIC).

| <b>QM</b>  |    |                    |                     |         |        |                      |                    |                    |                         |                    |                      |
|------------|----|--------------------|---------------------|---------|--------|----------------------|--------------------|--------------------|-------------------------|--------------------|----------------------|
| FV         | GL | Int.               | Prof.               | Met.NB. | Met.B. | Met.A.               | Ana.               | Tel.               | Total Cel.              | IMit.              | IMet.                |
| Tratamento | 1  | 7,53 <sup>ns</sup> | 10,16 <sup>ns</sup> | 3,10*   | 3,11*  | 0,0007 <sup>ns</sup> | 0,14 <sup>ns</sup> | 0,71 <sup>ns</sup> | 46760,42 <sup>ns</sup>  | 7,53 <sup>ns</sup> | 0,0007 <sup>ns</sup> |
| Tempo      | 9  | 125,83*            | 80,59*              | 1,02*   | 0,41*  | 3,13*                | 0,95*              | 0,54*              | 77610,42 <sup>ns</sup>  | 125,83*            | 4,55*                |
| TratxTemp  | 9  | 67,51*             | 41,65*              | 0,99*   | 0,43*  | 2,49*                | 0,60*              | 0,27 <sup>ns</sup> | 150089,16 <sup>ns</sup> | 67,51*             | 3,27*                |
| Resíduo    | 40 | 11,12              | 6,97                | 0,15    | 0,06   | 0,6                  | 0,17               | 0,18               | 76724,45                | 11,12              | 0,80                 |
| Média      |    | 90,41              | 5,76                | 0,54    | 0,23   | 1,66                 | 0,69               | 0,71               | 917,92                  | 9,59               | 2,44                 |
| CV (%)     |    | 3,69               | 45,85               | 70,74   | 105,52 | 46,58                | 58,81              | 60,71              | 30,18                   | 34,76              | 36,67                |

\*, ns significativo e não significativo respectivamente ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F.

**Tabela 19.** Teste comparativo das porcentagens médias das contagens de células dos meristemas radiculares de *Zea mays* var. AL Bandeirante com interação tratamentos x tempos de anáfase do experimento II.

| Variável | Tratamento | Tempo (horas) |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
|----------|------------|---------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
|          |            | 0,5           | 1     | 1,5   | 2     | 2,5   | 3     | 3,5   | 4     | 4,5   | 5     |
| Anáfase  | T1         | 0,0a          | 0,92a | 0,31a | 0,39a | 1,39a | 1,85a | 0,51a | 0,82b | 0,62a | 0,58a |
|          | T2         | 0,04a         | 0,21b | 0,70a | 0,71a | 0,91a | 0,53b | 0,32a | 1,77a | 0,56a | 0,65a |

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na VERTICAL não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

T1: tratamentos com 40 minutos em APM com vácuo; T2: tratamentos com 40 minutos em APM sem vácuo.

**Tabela 20.** Teste comparativo de médias da variável telófase sem interação entre tratamento x tempo no experimento III.

| Tratamento | Telófase |
|------------|----------|
| T1         | 0,60a    |
| T2         | 0,82a    |

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na VERTICAL não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

T1: tratamentos com 40 minutos em APM com vácuo; T2: tratamentos com 40 minutos em APM sem vácuo.

**Tabela 21.** Resultado da análise de variância da regressão linear dos valores quantitativos da contagem do número de células em meristemas radiculares de *Zea mays* var. AL Bandeirante no experimento III.

|            |    | QM                  |                     |                    |                      |                      |                      |                     |                         |                     |                      |
|------------|----|---------------------|---------------------|--------------------|----------------------|----------------------|----------------------|---------------------|-------------------------|---------------------|----------------------|
| FV         | GL | Int.                | Próf.               | Met.NB.            | Met.B.               | Met.A.               | Ana.                 | Tel.                | T.Cel.                  | IMit.               | IMet.                |
| Tratamento | 1  | 7,53 <sup>ns</sup>  | 10,16 <sup>ns</sup> | 3,10*              | 3,11*                | 0,0007 <sup>ns</sup> | 0,14 <sup>ns</sup>   | 0,71 <sup>ns</sup>  | 46760,42 <sup>ns</sup>  | 7,53 <sup>ns</sup>  | 0,0007 <sup>ns</sup> |
| Tempo      | 9  | 125,83*             | 80,59*              | 1,02*              | 0,41*                | 3,13*                | 0,95*                | 0,54*               | 77610,42 <sup>ns</sup>  | 125,83*             | 4,55*                |
| TratxTemp  | 9  | 67,51*              | 41,65*              | 0,99*              | 0,43*                | 2,49*                | 0,60*                | 0,27 <sup>ns</sup>  | 150089,16 <sup>ns</sup> | 67,51*              | 3,27*                |
| Tempo/T1   |    |                     |                     |                    |                      |                      |                      |                     |                         |                     |                      |
| L          | 1  | 146,11*             | 122,83*             | 0,39 <sup>ns</sup> | 4,66*                | 5,52*                | 0,37 <sup>ns</sup>   | 0,68 <sup>ns</sup>  | 675546,79*              | 146,11*             | 0,19 <sup>ns</sup>   |
| Q          | 1  | 452,46*             | 265,56*             | 1,62*              | 0,49*                | 5,05*                | 2,38*                | 0,39 <sup>ns</sup>  | 132404,24 <sup>ns</sup> | 452,46*             | 7,86*                |
| C          | 1  | 338,71*             | 204,91*             | 0,51 <sup>ns</sup> | 0,64*                | 12,56*               | 0,0007 <sup>ns</sup> | 0,24 <sup>ns</sup>  | 520452,29*              | 338,71*             | 13,16*               |
| D          | 6  | 36,96*              | 26,73*              | 0,22 <sup>ns</sup> | 0,30*                | 1,10 <sup>ns</sup>   | 0,85*                | 0,32 <sup>ns</sup>  | 48600,92 <sup>ns</sup>  | 32,96*              | 1,93*                |
| Tempo/T2   |    |                     |                     |                    |                      |                      |                      |                     |                         |                     |                      |
| L          | 1  | 86,94*              | 68,66*              | 6,85*              | 0,003 <sup>ns</sup>  | 1,08 <sup>ns</sup>   | 1,24*                | 2,09*               | 1508,37 <sup>ns</sup>   | 86,94*              | 2,31 <sup>ns</sup>   |
| Q          | 1  | 36,17 <sup>ns</sup> | 39,83*              | 2,40*              | 0,0006 <sup>ns</sup> | 0,16 <sup>ns</sup>   | 0,71*                | 0,002 <sup>ns</sup> | 171916,6 <sup>ns</sup>  | 36,17 <sup>ns</sup> | 1,39 <sup>ns</sup>   |

|   |   |        |        |                    |                      |                    |                    |                     |                        |        |                    |
|---|---|--------|--------|--------------------|----------------------|--------------------|--------------------|---------------------|------------------------|--------|--------------------|
| C | 1 | 62,94* | 40,79* | 0,28 <sup>ns</sup> | 0,0004 <sup>ns</sup> | 0,82 <sup>ns</sup> | 0,00 <sup>ns</sup> | 0,007 <sup>ns</sup> | 790,56 <sup>ns</sup>   | 62,94* | 2,11 <sup>ns</sup> |
| D | 6 | 69,84* | 32,86* | 0,78*              | 0,002 <sup>ns</sup>  | 3,13*              | 0,68*              | 0,32 <sup>ns</sup>  | 42511,95 <sup>ns</sup> | 69,84* | 5,29*              |

\*, ns significativo e não significativo respectivamente ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F.

**Tabela 22.** Equações de Regressão que expressa a resposta dos fatores tratamentos dentro de cada período de tempo analisado no experimento III.

| Variável                      | Trat. | Equação                                  | R <sup>2</sup> (%) |
|-------------------------------|-------|------------------------------------------|--------------------|
| <b>Interfase</b>              | T1    | $Y=89,634+7,902x-2,620x^2+0,191x^3$      | 73,87              |
|                               | T2    | $Y= 90,275+4,017x-1,209x^2+0,082x^3$     | -3,88              |
| <b>Prófase</b>                | T1    | $Y= 6,044-6,108x+2,044x^2-0,149x^3$      | 68,08              |
|                               | T2    | $Y= 4,652-2,778x+0,936x^2-0,066x^3$      | 14,63              |
| <b>Metáfase não bloqueada</b> | T1    | $Y= -0,171+0,311x-0,032x^2$              | 38,31              |
|                               | T2    | $Y= 2,540-0,595x-0,039x^2$               | 55,24              |
| <b>Metáfase bloqueada</b>     | T1    | $Y= 2,318-0,963x+0,154x^2-0,008x^3$      | 64,53              |
|                               | T2    | -                                        | -                  |
| <b>Metáfase agrupada</b>      | T1    | $Y= 2,763-2,032x+0,551x^2-0,037x^3$      | 66,68              |
|                               | T2    | -                                        | -                  |
| <b>Anáfase</b>                | T1    | $Y= -0,328+0,465x-0,043x^2$              | 16,36              |
|                               | T2    | $Y= -0,216+0,305x-0,021x^2$              | 13,28              |
| <b>Telófase</b>               | T1    | -                                        | -                  |
|                               | T2    | $Y= 0,311+0,092x$                        | 46,06              |
| <b>Total de células</b>       | T1    | $Y= 216,61+521,996x-114,514x^2+7.494x^3$ | 73,00              |
|                               | T2    | -                                        | -                  |
| <b>Índice mitótico</b>        | T1    | $Y= 10,365-7,902x+2,620x^2-0,191x^3$     | 73,87              |
|                               | T2    | $Y= 9,724-4,017x+1,209x^2-0,082x^3$      | -3,88              |
| <b>Índice metafásico</b>      | T1    | $Y= 4,279 -2,121x+0,551x^2-0,038x^3$     | 47,01              |
|                               | T2    | -                                        | -                  |