



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
Colegiado do CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



**Ciências  
Biológicas**  
UEL

---

## **TRABALHO DE CONCLUSÃO DO CURSO DE GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**GUILHERME DE CARVALHO BORGES**

### **LOCALIZAÇÃO DE *KNOBS* EM DOIS ACESSOS DE MILHO ESPECIAIS**

---

Londrina – Paraná  
2025

**TRABALHO DE CONCLUSÃO DO CURSO DE GRADUAÇÃO  
EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**GUILHERME DE CARVALHO BORGES**

**LOCALIZAÇÃO DE *KNOBS* EM DOIS ACESSOS DE  
MILHO ESPECIAIS**

Monografia apresentada ao Curso de Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina como um dos requisitos à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

**Orientador: Prof. Dr. André Luís Laforga Vanzela**

**Londrina – Paraná  
2025**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Borges, Guilherme de Carvalho.

Localização de knobs em dois acessos de milho especiais / Guilherme de Carvalho Borges. - Londrina, 2025. 20 f.

Orientador: André Luís Laforga Vanzela.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Graduação em Ciências Biológicas, 2025. Inclui bibliografia.

1. Knobs em milho - TCC. 2. Heterocromatina - TCC. 3. DNA satélite - TCC. 4. Hibridização fluorescente in situ (FISH) - TCC. I. Vanzela, André Luís Laforga. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Graduação em Ciências Biológicas. III. Título.

CDU 575.1

## **BANCA EXAMINADORA**

Prof. Dr. André Luís Laforga Vanzela

Profa. Dra. Fernanda Simões de Almeida

Prof. Dr. Rogério Fernandes de Souza (suplente)

Londrina, 17 de fevereiro de 2025.

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais, Adenir Ferreira e Rejane Milhor, por todo o amor, carinho e apoio que me concederam todos esses anos, por sempre terem acreditado em mim e por dizerem o quanto eu os orgulho. Com vocês, eu consigo ver o quão longe eu sou capaz de alcançar.

Aos meus amigos mais próximos, Yasmim Galian, Felipe Raggi, Yasmin Namie Suzuki e Pedro Antônio Campos, por terem me acompanhado nessa jornada e terem me feito rir mesmo nos piores momentos.

Aos meus colegas de laboratório, especialmente Letícia Parteka, Rafael de Assis, Juliana da Silva e Thamirys Valentim, por todos os ensinamentos e bons momentos.

Ao meu orientador André Vanzela, que me concedeu a oportunidade de trabalhar com citogenética e bioinformática, áreas que me identifico profissionalmente, além de sempre buscar novas oportunidades para eu me tornar um profissional mais qualificado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação Araucária, instituições que financiaram o laboratório e concederam bolsas de pesquisa.

E à Universidade Estadual de Londrina, que tornou possível tudo acontecer.

BORGES, Guilherme de Carvalho. **Localização de *knobs* em dois acessos de milho especiais**. 2025. 20 fls. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2025.

## RESUMO

O milho (*Zea mays*) é um cereal amplamente utilizado na alimentação animal, incluindo a humana, e possui uma extensa produção no Brasil. Sendo assim, processos de melhoramento são implementados visando uma maior produtividade e resistência a doenças. Uma das técnicas utilizadas é a produção de milhos compostos, que consiste no cruzamento de diversos parentais visando fixar características de interesse. Uma das características mais relevantes ao cultivo é o tempo de florescimento, e estudos recentes associaram essa característica aos *knobs*, regiões de heterocromatina hipercondensadas constituídas por DNA satélite. Considerando isso, esse trabalho buscou analisar a distribuição de *knobs* em duas variedades especiais de milhos compostos por meio da hibridização fluorescente *in situ* (FISH). Obtivemos 11 e 16 sinais em cada variedade, havendo a presença de heteromorfismos e polimorfismos em relação a presença e tamanho dos sinais de hibridização. As principais diferenças foram a presença de um sinal adicional no braço curto de um dos cromossomos do par 3, no acesso ISPBR-192008, e o polimorfismo em relação a posição do sinal, no par 5. Considerando os diversos cruzamentos que ocorreram ao longo do desenvolvimento desses cultivares, podemos inferir que a geração de milhos compostos leva a um aumento na quantidade de heteromorfismos e polimorfismos.

**Palavras-chave:** FISH. DNAsat. Heterocromatina. Milho composto

BORGES, Guilherme de Carvalho. ***Knob* localization in two special maize accessions**. 2025. 20 pgs. Final Dissertation (Biological Sciences Undergraduation) – Londrina State University. Londrina. 2025.

## ABSTRACT

Maize (*Zea mays*) is a cereal widely used in animal alimentation, including human consumption, and it has a extensive production in Brazil. Therefore, breeding programs are implemented aiming at higher productivity and disease resistance. One of the techniques used is the production of composite maize, which involves breeding several parental lineages to fix traits of interest. One of the most relevant traits for cultivation is flowering time, and recent studies have associated this trait with *knobs*, regions of hypercondensed heterochromatin composed of satellite DNA. Therefore, this study aimed to analyze the distribution of *knobs* in two special varieties of composite maize through fluorescent in situ hybridization (FISH). We obtained 11 and 16 signals in each variety, with the presence of heteromorphisms and polymorphisms about the presence and size of the hybridization signals. The main differences were the presence of an additional signal on the short arm of one of the chromosomes of pair 3, in the ISPBR-192008 accession, and the polymorphism about the position of the signal on pair 5. Considering the various breedings that occurred during the development of these cultivars, we can infer that the producing of composite maize leads to an increase in the number of heteromorphisms and polymorphisms.

**Keywords:** FISH. DNAsat. Heterochromatin. Composite maize.

## SUMÁRIO

	Pág.
1. INTRODUÇÃO.....	8
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	10
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	14
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	15
5. CONCLUSÕES .....	19
REFERÊNCIAS .....	20

## 1. INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays*) é uma monocotiledônea da família Poaceae que se originou nas Terras Baixas do México há cerca de 8.700 anos. Devido ao processo de seleção natural e artificial, a espécie passou por diversas modificações adaptativas, principalmente em relação ao tamanho e quantidade de grãos nas espigas. Atualmente, é a espécie comercial com maior variabilidade genética (BRIEGER et al., 1958; PIPERINO et al., 2008), e um dos cereais mais cultivados no mundo. O milho é amplamente utilizado na alimentação humana, pecuária e indústria, como na produção de óleo e fármacos (GARCIA et al., 2006). O Brasil é o terceiro maior produtor de milho no mundo, e a produção ocorre geralmente em duas safras (ROCHA et al., 2019). Estudos que buscam informações relacionadas ao tempo de florescimento poderiam contribuir para o aumento do número de colheitas anuais, o que levaria à ampliação da produtividade.

O milho comercial, mesmo tendo uma produção intensiva em grandes monoculturas, é pouco utilizado diretamente na alimentação humana. Ao invés disso, os milhos comerciais são amplamente processados pela indústria alimentícia para a produção de fubá, farinha de milho e óleos. O maior uso está na alimentação de aves e suínos (CRUZ, 2008). De outro modo, as variedades especiais de milho são cultivadas majoritariamente em pequenas propriedades, abastecendo os mercados regionais e estando presentes nas mesas de muitos brasileiros. Dentre essas variedades, temos o milho-branco, utilizado na canjica, milho-doce e super doce, destinados a produção de conservas, e o milho-pipoca (ARCANJO et al., 2024). A agricultura familiar é a principal responsável pela segurança alimentar do país, embora enfrente uma difícil competição com o agronegócio, devido à falta de investimentos e

mão-de-obra (SOUZA FILHO et al., 2004). Por isso, pesquisas que visam o aumento da produtividade desse setor são estratégicas para fortalecer esses produtores.

Uma das características mais marcantes nos cariótipos das variedades de milho é a presença de *knobs*, que são regiões hipercondensadas ricas em DNA repetitivo. Esses *knobs* variam em tamanho e número nos genomas e entre indivíduos e estão sendo associados com a produtividade (BERTÃO, 1998; GUERRA, 2000). Essas regiões consistem em monômeros de 180 ou 350 pb (pares de bases) repetidos em *tandem* milhões de vezes (BUCKLER et al., 1999). JIAN et al. (2017) estabeleceu uma relação entre a abundância de *knobs* e o tempo de florescimento do milho juntamente com a variação de massa das sementes.

Estudos como esse só são possíveis graças aos avanços da citogenética, que nos permitiu analisar o cariótipo de diversas plantas e suas peculiaridades, principalmente aquelas de interesse comercial, como o milho. Mesmo tendo o número cromossômico padronizado ( $2n=20$ ), os cromossomos de *Z. mays* variam no tamanho, porção de heterocromatina, posição e tamanho dos *knobs* (REALINI et al., 2016). Além disso, há variações quanto aos tipos cromossômicos, considerando a disposição do centrômero (SADDER e WEBER, 2001; KATO et al., 2004)

Considerando essas informações, esse trabalho empregou o uso de técnicas de citogenética com o objetivo de caracterizar os cromossomos metafásicos de dois acessos de milho especial, ambos de florescimento precoce, utilizando a hibridização *in situ* com fluorescência (FISH), para analisar a disposição de *knobs* nesses genomas.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. CULTIVO DO MILHO

Embora haja divergências quanto à origem exata do milho, sabe-se hoje que essa espécie se originou a partir de uma gramínea chamada teosinto (RANUM et al., 2014). O cultivo e a domesticação dessa espécie data de 7.000 a 10.000 anos atrás na Mesoamérica, especificamente nas Terras Baixas do México. Com o manejo dos nativos da região, o milho se dispersou pelo continente americano, dando origem a variedades adaptadas a diferentes climas (ARCANJO et al., 2024). Atualmente, há diversas variedades de tipos de grão e sabores. Um dos principais fatores para a sua ampla utilização na alimentação animal, incluindo a humana, é o alto valor energético, uma vez que mais de 70% do conteúdo é de carboidratos, possuindo 365kcal em apenas 100g (NUSS e TANUMIHARDJO, 2010).

No Brasil, a produção de milho ocorre em duas safras (ROCHA et al., 2019; CRUZ, 2008). Nas safras de 2023/24, foram utilizados mais de 21.000 ha para o plantio, tendo uma produção total de 115,7 mil toneladas. Já, para a safra de 2024/25, a CONAB estima que a produção total será de 119,6 mil toneladas, tendo um aumento de 3,3% em relação ao ano anterior (CONAB, 2025). O aumento se dará provavelmente pela ampliação da área da segunda safra em conjunto com a recuperação de produtividade. Sendo assim, estudos que visam diminuir o tempo de florescimento do milho poderiam contribuir para o aumento da produtividade, ou ainda, gerar a possibilidade da inclusão de mais safras ao longo do ano.

O milho possui uma grande importância econômica, não apenas no setor alimentício, como também no industrial para a produção de biocombustível. Devido a relevância, programas de melhoramento são implementados visando o aumento da

produtividade (ORDAS et al., 2012; RAMOS GUIMARAES et al., 2021). Dessa forma, há seleções interpopulacionais e intrapopulacionais que visam fixar alelos de efeitos aditivos, assim criando híbridos com características de interesse. Uma das estratégias utilizadas é a concentração de caracteres em só uma cultivar por meio do cruzamento de diversos parentais, que dá origem aos milhos compostos (BOREM et al., 2013). Essa prática ajuda a ressaltar resistência a doenças, por exemplo (KOLAWOLE et al., 2018).

## 2.2. CITOGENÉTICA DO MILHO

As técnicas de citogenética nos permitem caracterizar morfológicamente o cariótipo dos indivíduos, para que assim seja possível comparar espécies e populações, a fim de analisar as divergências no número, forma e tamanho dos cromossomos (GUERRA, 1988). Com a técnica de esmagamento, o cariótipo do milho pôde ser analisado e caracterizado quanto a presença de marcas citológicas e tamanho dos braços curto e longo dos cromossomos (CHEN, 1969). O cariótipo do milho é de  $2n=2x=20$  e varia principalmente na porcentagem e distribuição de heterocromatina e tamanho dos cromossomos (REALINI et al., 2016). A heterocromatina, região onde o DNA se encontra condensado, é rica em sequências repetitivas. Essa fração do genoma gera importantes marcas citológicas que possibilitam diferenciar a estrutura dos cromossomos (DECICO, 1991).

Uma das técnicas que foi importante para determinar marcas citológicas do milho foi o bandeamento C. Esta consiste no tratamento do material com reagentes para que haja a remoção parcial de proteínas e DNA eucromático, que se torna menos evidente (HOLMQUIST, 1979). Assim, foi possível determinar diversas marcas citológicas no milho, chamadas de bandas, como os *knobs*, bem como a presença de polimorfismos, já que as bandas podem divergir entre indivíduos (BERTÃO, 1998;

GUERRA, 2000). Também para identificar bandas e *knobs*, a técnica de bandeamento CMA/DAPI já foi muito utilizada. Por meio de uma dupla coloração com fluorocromo base-específicos é possível identificar regiões heterocromáticas com sequências ricas em guanina e citosina (coradas com cromomicina A3 ou CMA) ou então ricas em adenina e timina quando coradas com 4', 6-diamino-2-fenilindol (DAPI).

Essas técnicas mostraram que o maior número de bandas e *knobs* está associado a diferenças na altitude e latitude. POGGIO et al. (1998) mostrou que algumas populações de milho que viviam em altitudes acima de 2.000 metros apresentaram menos bandas quando comparados com populações que cresceram em baixas altitudes. Essa alteração poderia estar associada ao período vegetativo dessas plantas, como sugere TITO et al. (1991). Devido a importância comercial do milho, essa espécie foi extensamente utilizada em estudos e experimentos.

Os *knobs* foram avistados pela primeira vez por Barbara McClintock, em 1929, que os observou como estruturas coradas de forma mais intensa nos cromossomos (LONGLEY, 1941; MCCLINTOCK, 1929). Os *knobs* são constituídos por DNA satélite (DNAsat), possuindo uma sequência de 180pb repetidas em *tandem*. Assim, essas sequências estão hiper condensadas, formando blocos nos cromossomos. No entanto, regiões hiper condensadas também podem ser compostas pelo satélite TR-1, de 350pb, ou, ainda, por ambos (ANANIEV et al., 1998).

Os *knobs* podem variar de tamanho e posição entre os cromossomos e entre diferentes variedades de milho (DENNIS e PEACOCK, 1984; ANANIEV et al., 1998). Normalmente, essas estruturas se localizam distante do centrômero, estando entre as regiões intersticiais e terminais (STACK et al., 2017). Os centrômeros, por sua vez, também são formados por sequências repetitivas em *tandem*. Os centrômeros de

milho possuem entre 1 e 2 Mpb ricas em regiões CentC (*Centromere Repeat C*), monômeros de 156 pb (SCHNEIDER et al., 2016; ZHOU et al., 2022).

Regiões repetitivas têm sido associadas ao tempo de floração do milho. JIAN et al. (2017) mostraram que variedades com genomas menores e abundância de *knobs* possuem um menor tempo de florescimento. Além disso, CARVALHO et al. (2022) sugeriram que essa característica poderia estar associada à presença de um *knob* no cromossomo 9.

### 2.3. MAPEAMENTO CROMOSSÔMICO POR FISH

Embora técnicas de citogenética convencional cubram a análise de morfologia dos cromossomos, quando o interesse são sequências específicas, a hibridização fluorescente *in situ* (FISH) ganha mais destaque. Essa técnica consiste na desnaturação e renaturação da fita de DNA com sondas marcadas por fluorocromos, o que permite a localização das sequências equivalentes às sondas tanto nos núcleos interfásicos como nos cromossomos metafásicos (JIANG e GILL, 2006). Alguns dos usos da FISH incluem a identificação dos níveis de ploidia (ZHANG et al., 2016), análises filogenéticas (ZHOU et al., 2020) e a identificação cromossômica (CUI et al., 2022; WIDARMI et al., 2020).

Em milho, as principais sondas utilizadas são *knob*, TR-1, CentC e DNA ribossômico 5S. REALINI et al. (2018) utilizou as sondas de *knob* e TR-1 para entender a diversidade intra e interpopulacional de milhos crioulos. Já foi observado que a sequência de 180 pb do *knob* é restrita a essa porção de heterocromatina (DENNIS E PEACOCK, 1984). Foi relatada a possível relação entre a redução no tempo de florescimento associado ao acúmulo de *knob* no braço curto do cromossomo 9 (CARVALHO et al., 2022). Adicionalmente, foi observado que essas sequências se

relacionam com a altitude dos cultivares, uma vez que um estudo mostrou populações de regiões elevadas apresentando mais sequências TR-1 e menos *knobs* (FOURASTIÉ et al., 2018). Já o uso da região CentC como sonda, para localização de regiões centroméricas, mostraram diferenças nos sinais de hibridização. Esse polimorfismo se deve a diferenças na quantidade de monômeros entre as sequências (KATO et al., 2004).

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. MATERIAL BIOLÓGICO**

Os acessos das variedades de milho fazem parte do Banco de Germoplasma do Laboratório de Melhoramento Genético (LMG), do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina. Neste projeto, foram selecionados dois destes acessos. A Variedade 1 (V1) é o acesso ISPBR-192008, um milho branco de floração precoce, e a Variedade 2 (V2) é o acesso ISPBR-192005, também branco e de floração precoce.

#### **3.2. OBTENÇÃO DAS METÁFASES DE MILHO**

Foram coletados meristemas das raízes dos milhos, que foram tratados com 8HQ (8-hidroxiquinoleína 2mM), fixados em etanol e ácido acético (3:1) e armazenados a -20°C. Para a obtenção dos cromossomos, as amostras foram digeridas em uma solução contendo enzimas celulase e pectinase (2:20) e preparadas em lâminas por esmagamento em ácido acético 60%. Em seguida, o material foi utilizado na FISH.

### 3.3. MAPEAMENTO DOS *KNOBS* NOS CROMOSSOMOS

A sonda do *knob* de 180 pb (K180, com 93 pb) foi marcada com o fluorocromo 6-FAM (Fluoresceína) na extremidade 5', enquanto a da região CentC (78 pb) foi marcada com TAMRA. Ambas foram compradas pela *Exxtend Company* (<https://www.exxtend.com.br>) e hibridizadas em lâminas contendo núcleos metafásicos, posteriormente coradas com DAPI.

As reações de hibridização foram feitas utilizando uma mistura de 34  $\mu$ L contendo formamida a 100% (15  $\mu$ L), polietileno glicol a 50% (6  $\mu$ L), 20 $\times$  SSC (3  $\mu$ L), 100 ng de DNA de bloqueio (1  $\mu$ L), SDS a 10% (1  $\mu$ L), e 200 ng de sonda (4  $\mu$ L). Os cromossomos passaram por desnaturação a 90°C por 10 minutos em um termociclador, e a hibridização realizada a 37°C em uma câmara úmida por 24 horas.

Lavagens pós-hibridização foram feitas em tampão SSC (citrato de sódio salino) com estringência de 70%. Foi utilizado 2 $\times$ SSC e 4 $\times$  SSC/0.2% Tween 20 à 42°C e temperatura ambiente.

As lâminas foram contracoradas com 17  $\mu$ L de DAPI (comprimento de onda cor azul) a 2  $\mu$ g/mL<sup>-1</sup> por 30 min, e montadas com 20  $\mu$ L de DABCO, composto por glicerol (90%), 1,4-diazabicyclo (2,2,2)-octano (2.3%), 20 mM TrisHCl, pH 8.0 (2%), 2,5 mM MgCl<sub>2</sub> (4%) e água ultrapura (1,7%).

Imagens das metáfases foram capturadas no microscópio de epifluorescência Leica DM 4500 B, acoplado com uma câmera DFC300FX. Imagens de fluorescência em azul e verde foram editadas no programa Adobe Photoshop CS5 v12 para brilho e contraste.

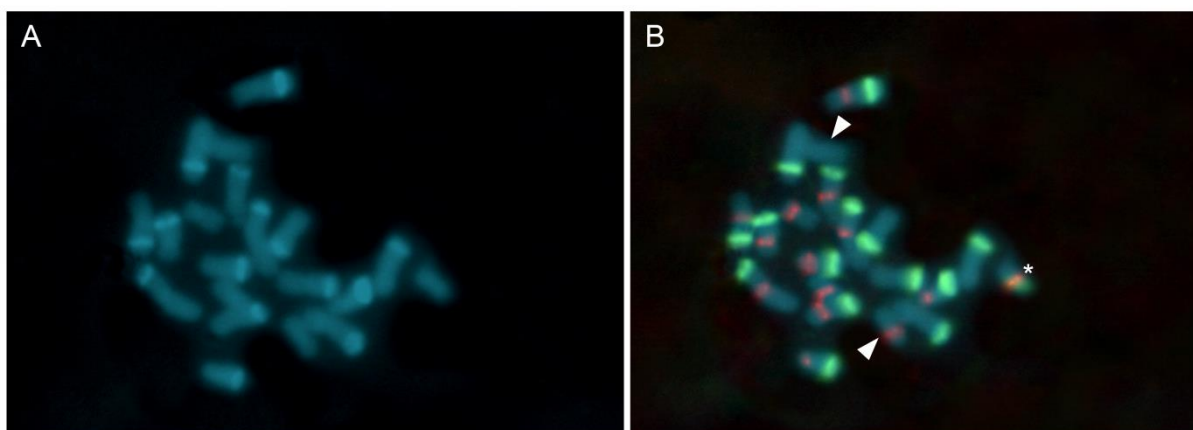
#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi realizado o mapeamento cromossômico com o uso das sondas de CentC apenas em V1, devido à ausência das sondas no momento em que as lâminas foram feitas. As sondas de *knob* foram utilizadas em ambas as variedades, sendo possível ter uma análise comparativa entre os dois acessos. Observamos a presença de polimorfismos entre os acessos e heteromorfismos nos pares cromossômicos.

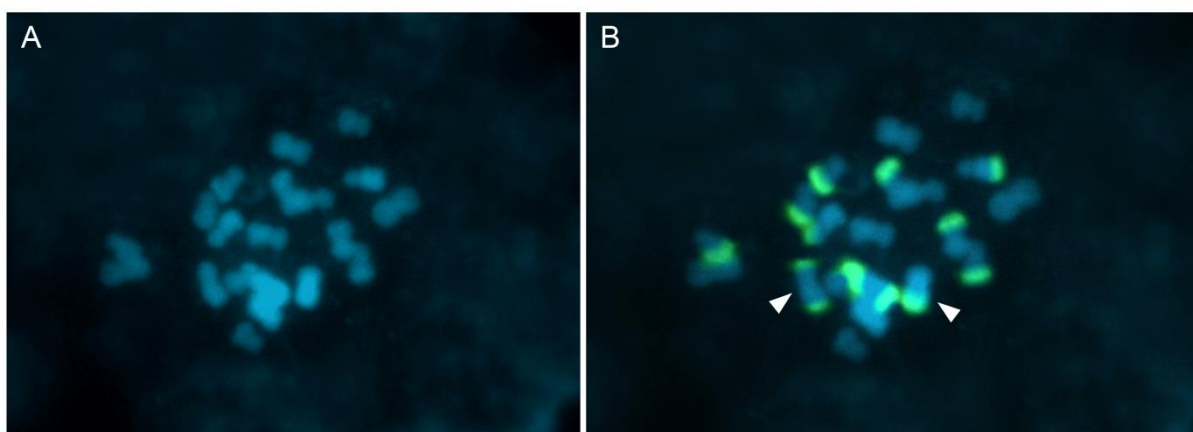
A FISH com a sonda de *knob*, utilizada nos dois acessos mostrou 16 e 11 blocos nas variedades 1 e 2, respectivamente. Na V1, não houve heteromorfismos quanto à presença de sinais. Nesse acesso, apenas os pares 9 e 10 não mostraram sinais de *knob*. Nos pares 1 e 5, os sinais foram localizados nos braços curtos, enquanto nos outros cromossomos os sinais de FISH foram observados nos braços longos.

Em relação à intensidade dos sinais de hibridização na V1, esses foram observados como sinais menos acentuados em um dos cromossomos dos pares 1, 5 e 6. Por fim, algo incomum observado neste acesso foi a sobreposição dos sinais de CentC e *knob* em um dos cromossomos do par 5 (Figuras 1 e 3), caracterizando um heteromorfismo.

Já, na V2, houve heteromorfismo no par cromossômico 3, o qual um deles apresentou dois sinais, um em cada braço, enquanto o outro apresentou um único sinal apenas na parte distal do braço longo. Nos pares 1, 2, 8, 9 e 10 não houve sinais, e nos outros cromossomos, esses foram localizados na porção distal do braço longo. Diferenças nas intensidades dos sinais também foram observadas. No par cromossômico 6, os sinais de FISH apareceram menos evidentes, bem como no cromossomo do par 3, com dois sinais (Figuras 2 e 3).

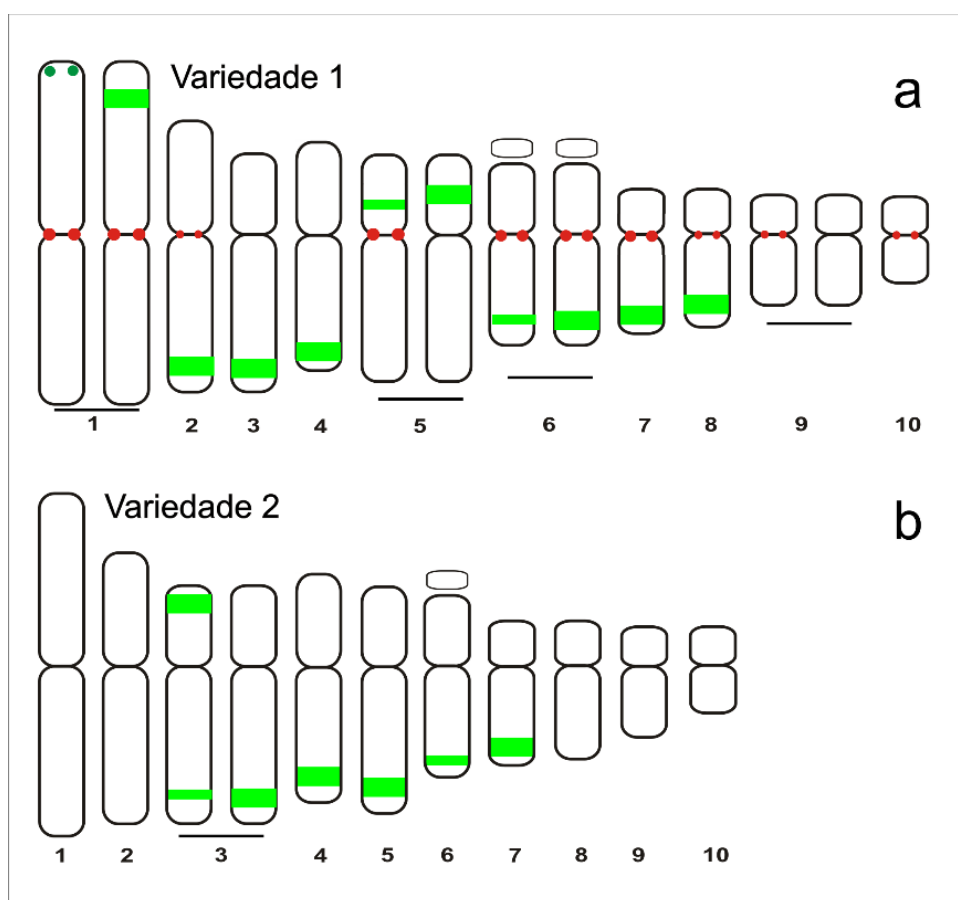


**Figura 1.** FISH de metáfases do acesso ISPBR-192008 (Variedade 1). A) Metáfase corada com DAPI. B) Metáfase corada com DAPI com as sondas para *knob* CentC, as setas indicam o heteromorfismo do par cromossômico 9 e o asterisco indica a colocalização das sondas no cromossomo 5.



**Figura 2.** FISH de metáfases do acesso ISPBR-192005 (Variedade 2). A) Metáfase corada com DAPI. B) Metáfase corada com DAPI com as sondas para *knob* e setas indicando o heteromorfismo do par cromossômico 3.

Em relação à sonda CentC específica para a região centromérica, foi possível observar 13 blocos dessa sequência na FISH realizada com a variedade 1. A FISH também mostrou que nos pares 2 e 8, a intensidade dos sinais foi consideravelmente menor em relação aos outros pares. Heteromorfismos também foram encontrados nos pares 5 e 9, em relação a presença dos sinais. Além disso, nenhum dos cromossomos dos pares 3 e 4 apresentaram sinais de FISH com essa sonda nessa variedade (Figuras 1 e 3).



**Figura 3.** Idiogramas ilustrando os sítios de localização de sequências de *knob* (verde) e CentC (vermelho) nas variedades 1 e 2. a) Acesso ISPBR-192008. b) Acesso ISPBR-192005

Nossos dados mostram que variedades de milhos compostos passaram por rearranjos cromossômicos, como por exemplo por inversões, ampliações ou deleções, envolvendo trechos com DNA repetitivos. Dados similares foram apresentados por REALINI et al (2018), os quais mostraram polimorfismos e heteromorfismos relacionados à rearranjos em variedades de milhos crioulos da Argentina. MONDIN et al. (2014) também relatou essas mesmas características em linhagens endogâmicas de milho. SILVA et al. (2020), ao analisar diferentes acessos de milho, encontrou resultados similares, tendo observado heterozigose nos pares 1 e 5 na linhagem “AL Bandeirante”, por exemplo.

Muitos sinais de hibridização obtidos em nosso estudo indicam que há diferenças de tamanho em ambas as sondas, sejam entre acessos ou no mesmo

par cromossômico. KATO et al. (2004) reportaram que essas variações se dão por diferenças no número de cópias dos monômeros das regiões de DNAsat, o que também caracteriza essa diversidade. DA SILVA (2024) também estudou linhagens de milhos especiais e encontrou variações similares quanto à presença, posição e tamanho dos sinais de *knob*.

Os milhos compostos são gerados a partir do cruzamento de diversos parentais com o objetivo de gerar novas variedades, aumentar a produtividade e conferir resistência a doenças (BOREM et al., 2013; KOLAWOLE et al., 2018). Os acessos utilizados nesse estudo e no trabalho de DA SILVA (2024) são exemplos dessas cultivares, e os múltiplos cruzamentos que geraram essas linhagens poderiam explicar os polimorfismos e heteromorfismos observados, tanto para os sinais de k-180 quanto para os de CentC.

## 5. CONCLUSÕES

Os dois acessos de milho apresentaram tanto polimorfismos quanto heteromorfismos em relação à presença, posição e tamanho dos sinais de *knob*, mais evidentes no par cromossômico 5, assim como a heterozigose de um sinal adicional no par 3 da Variedade 2. As sondas de CentC utilizadas na Variedade 1 mostraram variação no tamanho dos sinais, que se dão provavelmente pelas diferenças nas quantidades de monômeros na região dos centrômeros. Considerando que todas as diferenças observadas nesses dois compostos provavelmente estão presentes nos acessos parentais, podemos inferir que o cruzamento de diferentes linhagens para a geração de milhos compostos pode levar a um aumento na quantidade de polimorfismos e heteromorfismos na população segregante.

## REFERÊNCIAS

- 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 megatransposons?. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 18, p. 10785-10790, 1998.
- ALBERT, P. S. et al. Diversity of chromosomal karyotypes in maize and its relatives. *Cytogenetic and genome research*, v. 129, n. 1-3, p. 6-16, 2010.
- ARCANJO, Angelo Herbet Moreira et al. CULTIVARES E CARACTERÍSTICAS DO GRÃO DE MILHO. **LUMEN ET VIRTUS**, v. 15, n. 43, p. 9131-9147, 2024.
- BERTÃO, Mônica Rosa. Caracterização citogenética de linhagens de milho (*Zea mays* L.) através de bandeamento cromossômico e hibridação molecular in situ. 1998. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
- BORÉM, Aluizio; MIRANDA, G. V.; FRITSCHÉ-NETO, R. Melhoramento de plantas 6. ed. **Viçosa: Editora UFV**, 2013.
- BRIEGER, Friedrich Gustav et al. Races of maize in Brazil and other eastern South American countries. 1958.
- BUCKLER IV, Edward S. et al. Meiotic drive of chromosomal knobs reshaped the maize genome. *Genetics*, v. 153, n. 1, p. 415-426, 1999.
- CARVALHO, R. F. et al. A heterochromatic knob reducing the flowering time in maize. *Frontiers in Genetics*, v. 12, p. 799681, 2022.
- CHEN, Chi-Chang. The somatic chromosomes of maize. *Canadian Journal of Genetics and Cytology*, v. 11, n. 3, p. 752-754, 1969.
- CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos, Brasília, DF, v. 12, safra 2024/25, n. 4 quarto levantamento, janeiro 2025.
- CRUZ, José Carlos. A cultura do milho. 2008.
- CRUZ, J. C.; FILHO, I. A. P.; DUARTE, A. P. Milho Safrinha. : Brasília: EMBRAPA. 2021. Disponível em: <https://www.embrapa.br/agencia-de-informacao-tecnologica/cultivos/milho/producao/sistemas-diferenciais-de-cultivo/milho-safrinha> Acesso em: 23 mar. 2023.
- CUI, L. et al. Karyotype analysis, genomic and fluorescence in situ hybridization (GISH and FISH) reveal the ploidy and parental origin of chromosomes in *Paeonia itoh* hybrids. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 23, n. 19, p. 11406, 2022.

DA SILVA, JULIANA MACHADO. Relação entre abundância e localização de DNAs repetitivos e o tempo de florescimento em milho. 2024. 72 p. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para a obtenção do título de Mestre, Londrina.

DECICO, Maria Juliana Usberti. Análise da segregação de knobs em progênies F2 e de retrocruzamento derivadas de uma variedade de milho. 1991. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo

DENNIS, E. S.; PEACOCK, W. J. Knob heterochromatin homology in maize and its relatives. *Journal of molecular evolution*, v. 20, p. 341-350, 1984.

FOURASTIÉ, M. F. et al. Are cytological parameters of maize landraces (*Zea mays* ssp. *mays*) adapted along an altitudinal cline?. *Journal of plant research*, v. 131, p. 285-296, 2018.

GARCIA, João Carlos et al. Aspectos econômicos da produção e utilização do milho. 2006.

GUERRA, M. dos S. Introdução à citogenética geral. Guanabara Koogan, 1988.

GUERRA, Marcelo. Patterns of heterochromatin distribution in plant chromosomes. *Genetics and molecular biology*, v. 23, p. 1029-1041, 2000.

HOLMQUIST, Gerald. The mechanism of C-banding: depurination and  $\beta$ -elimination. *Chromosoma*, v. 72, n. 2, p. 203-224, 1979.

JIAN, Yinqiao et al. Maize (*Zea mays* L.) genome size indicated by 180-bp knob abundance is associated with flowering time. *Scientific Reports*, v. 7, n. 1, p. 1-9, 2017.

JIANG, J.; GILL, B. S. Current status and the future of fluorescence in situ hybridization (FISH) in plant genome research. *Genome*, v. 49, n. 9, p. 1057-1068, 2006.

KATO, Akio; LAMB, Jonathan C.; BIRCHLER, James A. Chromosome painting using repetitive DNA sequences as probes for somatic chromosome identification in maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 101, n. 37, p. 13554-13559, 2004.

KOLAWOLE, Adesike O. et al. Genetic advance in grain yield and other traits in two tropical maize composites developed via reciprocal recurrent selection. **Crop Science**, v. 58, n. 6, p. 2360-2369, 2018.

LONGLEY, A. E. Chromosome morphology in maize and its relatives. *Botanical Review*, v. 7, n. 5, p. 263-289, 1941.

MCCLINTOCK, Barbara. Chromosome morphology in *Zea mays*. **Science**, v. 69, n. 1798, p. 629-629, 1929.

MONDIN, Mateus et al. Karyotype variability in tropical maize sister inbred lines and hybrids compared with KYS standard line. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, p. 544, 2014.

NUSS, Emily T.; TANUMIHARDJO, Sherry A. Maize: a paramount staple crop in the context of global nutrition. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, v. 9, n. 4, p. 417-436, 2010.

ORDÁS LÓPEZ, Bernardo et al. Comparison of two methods of reciprocal recurrent selection in maize (*Zea mays* L.). 2012.

PIPERNO, Dolores R. et al. Starch grain and phytolith evidence for early ninth millennium BP maize from the Central Balsas River Valley, Mexico. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 106, n. 13, p. 5019-5024, 2009.

POGGIO, Lidia et al. Genome size and environmental correlations in maize (*Zea mays* ssp. *mays*, Poaceae). *Annals of Botany*, v. 82, p. 107-115, 1998.

RAMOS GUIMARÃES, Henrique Paulo et al. Index selection can improve the selection efficiency in a rice recurrent selection population. **Euphytica**, v. 217, n. 5, 2021.

RANUM, Peter; PEÑA-ROSAS, Juan Pablo; GARCIA-CASAL, Maria Nieves. Global maize production, utilization, and consumption. *Annals of the new York academy of sciences*, v. 1312, n. 1, p. 105-112, 2014.

REALINI, María Florencia et al. Intra-specific variation in genome size in maize: cytological and phenotypic correlates. *AoB Plants*, v. 8, 2016.

REALINI, M. F. et al. Exploring karyotype diversity of Argentinian Guaraní maize landraces: relationship among South American maize. *PLoS One*, v. 13, n. 6, p. e0198398, 2018.

ROCHA, Leilaine et al. Análise econômica de soja e milho safrinha em sucessão de Culturas. *Enciclopédia Biosfera*, v. 16, n. 29, 2019.

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

SCHNEIDER, Kevin L. et al. Inbreeding drives maize centromere evolution. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 113, n. 8, p. E987-E996, 2016.

SILVA, Jéssica Coutinho et al. Repetitive sequences and structural chromosome alterations promote intraspecific variations in *Zea mays* L. karyotype. **Scientific reports**, v. 10, n. 1, p. 8866, 2020.

SOUZA FILHO, Hildo M. et al. Agricultura Familiar e Tecnologia no Brasil: características, desafios e obstáculos. In: Anais do 42º Congresso da Sociedade Brasileira de Economia, Sociologia e Administração Rural. Brasília: Sober, 2004.

STACK, Stephen M. et al. Meiotic crossing over in maize knob heterochromatin. *Genetics*, v. 205, n. 3, p. 1101-1112, 2017.

TITO, C. M.; POGGIO, L.; NARANJO, C. A. Cytogenetic studies in the genus *Zea*: 3. DNA content and heterochromatin in species and hybrids. *Theoretical and Applied Genetics*, v. 83, p. 58-64, 1991.

WIDARMI, W. D. et al. Characterization of lettuce chromosomes based on condensation patterns and physical mapping of 45S and 5S rDNAs using fluorescence in situ hybridization. *Cytologia*, v. 85, n. 1, p. 49-55, 2020.

ZHANG, L. et al. Identification of peanut (*Arachis hypogaea*) chromosomes using a fluorescence in situ hybridization system reveals multiple hybridization events during tetraploid peanut formation. *New Phytologist*, v. 211, n. 4, p. 1424-1439, 2016.

ZHOU, Jingwei et al. Centromeres: From chromosome biology to biotechnology applications and synthetic genomes in plants. **Plant Biotechnology Journal**, v. 20, n. 11, p. 2051-2063, 2022.