

GENÓTIPOS DE MILHO COM ALTA CAPACIDADE PARA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA E REGENERAÇÃO DE PLANTAS OBTIDOS A PARTIR DE CALOS¹

Janay Almeida dos Santos-Serejo^{2,4}; Margarida L. R. de Aguiar-Perecin^{3*}

²*Pós-Graduada do Depto. de Genética - USP/ESALQ.*

³*Depto. Genética - USP/ESALQ, C.P. 83 - CEP: 13418-900 - Piracicaba, SP.*

⁴*Bolsista CNPq.*

**Autor Correspondente <mlrapere@carpa.ciagri.usp.br>*

RESUMO: Como parte de um programa que visa a seleção de linhagens adaptadas a regiões tropicais, com a capacidade para regenerar plantas a partir de calos embriogênicos de curta duração, foram investigadas três linhagens obtidas a partir de uma variedade de milho tipo flint, e seus respectivos híbridos. As culturas foram obtidas a partir de embriões imaturos inoculados em meio N6 suplementado com 1,5 mg L⁻¹ de 2,4-D e prolina 12 mM. A frequência de calos embriogênicos 45 dias após o início da cultura foi semelhante aos melhores genótipos descritos na literatura (83-99%), refletindo a alta qualidade dos genótipos testados para o estabelecimento de culturas de curta duração. O número médio de plantas férteis regeneradas em culturas com 2-3 meses de idade variou de 2 a 8,15 por calo, destacando-se os híbridos 13342/5 x 13342/2 e 132331/1 x 13342/5. Os resultados mostram que estes genótipos são promissores para utilização em programas envolvendo transformação de plantas e propagação de genótipos.

Palavras-chave: milho, cultura de tecido, embriogênese somática, regeneração

GENOTYPES WITH HIGH SOMATIC EMBRYOGENESIS AND PLANT REGENERATION CAPACITY OBTAINED FROM TISSUE CULTURE

ABSTRACT: As part of a breeding program to select tropical maize lines which are able to regenerate plants from embryogenic calli, three lines obtained from a flint maize variety, and their respective hybrids, have been investigated. Short-term tissue cultures were obtained from immature embryos inoculated on N6 medium supplemented with 1.5 mg L⁻¹ 2,4-D and 12 mM L-proline. The frequency of 45 day-old embryogenic calli was similar to those of the best genotypes described in the literature (83-99%), reflecting the high quality of the genotypes evaluated to establish short-term tissue cultures. The average number of fertile regenerated plants in 2-3 month-old cultures ranged from 2 to 8.15 per callus, and the hybrids 13342/5 x 13342/2 and 132331/1 x 13342/5 showed the best performance. The results show that these genotypes may be used in programs involving plant transformation and genotype propagation.

Key words: maize, tissue culture, somatic embryogenesis, regeneration

INTRODUÇÃO

Nos últimos anos tem crescido o interesse na utilização de culturas embriogênicas de milho visando a produção de plantas geneticamente transformadas (revisão em Armstrong, 1999). Os primeiros relatos de produção de milho transgênico fértil ocorreram no início desta década (Gordom-Kamm et al., 1990; Fromm et al., 1990; Walters et al., 1992). Desde então, genes cuja exploração através de métodos tradicionais de melhoramento é inviável, têm sido introduzidos via transformação e mostrado capacidade de conferir resistência a importantes pragas e doenças, bem como tolerância a herbicidas (Kozziel et al., 1993; Murry et al., 1993; Armstrong et al. 1995). Entretanto, a produção de plantas geneticamente transformadas depende da integração do gene exógeno na célula alvo e da eficiência com que plantas são regeneradas a partir destas células. Até o presente, os sistemas mais utilizados para transformação em milho têm

sido a cultura de calos embriogênicos, ou mesmo o cultivo direto de embriões imaturos ou pré-cultivados (Armstrong, 1999).

Várias linhagens e híbridos adaptados a regiões de clima temperado têm sido utilizados para indução de culturas de calos, porém, a regeneração de plantas a partir de calos embriogênicos tem sido obtida eficientemente a partir de poucos genótipos, destacando-se a linhagem A188, que apresenta pouco valor agrônômico mas é muito superior a outras linhagens de milho em sua capacidade para regenerar plantas a partir de calos embriogênicos (Green & Phillips, 1975; Lee & Phillips, 1987; Armstrong & Phillips, 1988; Armstrong et al., 1992). Alguns genótipos adaptados a regiões tropicais e subtropicais com capacidade para produção de calos embriogênicos têm sido relatados (Prioli & Silva, 1989; Furini & Jewell, 1994; Bohorova et al., 1995; Fluminhan & Aguiar-Perecin, 1998). Entre quatro famílias de linhagens derivadas de uma variedade de milho tipo flint de origem tropical (Jac-Duro,

¹Parte de Tese de Doutorado do primeiro autor apresentada à USP/ESALQ - Piracicaba, SP.

Sementes Agroceres, Brasil), destacou-se uma que apresentou alta capacidade de produção de calos tipo II, isto é, friável e altamente embriogênico (Fluminhan, 1992; Fluminhan & Aguiar-Perecin, 1998). Em outro experimento, verificou-se que uma cultura embriogênica de longa duração, derivada de uma determinada linhagem desta família e que apresentava estabilidade cromossômica, regenerava plantas férteis (Santos, 1995; Santos & Aguiar-Perecin, 1995). Num estudo posterior utilizando três linhagens da família 1-3 e respectivos híbridos, Gardingo (1998) constatou que com a introdução de modificações no meio de cultura, esses genótipos apresentavam resposta embriogênica superior às observadas entre linhagens relacionadas com esses genótipos, por Fluminhan & Aguiar-Perecin (1998).

No presente trabalho são relatados os resultados de uma avaliação da capacidade de regeneração de plantas a partir de culturas de curta duração (cerca de 2-3 meses de cultivo) derivadas dos mesmos genótipos estudados por Gardingo (1998).

MATERIAL E MÉTODOS

As linhagens utilizadas são derivadas de uma variedade de milho tipo flint de origem tropical (Jac-Duro, Sementes Agroceres, Brasil), pertencentes à família designada 1-3 que num estudo anterior apresentou resposta altamente embriogênica e diferentes frequências de instabilidade mitótica (Fluminhan & Aguiar-Perecin, 1998). A TABELA 1 apresenta as linhagens e respectivos híbridos usados no presente estudo, bem como a descrição de seus marcadores cromossômicos (knobs heterocromáticos), mapeados em estudos citogenéticos anteriores, que visavam a investigação da estabilidade cromossômica desta culturas (Aguiar-Perecin & Decico, 1988; Fluminhan et al., 1996), e que consideramos como descritores importantes destas linhagens.

As culturas foram iniciadas a partir de embriões imaturos (1,5 - 2,0 mm), removidos de espigas 12-14 dias após a polinização, e inoculados em placas de Petri

contendo meio N6 (Chu et al., 1975) com componentes orgânicos de acordo com Fluminhan et al. (1996) e suplementado com 1,5 mg L⁻¹ de 2,4-D e prolina 12 mM. O pH foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem e o meio foi solidificado com agar a 8%. Aproximadamente 60 embriões por espiga e no mínimo duas espigas por genótipo foram utilizados. As culturas foram mantidas no escuro a 28 °C e subcultivadas a cada 15-21 dias.

A frequência de embriogênese somática foi avaliada 45 dias após o início da cultura, e está expressa como percentagem de calos embriogênicos em relação ao número de embriões inoculados.

A regeneração de plantas foi realizada 2-3 meses após o início da cultura, pela transferência de oito calos embriogênicos por genótipo para placas contendo meio N6 suplementado com 0,5 mg L⁻¹ de 2,4-D (quatro calos por placa), onde permaneceram por 3-5 dias no escuro e 7-10 dias sob luz (fotoperíodo 16:8 horas). Em seguida, foram transferidos para placas contendo meio MS (Murashige e Skoog, 1962) sem 2,4-D, até desenvolverem coleoptile e raízes (14-20 dias), sendo então transferidos para frascos contendo meio MS sem hormônio. As plântulas com sistema radicular bem desenvolvido foram transplantadas para potes plásticos contendo uma mistura de terra e vermiculite (1:1) e mantidas durante 1 a 3 dias em casa-de-vegetação a 28-30 °C. Em seguida, foram transferidas para vasos de cerâmica e finalmente para sacos plásticos, em casa de vegetação.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O presente estudo faz parte de um programa que visa a seleção de linhagens adaptadas a regiões tropicais com capacidade de formar calos altamente embriogênicos, e de regenerar plantas férteis que apresentem estabilidade cromossômica. Nesta análise foi investigada a capacidade de determinadas linhagens e respectivos híbridos regenerarem plantas a partir de culturas de calos de curta duração (2-3 meses de cultivo), usando o protocolo descrito por Fluminhan (1992) e Santos (1995), com modificações.

Os genótipos utilizados foram os mesmos investigados por Gardingo (1998) para avaliação da resposta embriogênica em culturas de calos de curta duração (45 dias) e de longa duração (6 e 12 meses). A linhagem 13342/2 foi utilizada em substituição à 13342/1, avaliada por Gardingo (1998), ambas com a mesma composição de knobs (TABELA 1).

Em todos os genótipos analisados foi observada a formação de embriões somáticos sobre a superfície dos calos duas semanas após a inoculação (Figura 1). Calos tipo II, friáveis e altamente embriogênicos, semelhantes aos descritos por Armstrong & Green (1985), foram observados nas linhagens 13342/5 e 132331/1, e no respectivo híbrido (Figuras 1b, 1c, 2a e 3a). Na linhagem 13342/2 de uma maneira geral, foram observados calos de aparência mais compacta, apresentando regiões

TABELA 1 - Linhagens e respectivos híbridos usados no presente estudo, bem como a descrição de seus marcadores cromossômicos (knobs heterocromáticos).

Genótipo	Knob*						
	K3L	K6L ₂	K6L ₃	K7S	K7L	8L ₁	K9S
13342/2	++	++	++	++	++	++	00
13342/5	00	++	++	++	++	++	00
132331/1	00	++	++	++	++	++	++
13342/2 x 13342/5	+0	++	++	++	++	++	00
13342/2 x 132331/1	+0	++	++	++	++	++	+0
132331/1 x 13342/5	00	++	++	++	++	++	+0

*K, knob; o número se refere ao cromossomo que possui o knob; S, braço curto; L, braço longo.

embriogênicas (Figura 1a). Esta característica foi observada também nos híbridos originados de cruzamentos que envolveram esta linhagem (Figuras 2b e 3b). A resposta observada na linhagem 13342/2 é semelhante aos resultados obtidos para a linhagem 13342/1 nos experimentos de Gardingo (1998).

A frequência de embriogênese somática aos 45 dias variou de 83,46 % no híbrido 13342/2 X 13342/5 a 99,22 % na linhagem 13342/5 (TABELA 2), confirmando a superioridade destes genótipos observada em experimentos anteriores (Fluminhan & Aguiar-Perecin, 1998; Gardingo, 1998). Os resultados obtidos são comparáveis àqueles observados para os melhores genótipos tropicais descritos na literatura (Bohorova et al., 1995; Prioli & Silva, 1989; Hodges et al., 1986), e superiores aos encontrados para genótipos de origem tropical e subtropical testados por Furini & Jewell (1994).

A correlação entre genótipo e resposta embriogênica em culturas de calos iniciadas a partir de embriões imaturos tem sido bem documentada (Green & Phillips, 1975; Vasil et al., 1984; Tomes & Smith, 1985; Kamo & Hodges, 1986). Poucos genótipos de milho são capazes de formar calos tipo II, o que sugere a ocorrência de um controle genético na determinação do tipo de resposta ao cultivo *in vitro* (Tomes & Smith, 1985; Henry et al., 1994). Entretanto, na literatura existem poucos relatos sobre os genes envolvidos na embriogênese somática e regeneração de plantas de milho. Wan et al. (1992) identificaram, através da análise de RFLP, seis regiões cromossômicas envolvidas na resposta ao cultivo *in vitro*. Armstrong et al. (1992) verificaram que a região cromossômica mais crítica para a formação de calos encontrava-se no braço longo do cromossomo 9. Portanto, as linhagens presentemente estudadas representam um material interessante para futuras investigações do controle genético da resposta ao cultivo *in vitro*. Analisando genótipos tropicais, Prioli & Silva (1989) encontraram alta frequência de embriogênese somática em linhagens da raça Cateto, que é um dos componentes da variedade usada como fonte das linhagens utilizadas no presente estudo. Portanto, estas linhagens podem ter acumulado segmentos cromossômicos derivados da raça Cateto importantes para a resposta embriogênica.

A regeneração de plantas foi realizada 2-3 meses após o início da cultura, selecionando-se oito calos por genótipo (quatro calos por placa). A manutenção do calo com embriões somáticos em sua superfície em meio contendo $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de 2,4-D, no escuro e depois sob luz, foi importante para o desenvolvimento dos embriões menores e permitiu a sincronização dos embriões no processo de regeneração de plantas. Alguns pontos no processo foram críticos, como por exemplo, a passagem dos embriões germinados para frascos, onde a densidade de embriões é importante. Foram obtidos bons resultados com 8-15 embriões germinados por frasco. Outra etapa importante refere-se à aclimação das plantas em casa de vegetação, sendo que o grau de umidade, temperatura, época do ano e intensidade de luz são pontos que ainda devem ser melhorados para obtenção de maior rendimento de regenerantes a partir dos genótipos investigados.

As frequências de plantas regeneradas a partir dos genótipos estudados estão expressas na TABELA 2. O número médio de regenerantes variou de 2 a 8,15 por calo entre os genótipos analisados. O híbrido 13342/2 x 13342/5 apresentou o maior número de plantas regeneradas, sendo que 19 produziram espigas. O maior rendimento de plantas por calo foi obtido no híbrido 132331/1 x 13342/5, o qual também apresentou maior frequência de calos embriogênicos e maior estabilidade cromossômica no estudo realizado por Gardingo (1998).

A média de plantas regeneradas por calo pode ser considerada alta (TABELA 2), sendo semelhante aos resultados obtidos para a linhagem A188 por Hodges et al. (1986). Os resultados são, no entanto, superiores aos obtidos por Furini & Jewell (1994) em genótipos tropicais e subtropicais, e por Hodges et al. (1986) em diversas linhagens e em híbridos obtidos através do cruzamento destas linhagens com a linhagem A188.

Do total de 185 plantas regeneradas, 48 foram utilizadas para análise citológica. A análise mitótica e meiótica das plantas regeneradas mostrou estabilidade cromossômica em todos os genótipos (Santos-Serejo, 1999). Das plantas restantes, 70 (aproximadamente 50%) produziram espigas com sementes, variando em média de 35,7 sementes por espiga no genótipo 132331/1 x 13342/5 a 73,5 no genótipo 13342/2 x 132331/1 (TABELA 2). Algumas plantas apresentaram inflorescência masculina

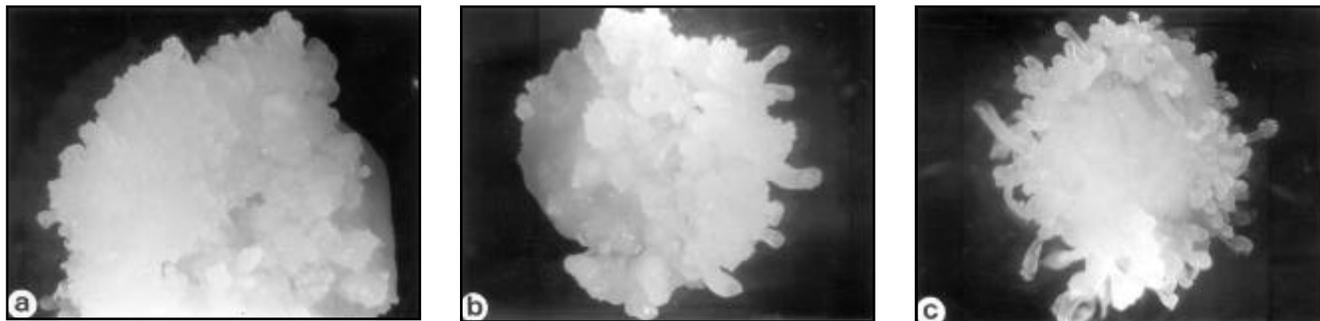


Figura 1 - Calos embriogênicos com 45 dias de cultivo, dos genótipos a) 13342/2; b) 13342/5; c) 132331/1. O genótipo 13342/2 tem tendência de formar calos mais compactos. Aumento de 9x.

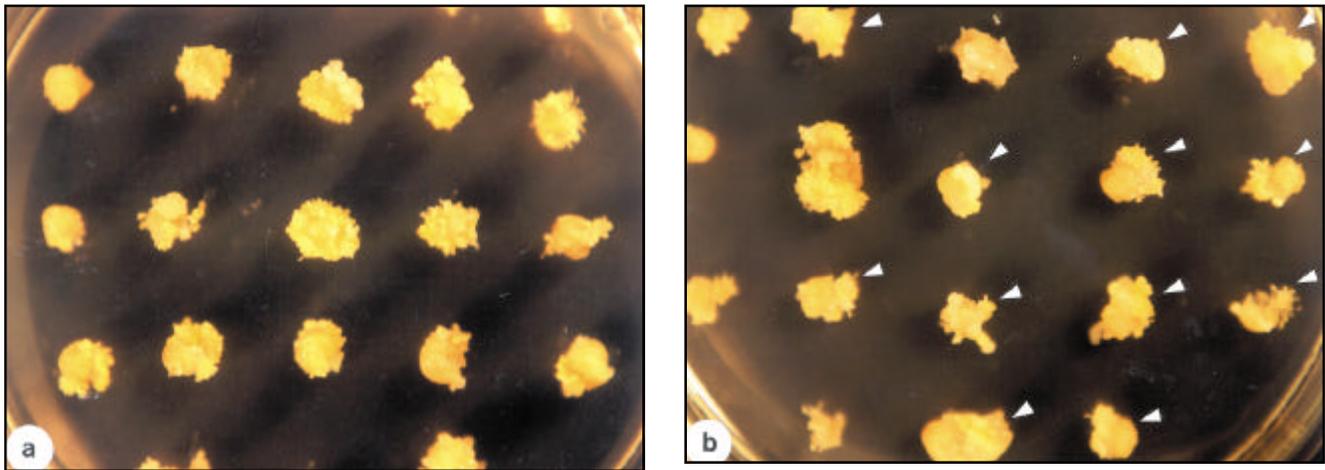


Figura 2 - Placas de culturas com 45 dias de cultivo. a) Linhagem 132331/1, altamente embriogênica; b) Híbrido 132331/1 x 13342/2, apresentando vários calos compactos (setas), típicos do genótipo 13342/2. Aumento de 0,8x.

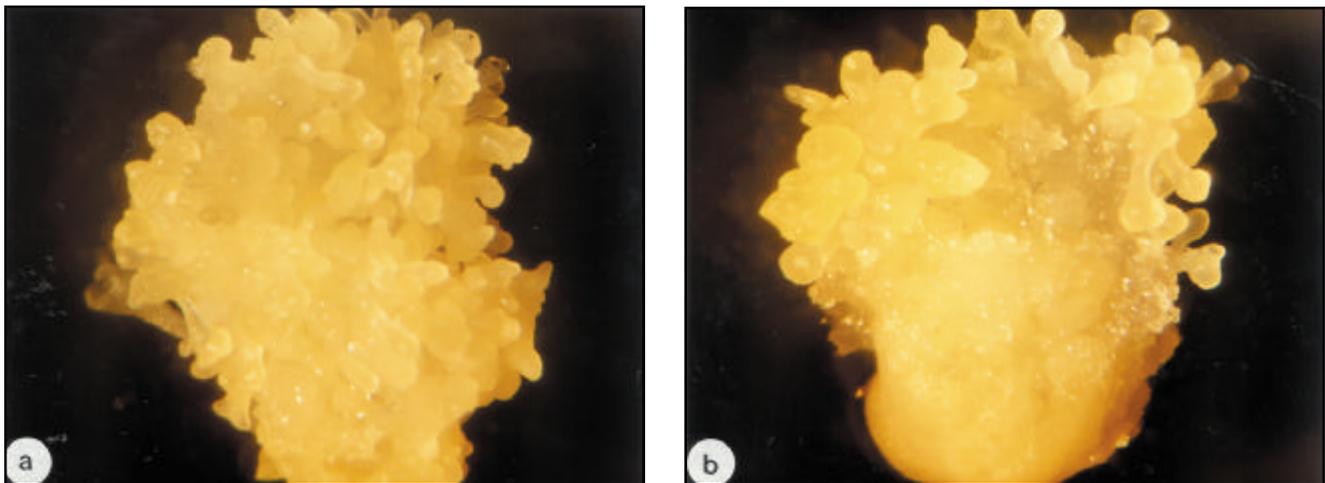


Figura 3 - Calos embriogênicos com 45 dias de cultivo, dos genótipos a) 132331/1 x 13342/5, altamente embriogênico; b) 13342/2 x 132331/1, mais compacto e apresentando regiões embriogênicas. Aumento de 13x.



Figura 4 - Plantas regeneradas a partir de culturas com 2-3 meses. a) Linhagem 132331/1; b) Híbrido 132331/1 x 13342/5.

TABELA 2 - Frequência de calos embriogênicos 45 dias após o início da cultura, número de plantas regeneradas, de espigas produzidas e de sementes por espiga.

Genótipo	Calos embriogênicos	NCR [#]	Plantas regeneradas		Espigas [†]	Sementes por espiga [‡]
	%*		Total	Plantas/calco		
13342/2	85,24 (104/122)	6	34	5,67	14	53,0
13342/5	99,22 (128/129)	2	4	2,0	-	-
132331/1	90,53 (220/243)	7	41	5,86	24	44,1
13342/2 x 13342/5	83,46 (106/127)	7	51	7,29	19	59,4
13342/2 x 132331/1	90,27 (232/257)	4	19	4,75	2	73,5
132331/1 x 13342/5	97,54 (238/244)	5	36	8,15	11	35,7

*Entre parêntesis número de calos embriogênicos por número de embriões inoculados.

[#]NCR = número de calos que regeneraram plantas. Foram testados oito calos por genótipo.

[†]Não inclui plantas que foram utilizadas para análise citológica

[‡]Média das espigas analisadas.

parcialmente feminilizada ou seca, provavelmente devido a estresse fisiológico ocorrido durante a aclimação. A Figura 4 apresenta plantas regeneradas a partir de culturas com 2-3 meses, derivadas da linhagem 132331/1 e do híbrido 132331/1 x 13342/5.

Os resultados obtidos tornam evidente que as linhagens testadas, constituem genótipos promissores para estudos do controle genético da resposta *in vitro*, bem como para obtenção de plantas transgênicas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIAR-PERECIN, M.L.R. de; DECICO, J.U. Preliminary results on the segregation of knobs (C-bands) in inbred lines from a flint variety. **Maize Genetics Cooperation Newsletter**, v.62, p.100, 1988.
- ARMSTRONG, C.L. The first decade of maize transformation: a review and future perspective. **Maydica**, v.44, p.101-109, 1999.
- ARMSTRONG, C.L.; GREEN, C.E. Establishment and maintenance of friable, embryogenic maize callus and the involvement of L-proline. **Planta**, v.164, p.207-214, 1985.
- ARMSTRONG, C.L.; PHILLIPS, R.L. Genetic and cytogenetic variation in plants regenerated from organogenic and friable, embryogenic tissue cultures of maize. **Crop Science**, v.28, p.363-369, 1988.
- ARMSTRONG, C.L.; ROMERO-SEVERSON, J.; HODGES, T.K. Improved tissue culture response of an elite maize inbred through backcross breeding, and identification of chromosomal regions important for regeneration by RFLP analysis. **Theoretical and Applied Genetics**, v.84, p.755-762, 1992.
- ARMSTRONG, C.L.; PARKER, G.B.; PERSHING, J.C.; BROWN, S.M.; SANDERS, P.R.; DUNCAN, D.R.; STONE, T.; DEAN, D.A.; DEBOER, D.L.; HART, J.; HOWE, A.R.; MORRISH, F.M.; PAJEAU, M.E.; PETERSEN, W.L.; REICH, B.J.; RODRIGUEZ, R.; SANTINO, C.G.; SATO, S.J.; SCHULER, W.; SIMS, S.R.; STEHLING, S.; TAROCHIONE, L.; FROMM, M.E. Field evaluation of European corn borer control in progeny of 173 transgenic corn events expressing an insecticidal protein from *Bacillus thuringiensis*. **Crop Science**, v.35, p.550-557, 1995.
- BOHOROVA, N.E.; LUNA, B.; BRITO, R.M.; HUERTA, L.D.; HOISINGTON, D.A. Regeneration potential of tropical, subtropical, midaltitude, and highland maize inbreds. **Maydica**, v.40, p.275-281, 1995.
- CHU, C.C.; WANG, C.C.; SUN, C.S.; HSU, K.C.; YIN, C.Y.; CHU, C.Y.; BI, F.Y. Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. **Scientia Sinica**, v.16, p.659-688, 1975.
- FLUMINHAN, A. Cultivo *in vitro* de milho (*Zea mays*) e análise de sua instabilidade mitótica. Piracicaba, 1992. 213p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- FLUMINHAN, A.; AGUIAR-PERECIN M.L.R. Embryogenic response and mitotic instability in callus cultures derived from maize inbred lines differing in heterochromatic knob content of chromosomes. **Annals of Botany**, v.82, p.569-576, 1998.
- FLUMINHAN, A.; AGUIAR-PERECIN M.L.R.; SANTOS, J.A. Evidence for heterochromatin involvement on chromosome breakage in maize callus culture. **Annals of Botany**, v.78, p.73-81, 1996.
- FROMM, M.E.; MORRISH, F.; ARMSTRONG, C.; WILLIAMS, R.; THOMAS, J.; KLEIN, T.M. Inheritance and expression of chimeric genes in the progeny of transgenic maize plants. **Bio/Technology**, v.8, p.833-839, 1990.
- FURINI, A.; JEWELL, D.C. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature and mature embryos of tropical and subtropical *Zea mays* L. genotypes. **Maydica**, v.39, p.155-164, 1994.
- GARDINGO, J.R. Resposta embriogênica e estabilidade cromossômica em calos derivados de linhagens e híbridos de milho (*Zea mays* L.). Piracicaba, 1998. 125p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- GORDOM-KAMM, W.J.; SPENCER, T.M.; MANGANO, M.L.; ADAMS, T.R.; DAINES, R.J.; START, W.G.; O'BRIEN, J.V.; CHAMBERS, S.A.; ADAMS JUNIOR, W.R.; WILLETTS, N.G.; RICE, T.B.; MACKAY, C.J.; KRUEGER, R.W.; KAUSCH, A.P.; LEMAUX, P.G. Transformation of maize cells and regeneration of fertile transgenic plants. **The Plant Cell**, v.2, p.603-618, 1990.
- GREEN, C.E.; PHILLIPS, R.L. Plant regeneration from tissue cultures of maize. **Crop Science**, v.15, p.417-421, 1975.
- HENRY, Y.; VAIN, P.; DE BUYSER, J. Genetic analysis of *in vitro* plant tissue culture responses and regeneration capacities. **Euphytica**, v.79, p.45-58, 1994.
- HODGES, T.K.; KAMO, K.K.; IMBRIE, C.; BECWAR, M.R. Genotype specificity of somatic embryogenesis and regeneration in maize. **Bio/Technology**, v.4, p.219-223, 1986.
- KAMO, K.K.; HODGES, T.K. Establishment and characterization of long-term embryogenic maize callus and cell suspension cultures. **Plant Science**, v.45, p.111-117, 1986.

- KOZIEL, M.G.; BELAND, G.L.; BOWAMAN, C.; COROZZI, N.B.; CRENSHAW, R.; CROSSLAND, L.; DAWSON, J.; DESAI, N.; HILL, M.; KADWELL, S.; LAUNIS, K.; LEWIS, K.; MADDOX, D.; McPHERSON, K.; MEGHJI, M.R.; MERLIN, E.; RHODES, R.; WARREN, G.W.; WRIGHT, M.; EVOLA, S.V. Field performance of elite transgenic maize plants expressing the insecticidal protein derived from *Bacillus thuringiensis*. **Bio/Technology**, v.11, p.194-200, 1993.
- LEE, M.; PHILLIPS, R.L. Genomic rearrangements in maize induced by tissue culture. **Genome**, v.29, p.122-128, 1987.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-497, 1962.
- MURRY, L.E.; ELLIOT, L.G.; CAPITANT, S.A.; WEST, J.A.; HANSON, K.K.; SCARAFIA, L.; JOHNSTON, S.; DELECAFLAHERTY, C.; NICHOLS, S.; CUNANAN, D.; DIETRICH, P.S.; METTLER, I.J.; DEWALD, S.; WARNICK, D.A.; RODES, C.; SINIBALDI, R.M.; BRUNKE, K.J. Transgenic corn plants expressing MDMV strain B coat protein are resistant to mixed infections of maize dwarf mosaic virus and maize chlorotic mottle virus. **Bio/Technology**, v.11, p.1559-1564, 1993.
- PRIOLI, L.M.; SILVA, W.J. Somatic embryogenesis and plant regeneration capacity in tropical maize inbreds. **Revista Brasileira de Genética**, v.12, p.553-566, 1989.
- SANTOS, J.A. Estudo da instabilidade cromossômica em culturas de longa duração de calos de milho (*Zea Mays* L.). Piracicaba, 1995. 187p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- SANTOS, J.A.; AGUIAR-PERECIN, M.L.R. Chromosome instability in long-term maize callus cultures. **Chromosome Research**, v.3, p.60, 1995. Supplement. /Apresentado ao 12. International Chromosome Conference, Madri, Spain, 1995 - Resumo/
- SANTOS-SEREJO, J.A. Análise da transmissão e comportamento meiótico de cromossomos alterados em plantas de milho regeneradas *in vitro* e seleção de genótipos para cultura de calos com alta capacidade de regeneração. Piracicaba, 1999. 131p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- TOMES, D.T.; SMITH, O.S. The effect of parental genotype on initiation of embryogenic callus from elite maize (*Zea mays* L.) germplasm. **Theoretical and Applied Genetics**, v.70, p.505-509, 1985.
- VASIL, V.; VASIL, I.K.; LU, C. Somatic embryogenesis in long-term callus cultures of *Zea mays* L. (Gramineae). **American Journal of Botany**, v.71, p.158-161, 1984.
- WALTERS, D.A.; VETSCH, C.S.; POTTS, D.E.; LUNDQUIST, R.C. Transformation and inheritance of a hygromycin phosphotransferase gene in maize plants. **Plant Molecular Biology**, v.18, p.189-200, 1992.
- WAN, Y.; ROCHEFORD, T.R.; WIDHOLM, J.M. RFLP analysis to identify putative chromosomal regions involved in the anther culture response and callus formation of maize. **Theoretical and Applied Genetics**, v.85, p.360-365, 1992.

Recebido em 25.06.99