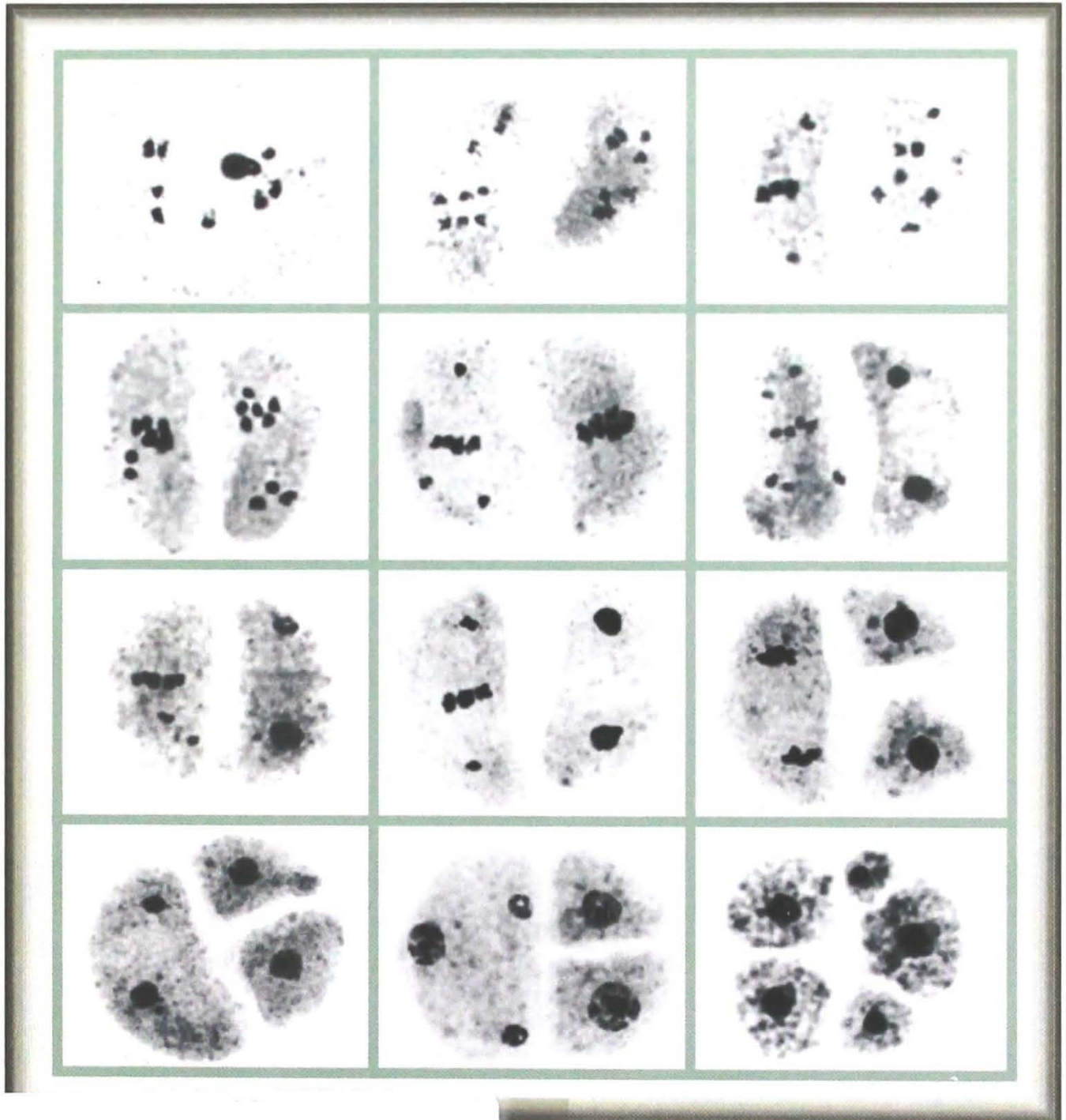


**Comportamento Citológico Atípico  
Durante a Microsporogênese em  
*Brachiaria ruziziensis* e *B. decumbens***



## **República Federativa do Brasil**

*Luiz Inácio Lula da Silva*

Presidente

## **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**

*Roberto Rodrigues*

Ministro

## **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**

### **Conselho de Administração**

*José Amauri Dimárzio*

Presidente

*Clayton Campanhola*

Vice-Presidente

*Alexandre Kalil Pires*

*Dietrich Gerhard Quast*

*Sérgio Fausto*

*Urbano Campos Ribeiral*

Membros

### **Diretoria-Executiva**

*Clayton Campanhola*

Diretor-Presidente

*Gustavo Kauark Chianca*

*Herbert Cavalcante de Lima*

*Mariza Marilena T. Luz Barbosa*

Diretores-Executivos

### **Embrapa Gado de Corte**

*Kepler Euclides Filho*

Chefe-Geral

# ***Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento***

## **Comportamento Citológico Atípico Durante a Microsporogênese em *Brachiaria ruziziensis* e *B. decumbens***

Claudicéia Risso-Pascotto  
Andréa Beatriz Mendes-Bonato  
Maria Suely Pagliarini  
Cacilda Borges do Valle

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

**Embrapa Gado de Corte**

Rodovia BR 262, km 4, CEP 79002-970 Campo Grande, MS

Caixa Postal 154

Fone: (67) 368 2064

Fax: (67) 368 2180

<http://www.cnpqg.embrapa.br>

E-mail: [sac@cnpqg.embrapa.br](mailto:sac@cnpqg.embrapa.br)

**Comitê de Publicações da Unidade**

Presidente: *Cacilda Borges do Valle*

Secretário-Executivo: *Liana Jank*

Membros: *Antonio do Nascimento Rosa, Arnildo Pott, Ecila Carolina Nunes Zampieri Lima, Ezequiel Rodrigues do Valle, José Raul Valério, Maria Antonia Martins de Ulhôa Cintra, Rosângela Maria Simeão Resende, Tênisson Waldow de Souza*

Supervisor editorial: *Ecila Carolina Nunes Zampieri Lima*

Revisor de texto: *Sylvia Odinei Cesco*

Normalização bibliográfica: *Maria Antonia M. de Ulhôa Cintra*

Capa: *Paulo Roberto Duarte Paes*

Foto de capa: *Claudicéia Risso-Pascotto*

Editoração eletrônica: *Ecila Carolina Nunes Zampieri Lima*

**1ª edição**

1ª impressão (2003): 500 exemplares

**Todos os direitos reservados.**

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

CIP-Brasil. Catalogação-na-publicação.

Embrapa Gado de Corte.

---

Comportamento citológico atípico durante a microsporogênese em *Brachiaria ruzizensis* e *B. decumbens* / Claudicéia Risso-Pascotto ... [et al.]. – Campo Grande : Embrapa Gado de Corte, 2003.

29 p. ; 21 cm. – (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Gado de Corte, ISSN 1679-0790 ; 16).

ISBN 85-297-0151-8

1. *Brachiaria ruzizensis*. 2. *Brachiaria decumbens*. 3. Citogenética vegetal. 4. Meiose. 5. Poliploidia. I. Risso-Pascotto, Claudicéia. II. Mendes-Bonato, Andréa Beatriz. III. Pagliarini, Maria Suely. IV. Valle, Cacilda Borges do. V. Embrapa Gado de Corte (Campo Grande, MS). VI. Título. VII. Série.

---

CDD 572.8 (21. ed.)

© Embrapa 2003

# Sumário

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Resumo</b> .....   | <b>5</b>  |
| <b>Abstract</b> .....   | <b>7</b>  |
| <b>Introdução</b> .....   | <b>8</b>  |
| <b>Material e Métodos</b> .....   | <b>9</b>  |
| <b>Resultados e Discussão</b> .....   | <b>10</b> |
| Bloqueio da segunda divisão meiótica em <i>Brachiaria ruzizensis</i> .....                                | 10        |
| Ciclo nucleolar anormal em <i>Brachiaria decumbens</i> .....  | 14        |
| Desenvolvimento gametofítico anormal em <i>Brachiaria decumbens</i> .....                                 | 17        |
| Visualização do fragmoplasto, fusos múltiplos e citocinese defectiva em <i>Brachiaria decumbens</i> ..... | 20        |
| <b>Comentários Finais</b> .....   | <b>23</b> |
| <b>Referências Bibliográficas</b> .....   | <b>25</b> |



# Comportamento Citológico Atípico Durante a Microsporogênese em *Brachiaria ruziziensis* e *B. decumbens*

*Claudicèia Risso-Pascotto*<sup>1</sup>

*Andréa Beatriz Mendes-Bonato*<sup>2</sup>

*Maria Suely Pagliarini*<sup>3</sup>

*Cacilda Borges do Valle*<sup>4</sup>

## Resumo

Em gramíneas forrageiras do gênero *Brachiaria*, populações poliplóides naturais são abundantes e geralmente apomíticas, enquanto as diplóides, que se reproduzem sexualmente, são raras. Considerando-se a estreita correlação existente entre poliploidia e apomixia neste gênero, e a necessidade de identificação de genótipos sexuais compatíveis para o sucesso da hibridação, conhecimentos de características citológicas básicas como modo de reprodução, comportamento meiótico e nível de ploidia tornam-se essenciais para direcionar os programas de melhoramento. Durante análises desenvolvidas na Universidade Estadual de Maringá, com acessos de várias espécies de uma coleção de germoplasma, mantida na Embrapa Gado de Corte, três acessos, sendo um de *B. ruziziensis* (BRA005568) e dois de *B. decumbens* (BRA007722 e BRA001058) apresentaram anormalidades meióticas incomuns e foram analisados com especial atenção. Inflorescências em estágio ideal para estudos meióticos foram coletadas, fixadas em uma mistura de etanol 95%, clorofórmio e ácido propiônico (6:3:2) durante 24 horas e armazenadas sob refrigeração. Os microsporócitos foram

---

<sup>1</sup> Biól., M.Sc., Doutoranda em Ciências Biológicas (Área de concentração: Biologia Celular), Departamento de Biologia Celular e Genética, Universidade Estadual de Maringá, CEP 87020-900 Maringá, PR.

<sup>2</sup> Enga.-Agra., M.Sc., Doutoranda em Ciências Biológicas (Área de concentração: Biologia Celular), Departamento de Biologia Celular e Genética, Universidade Estadual de Maringá.

<sup>3</sup> Biól., D.Sc., Departamento de Biologia Celular e Genética, Universidade Estadual de Maringá.

<sup>4</sup> Enga.-Agra., Ph.D., CREA N° 35.409/D-Visto 1542/MS, Embrapa Gado de Corte, Rodovia BR 262 Km 4, Caixa Postal 154, CEP 79002-970 Campo Grande, MS. Correio eletrônico: cacilda@cnpqg.embrapa.br

preparados pela técnica de esmagamento e corados com carmim propiônico 0,5%. O acesso de *B. ruziziensis* ( $2n = 2x = 18$ ) apresentou frequência de produtos meióticos anormais não esperada, com base em sua condição diplóide. A meiose I apresentou baixa frequência de anormalidades, enquanto na meiose II, a frequência de anormalidades aumentou de forma inesperada. Alguns cromossomos não conseguiram alcançar a placa equatorial. As células com cromossomos não alinhados na placa não receberam o sinal para prosseguir em divisão. Tais cromossomos deram origem a núcleos telofásicos de diferentes tamanhos, levando à formação de produtos meióticos anômalos. As observações sugerem a presença de um erro que afeta o “ponto de checagem do fuso”, interrompendo a segunda divisão meiótica. Ciclo nucleolar anormal relacionado ao processo de desorganização do nucléolo e nucleogênese foi observado no acesso BRA007722 de *B. decumbens* ( $2n = 4x = 36$ ). O acesso BRA001058 de *B. decumbens* cv. Basilisk ( $2n = 4x = 36$ ) apresentou duas formas distintas de anormalidades quando coletado em diferentes épocas. Em uma das épocas, os micronúcleos formados na primeira divisão organizaram fusos na segunda divisão e sofreram citocineses adicionais que levaram à formação de micrócitos de diferentes tamanhos. Na outra época de coleta, algumas plantas apresentaram uma anormalidade que afetou o desenvolvimento do gametófito masculino. As mitoses do grão de pólen não seguiram o padrão normal, comprometendo a formação das células vegetativa e generativa. As anormalidades encontradas no gênero *Brachiaria* representam um material biológico ímpar para o entendimento do controle genético da meiose. Algumas delas podem representar, também, ferramentas úteis para programas de melhoramento.

**Termos para indexação:** braquiária, citogenética, gramíneas forrageiras, meiose, mutantes, poliploidia.



# Unusual Cytological Pattern During Microsporogenesis in *Brachiaria ruziziensis* and *B. decumbens*

## Abstract

*In forage grasses of the Brachiaria genus natural polyploid and apomictic populations are abundant, whereas sexual diploid ones are rare. Taking into consideration the high correlation between polyploidy and apomixis in the genus, and the need to identify sexually compatible genotypes to accomplish hybridization, it becomes essential to obtain data on basic characteristics, such as mode of reproduction, chromosome behavior in meiosis, and ploidy levels within and among compatible species, to conduct a successful breeding program. During cytological analyses performed in the State University of Maringá laboratory in accessions of different species collected in the germplasm bank maintained at Embrapa Beef Cattle Center, three accessions, one of B. ruziziensis (BRA005568) and two of B. decumbens (BRA007722 and BRA001058), showed unusual meiotic behavior and were analyzed with special attention. Inflorescences at the right stage for meiotic analysis were collected, fixed in a mixture of 95% ethanol, chloroform and propionic acid (6:3:2) for 24 hours, transferred to 70% alcohol and stored under refrigeration until use. Microsporocytes were prepared by squashing and staining with 0.5% propionic carmine. The accession of B. ruziziensis ( $2n = 2x = 18$ ) presented a frequency of abnormal meiotic products not expected based on its diploid condition. Meiosis I was quite normal, whereas in the second division the frequency of abnormalities increased exceptionally. Some chromosomes did not reach the metaphase plate. Cells with scattered chromosomes did not receive the signal to continue their cycle. The scattered chromosomes resulted in telophase nuclei of different sizes,*

leading to the formation of abnormal meiotic products. The results suggest the occurrence of a mutation affecting the spindle checkpoint arresting the second division. Abnormal nucleolar cycle related to the process of nucleolus disorganization and nucleologenesis was observed in the accession BRA007722 of *B. decumbens* ( $2n = 4x = 36$ ). The accession BRA001058 of *B. decumbens* cv. *Basilisk* ( $2n = 4x = 36$ ) presented two distinct forms of abnormalities when collected in different periods. In one, micronuclei from the first division, organized their own spindles in the second division, and suffered additional cytokinesis that led to microcytes formation. In the other period, some plants presented an abnormality affecting the male gametophyte development. The mitosis of pollen grain was abnormal, thus compromising the formation of generative and vegetative cells. The abnormalities found in the genus *Brachiaria* makes it an extraordinary biological material to better understand the genetic control of meiosis. Some of them could also represent important tools for breeding programs.

**Index terms:** *braquiária, forage grasses, cytogenetics, meiosis, mutants, polyploidy.*

## Introdução

A meiose é um processo de crucial importância no ciclo de vida dos organismos e compreende uma série de eventos que envolve pareamento de cromossomos homólogos, ocorrência de permuta genética, formação de quiasmas e segregação cromossômica.

Todos os eventos da meiose são geneticamente controlados. Mutantes meióticos descritos em plantas e animais têm revelado que o processo meiótico é controlado por um grande número de genes que operam numa ordem hierárquica (Gottschalk & Kaul, 1974; Baker et al., 1976; Golubovskaya, 1979, 1989). Apesar de dezenas de mutantes meióticos terem sido descritos, na última década, o emprego de *Arabidopsis thaliana* como modelo para estudos biológicos nas mais diferentes áreas de conhecimento trouxe novas contribuições para o entendimento da meiose. Inúmeros mutantes meióticos originais foram descritos recentemente nesta espécie (Chaudhury et al., 1992; He et al., 1996; Hülskamp et al., 1995; Taylor et al., 1998).

Com o objetivo de subsidiar o programa de melhoramento genético desenvolvido pela Embrapa Gado de Corte, iniciou-se há poucos anos, no Departamento de Biologia Celular e Genética da Universidade Estadual de Maringá, um extenso trabalho de caracterização citogenética de acessos de *Brachiaria* existentes na coleção de germoplasma deste gênero. Estes estudos visam determinar o número de cromossomos e avaliar detalhadamente o comportamento meiótico dos acessos ali existentes. Quase uma centena de acessos já foi citologicamente estudada. A maioria deles mostrou-se poliplóide, principalmente tetraplóide, apresentando anormalidades meióticas típicas da poliploidia. Todavia, dentre os acessos analisados, alguns apresentaram anormalidades nunca antes descritas para o gênero *Brachiaria*, ou até mesmo para qualquer outra espécie vegetal. Tratam-se de anormalidades interessantes para serem usadas didaticamente ou, até mesmo, como ferramenta auxiliar nos programas de melhoramento. O objetivo deste trabalho é detalhar quatro casos de anormalidades atípicas em plantas poliplóides, encontradas em um acesso de *B. ruzizensis* e dois acessos de *B. decumbens*.

## Material e Métodos

Os acessos de *B. ruzizensis* (BRA005568) e *B. decumbens* (BRA007722 e BRA001058) sob estudo foram coletados em parcelas no campo de conservação de germoplasma da Embrapa Gado de Corte, situado no município de Campo Grande (clima do tipo AW: savana tropical úmida; precipitação média = 1.526 mm; temperatura média = 22°C; altitude 520 m; latitude = 20°28'S; longitude = 55°40'W); solo Latossolo Vermelho Escuro, álico (59% areia; 8% silte; 33% argila; pH = 4,2; 2,7% matéria orgânica; P = 1 ppm; 0,05, 0,1, 0,9, 6,9 Meq/100 cc de K, Ca + Mg, Al, CEC, respectivamente). O acesso BRA001058 é usado comercialmente sob a denominação de cultivar Basilisk. O material para análise meiótica foi coletado mais de uma vez, entre 1999 e 2002.

Inflorescências jovens, ainda envolvidas pela folha bandeira, foram colhidas e fixadas em uma mistura de etanol 95%, clorofórmio e ácido propiônico (6:3:2) durante 24 horas e armazenadas sob refrigeração. Os microsporócitos foram preparados pela técnica de esmagamento e corados com carmim propiônico 0,5%. Para determinação do número de cromossomos, foram analisadas, no mínimo, 20 células por acesso, nas fases de diacinese ou metáfase I. Para o estudo do comportamento meiótico, foram analisadas, aproximadamente, 2.000 células por acesso, representando as diferentes fases da divisão. Todas as

anormalidades meióticas foram consideradas e as mais representativas foram microfotografadas em filme preto e branco, Kodak Imagelink – HQ Asa 25 e ampliadas em papel fotográfico Kodachrome RC F3.

## Resultados e Discussão

### Bloqueio da segunda divisão meiótica em *Brachiaria ruziziensis*

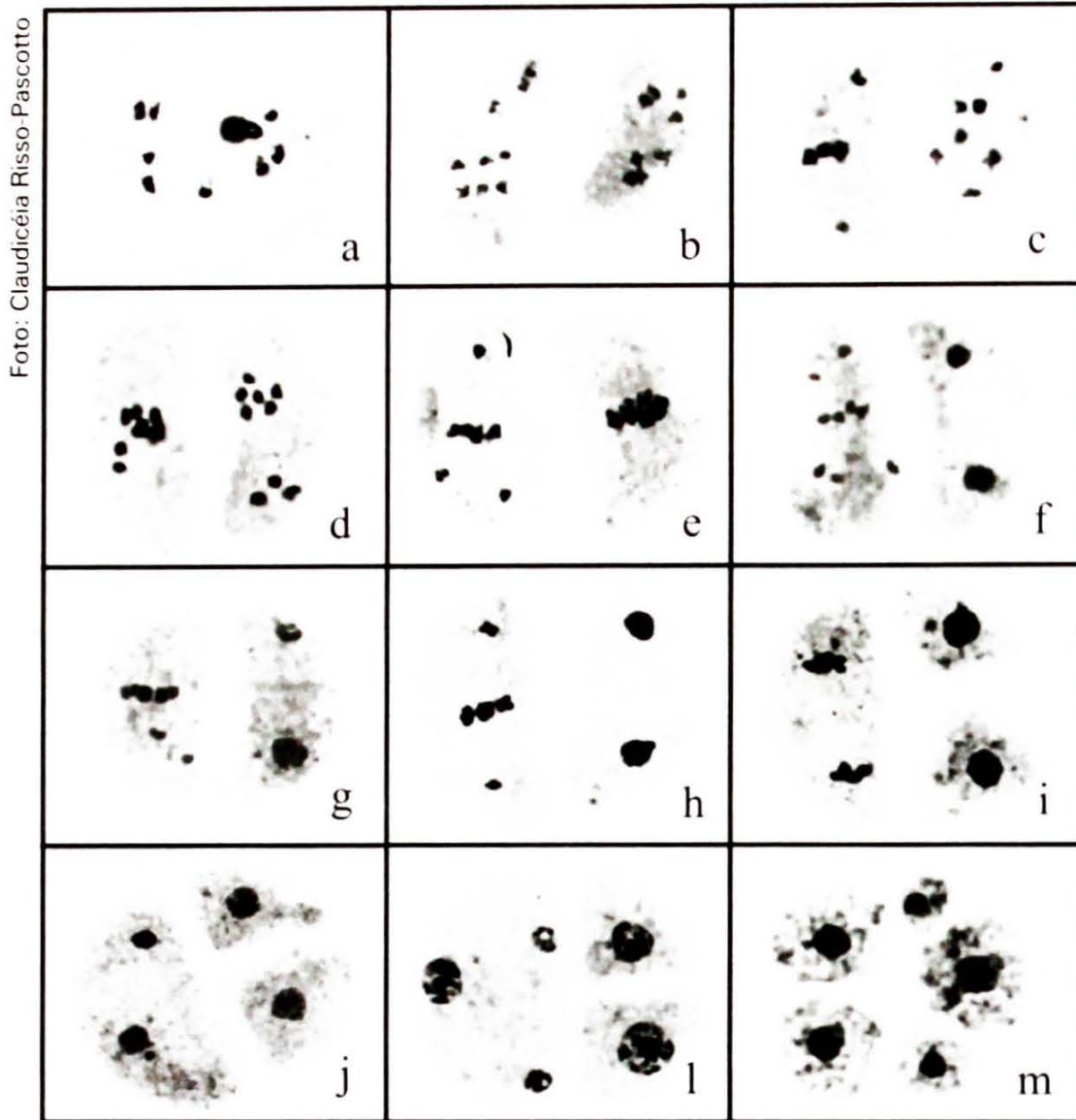
A análise citológica demonstrou condição diplóide ( $2n = 2x = 18$ ) para o acesso BRA005568 de *Brachiaria ruziziensis* (Fig. 1a). Na primeira divisão, o comportamento meiótico foi considerado normal para o nível de ploidia, onde poucas anormalidades relacionadas com terminalização de quiasmas foram observadas. Alguns cromossomos em ascensão precoce e cromossomos retardatários deram origem a poucos micronúcleos em telófase I.

Em geral, acessos diplóides apresentam algumas anormalidades na primeira divisão como as aqui descritas, mas a segunda divisão meiótica é sempre muito mais regular e o produto final da meiose é normal (Mendes-Bonato et al., 2002). Todavia, este acesso de *B. ruziziensis* apresentou, na segunda divisão, uma alta frequência de produtos meióticos anormais, não esperada e não condizente com diploidia. Uma alta frequência de células com anormalidades relacionadas à orientação dos cromossomos na placa metafásica e assincronia de divisão entre as duas células-irmãs foi observada na segunda divisão. No início da segunda divisão, ambas as células em prófase II apresentavam comportamento normal, mas ao final deste estágio, com o rompimento do envoltório nuclear, os cromossomos, mostrando típico grau máximo de condensação, apresentaram-se espalhados pelo citoplasma, ao invés de se orientarem na placa metafásica (Fig. 1b). Nos estágios seguintes da segunda divisão, alguns cromossomos permaneceram espalhados no citoplasma, enquanto outros alcançaram a placa metafásica (Fig. 1c, e), sugerindo erros na ligação dos cinetócoros com as fibras do fuso.

Na maioria dos casos, o comportamento entre as duas células-irmãs foi diferente, gerando uma assincronia de divisão. Em alguns casos, a incapacidade dos cromossomos de congregarem-se na placa metafásica levou à formação de núcleos contendo diferentes quantidades de cromossomos (Fig. 1d), os quais se formaram no local onde os cromossomos se encontravam (Fig. 1g, j). Estas células foram incapazes de prosseguir na meiose, de tal forma que não passaram por anáfase II e as cromátides irmãs não foram liberadas.

A célula que não conseguiu alinhar seus cromossomos teve seu ciclo celular normal bloqueado, enquanto a célula irmã com cromossomos alinhados progrediu no ciclo. Assincronia entre as duas células foi observada desde a metáfase até o estágio de tétrade. A Fig. 1 ilustra diferentes aspectos da assincronia entre as células. Os dados mostraram claramente que as células com cromossomos não alinhados na placa metafásica tiveram a meiose II bloqueada até que os cromossomos não alinhados conseguissem formar micronúcleos nos locais em que se encontravam (Fig. 1e). Esta assincronia levou à formação de produtos meióticos variados, desde tríades até héxades, e tétrades com micrósporos de diferentes tamanhos.

A meiose é um tipo de divisão celular pelo qual células reprodutivas diplóides dão origem a células haplóides que se diferenciam em gametas. Este processo envolve duas etapas, cada uma acompanhada por redução no número de cromossomos. Na primeira divisão, os cromossomos homólogos separam-se e são puxados para pólos opostos e a célula se divide em duas. Imediatamente após, na segunda divisão, as cromátides irmãs são igualmente separadas para pólos opostos. No início de ambas as divisões, um complexo especializado de proteínas em cada cromátide, conhecido como cinetócoro, captura microtúbulos vindos dos dois pólos. Para que a segregação seja regular, cada cromossomo homólogo na meiose I e cada cromátide irmã na meiose II devem ligar-se aos microtúbulos dos pólos opostos (Sluder & McCollum, 2000). A correta ligação dos cromossomos ao fuso é assegurada por um mecanismo complexo, conhecido como "ponto de checagem de fuso" (*spindle checkpoint*). Este mecanismo detecta a presença de um único cinetócoro não ligado ao fuso e bloqueia o progresso da mitose até que o cinetócoro não ligado capture um microtúbulo. O ponto de checagem funciona pela destruição de algumas proteínas, o que é requerido para o início da anáfase (Gorbsky et al., 1999). As proteínas envolvidas no ponto de checagem são geralmente conhecidas como *mad* (*mitotic arrest deficient*) por terem sido isoladas de mutantes com bloqueios na divisão mitótica.



**Fig. 1.** *Brachiaria ruzizensis* (BRA005568): a) microsporócito em diacinese com nove bivalentes; b-m) diferentes estágios da segunda divisão meiótica; b) prófase tardia com cromossomos espalhados no citoplasma; c) prófase/metáfase assincrônica. Na célula em metáfase, dois cromossomos ainda não alcançaram a placa; d) ambas as células apresentam cromossomos espalhados no citoplasma; e) metáfase com cromossomos espalhados em uma célula; f, g, h) metáfase/telófase com cromossomos ainda espalhados na célula em metáfase. Em f e g, observe a diferença no tamanho dos núcleos telofásicos; i) anáfase/telófase; j) telófase/tétrade. Observe a diferença no tamanho dos núcleos telofásicos; l) telófase/tétrade. A célula em telófase apresenta três núcleos de diferentes tamanhos resultantes de cromossomos que não chegaram à placa metafásica; m) pêntade com dois micrócitos.

A maioria dos estudos sobre pontos de checagem de fuso foi desenvolvida em células mitóticas (Gorbsky, 1995; Nicklas, 1997; Allshire, 1997; Amon, 1999; Yu et al., 2000). Alguns pesquisadores têm sugerido que a meiose também tem pontos de checagem para assegurar que um determinado evento esteja completo antes que o subsequente se inicie (Page & Orr-Weaver, 1997). Pontos de checagem, ou, mais especificamente, ponto de checagem bloqueando a meiose II, como observado no presente acesso de *B. ruziziensis*, não foi descrito para nenhuma espécie animal ou vegetal. Este possível mutante mostra um comportamento muito semelhante ao dos mutantes *mad2* identificados em leveduras, porque há um bloqueio na segunda divisão meiótica, cujo processo de segregação cromossômica é idêntico ao da mitose, ou seja, há separação de cromátides irmãs.

A checagem de fuso previne que a transição da metáfase para a anáfase ocorra em células que apresentem defeitos no fuso ou na ligação dos cromossomos às fibras do fuso. Ela bloqueia o início da anáfase na mitose ou meiose se os cromossomos não estão alinhados na placa metafásica. A interação perfeita entre microtúbulos e cinetócoros parece ser essencial para a liberação deste evento (Gorbsky et al., 1999). No presente acesso, as observações sugerem que a checagem de fuso impediu a transição da metáfase para anáfase em células que continham cromossomos espalhados no citoplasma. Na verdade, estas células não receberam o sinal de "siga em frente" para a anáfase. Como consequência, a meiose II foi bloqueada, as cromátides irmãs não foram liberadas e os cromossomos dispersos no citoplasma formaram micronúcleos no local em que se encontravam.

Mutações que comprometem o ponto de checagem contribuem para a instabilidade cromossômica, uma característica de muitos tipos de câncer humano (Cahill et al., 1998). Há de se conhecer melhor os mecanismos determinantes dessa possível mutação. É da maior importância que haja controle na checagem de fuso na meiose por causa dos problemas relacionados com a segregação irregular de cromossomos que geram muitos tipos de síndromes com efeitos nefastos ou deletérios na espécie humana. A possível mutação bloqueando a segunda divisão meiótica encontrada neste acesso, quando estudada adequadamente do ponto de vista genético e molecular, poderá trazer novas informações neste campo de conhecimento.

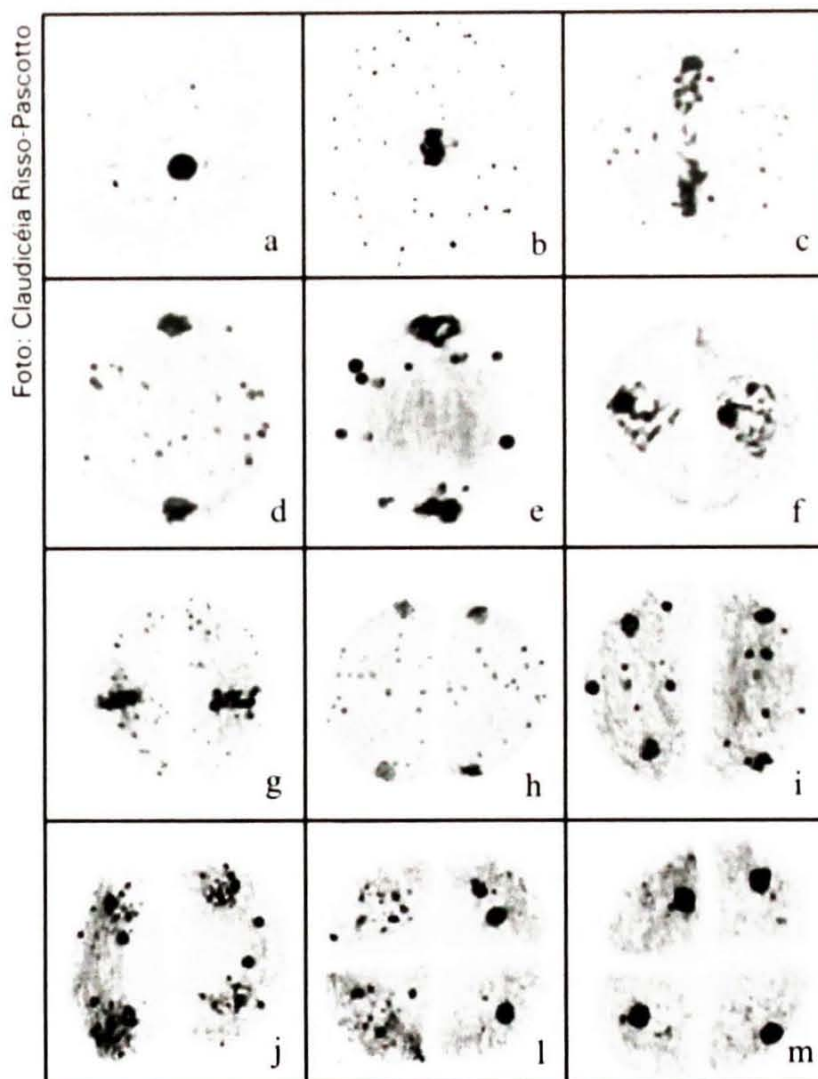
## Ciclo nucleolar anormal em *Brachiaria decumbens*

Os estudos citológicos revelaram um padrão de ciclo nucleolar atípico durante a meiose no acesso BRA007722 de *B. decumbens* ( $2n = 4x = 36$ ). Até a prófase tardia, o comportamento do nucléolo foi normal (Fig. 2a), quando desaparecia ao final da diacinese. Enquanto em plantas com meioses normais nenhum resíduo de nucléolo foi observado até a telófase I, neste acesso, a partir da metáfase I, inúmeros nucléolos extracromossômicos foram observados espalhados no citoplasma após a sua dissolução ao final da prófase (Fig. 2b). Durante a anáfase inicial, estes nucléolos extracromossômicos ainda eram observados em grande quantidade (Fig. 2c), mas com o avanço do ciclo celular envolveram-se em um processo de fusão, aumentando em tamanho e diminuindo em quantidade (Fig. 2d). Este processo de fusão persistiu de tal forma que, no início da telófase I, o número de nucléolos era menor, porém estes eram de maior tamanho, e alguns nucléolos podiam ainda ser vistos no citoplasma (Fig. 2e). Ao final da telófase, todos os nucléolos extracromossômicos foram reunidos em um único nucléolo em cada núcleo e permaneceram nesta condição até ao final da prófase II (Fig. 2f), quando desapareceram novamente. Na metáfase II, cada nucléolo foi fracionado novamente em inúmeros nucléolos extracromossômicos (Fig. 2g). Durante a anáfase II (Fig. 2h) e telófase II inicial e tardia (Fig. 2i, j), o comportamento do nucléolo foi idêntico ao observado na primeira divisão. Na maioria das células em telófase II, os nucléolos extracromossômicos fundiram-se em um único nucléolo, enquanto em outras, a fusão só aconteceu nos estágios finais da formação da tétrade (Fig. 2l, m). Este comportamento do nucléolo não afetou a fertilidade do pólen, a qual foi estimada em 89,68%. A esterilidade do pólen observada neste acesso pode ser atribuída à poliploidia, em que associações cromossômicas multivalentes são geralmente acompanhadas por segregação irregular de cromossomos e formação de gametas geneticamente desbalanceados.

O nucléolo é o elemento estrutural mais óbvio do núcleo interfásico de células eucarióticas. Na microscopia óptica, aparece como uma estrutura esférica que ocupa uma porção substancial do espaço nuclear. Como uma estrutura dinâmica, seu volume e a proporção de seus componentes são geralmente modificados em função da atividade biossintética da célula (Giménez-Martin et al., 1977). O nucléolo, como sítio de biogênese de ribossomos, contém genes de rRNA transcricionalmente ativos e partículas de precursores de ribossomos em diferentes estágios de maturação (Sommerville, 1986). O aparecimento e desaparecimento do nucléolo, em certos estágios do ciclo celular, sugerem um ciclo



nucleolar. Uma análise detalhada da relação entre ciclo celular e ciclo nucleolar foi feita por Giménez-Martin et al. (1974, 1977), em que se mostrou que a desorganização nucleolar ocorre na prófase e a nucleologênese tem lugar na telófase.



**Fig. 2.** *Brachiaria decumbens* (BRA001058): a) microsporócito em diacinese com nucléolo normal; b) metáfase I com inúmeros nucléolos extracromossômicos de diferentes tamanhos espalhados pelo citoplasma; c) anáfase I inicial com inúmeros nucléolos extracromossômicos; d) anáfase I tardia mostrando número menor de nucléolos de maior tamanho; e) telófase I precoce com poucos nucléolos de grande tamanho, após fusão; f) prófase II normal com um único nucléolo em cada núcleo; g) metáfase II com inúmeros nucléolos extracromossômicos no citoplasma; h) anáfase II tardia com número reduzido de micronucléolos; i) telófase II precoce com poucos nucléolos extracromossômicos de grande tamanho; j) telófase II completando o processo de fusão de corpúsculos pré-nucleolares; l) tétrede completando o processo fusional; m) tétrede com nucléolo normal em cada núcleo.

Muitos pesquisadores têm estudado detalhadamente o ciclo nucleolar na mitose (Scheer & Benavente, 1990), mas há poucos estudos acerca da nucleologênese durante a meiose (Loidl & Greilhuber, 1983; Langer & Koul, 1985). Normalmente, os estudos de ciclo nucleolar envolvem técnicas com marcadores que permitem acompanhar seu destino durante o ciclo celular. O comportamento nucleolar observado neste acesso de *B. decumbens* mostrou claramente, sem uso de marcador algum, detalhes preciosos do ciclo nucleolar durante a meiose, não visíveis em plantas com divisões normais. O comportamento do nucléolo neste acesso pode ser atribuído a um erro que afetou algum passo importante da desorganização nucleolar, de tal forma que o nucléolo não conseguiu ser fragmentado em partículas invisíveis como geralmente acontece. Não se encontrou esse tipo de comportamento em outras avaliações de quase uma centena de acessos de diferentes espécies de *Brachiaria* cultivados sob as mesmas condições ambientais na Embrapa Gado de Corte e analisados com a mesma técnica (Mendes-Bonato et al., 2002).

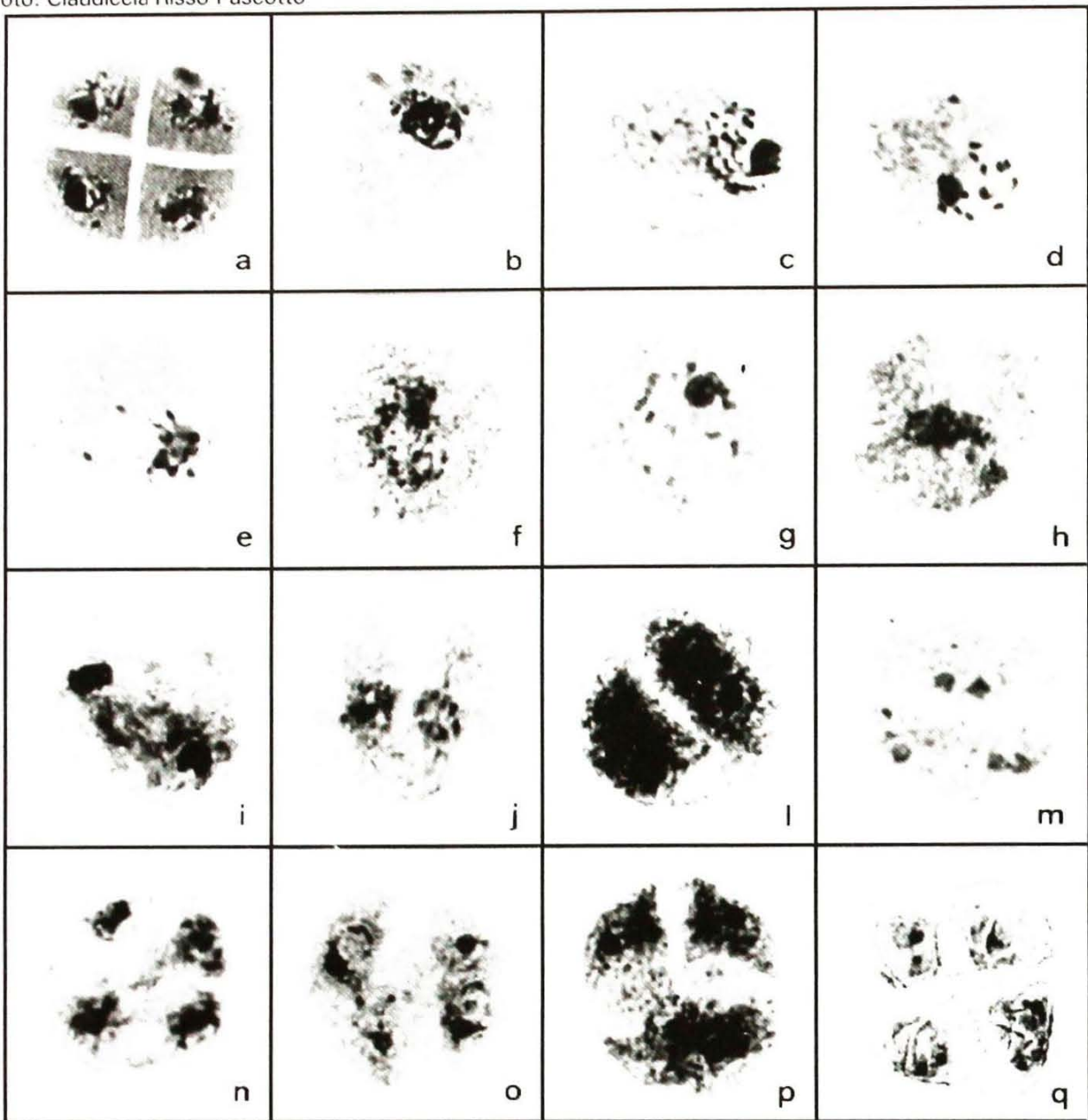
Utilizando técnicas sofisticadas, Giménez-Martin et al. (1977) e Torre & Giménez-Martin (1982) propuseram que a nucleologênese em organismos superiores ocorre através da reunião de material nucleolar pré-existente antes que nova síntese de rRNA ocorra no núcleo interfásico. Por outro lado, Sato (1988) propôs que o material nucleolar pré-existente não é utilizado na construção do novo nucléolo. Sem utilizar qualquer metodologia específica, este mutante de *B. decumbens* mostrou claramente que o novo nucléolo é reconstruído a partir da fusão de corpos pré-nucleolares originados da desorganização do nucléolo que o antecedeu. Dessa forma, este acesso constitui-se num excelente material didático para demonstrar o ciclo nucleolar, o que pode ser feito com uma metodologia simples.

Ocorrências de persistência nucleolar durante o ciclo celular têm sido descritas em mitose (Giménez-Martin et al., 1977) e em meiose (Langer & Koul, 1985), mas as estruturas semelhantes a nucléolos (*nucleolus-like bodies* - NLBs) só têm sido descritas durante a prófase. NLBs geralmente são estruturas grandes, esféricas e densas e encontram-se associadas ao nucléolo, à cromatina ou livres no citoplasma, e em pequeno número. Em nenhuma de suas ocorrências, NLBs foram relatadas persistir após a prófase ou envolverem-se em processo de fusão como observado no presente acesso. O significado dessas estruturas é ainda desconhecido.

## Desenvolvimento gametofítico anormal em *Bracharia decumbens*

A caracterização citogenética da cultivar Basilisk (acesso BRA001058) de *B. decumbens* foi desenvolvida envolvendo a microsporogênese e a microgametogênese. O acesso mostrou-se tetraplóide ( $2n = 4x = 36$ ), apresentando anormalidades meióticas típicas decorrentes do nível de ploidia. Ascensão precoce de cromossomos para os pólos e cromossomos retardatários levaram à formação de micronúcleos em ambas as divisões, resultando em tétrades geneticamente desbalanceadas. Após a dissolução da parede de calose, os micrósporos, com aparência normal, foram liberados no interior da antera. Cada micrósporo iniciou, então, a sua preparação para sofrer a primeira mitose do pólen. Em plantas com divisões normais, nos estágios iniciais da mitose, o núcleo torna-se polarizado (Fig. 3b-e), mas em alguns micrósporos estes estágios foram caracterizados por simetria, isto é, o núcleo não foi deslocado do centro da célula para a periferia (Fig. 3f-j). A típica placa celular hemisférica não foi observada nestas células e todos os estágios da mitose, da prófase à telófase, ocorreram no centro da célula. Após a citocinese, duas células de igual tamanho resultaram de uma divisão simétrica (Fig. 3l). Ambas as células mostraram igual condensação de cromatina e apresentavam núcleos esféricos e de mesmo tamanho. Ao invés de somente a célula generativa sofrer a segunda mitose do pólen, como esperado, nestes micrósporos ambas as células sofreram uma nova mitose. Ao final da segunda mitose do pólen, quatro núcleos de mesmo tamanho e forma e igualmente condensados foram observados em cada pólen (Fig. 3m-p). Até este estágio, a parede do pólen não era visível. Contudo, após a citocinese, as células individualizaram-se e deram origem a quatro grãos de pólen de igual tamanho que inicialmente, permaneceram juntos, exibindo uma configuração típica de tétrade (Fig. 3q). A parede do grão de pólen encontrava-se perfeitamente formada neste estágio. Grãos de pólen estéreis resultaram destas células. Esta anormalidade não afetou a todos os micrósporos, mas 43,24% das células apresentaram mitose anormal de pólen.

Foto: Claudicéia Risso-Pascotto



**Fig. 3.** *Brachiaria decumbens* (BRA001058): a) tétrade de micrósporos com alguns micronúcleos; b-e) micrósporo em intérfase (b), prófase (c), prometáfase (d) e metáfase (e) em plantas com divisão normal. Observe a posição polarizada do núcleo nas células; f-j) micrósporo em intérfase (f), prometáfase (g), metáfase (h), anáfase (i) e telófase (j) da primeira mitose do pólen nas plantas mutantes. Observe a não polarização do núcleo nestas células; l) metáfase da segunda divisão mitótica do grão de pólen. Observe que, após a citocinese, as duas células apresentam o mesmo tamanho; m) diferentes estágios de anáfase nas duas células; n) anáfase tardia; o) telófase; p) citocinese dividindo igualmente as células filhas; q) quatro grãos de pólen estéreis resultantes de duas divisões mitóticas simétricas.

Em plantas superiores, o final da meiose masculina marca o início da diferenciação celular que leva à formação do gametófito (Twell et al., 1998). O desenvolvimento do pólen e a gametogênese masculina são dependentes de polarização celular, a qual contribui para uma divisão celular altamente assimétrica, denominada primeira mitose do pólen. Em divisões normais, o núcleo é deslocado do centro para a periferia no estágio G1 do ciclo celular do micrósporo. O deslocamento continua e é mantido pela ação de microtúbulos do citoesqueleto (Tanaka, 1997). De acordo com Heslop-Harrison (1968), para que a diferenciação típica da célula generativa e vegetativa possa ocorrer, a divisão celular assimétrica precisa ser completada pela formação de uma placa celular típica, na qual a orientação do fuso é muito importante. O pólo generativo se aloja adjacente à membrana plasmática e o pólo vegetativo fica localizado na membrana interna do micrósporo. A formação da placa celular hemisférica não foi observada durante a primeira mitose do pólen neste acesso de *Brachiaria*.

A célula vegetativa e generativa em plantas com divisão normal diferem em morfologia e função (Tanaka, 1997; Twell et al., 1998). A célula vegetativa é grande e acumula uma grande quantidade de metabólitos necessários para o rápido crescimento do tubo polínico, enquanto a célula generativa é pequena e contém poucas organelas e metabólitos (Park et al., 1998). Uma característica peculiar dos micrósporos anormais deste acesso foi a falta de diferenciação entre a célula vegetativa e a generativa. Segundo Tanaka (1997), quando a divisão assimétrica é inibida ou substituída por uma divisão simétrica, a célula generativa não se forma. Divisões simétricas espontâneas, como observado neste acesso, são raras na natureza. Na maioria dos casos descritos, foram induzidas pela ação de alguma droga.

Em *B. decumbens*, após a primeira mitose do pólen, as duas células resultantes exibiram mesmo tamanho e igual condensação de cromatina. Em geral, o núcleo da célula vegetativa contém cromatina difusa e o da célula generativa contém cromatina condensada. Esta diferenciação acontece logo após a primeira mitose do pólen e parece estar ligada à atividade gênica, pois o núcleo generativo é transcricionalmente menos ativo que o vegetativo (Tanaka et al., 1998). Nos micrósporos anormais deste acesso, ambos os núcleos passaram pela segunda mitose do pólen. Normalmente, somente o núcleo generativo, que contém cromatina condensada, sofre esta mitose e dá origem a dois núcleos gaméticos. A ausência de diferenciação na condensação da cromatina sugere que ambos os núcleos são igualmente ativos neste acesso.

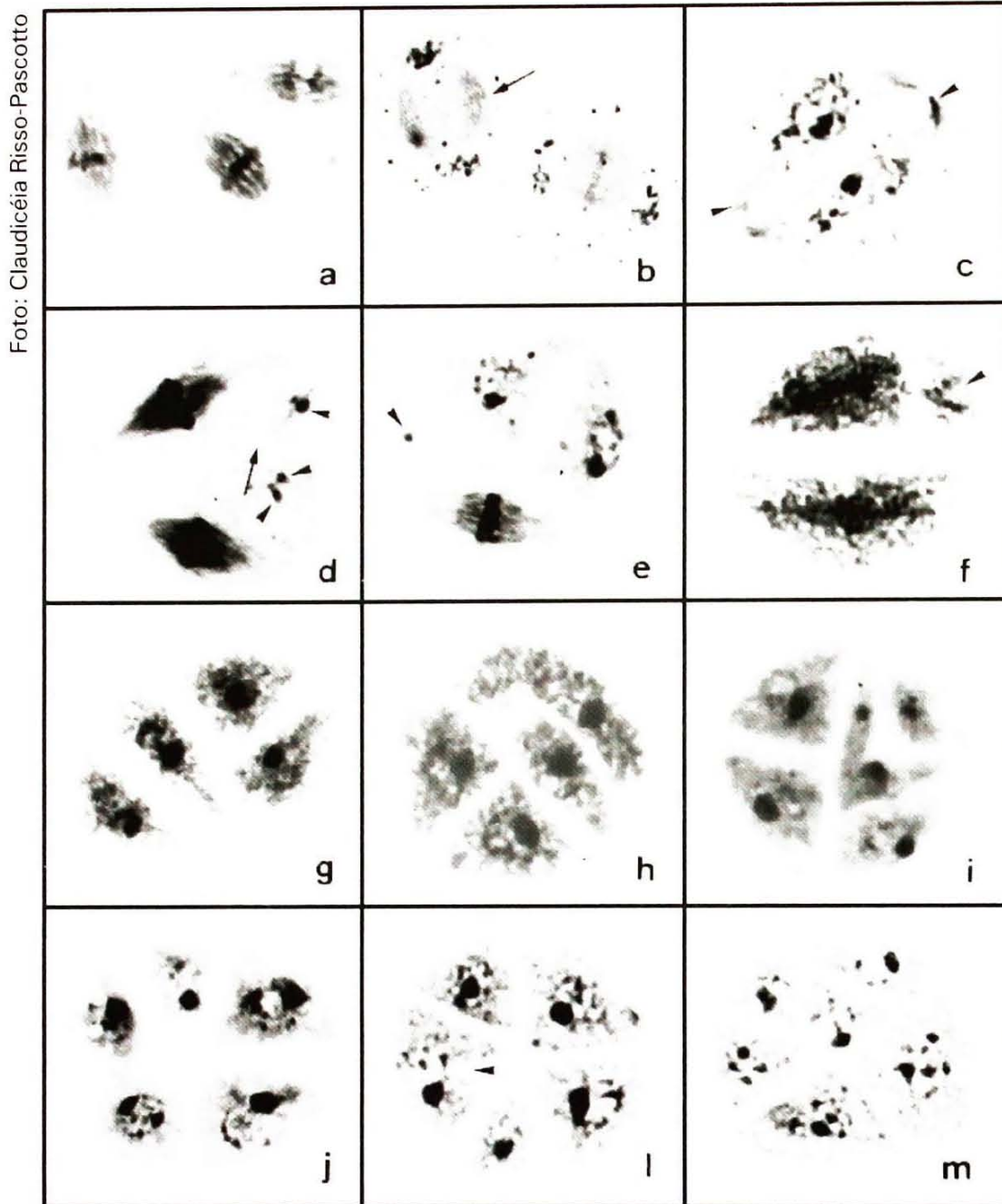
Na maioria das plantas, a célula generativa completa sua divisão durante o crescimento do tubo polínico no estilete. Assim, quando totalmente maduro, o gametófito consiste de três células, a célula vegetativa e duas células espermáticas (Mascarenhas, 1989). Neste caso, com a cultivar Basilisk, as duas células resultantes da primeira mitose sofreram a segunda mitose, também simétrica, resultando em uma estrutura com quatro núcleos de igual tamanho, que se diferenciou em quatro grãos de pólen estéreis. Em outras palavras, a segunda mitose do pólen não deu origem às células espermáticas, sugerindo que a determinação genética para o desenvolvimento do gametófito foi completamente alterada. Apesar de ser uma estrutura simples, a produção de pólen funcional envolve uma série complexa de processos regulados e requer a expressão de um grande número de genes esporofíticos e gametofíticos (Sari-Gorla et al., 1997). A primeira mitose do pólen parece ser um ponto crítico no desenvolvimento do gametófito masculino (McCormick, 1993), pois um conjunto de genes específicos é ativado neste momento. Segundo Sari-Gorla et al. (1997); o fato de que mutantes macho-estéreis esporofíticos são expressos antes da mitose enquanto seus alelos que atuam no gametófito são expressos após a mitose, sugere que após a mitose do pólen o papel do genoma do esporófito em direcionar o desenvolvimento do pólen é reduzido. Em *B. decumbens*, o comportamento citológico descrito para a primeira e segunda mitose do pólen sugere que genes esporofíticos estão sendo expressos antes da primeira mitose, afetando a simetria da primeira divisão e a diferenciação celular, enquanto seus alelos gametofíticos estão sendo expressos após a mitose, afetando a segunda mitose e a formação das células espermáticas.

### **Visualização do fragmoplasto, fusos múltiplos e citocinese defectiva em *Brachiaria decumbens***

Algumas plantas da cultivar Basilisk (acesso BRA001058) de *B. decumbens* apresentaram alguns aspectos citológicos interessantes relacionados ao fuso. Fusos altamente corados foram observados na metáfase e anáfase da primeira divisão (Fig. 4a), fato não verificado em qualquer outro acesso de *Brachiaria* fixado e preparado da mesma maneira. Em telófase I, os microtúbulos interzonais, ou microtúbulos do fragmoplasto, continuavam ainda evidentes (Fig. 4b). Durante a formação do fragmoplasto propriamente dita, as fibras eram empurradas para a parede celular, persistindo até a prófase II (Fig. 4c), mesmo após a ocorrência de citocinese. De acordo com Staehelin & Hepler (1996), os microtúbulos do fragmoplasto originam-se a partir de microtúbulos remanescentes do fuso. No final da anáfase, os microtúbulos coalescem numa região central

formando o fragmoplasto. No momento da citocinese, esta estrutura torna-se mais curta e se expande, até que finalmente alcance a parede celular. As demonstrações deste comportamento dos microtúbulos formando o fragmoplasto e seu comportamento posterior têm sido feitas utilizando-se técnicas especiais. No presente acesso de *B. decumbens*, este mecanismo pode ser visualizado com coloração simples de carmim propiônico e sem a aplicação de qualquer outra técnica mais sofisticada. Comportamento semelhante de microtúbulos de fragmoplasto foi descrito em um híbrido intergenérico de cereais e esteve relacionado com a formação de núcleos de restituição na meiose I (Shamina et al., 1999).

Devido a sua condição poliplóide ( $2n = 4x = 36$ ), este acesso apresentou uma considerável quantidade de cromossomos em ascensão precoce para os pólos e cromossomos retardatários, os quais deram origem a micronúcleos na telófase I. O comportamento dos micronúcleos neste acesso diferiu do observado em qualquer outro acesso de *Brachiaria* já analisado. Enquanto em outros acessos de *Brachiaria* os micronúcleos permanecem nesta condição até o momento da ocorrência da segunda citocinese, ou seja, antes da formação da tétrade (Mendes-Bonato et al., 2002), neste acesso, os micronúcleos formados na primeira divisão organizaram seu próprio fuso na segunda divisão (Fig. 4d). Em muitos microsporócitos, os micronúcleos com seus fusos eram fracionados em micrócitos por citocineses adicionais (Fig. 4d-f). Como regra, nestas células o núcleo principal adquiriu um novo plano de orientação (Fig. 4d, e). Citocineses anormais foram observadas na segunda divisão também em células sem micronúcleos (Fig. 4g, h). Alguns planos curiosos de citocinese foram observados em algumas células, dividindo o citoplasma em células com formatos irregulares (Fig. 4h, i). Estas citocineses deram origem a uma alta freqüência de produtos meióticos anormais (Fig. 4j-m). Pêntades, tétrades em forma de T, héxades e héptades foram observadas ao final da meiose.



**Fig. 4.** *Brachiaria decumbens* (BRA001058): a) microsporócitos em metáfase I e anáfase I mostrando fusos intensamente corados; b) telófase I mostrando microtúbulos interzonais intensamente corados e fragmoplasto. Em uma das células (seta), as fibras estão sendo empurradas contra a parede celular; c) prófase II com microtúbulos interzonais remanescentes próximos da parede celular; d) metáfase II com micronúcleos formando seus próprios fusos. A seta marca um local de citocinese precoce; e) divisão assincrônica em meiose II. Note a presença de micrócito com um micronúcleo (cabeça de seta); f) metáfase II com um micrócito; g) tétrade em forma de T; h, i) tétrade (h) e pêntade (i) mostrando micrósporos de formato irregular resultante de citocinese anormal; j, l, m) pêntades (j, l) e hêxade (m) resultante de celularização precoce. Observe que em l um dos micrósporos está sofrendo uma citocinese precoce (cabeça de seta).



Muito pouco é conhecido sobre o desenvolvimento do fuso meiótico em plantas, muitos dos quais tornam-se multipolares na segunda divisão (Brown & Lemmon, 1989, 1991, 1998). Neste acesso, a formação de micronúcleos decorrente da poliploidização levou à formação de fusos múltiplos na segunda divisão, seguidos, ou até mesmo antecidos, por citocinese adicional. Este fenômeno causou uma celularização precoce, fracionando o genoma. Segundo Baskin & Cande (1990), é o fuso quem determina onde e quando a citocinese deve ocorrer. O núcleo, incluindo micronúcleos, organiza sistemas de microtúbulos radiais que definem o volume de citoplasma proporcional ao seu tamanho. No presente acesso, todavia, citocineses aconteceram sem a presença de fusos ou sequer de cromossomos. A ocorrência de fusos múltiplos associada com citocineses adicionais tem sido descrita em várias espécies de plantas (Pagliarini, 1990, 2000).

Fusos múltiplos podem ter origem genética. Um ou vários genes têm sido descritos como responsáveis por esta anomalia (Pagliarini, 1990). Segundo Tai (1970), espécies poliplóides têm mais chances de apresentar fusos múltiplos, sugerindo que existem cromossomos ligados à formação do fuso. As causas da formação de fusos múltiplos neste acesso permanecem desconhecidas, pois acessos poliplóides de outras espécies, e mesmo outros acessos desta espécie, inclusive plantas deste mesmo acesso coletadas em diferentes locais e épocas, não têm apresentado esta anomalia. Fertilidade de pólen reduzida é uma das conseqüências da formação de fusos múltiplos e celularização devido ao fracionamento do genoma (Pagliarini, 1990, 2000). Neste acesso, 44,26% dos produtos meióticos foram representados por pêntades, héptades e hécades, comprometendo a fertilidade do pólen.

## Comentários Finais

Mutações que causam macho-esterilidade em plantas são de grande interesse para os programas de melhoramento. O programa de melhoramento de *Brachiaria*, desenvolvido pela Embrapa Gado de Corte, objetiva produzir híbridos através de cruzamentos intra- e interespecíficos, utilizando acessos sexuais ou híbridos como fêmeas e acessos apomíticos como machos. Considerando que os progenitores sexuais são alógamos e a emasculação manual é difícil de se realizar, a ocorrência de mutantes macho-estéreis poderia aumentar a eficiência do programa, evitando a autopolinização do progenitor sexual. Há que se considerar, todavia, que os acessos apomíticos de *Brachiaria* são também

pseudógamos, ou seja, necessitam de fertilização dos núcleos secundários do saco embrionário para o desenvolvimento do endosperma e formação da semente e, para isto, gametas masculinos viáveis são requeridos.

As anormalidades encontradas no gênero *Brachiaria* sugerem ser resultantes de mutações, algumas das quais ainda não descritas em qualquer outra espécie vegetal, representando, portanto, um material biológico muito interessante para o entendimento do controle genético da meiose. Num dos casos, uma possível mutação que afeta o "ponto de checagem do fuso", interrompendo a segunda divisão meiótica, foi detectada em *B. ruziziensis*. *B. decumbens* cv. Basilisk apresentou duas formas distintas de anormalidades quando coletada em diferentes épocas. Em uma das épocas, os micronúcleos formados na primeira divisão organizaram fusos na segunda divisão e sofreram citocineses adicionais que levaram à formação de micrócitos de diferentes tamanhos. Na outra época de coleta, algumas plantas apresentaram uma anormalidade envolvendo o desenvolvimento do gametófito masculino. As mitoses do grão de pólen não seguiram o padrão normal, comprometendo a formação das células vegetativa e generativa. Ciclo nucleolar anormal relacionado ao processo de desorganização do nucléolo e nucleologênese foi observado no outro acesso de *B. decumbens* (BRA007722).

Algumas destas anormalidades podem representar ferramentas úteis ou determinar a eliminação de genitores nos programas de melhoramento: possíveis mutações originando macho-esterilidade em acessos e híbridos sexuais favoreceriam a polinização cruzada sem necessidade de isolamento ou emasculação. Já macho-esterilidade nos acessos e híbridos apomíticos resultariam em altas taxas de sementes vazias, pela falha na fecundação dos núcleos polares e conseqüente não-formação do endosperma, além de impossibilitar o uso desses genótipos como futuros genitores em novos cruzamentos no programa de melhoramento. A grande quantidade de anormalidades originais, conjugada com a alta freqüência de diferentes níveis de poliploidia, sugere que o gênero *Brachiaria* esteja, ainda, sofrendo intensamente a ação de fatores seletivos que promovem evolução.

## Referências Bibliográficas

ALLSHIRE, R. C. Centromeres, checkpoints and chromatid cohesion. **Current Opinion in Genetics and Development**, London, v. 7, p. 264-273, 1997.

AMON, A. The spindle checkpoint. **Current Opinion in Genetics and Development**, London, v. 9, p. 69-75, 1999.

BAKER, B. S.; CARPENTER, A. T. C.; ESPOSITO, M. S.; ESPOSITO, R. E.; SANDLER, L. The genetic control of meiosis. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, v. 10, p. 53-134, 1976.

BASKIN, T. I.; CANDE, W. Z. The structure and function of the mitotic spindle in flowering plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 41, p. 277-315, 1990.

BROWN, R. C.; LEMMON, B. E. Minispindles and cytoplasmic domains in microsporogenesis in orchids. **Protoplasma**, New York, v. 148, p. 26-32, 1989.

BROWN, R. C.; LEMMON, B. E. The cytokinetic apparatus in meiosis: control of division plane in the absence of a preprophase band of microtubules. In: LLOYD, C. [Ed.]. **The cytoskeleton basis of plant growth and form**. London: Academic Press, 1991. p. 259-273.

BROWN, R. C.; LEMMON, B. E. Division polarity and plasticity of meiosis I spindle in *Cypripedium californicum* (Orchidaceae). **Protoplasma**, New York, v. 203, p. 168-174, 1998.

CAHILL, D. P.; LENGAUER, C.; YU, J.; RIGGINS, G. J.; WILLSON, J. K. V.; MARKOWITZ, S. D.; KINZLER, K. W.; VOLGSTEIN, B. Mutations of mitotic checkpoint genes in human cancers. **Nature**, London, v. 392, p. 300-303, 1998.

CHAUDHURY, A. M.; CRAIG, S.; BLOEMER, K. C.; FARRELL, L.; DENNIS, E. S. Genetic control of male fertility in higher plants. **Australian Journal of Plant Physiology**, Victoria, v. 19, p. 419-426, 1992.

- GIMÉNEZ-MARTIN, G.; TORRE, C. de la; FERNÁNDEZ-GÓMEZ, M. E.; GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, A. Experimental analysis of nucleolar reorganization. **Journal of Cell Biology**, New York, v. 60, p. 502-507, 1974.
- GIMÉNEZ-MARTIN, G.; TORRE, C. de la; LOPEZ-SAEZ, J. F.; ESPONDA, P. Plant nucleolus: structure and physiology. **Cytobiologie**, Stuttgart, v. 14, p. 421-462, 1977.
- GOLUBOVSKAYA, I. N. Genetic control of meiosis. **International Review of Cytology**, New York, v. 58, p. 247-290, 1979.
- GOLUBOVSKAYA, I. N. Meiosis in maize: *mei* genes and conception of genetic control of meiosis. **Advances in Genetics**, New York, v. 26, p. 149-192, 1989.
- GORBSKY, G. L.; KALLIO, M.; DAUM, J. R.; TOPPER, L. M. Protein dynamics at the kinetochore: cell cycle regulation of the metaphase to anaphase transition. **FASEB Journal**, Bethesda, v. 13, suppl. 2, p. 231-234, 1999.
- GORBSKY, G. L. Kinetochores, microtubules and the metaphase checkpoint. **Trends in Cell Biology**, Oxford, v. 5, p. 143-148, 1995.
- GOTTSCHALK, W.; KAUL, M. L. H. The genetic control of microsporogenesis in higher plants. **The Nucleus**, Calcutta, v. 17, p. 133-166, 1974.
- HE, C.; TIRLAPUR, U.; CRESTI, M.; PEJA, M.; CRONE, D. G.; MASCARENHAS, J. P. An *Arabidopsis thaliana* mutant showing aberrations in male meiosis. **Sexual Plant Reproduction**, New York, v. 9, p. 54-57, 1996.
- HESLOP-HARRISON, J. Synchronous pollen mitosis and the formation of generative cell in massulate orchids. **Journal Cell Science**, Cambridge, v. 3, p. 457-466, 1968.
- HÜLSKAMP, M.; KOPCZAK, S. D.; HOREJSI, T. F.; KILH, B. K.; PRUIT, R. E. Identification of genes required for pollen-stigma recognition in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Journal**, Oxford, v. 8, p. 703-714, 1995.
- LANGER, A.; KOUL, A. K. Nucleolar cycle during megasporogenesis of *Lilium regale* Wils. **The Nucleus**, Calcutta, v. 28, p. 179-182, 1985.

LOIDL, J.; GREILHUBER, J. Structural changes of Ag-stained nucleolus organizing regions and nucleoli during meiosis in *Allium flavum*. **Canadian Journal of Genetics and Cytology**, Ottawa, v. 25, p. 524-529, 1983.

MASCARENHAS, J. P. The male gametophyte in flowering plants. **Plant Cell**, Rockville, v. 1, p. 657-664, 1989.

McCORMICK, S. Male gametophyte development. **Plant Cell**, Rockville, v. 5, p. 1265-1275, 1993.

MENDES-BONATO, A. B.; PAGLIARINI, M. S.; FORLI, F.; VALLE, C. B. do; PENTEADO, M. I. O. Chromosome number and microsporogenesis in *Brachiaria brizantha* (Gramineae). **Euphytica**, Wageningen, v. 125, p. 419-425, 2002.

NICKLAS, R. B. How cells get the right chromosomes. **Science**, Washington, v. 275, p. 632-637, 1997.

PAGE, A. W.; ORR-WEAVER, T. L. Stopping and starting the meiotic cell cycle. **Current Opinion in Genetics and Development**, London, v. 7, p. 23-31, 1997.

PAGLIARINI, M. S. Instabilidade meiótica em *Thunbergia mysorensis* (Acanthaceae). **Ciência e Cultura**, São Paulo, v. 42, p. 83-87, 1990.

PAGLIARINI, M. S. Meiotic behavior of economically important plant species: the relationship between fertility and male sterility. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 23, p. 997-1002, 2000.

PARK, S. K.; HOWDEN, R.; TWELL, D. The *Arabidopsis thaliana* gametophytic mutation *Gemini pollen1* disrupts microspore polarity, division asymmetry and pollen cell fate. **Development**, Cambridge, v. 125, p. 3789-3799, 1998.

SARI-GORLA, M.; GATTI, E.; VILLA, M.; P E, M. G. A multi-nucleate male-sterile mutant of maize with gametophytic expression. **Sexual Plant Reproduction**, New York, v. 10, p. 22-26, 1997.

SATO, S. Cytological evidence on the ability of the nucleolus of organizing regions to assemble pre-existing nucleolar material. **Experientiae**, Viçosa, v. 44, p. 264-266, 1988.

SCHEER, V.; BENAVENTE, R. Functional and dynamic aspects of the mammalian nucleolus. **BioEssays**, Cambridge, v. 12, p. 14-21, 1990.

SHAMINA, N.; DOROGAVA, N.; GONCHAROV, N.; ORLOVA, A.; TRUNOVA, S. Abnormalities of spindle and cytokine behavior leading to the formation of meiotic restitution nuclei in intergeneric cereal hybrids. **Cell Biology International**, London, v. 23, p. 863-870, 1999.

SLUDER, G.; McCOLLUM, D. The mad ways of meiosis. **Science**, Washington, v. 289, p. 254-255, 2000.

SOMMERVILLE, J. Nucleolar structure and ribosome biogenesis. **Trends in Biochemistry Science**, Amsterdam, v. 11, p. 438-442, 1986.

STAEHELIN, L. A.; HEPLER, K. Cytokinesis in higher plants. **Cell**, Cambridge, v. 84, p. 821-824, 1996.

TAI, W. Multipolar meiosis in diploid crested wheat-grass, *Agropyrum cristatum*. **American Journal of Botany**, Bronx, v. 57, p. 1160-1169, 1970.

TANAKA, I. Differentiation of generative and vegetative cells in angiosperm pollen. **Sexual Plant Reproduction**, New York, v. 10, p. 1-7, 1997.

TANAKA, I.; ONO, K.; FUKUDA, T. The developmental fate of angiosperm pollen is associated with a preferential decrease in the level of histone H1 in the vegetative nucleus. **Planta**, Berlin, v. 206, p. 561-569, 1998.

TAYLOR, P. E.; GLOVER, J. A.; LAVITHIS, M.; CRAIG, S.; SINGH, M. B.; KNOX, R. B.; DENNIS, E. S.; CHAUDHURY, A. M. Genetic control of male fertility in *Arabidopsis thaliana*: structural analyses of postmeiotic developmental mutants. **Planta**, Berlin, v. 205, p. 492-505, 1998.

TORRE, C. de la; GIMÉNEZ-MARTIN, G. The nucleolar cycle. In: JORDAN, G.; CULLIS, C. A. [Ed.]. **The nucleolus**. Cambridge: Cambridge University Press, 1982. p. 153-177.

TWELL, D.; PARKE, S. K.; LALANNE, E. Asymmetric division and cell-fate determination in developing pollen. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 3, p. 305-310, 1998.

YU, H. G.; HIATT, E. N.; DAWE, K. The plant kinetochore. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 5, p. 543-547, 2000.





**Embrapa**

---

*Gado de Corte*

Ministério da Agricultura,  
Pecuária e Abastecimento

Governo  
Federal

