

ANÁLISE GENÉTICA DA SEGREGAÇÃO DE PLANTAS PARCIALMENTE FÉRTEIS EM CITOPLASMA MACHO-ESTÉRIL TIPO C, EM MILHO (*Zea mays L.*)^{1/}

Isabel Regina Prazeres de Souza^{2/}
Luiz Sérgio Saraiva^{3/}

1. INTRODUÇÃO

Com os severos danos provocados pelo fungo *Bipolaris maydis*, raça T, em plantações de milho com citoplasma macho-estéril tipo T, no início da década de 70 (2, 3, 4, 5), o citoplasma macho-estéril tipo C tornou-se o mais promissor para substituí-lo na produção de milho híbrido, visto apresentar maior estabilidade ante as variações do meio ambiente do que o tipo S (5,7). Diversos trabalhos sobre a herança da restauração da fertilidade do citoplasma macho-estéril tipo C apresentaram conclusões contraditórias (7, 8, 9, 10), e os mais recentes (11, 12) indicaram o envolvimento de três genes independentes.

Nos cruzamentos ou nas autofecundações de híbridos com citoplasma C surgiu, freqüentemente, plantas que apresentam pendões parcialmente férteis, com graus de expressão variável (6, 11, 12). Essas plantas, que aparecem em baixas freqüências, têm sido simplesmente desconsideradas ou agrupadas às plantas macho-férteis na análise da segregação destinada a determinar a herança da restauração da fertilidade.

Tendo em vista que as plantas em que a restauração da fertilidade masculina é apenas parcial não têm sido submetidas a análise genética minuciosa, procedeu-se ao estudo da segregação oriunda dessas plantas parcialmente férteis, visando

^{1/} Parte da tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, pelo primeiro autor, como um dos requisitos para a obtenção do grau de Magister Scientiae.

Aceito para publicação em 1.º-11-1988.

^{2/} EMBRAPA/CNPAI, C.P. 341. 64200 Parnaíba, PI.

^{3/} Departamento de Biologia Geral da UFV. 36570 Viçosa, MG. Bolsista do CNPq.

fornecer informações adicionais para o entendimento do mecanismo de restauração da fertilidade do citoplasma macho-estéril tipo C.

2. MATERIAL E MÉTODOS

As linhagens macho-férteis (MF) da Universidade Federal de Viçosa (U.F.V.), identificadas como 7, 870 e 964, foram cruzadas com a linhagem 264 macho-estéril com citoplasma C (ME-C), também da U.F.V. Os híbridos simples parcialmente férteis (PF) assim obtidos foram autofecundados, para a obtenção da geração F₂. Foi também efetuado o primeiro retrocruzamento (RC1) entre o híbrido PF (264 ME-C X 964 MF) e a linhagem 264 ME-C. Todos os cruzamentos foram realizados manualmente, de acordo com o procedimento-padrão de cruzamentos controlados, tomando cuidado para evitar contaminação nas polinizações. Esses cruzamentos controlados, para a obtenção da geração F₂ e RC1, foram realizados por MIRANDA (11), na U.F.V.

O número de fileiras que constituíram as parcelas das gerações F₂ e do RC1 foi variável, dependendo do número de sementes provenientes de cada espiga. As plantas resultantes foram submetidas à avaliação do grau de fertilidade dos pendões, de acordo com a escala elaborada por BECKETT (1), com algumas modificações:

a) macho-estéril (ME): anteras, protraídas ou não, que continham somente grãos de pólen abortados;

b) parcialmente fértil (PF): anteras parcialmente férteis protraídas, com pouca liberação de pólen. Essa classe foi subdividida em PF₁, PF₂ e PF₃, por ser a proporção de anteras protraídas altamente variável; PF₁, aproximadamente, até 5% de anteras com liberação de pólen; PF₂, acima de 5 até 20%; e PF₃, acima de 20% e, aproximadamente, até 70% de anteras com liberação de pólen;

c) macho-fértil (MF): anteras totalmente normais, apresentando, às vezes, simultaneamente, freqüência baixa de anteras ligeiramente subnormais.

A avaliação dos pendões foi efetuada diariamente, por todo o período de florescimento. Os pendões MF foram cortados das plantas assim que se apresentaram como tal, e as plantas despwendoadas foram contadas no final do período de avaliação. Foi adotado esse procedimento por ser mais eficiente para evitar a inclusão de plantas MF no grupo das PF no final do florescimento, quando grande número de anteras já se havia desprendido das espiguetas.

As proporções esperadas para as gerações F₂ e RC1 foram testadas pelo método do qui-quadrado ajustado, segundo as recomendações de Yates, citado por STRICKBERGER (14).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No Quadro 1 encontram-se os dados referentes à segregação da geração F₂, resultante da autofecundação de híbridos PF₃ das linhagens 264 ME-C e 964 MF. Todas as famílias produziram as cinco classes fenotípicas, o que também foi observado na autofecundação de híbridos MF das mesmas linhagens por SOUZA e SARAIVA (13). As classes MF e ME foram as mais freqüentes, com porcentagens aproximadamente iguais, variando de 39,29% a 50,00% e de 36,76% a 50,00%, respectivamente. As classes PF foram as menos freqüentes, tendendo a PF₂ a apresentar a mais baixa freqüência, variando apenas de 0,81% a 2,35%. O agrupamento das classes PF₁, PF₂ e PF₃ em uma única classe, PF, com freqüência de 6,07% a

QUADRO 1 - Número e porcentagem de plantas na segregação da geração F₂, resultante da autofecundação dos híbridos PF₃ das linhagens 264ME-C e 964MF

Família	Classes fenotípicas				Total plantas PF
	MF	PF ₁	PF ₂	PF ₃	
1 (Nº)	74	14	4	2	76
(%)	43,53	8,24	2,35	1,18	44,70
2 (Nº)	47	6	2	2	46
(%)	45,63	5,83	1,94	1,94	44,66
3 (Nº)	68	8	3	7	50
(%)	50,00	5,88	2,21	5,15	36,76
4 (Nº)	55	3	3	9	70
(%)	39,29	2,14	2,14	6,43	50,00
5 (Nº)	113	4	2	9	119
(%)	45,75	1,62	0,81	3,64	48,18
					6,07

13,24%, apresentou variação semelhante à de 4,18% a 15,19%, na autofecundação do híbrido MF (13). Foi surpreendente o fato de o híbrido PF₃ autofecundado ter produzido apenas 3,67%, média das famílias, de plantas também PF₃ na geração F₂.

Para testar, estatisticamente, as hipóteses genéticas formuladas, as plantas PF, por liberarem anteras viáveis em diferentes percentagens e, quando autofecundadas, segregarem em MF, PF e ME, foram analisadas juntamente com as MF.

Pelo Quadro 2, observa-se que a razão de 36 (MF + PF): 28 ME foi a que melhor se ajustou a todas as famílias segregantes da geração F₂, oriunda da autofecundação de híbridos PF₃. A probabilidade de erro, na rejeição dessa razão, é de 30% a 50% e, na rejeição da hipótese de homogeneidade, de 20% a 30%. Essa razão, 36 (MF + PF): 28 ME, foi também apresentada por quatro entre treze famílias segregantes da geração F₂, oriunda da autofecundação de híbridos MF, resultantes do cruzamento das mesmas linhagens, 264 ME-C e 964 MF (13). O RC₁ do híbrido PF₃ da linhagem 264 ME-C produziu, na segregação, a razão de 1 (MF + PF): 1 ME (Quadro 3). A mesma razão de segregação foi observada por SOUZA e SARAIVA (13) no RC₁ do híbrido MF.

Os resultados obtidos na segregação da geração F₂ e do RC₁ de plantas PF₃ indicam o envolvimento de três genes independentes (Rf₄/rf₄, Rf₅/rf₅ e Rf₆/rf₆) na restauração parcial da fertilidade. A mesma conclusão foi obtida por SOUZA e SARAIVA (13), analisando a segregação oriunda do híbrido com restauração total da fertilidade. Os referidos pesquisadores apresentam a hipótese de que a restauração da fertilidade do citoplasma tipo C resulta de interação gênica, com genes complementares e duplicados, o gene dominante Rf₄ complementando-se com os genes dominantes duplicados Rf₅ e, ou, Rf₆. Na ausência do dominante Rf₄ (rf₄rf₄), não há restauração da fertilidade, mesmo na presença dos duplicados dominantes Rf₅ e Rf₆, uma vez que não há complementação necessária para que se expresse a restauração.

O Quadro 4 apresenta a segregação da geração F₂, resultante da autofecundação de híbridos PF₁, PF₂ e PF₃ das linhagens 264 ME-C e 870 MF. Para as famílias PF₁, ajustaram-se as diferentes razões de segregação: 20 (MF + PF): 44 ME, 27 (MF + PF): 37 ME e 32 (MF + PF): 32 ME, e, para as duas famílias de híbridos PF₂, as razões de 20 (MF + PF): 44 ME e 32 (MF + PF): 32 ME. Observa-se que tanto para o híbrido PF₁ quanto para o PF₂ ocorreram as razões de 20 (MF + PF): 44 ME e 32 (MF + PF): 32 ME, evidenciando, consequentemente, semelhança de comportamento na segregação de híbridos PF₁ e PF₂. O híbrido PF₃ comportou-se diferentemente dos híbridos PF₁ e PF₂, apresentando as razões de segregação de 38 (MF + PF): 26 ME, 39 (MF + PF): 25 ME e 41 (MF + PF): 23 ME, predominando a frequência de plantas MF + PF na geração F₂, o que não ocorreu com as famílias de geração F₂, originária de híbridos PF₁ e PF₂. O fato de os híbridos PF₁, PF₂ e PF₃ terem produzido, por autofecundação, razão de segregação de três genes, sugere que eles diferem apenas com relação ao conjunto de genes modificadores que atuam sobre os genes principais, Rf₄, Rf₅ e Rf₆. Desse modo, para a restauração completa da fertilidade seria necessário, além dos genes restauradores, um conjunto completo de genes modificadores para cada um desses restauradores. A falta de alguns modificadores pode permitir que o genótipo Rf₄r₄Rf₅r₅Rf₆r₆ seja apenas PF (PF₁, PF₂ e PF₃), dependendo dos modificadores presentes.

A segregação da geração F₂, resultante da autofecundação de híbridos PF₁ e PF₂ das linhagens 264 ME-C e 7MF, encontra-se no Quadro 5. As três famílias PF₁ e uma das quatro famílias PF₂ segregaram, produzindo as cinco classes fenotípicas. A classe mais freqüente foi a ME, que variou de 55,36 a 63,74% e de 53,62 a 57,25%,

QUADRO 2 - Segregação da geração F₂, resultante da autofecundação dos híbridos PF₃ das linhagens 264ME-C e 964MF

Família	Nº de plantas (Observado)		χ^2	P (%)
	(MF + PF)	ME		
	Proporção esperada [36 (MF + PF) : 28ME]			
1	94	76	0,030	80-90
2	57	46	0,008	90-95
3	86	50	2,420	10-20
4	70	70	1,976	10-20
5	128	119	1,792	10-20
Desvio			0,766	30-50
Heterogeneidade			5,459	20-30

QUADRO 3 - Segregação do RC1 de híbridos PF₃ das linhagens 264ME-C e 964MF

Família	Nº de plantas (Observado)	ME	χ^2	P (\$)
			Proporção esperada [1(MF + PF) : 1 ME]	
1	17	26	1,488	20-30
2	21	23	0,023	80-90
3	47	53	0,250	50-70
4	14	20	0,735	30-50
5	32	19	2,824	5-10
Desvio			0,298	50-70
Heterogeneidade			5,022	20-30

QUADRO 4 - Segregação da geração F_2 , resultante da autofecundação de híbridos PF_1 , PF_2 e PF_3 das linhagens 264ME-C e 870MF

Híbrido PF	Nº de plantas (Observado)		Proporção esperada		χ^2	P (%)
	(MF + PF)	ME	(MF + PF)	ME		
PF ₁	66	143	20:44	0,000	99	
PF ₁	88	127	27:37	0,093	70-80	
PF ₁	31	55	27:37	1,090	20-30	
PF ₁	66	71	32:32	0,117	70-80	
PF ₁	61	69	32:32	0,377	50-70	
PF ₁	149	145	32:32	0,031	80-90	
PF ₂	59	128	20:44	0,000	99	
PF ₃	118	80	38:26	0,000	99	
PF ₃	136	87	39:25	0,003	95-99	
PF ₃	59	33	41:23	0,009	90-95	

QUADRO 5 - Número e porcentagem de plantas na segregação da geração F₂, resultante da autofecundação dos híbridos PF₁ e PF₂ das linhagens 264ME-C e 7MF

Híbrido PF	Classes fenotípicas				Total plantas PF
	MF	PF ₁	PF ₂	PF ₃	
PF ₁ (Nº)	25	14	6	5	62
(%)	22,32	12,50	5,36	4,46	25
					22,32
PF ₁ (Nº)	43	19	7	3	105
(%)	24,29	10,74	3,96	1,69	29
					16,39
PF ₁ (Nº)	8	22	2	1	58
(%)	8,79	24,17	2,20	1,10	25
					27,47
PF ₂ (Nº)	27	30	7	0	74
(%)	19,57	21,74	5,07	0,00	37
					26,81
PF ₂ (Nº)	33	18	8	0	79
(%)	23,91	13,04	5,80	0,00	26
					18,84
PF ₂ (Nº)	15	17	3	0	43
(%)	19,23	21,79	3,85	0,00	20
					25,64
PF ₂ (Nº)	6	20	6	3	45
(%)	7,50	25,00	7,50	3,75	29
					36,25

para os híbridos PF₁ e PF₂, respectivamente, intervalos que são muito próximos. Entre as classes PF a mais freqüente foi a PF₁, seguida pela PF₂, e a menos freqüente foi a PF₃, principalmente na segregação dos híbridos PF₂, quando apenas uma entre quatro famílias produziu a classe PF₃. As classes PF₁, PF₂ e PF₃, ao serem agrupadas numa única classe, PF, apresentaram variação de 16,39 a 27,47% e de 18,84 a 36,25%, para os híbridos PF₁ e PF₂, respectivamente. Essa única classe apresentou, na maioria das famílias segregantes, maior freqüência, quando comparada à da classe MF. A média da classe PF₁, entre as famílias segregantes, oriundas da autofecundação dos híbridos PF₁, foi de 15,8%, e a média da classe PF₂, entre as famílias segregantes, oriundas da autofecundação dos híbridos PF₂, foi de 5,56%. Do mesmo modo, como ocorreu com os dados da geração F₂ de híbridos MF (13), os dados da geração F₂, oriunda da autofecundação de híbridos PF₁ e PF₂, também não se ajustaram a nenhuma relação fenotípica conhecida, nem mesmo quando as três classes PF foram agrupadas numa única classe; portanto, foram consideradas duas classes fenotípicas, (MF + PF) e ME, quando se testaram estatisticamente as razões de segregação (Quadro 6).

O Quadro 6 apresenta o resultado da segregação da geração F₂, resultante da autofecundação de híbridos PF₁ e PF₂ das linhagens 264 ME-C e 7MF. Tanto para as quatro famílias segregantes da geração F₂ de híbridos PF₁ quanto para as quatro famílias de híbridos PF₂, os resultados ajustaram-se à relação de 27 (MF + PF): 37 ME, reforçando, mais uma vez, a semelhança de comportamento dos híbridos PF₁ e PF₂, quando autofecundados, conforme observado anteriormente para o cruzamento entre as linhagens 264 ME-C e 870 MF (Quadro 4). Foi observada, na segregação da geração F₂, a predominância da freqüência da classe de plantas ME. A relação de segregação de três genes indica que na progénie de geração F₂, oriunda do cruzamento entre as linhagens 264 ME-C e 7 MF, só ocorre a restauração da fertilidade, total ou parcial, com a presença simultânea, no genótipo, de alelos dominantes nos três locos (Rf₄-Rf₅-Rf₆). Os genótipos Rf₄Rf₅rfrf₆, Rf₄rfrf₅Rf₆, rfrf₄Rf₅Rf₆, Rf₄rfrf₅rfrf₆, rfrf₄Rf₅rfrf₆, rfrf₄rfrf₅Rf₆ e rfrf₄rfrf₅rfrf₆ produzem a macho-esterilidade. Isso significa que os genótipos Rf₄-Rf₅-rfrf₆ e Rf₄-rfrf₅Rf₆, embora apresentem os genes complementares para a restauração da fertilidade, Rf₄ e Rf₅ ou Rf₆, produzem plantas ME. Isso indica a falta do conjunto de genes modificadores necessários para que os genes duplicados Rf₅ e Rf₆ possam complementar-se, separadamente, com o Rf₄, produzindo a restauração da fertilidade. O genótipo Rf₄-Rf₅-Rf₆ causaria a restauração da fertilidade, mesmo os genes Rf₅ e Rf₆, separadamente, não tendo o complexo gênico de modificadores necessários para que eles levem à restauração da fertilidade. Todavia, como Rf₅ e Rf₆ são genes duplicados, os genes modificadores presentes em Rf₅ e Rf₆ somariam seus efeitos, resultando na presença de Rf₄ plantas com pendões que apresentariam restauração total ou parcial da fertilidade. O fato de ter sido a segregação da geração F₂ de 27 (MF + PF): 37 ME indica que tanto os híbridos PF₁ quanto os PF₂, que deram origem à geração F₂, eram heterozigóticos para os três genes (Rf₄rfrf₅Rf₆) e que, provavelmente, a ausência de alguns modificadores dos dominantes impediu que os híbridos fossem completamente fértiles. Desse modo, comparando esses resultados com os cruzamentos das linhagens 264 ME-C e 964 ME (Quadro 2), pode-se concluir que os genótipos F₁ heterozigóticos para três ou dois genes (Rf₄rfrf₅Rf₆rfrf₆ e Rf₄rfrf₅Rf₆rfrf₆) podem ser MFs ou PFs (PF₁, PF₂ ou PF₃), dependendo da presença dos genes modificadores necessários para que esses genes principais produzam efeitos sobre a restauração da fertilidade, que pode ser total (MF) ou parcial (PF).

É possível que variações nas condições ambientais estejam também envolvi-

QUADRO 6 - Segregação da geração F₂, resultante da autofecundação dos híbridos PF₁ e PF₂ das linhagens 264ME-C e 7MF

Híbrido PF	Nº de plantas (Observado)		χ^2	P (%)
	(MF + PF)	ME		
Proporção esperada [27(MF + PF) : 37 ME]				
PF ₁	50	62	0,185	50-70
PF ₁	72	105	0,109	70-80
PF ₁	33	58	1,078	20-30
PF ₁	37	70	2,237	10-20
PF ₂	64	74	0,829	30-50
PF ₂	59	79	0,002	95-99
PF ₂	35	43	0,133	70-80
PF ₂	35	45	0,029	89-90
Desvio			0,041	80-90
Heterogeneidade			4,562	70-80

das na expressão dos diferentes graus de fertilidade parcial, tornando-se, portanto, necessários outros estudos.

4. RESUMO E CONCLUSÕES

Foi efetuada a análise genética da restauração parcial (PF) da fertilidade masculina de plantas de milho com citoplasma macho-estéril tipo C.

Foram comparadas as segregações da geração F_2 , proveniente da autofecundação de híbridos PF com graus de expressão variável: PF₁, menos de 5% das anteras com liberação de pólen; PF₂, de 5% a 20%; PF₃, acima de 20% e até 70% das anteras com liberação de pólen.

Os híbridos PF (PF₁, PF₂ e PF₃) produziram razões de segregação de três genes independentes. PF₁ e PF₂ mostraram comportamento semelhante, produzindo a mesma razão de segregação; por outro lado, o híbrido PF₃ comportou-se diferentemente dos híbridos PF₁ e PF₂.

O fato de híbridos PF, com graus de expressão da fertilidade masculina variável (PF₁, PF₂ e PF₃), originarem segregação de três genes indica que tanto PF₃ quanto PF₂ e PF₁ eram heterozigóticos para os três genes (Rf₄r_f₄Rf₅r_f₅Rf₆r_f₆) e que, provavelmente, a ausência de alguns genes modificadores dos genes dominantes restauradores (Rf₄, Rf₅ e Rf₆) impediu que os híbridos fossem MF. Desse modo, para a restauração completa da fertilidade (MF) seria necessário, além dos genes restauradores, um conjunto completo de modificadores para cada um dos restauradores.

5. SUMMARY

(GENETIC ANALYSIS OF PARTIAL FERTILITY RESTORATION OF MALE-STERILE C-CYTOPLASM IN MAIZE (*Zea mays L.*))

The inheritance of partial fertility restoration (PF) of male-sterile C-cytoplasm in maize was studied by comparing F_2 segregations from PF hybrids with different degree of expression: PF₁, with less than 5% of anthers showing pollen liberation; PF₂, from 5% to 20%; PF₃, above 20% and up to 70% of anthers with pollen liberation.

The PF hybrids (PF₁, PF₂ and PF₃) produced segregation ratios of three independent genes. PF₁ and PF₂ showed similar behavior, and gave the same segregation ratio, but PF₃ hybrid gave different ratio from PF₁ and PF₂.

The fact that PF hybrids with different degree of expression produced segregation ratio of three independent genes indicate that PF₃, PF₂ and PF₁ were heterozygous Rf₄r_f₄Rf₅r_f₅Rf₆r_f₆ and that, probably, some modifier genes from the dominant restoring genes (Rf₄, Rf₅ and Rf₆) were missing, not allowing the hybrids to express male fertility in tassel, but only a partial fertility. In this way, for complete fertility restoration, not only the fertility restoration genes (Rf₄, Rf₅ and Rf₆), are necessary but also a complex of modifying genes for each of the restoring genes.

6. LITERATURA CITADA

1. BECKETT, J.B. Classification of male-sterile cytoplasms in maize (*Zea mays L.*). *Crop Sci.*, 11:724-727. 1971.

2. CAMPOS, V.P. & CARVALHO, M.G. Caracterização das raças de *H. maydis* e comportamento de linhagens de milho frente à raça T. *Rev. Ceres*, 21:329-343. 1974.
3. COCHRAN, D.E. Progress of cytoplasmic and genetic sterility in hybrid seed production. *Proc. Ann. Corn & Sorghum Res. Conf.*, 30:116-130. 1975.
4. GRACEN, V.E. & GROGAN, C.O. Diversity and suitability for hybrid production of different sources of cytoplasmic male sterility in maize. *Agron. J.*, 66: 654-657. 1974.
5. GRACEN, V.E.; KHEYR-POUR, A.; EARLE, E.D. & GREGORY, P. Cytoplasmic inheritance of male sterility and pest resistance. *Proc. Ann. Corn & Sorghum Res. Conf.*, 34:76-91. 1979.
6. GROGAN, C.O.; SARVELLA, P.; SANFORD, J.O. & JORDAN, H.V. Influence of cytoplasmic male sterility on dry matter accumulation in maize. *Crop Sci.*, 5:365-367. 1965.
7. JOSEPHSON, L.M.; MORGAN, T.E. & ARNOLD, J.M. Genetics and inheritance of fertility restoration of male-sterile cytoplasms in corn. *Proc. Ann. Corn & Sorghum Res. Conf.*, 33:48-59. 1978.
8. KHEYR-POUR, A. & GRACEN, V.E. Genetics of cms-C fertility restoration. *Maize Genet. Coop. Newslett.*, 54:57-59. 1980.
9. KHEYR-POUR, A.; GRACEN, V.E. & EVERETT, H.L. Genetics of cms-C fertility restoration. *Maize Genet. Coop. Newslett.*, 53:48-51. 1979.
10. KHEYR-POUR, A.; GRACEN, V.E. & EVERETT, H.L. Genetics of fertility restoration in the C-group of cytoplasmic male sterility in maize. *Genetics*, 98: 379-388. 1981.
11. MIRANDA, L.A. *Herança da restauração da fertilidade em citoplasma macho-estéril do tipo C em milho* (*Zea mays L.*). Viçosa, U.F.V., Imprensa Universitária, 1985. 70p. (Tese de M.S.).
12. SOUZA, I.R.P. *Análise genética da restauração da fertilidade em milho* (*Zea mays L.*) com macho-esterilidade citoplasmática tipo C. Viçosa, U.F.V., Imprensa Universitária, 1988. 83 p. (Tese de M.S.).
13. SOUZA, I.R.P. & SARAIVA, L.S. Análise genética da restauração da fertilidade em milho (*Zea mays L.*) com citoplasma macho-estéril do tipo C. *Rev. Bras. Genet.* (no prelo).
14. STRICKBERGER, M.W. *Genética*. Barcelona, Ediciones Omega, 1974. 880p.