



GUSTAVO BARNABÉ BIUDES

**EFICIÊNCIA E ESTABILIDADE DA MACHO
ESTERILIDADE GENÉTICO
CITOPLASMÁTICA NA OBTENÇÃO DE
HÍBRIDOS DE MILHO**

LAVRAS-MG

2012

GUSTAVO BARNABÉ BIUDES

**EFICIÊNCIA E ESTABILIDADE DA MACHO ESTERILIDADE
GENÉTICO CITOPLASMÁTICA NA OBTENÇÃO DE HÍBRIDOS DE
MILHO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, área de concentração em Genética e Melhoramento de Plantas, para a obtenção do título de Doutor.

Orientador

Dr. João Bosco dos Santos

LAVRAS - MG

2012

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca da UFLA**

Biudes, Gustavo Barnabé.

Eficiência e estabilidade da macho esterilidade genético
citoplasmática na obtenção de híbridos de milho / Gustavo Barnabé
Biudes. – Lavras : UFLA, 2012.

140 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2012.

Orientador: João Bosco dos Santos.

Bibliografia.

1. *Zea mays*. 2. Melhoramento genético. 3. Adaptabilidade. 4.
Estabilidade. 5. Interação GxA. 6. CMS. I. Universidade Federal de
Lavras. II. Título.

CDD – 631.523

GUSTAVO BARNABÉ BIUDES

**EFICIÊNCIA E ESTABILIDADE DA MACHO ESTERILIDADE
GENÉTICO CITOPLASMÁTICA NA OBTENÇÃO DE HÍBRIDOS DE
MILHO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, área de concentração em Genética e Melhoramento de Plantas, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 19 de julho de 2012.

Dra. Angela de Fátima B. Abreu	EMBRAPA
Dr. César Augusto Brasil P. Pinto	UFLA
Dr. Jair Moura Duarte	SYNGENTA
Dr. José Airton R. Nunes	UFLA



Dr. João Bosco dos Santos
Orientador

LAVRAS-MG

2012

DEDICO

À Leonice, Vanildo, Fabiano, Brígida, Fernanda, Alexandre e Maria Paula que sempre acreditaram em mim e proporcionaram a felicidade de estarem ao meu lado.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Departamento de Biologia (DBI), pela oportunidade concedida para realização do doutorado;

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pela concessão da bolsa de estudos;

À Syngenta, por todo o apoio na realização desse trabalho

Aos professores do Departamento de Biologia da UFLA, pelos ensinamentos transmitidos e harmoniosa convivência;

Ao professor Dr. João Bosco dos Santos, pela orientação, paciência, dedicação e seus ensinamentos que foram de grande relevância para a realização deste trabalho e meu crescimento profissional;

À Pesq., Dra. Ângela de Fátima Barbosa Abreu, por todo o apoio, ensinamentos e amizade, contribuindo de forma significativa pelo desenvolvimento profissional;

Ao Pesq., Dr. Jair Duarte, por todo suporte, amizade, ensinamentos e comprometimento para o meu desenvolvimento profissional;

Aos professores, César Augusto Brasil P. Pinto e José Airton R. Nunes, pelos ensinamentos durante o curso e por fazerem parte da defesa;

Aos amigos do doutorado, Deoclécio Domingos Garbuglio, pelo companheirismo, amizade e contribuição, e ao Fernando Ferreira Leão, pela amizade e companhia em muitos momentos;

Ao Dr Carlos Camargo (*in memoriam*) e a Dra. Vânia Moda-Cirino, pela amizade, confiança e ensinamentos, no mestrado e graduação;

Aos meus familiares e amigos da Syngenta e da UFLA, obrigado pelo apoio e incentivo.

A todos meu muito obrigado!

RESUMO GERAL

Híbridos de milho desenvolvidos de linhagens macho-estéreis propiciam consideráveis vantagens às empresas produtoras de sementes híbridas. Sistemas macho-estéreis dispensam a necessidade de despendoamento do campo de produção, resultando em redução no custo e aumento na qualidade da semente híbrida produzida. A macho-esterilidade refere-se ao fracasso no desenvolvimento dos órgãos masculinos. Em milho o sistema macho-estéril mais utilizado é o genético citoplasmático, o qual depende da necessidade da interação de genes nucleares com genes do citoplasma para que ocorra a consolidação do efeito. Entre os citoplasmas macho-estéreis descritos, o T foi amplamente utilizado até a década de 1970, entretanto, devido à suscetibilidade a helmintosporiose os sistemas S e C passaram a ser incorporados nos programas de melhoramento, e atualmente vem sendo amplamente utilizados. O método de melhoramento frequentemente adotado é o retrocruzamento de doadores macho-estéreis com linhagens elites utilizadas como recorrentes. Após a sua obtenção, as linhagens macho-estéreis devem ser avaliadas em diferentes ambientes visando verificar a estabilidade da macho-esterilidade e o comportamento agrônômico. Os híbridos obtidos por estas linhagens também devem ser avaliados quanto ao potencial produtivo nas redes de ensaio que devem englobar diferentes regiões e condições de cultivo. Na avaliação do híbrido é importante verificar a interação dos genótipos com o ambiente, especialmente visando identificar aqueles com alto potencial produtivo e adaptabilidade na produção de grãos. Entre as técnicas estatístico-genéticas existentes, a FGGA mostrou-se eficiente por permitir a realização da estratificação ambiental e a análise de adaptabilidade.

Palavras-chave: CMS. Interação GxA. Adaptabilidade. Estabilidade.

GENERAL ABSTRACT

Corn hybrids developed from male-sterile inbred lines provide considerable benefits to hybrid seed producing companies. Male-sterile systems eliminate the need for detasseling from the production field, resulting in a reduction of cost and increasing in the quality of the produced hybrid seeds. The male-sterility refers to the failure in the development of male organs. In corn, the most widely male-sterile system used is the genetic-cytoplasmic, which depends on the need of interaction between nuclear genes and genes from the cytoplasm in order to occur the consolidation effect. Among the described male-sterile cytoplasm, T was widely used until the 1970s, however, due to the susceptibility to *Helminthosporium*, systems S and C became incorporated into breeding programs, and are currently widely used. The breeding method frequently adopted is the backcross between donor male-sterile and elite lines used as recurrent. After obtaining the male-sterile inbred lines, they must be evaluated in different environments in order to verify the stability of male-sterility and agronomic performance. The hybrids obtained from these inbred lines should also be evaluated in regard to yield potential in trial networks which should encompass different regions and cultivation conditions. In the evaluation of the hybrid it is important to verify genotype interaction to the environment, especially to identify those with high yield potential and adaptability in grain production. Among the existing genetic-statistical techniques, the FGGA was shown to be efficient by allowing environmental stratification and analysis of adaptability.

Keywords: CMS. G x E Interaction. Adaptability. Stability.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 2

- Figura 1 Amplificação da reação de PCR para a identificação do citoplasma macho-estéril S em quatro linhagens de milho e cinco híbridos..... 67
- Figura 2 Período de Florescimento Masculino de dez genótipos avaliados em Centralina (MG), Cristalina (GO), em duas épocas, e em Planura (GO), em 2011 (...continua...) 73

CAPÍTULO 3

- Figura 1 Análise Gráfica da adaptabilidade de nove híbridos de milho, a partir dos escores obtidos, considerando os ambientes envolvidos nos fatores 1, 2, 3 e 4 (...continua...)..... 110

CAPÍTULO 4

- Figura 1 Produtividade média de grãos obtida para as linhagens SYN-LA e SYN-LC, em cinco locais durante a safra de 2009/2010..... 132
- Figura 2 Distribuição da classificação por tipo de peneira das sementes dos híbridos SYN-MF e SYN-ME produzidos utilizando despendoamento das linhagens fêmeas 136

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

- Tabela 1 Localidades de condução dos experimentos de avaliação das cinco linhagens e cinco híbridos, na safra de 2011 63
- Tabela 2 Resumo da análise de variância individual e conjunta para Plantas Macho Estéreis (%) de novegenótipos avaliados em Centralina (MG), Cristalina (GO), em duas épocas, e em Planura (MG), em 2011 69
- Tabela 3 Porcentagem de plantas macho estéreis para os genótipos avaliados em Centralina (MG), Cristalina (GO) em duas épocas e em Planura (MG), 2011 70
- Tabela 4 Resumo da análise de variância individual e conjunta para a Quantidade de Pólen e Viabilidade do Pólen para seis genótipos avaliados em Centralina (MG) e em Planura (MG), 2011 75
- Tabela 5 Dados médios para seis genótipos avaliados para a Quantidade de Pólen e Viabilidade do Pólen em Centralina (MG) e em Planura (GO), 2011 76
- Tabela 6 Dados médios para seis genótipos avaliados para a Quantidade de Pólen Viável em Centralina (MG) e em Planura (GO), 2011 78

CAPÍTULO 3

- Tabela 1 Quadrados médios de genótipos (QMG) e de resíduo (QMR), médias da porcentagem de plantas macho estéreis, acurácia experimental (r_{gg}) em dezesseis ambientes e médias das linhagens macho estéreis SYN-1, SYN-2, SYN-3 e SYN-4 101

Tabela 2	Resumo da análise de variância conjunta para porcentagem de plantas macho estéreis, assumindo locais e safras como ambientes, e estimativas do coeficiente de variação experimental e a média geral, das linhagens macho estéreis SYN-1, SYN-2, SYN-3 e SYN-4	102
Tabela 3	Quadrados médios de genótipos (QMG) e de resíduo (QMR), médias de produtividade de grãos e acurácia (r_{gg}) de nove híbridos avaliados em 25 locais de diferentes estados da região Central do Brasil, conduzidos na safra 2009/2010.....	104
Tabela 4	Resumo da análise de variância conjunta para produtividade de grãos (kg ha^{-1}), e estimativas do coeficiente de variação experimental e a média geral, avaliados em 25 locais de diferentes estados da região Central do Brasil, conduzidos na safra 2009/2010.....	106
Tabela 5	Porcentagem da variação acumulada e autovalores para cada fator obtido para análise de estratificação dos ambientes de nove híbridos avaliados em 25 locais de diferentes estados da região Central do Brasil, conduzidos na safra 2009/2010.....	107
Tabela 6	Estratificação ambiental por meio da análise de fatores, de nove híbridos, avaliados em 25 locais de diferentes estados da região Central do Brasil, conduzidos na safra 2009/2010.....	108
Tabela 7	Produtividade média de nove híbridos avaliados em 25 locais de diferentes estados da região Central do Brasil, conduzidos na safra 2009/2010	113

CAPÍTULO 4

Tabela 1	Porcentagem de plantas autofecundadas durante a avaliação dos híbridos SYN-MF obtido pela linhagem fêmea macho fértil e SYN-ME obtido pela linhagem fêmea macho-estéril, em Uberlândia no ano de 2009.....	129
----------	--	-----

SUMÁRIO

	CAPÍTULO 1 Introdução Geral	14
1	INTRODUÇÃO	14
2	REFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1	Histórico e importância do milho	16
2.2	Machoesterilidade	19
2.2.1	Origem dos sistemas CMS	21
2.2.2	Tipos citoplasmáticos	23
2.2.2.1	CMS-T	23
2.2.2.2	CMS-S	25
2.2.2.3	CMS-C	26
2.2.3	Caracterização do citoplasma macho-estéril	27
2.2.4	Obtenção e avaliação da linhagem macho-estéril	29
2.2.5	Efeito da macho esterilidade	33
2.3	Estabilidade e adaptabilidade em milho	36
2.3.1	Interação genótipos x ambientes	36
2.3.2	Estabilidade e adaptabilidade	40
	REFERÊNCIAS	47
	CAPÍTULO 2 Eficiência e estabilidade da macho esterilidade em linhagens e híbridos de milho	58
1	INTRODUÇÃO	60
2	MATERIAL E MÉTODOS	63
2.1	Avaliações Moleculares	63
2.2	Avaliações Fenotípicas	64
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	67
3.1	Caracterização molecular dos citoplasmas	67
3.2	Análise Fenotípica	68
4	CONCLUSÕES	81
	REFERÊNCIAS	82
	CAPÍTULO 3 Estratificação ambiental e adaptabilidade de linhagens e híbridos de milho macho estéreis em diferentes ambientes	85
1	INTRODUÇÃO	87
2	MATERIAL E MÉTODOS	90
2.1	Avaliação das linhagens	90
2.2	Avaliação dos híbridos	90
2.2.1	Estimação dos efeitos genotípicos e de interação GxA	91
2.2.2	Aplicação da análise de fatores à matriz G+GA	92
2.2.3	Comunalidade e especificidade	94
2.2.4	Estratificação ambiental	97

2.2.5	Análise de adaptabilidade.....	99
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	100
4	CONCLUSÕES	116
	REFERÊNCIAS	117
	CAPÍTULO 4 Avaliação comparativa da qualidade da semente híbrida em sistema de produção usando linhagens macho estéreis	120
1	INTRODUÇÃO	122
2	MATERIAL E MÉTODOS	124
2.1	Produção de Híbridos Experimentais	124
2.2	Avaliação da qualidade dos híbridos experimentais	125
2.3	Análise da produtividade das linhagens	126
2.4	Estimativa do custo de produção relativo	126
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	128
4	CONCLUSÃO	138
	REFERÊNCIAS	139

CAPÍTULO 1 Introdução Geral

1 INTRODUÇÃO

O milho é um dos principais cereais que compõe a base alimentar da população mundial. Algumas estimativas mostram que em 2020 o milho será o cereal com maior demanda em função da ampla gama de produtos e derivados deste cereal.

Após séculos de melhoramento, o milho vem sendo cultivado em diferentes regiões geográficas, sobre as mais vastas condições de cultivo. Entretanto, atualmente é notável o uso intensivo de tecnologia nas lavouras de produção, especialmente exemplificado pelo uso de modernos maquinários, sementes híbridas e sementes geneticamente modificadas de alta qualidade.

A adoção de sementes híbridas vem ocorrendo sistematicamente no Brasil e tem permitido significativos incrementos na produtividade de grãos e qualidade da semente comercializada. Contudo existe um importante desafio no sistema de produção da semente híbrida, relacionada à complexa logística, pela necessidade de despendoar extensivos campos de produção de sementes visando garantir a polinização cruzada. Nesse sentido, os programas de melhoramento têm intensificado a utilização de sistemas de macho esterilidade genéticos citoplasmática.

Linhagens macho-estéreis podem resultar em vantagens significativas na logística dos campos de produção, resultando em redução dos custos e aumento na qualidade da semente obtida. Entretanto, uma vez obtidas, as linhagens devem ser avaliadas quanto ao seu potencial produtivo e pela estabilidade e eficiência da macho esterilidade em diferentes condições de cultivo, especialmente àquelas representativas das condições de multiplicação e produção do híbrido.

Após o desenvolvimento da linhagem é de suma importância a avaliação do híbrido. Em função da potencial interação genótipos x ambientes, o híbrido normalmente é avaliado em diferentes locais e safras, representativos das condições de cultivo a qual o híbrido se destina. Nesse sentido, os híbridos devem ser alocados nas redes de ensaio para que seja capturada a interação e por meio de técnicas estatístico-genéticas possam ser identificados os genótipos com maior potencial produtivo e adaptados.

Existem diferentes técnicas com diferentes abordagens, definições e interpretações para adaptabilidade e estabilidade, bem como diferentes métodos que permitem estimá-las. As principais diferenças entre os métodos estão nos parâmetros adotados para a sua avaliação e nos procedimentos biométricos adotados para avaliá-los. Uma abordagem que tem sido frequentemente utilizada são os métodos multivariados que podem ajudar tanto na identificação de genótipos de alta produtividade e largamente adaptados, como no chamado zoneamento agrônômico, com fins de recomendação regionalizada e seleção de locais teste. Entre os métodos disponíveis, o FGGA (análise de fatores associada aos efeitos genotípicos e de interação genótipos x ambientes) tem sido utilizados com sucesso para atingir esses objetivos.

Diante deste contexto, o presente estudo teve por objetivos:

- a) Avaliar linhagens macho estéreis de milho e híbridos provenientes de linhagens macho estéreis, quanto a eficácia e a estabilidade da macho esterilidade em diferentes ambientes;
- b) Avaliar híbridos de milho quanto ao potencial produtivo em distintos ambientes de cultivo;
- c) Avaliar a proporção de plantas autofecundadas nos campos de produção de semente híbridas em diferentes combinações de sementes macho estéreis e macho férteis.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Histórico e importância do milho

O milho é o cereal mais cultivado no mundo, exercendo grande importância para a alimentação humana, animal e fonte de diferentes produtos industriais, entre os quais, óleo e álcool.

Foi domesticado há cerca de 8.000 anos atrás e desde a sua descoberta por Cristovão Colombo na América Tropical, foi difundido para diferentes regiões do mundo e mostrou adaptação a distintas condições climáticas e latitudes. Atualmente o milho é cultivado nos cinco continentes (WEIDER, 2008).

Acima de 140 milhões de hectares anualmente são destinados ao cultivo de milho no mundo. O crescimento da produção tem acompanhado a demanda. Entretanto, estimativas prevêem que em 2020 a demanda de milho será 145% da demanda de 1997, superando a demanda por trigo e arroz (ORTIZ, 2008).

Diante desse desafio, duas estratégias têm sido consideradas: expansão da área agricultável e aumento da produção de grãos por unidade de área. A expansão da área é extremamente limitada em função da baixa disponibilidade de áreas agricultáveis, problemas políticos que inibem investimentos em pesquisas e pela necessidade de desmatamento das florestas. O acréscimo de área destinada ao cultivo de milho será cada vez menor e não será suficiente para suprir a demanda pelo cereal. Desta forma, a alternativa é propiciar condições para obter elevadas produções por área.

A média da produtividade mundial em 2010 foi de 4,3 t por hectare (FOOD AND AGRICULTURE OF THE UNITED NATIONS - FAO, 2010) sendo que ainda é notória uma grande diferença na produtividade em função do nível de desenvolvimento do país.

Entre os fatores que podem contribuir para o aumento da produtividade, especial atenção tem sido atribuída ao desenvolvimento de técnicas de cultivo mais apropriadas, com adoção de modernos maquinários e sistemas de adubação e proteção de cultivos que propiciem ganhos na produtividade. Entretanto, um elo importante dessa equação são genótipos superiores com capacidade de responder aos investimentos.

Nesse contexto, com o objetivo de atingir patamares cada vez maiores de produtividade, os melhoristas de plantas têm considerado com grande destaque a obtenção de sementes híbridas que visam explorar a superioridade dos genótipos heterozigotos em relação aos demais, ou seja, o aproveitamento do vigor híbrido, comumente chamado de heterose, que foi primeiramente descrito por Shull e East, independentemente, no início do século XX (CROW, 1998).

A cultura do milho exemplifica os avanços conseguidos com a utilização de sementes híbridas. Atualmente a produção deste cereal é baseada na exploração da heterose. Em alguns sistemas de produção, como o americano, a adoção de sementes híbridas foi bastante rápida, sendo atualmente utilizada em praticamente toda a área comercial. O ganho em produtividade obtido com a substituição de variedades tradicionais pelos híbridos nos EUA foi extraordinário. Em 1930 quando ainda eram adotadas variedades de polinização aberta, a produtividade média era de 2.000 kg ha⁻¹, passando para 6.000 kg ha⁻¹ na década de 80, sendo que desse ganho, 58% é atribuído ao melhoramento genético e o restante a práticas agronômicas (TROYER, 2006).

No Brasil, o segundo país a adotar híbridos de milho, a situação foi semelhante, com alguns resultados mostrando ganhos superiores a 1% ao ano na produtividade de grãos nos últimos 60 anos (FERNANDES; FRANSON, 1997; PATERNIANI; CAMPOS, 1999).

Além do ganho na produtividade, o híbrido garante uma maior uniformidade da cultura, melhor qualidade e melhor tolerância ou resistência a fatores bióticos e abióticos, facilitando o manejo da cultura e explorando o seu potencial de produção.

Apesar do grande sucesso do emprego de sementes híbridas visando explorar o potencial genético, algumas etapas de sua obtenção são bastante trabalhosas, onerando o custo da semente produzida. Entre outras etapas, o processo de produção de sementes híbridas envolve a geração de linhagens endogâmicas, com a posterior multiplicação em larga escala e a produção comercial do híbrido. Esta última etapa é decisiva para a qualidade das sementes híbridas, sobretudo pela necessidade no controle dos processos de polinização.

O fato de as flores masculinas e femininas serem localizadas em diferentes partes da planta torna-se uma grande vantagem para explorar a hibridação em larga escala. No caso do milho, o arranquio do pendão imaturo, que contém as flores masculinas, torna a planta emasculada, evitando a autofecundação das plantas, e todas as sementes que ela produzir serão provenientes de polinização cruzada (DUVICK, 1965).

Visando o controle da polinização, o despendoamento manual e/ou mecânico são as técnicas que vêm sendo amplamente empregadas pelas empresas produtoras de sementes (MAGALHÃES et al., 1999). Entretanto, essas atividades além de terem um alto custo, a qualidade pode ser comprometida em função dos materiais genéticos envolvidos, condições ambientais e sistema utilizado, além do que o processo manual é altamente exigente em mão de obra e o despendoamento pode acarretar em prejuízo devido à retirada excessiva de folhas.

Diante deste contexto, uma alternativa que tem sido considerada na obtenção de sementes híbridas é a utilização de sistemas estéreis.

2.2 Machoesterilidade

A esterilidade se refere ao fracasso no desenvolvimento dos órgãos femininos e/ou masculinos (ROY; SARKAR, 1991). Quando a esterilidade é devida à supressão da produção de grãos de pólen funcional, porém sem afetar o desenvolvimento de gametófitos da fêmea, o processo é conhecido como macho esterilidade (KASER-SCHNEIDER, 2002).

Sistemas macho estéreis podem proporcionar a não produção de pólen ou a produção de polens não funcionais, permitindo a eliminação da emasculação do parental fêmea nos campos de produção de sementes híbridas (SCHNABLE; WISE, 1998; WEIDER et al., 2009).

A macho esterilidade pode ter múltiplas origens, podendo ser resultado de condições ambientais adversas, incidência de doenças, hibridações, mutações naturais e artificiais ou engenharia genética (BUDAR; TOUZET; PAEPE, 2003; WANG; HUANG; YANG, 2011).

A primeira documentação da macho esterilidade ocorreu em 1763 quando Koelreuter observou o aborto de anteras em alguns híbridos específicos. Desde a sua descoberta a macho esterilidade já foi descrita em mais de 300 espécies (KAUL, 1988), muitas das quais com grande interesse pela agricultura, tais como o sorgo, feijão, milho, girassol e beterraba açucareira (BUDAR; TOUZET; PAEPE, 2003; POEHLMAN; SLEPER, 1995; SCHANBLE; WISE, 1998).

Em milho, a macho esterilidade foi descrita pela primeira vez em 1933 por Rhoades que identificou um citoplasma macho-estéril em variedades provenientes de Peruviano, um ancestral do milho moderno. Diante da grande importância da cultura do milho como fonte alimentar, associado à crescente utilização de sementes híbridas por produtores, a macho esterilidade vem sendo

explorada desde a sua descoberta, pelos programas de melhoramento visando o desenvolvimento de variedades híbridas.

Sistemas macho estéreis são considerados valiosas ferramentas na produção de sementes híbridas, com potencial para aumentar a produtividade das linhagens, aumentar a pureza e diminuir os custos de produção da semente (KASER-SCHNEIDER, 2002; MACKENZIE, 2004).

Embora existam vários tipos de macho esterilidade, especialmente em função das espécies em que esta ocorre, no milho o principal sistema que vem sendo explorado é a macho esterilidade citoplasmática a qual é associada à sigla CMS (*Cytoplasmic Male Sterility*) ou Macho Esterilidade Citoplasmática. No sistema CMS para a consolidação da macho esterilidade há a necessidade da interação de genes nucleares com o citoplasma. Enquanto os genes nucleares exibem herança mendeliana, os genes citoplasmáticos apresentam transmissão materna (FLEMING, 1975; KAUL, 1998; RUIZ; DANIELL, 2005).

O sistema CMS em milho possui três principais grupos sendo eles o CMS-T (ROGERS; EDWARDSON, 1952), CMS-S (JONES; STINSON; KHOO, 1957) e CMS-C (BECKETT, 1971).

Os grupos CMS são distinguidos em função dos genes envolvidos na restauração da fertilidade (*Rf*) do pólen. Com o advento da biologia molecular, tem sido possível a classificação do CMS de forma mais rápida e segura, sendo reconhecidos atualmente mais de 40 subtipos de CMS em milho, vinculados aos três grupos principais (KAESER et al., 2003; LAUGHNAN; GABAY-LAUGHNAN, 1983; LEVINGS, 1990).

Além da classificação, os genes *Rf* são determinantes para o funcionamento do sistema CMS, sendo relacionados a diferentes ações entre as quais, a supressão do efeito dos genes de macho esterilidade mitocondriais, controle do número de cópias e da transmissão de moléculas subgenômicas (JANSKA et al., 1998), processamento pós-transcricional, modificação de

proteínas relacionadas à macho esterilidade citoplasmática (SARRIA et al., 1998) e, ainda, na compensação metabólica da disfunção mitocondrial (LIU et al., 2001).

Independente da relação entre os genes citoplasmáticos e nucleares, a macho esterilidade pode apresentar importantes interações com o ambiente. Fatores climáticos, como temperatura do ar, evapotranspiração e vapor d'água, estão correlacionados positiva ou negativamente com a reversão parcial da esterilidade, indicando uma interação entre fatores ambientais e genéticos (MUNCH et al., 2010; WEIDER et al., 2009).

2.2.1 Origem dos sistemas CMS

Na cultura do milho existem dois modelos que descrevem a origem do citoplasma macho-estéril (DOEBLEY; SISCO, 1989).

Um primeiro modelo propõe que a origem dos citoplasmas macho estéreis deve-se a mutações no genoma mitocondrial (mtDNA) como um resultado de recombinações intra e/ou intermolecular envolvendo curtas sequências repetidas de DNA (LEVINGS, 1993). Entre outras funções, as mutações afetaram as proteínas envolvidas na meiose (GLOVER et al., 1998), o metabolismo hormonal das plantas (MOFFATT; SOMMERVILLE, 1998) e das moléculas do complexo lipídico (AARTS, 1995) ou a síntese de metabólitos secundários (MEER et al., 1992).

Por outro lado, há um modelo que propõe que o citoplasma macho-estéril é proveniente da introgressão de citoplasma externo. Essas teorias explicam o fenótipo CMS e consideram que a esterilidade é o resultado da interação incompatível entre o citoplasma estrangeiro com o genoma nuclear do milho.

O primeiro sistema citoplasmático macho-estéril descoberto foi o T, detectado em 1944 por Rogers que identificou a esterilidade citoplasmática na variedade mexicana Golden June (ROGERS; EDWARDSON, 1952). Em função de trabalhar na Estação Experimental de Agricultura do Texas, este tipo ficou conhecido como citoplasma estéril Texas. O citoplasma S foi descoberto por M.T Jenkins do USDA (*United States Department of Agriculture*) a partir de uma variedade de milho Teopode e foi desenvolvido comercialmente por Jones, Stinson e Khoo (1957). Após o descobrimento dos citoplasmas S e T os melhoristas testaram outros citoplasmas de milho usando técnicas restauradoras. Avaliando diferentes variedades de milho, Beckett (1971) detectou outro tipo de citoplasma proveniente do milho brasileiro Charrua, sendo dessa forma denominado CMS-C.

Genomas da mitocôndria dos citoplasmas do tipo C e T foram encontrados nos ancestrais do milho, implicando que o citoplasma C e T surgiram por mutações dentro da mitocôndria do milho (SOFI; RATHER; WANI, 2007). Já o citoplasma S provavelmente é proveniente do *Z. mexicana* (*Copandiro teosinte*). É possível que esse citoplasma tenha sido introgridido para milho doméstico por meio da raça de milho Conico Norteno do México, que também contém citoplasma S (DOEBLEY; SISCO, 1989).

Os citoplasmas de milho podem também ser diferenciados pelos sistemas de incompatibilidade envolvidos. Os sistemas de restauração podem ser classificados como sendo esporofítico quando atua prioritariamente no início da esporogênese, antes da meiose, ou gametofítico quando atua após meiose, em micrósporos ou grãos de pólen (MUNSCH et al., 2010). Estas diferenças levam a diferentes padrões de fertilidade. Uma planta diploide que carrega um citoplasma macho-estéril e é heterozigota para o gene restaurador (Rf / rf) pode produzir duas classes de grãos de pólen: aqueles que carregam o restaurador (Rf) e aqueles que conferem a macho esterilidade (rf). No caso de restauração

esporofítica as duas classes de gametas serão funcionais. Em contraste, no caso de plantas heterozigotas para um restaurador gametofítico, somente aqueles gametas que conduzem o restaurador serão funcionais.

O sistema restaurador gametofítico é mais propenso a reversão da fertilidade (KAMPS; MCCARTY; CHASE, 1996).

A diversidade no sistema de restauração estende-se ao número de genes restauradores que são necessários. Em alguns sistemas, a completa restauração requer a ação de vários genes, muitos dos quais tem somente pouco efeito (SCHNABLE; WISE, 1998). Por outro lado, em alguns sistemas poucos genes têm grandes efeitos, porém, genes modificadores adicionais são às vezes requeridos para completar a restauração da fertilidade (POEHLMAN; SLEPER, 1995).

2.2.2 Tipos citoplasmáticos

Existem diferentes tipos de macho esterilidade, que podem ser classificados de acordo como sistema de restauração utilizado. Atualmente são três os principais sistemas utilizados no processo de melhoramento: CMS-T, CMS-S e CMS-C.

2.2.2.1 CMS-T

O tipo CMS-T de restauração de fertilidade tem sido descrito como esporofítico, da mesma forma que o CMS-C. Dois genes nucleares *Rf1* e *Rf2* localizados nos cromossomos 3 e 9, respectivamente, são requeridos para a completa restauração desse tipo de CMS (DUVICK, 1965; WISE et al., 1999). Embora a presença do gene *Rf1* seja suficiente para reduzir a síntese do polipeptídeo, atribuindo um elevado nível de restauração, apenas a ação de

ambos *Rf1* e *Rf2* confere completa restauração da fertilidade (NEWTON, 1989). Por outro lado, dois genes *Rf8* e *Rf** podem conferir uma restauração parcial (WISE et al., 1999).

Em contraste ao gene restaurador *Rf1*, o *Rf2* está presente em quase todas as linhagens de milho, até mesmo aquelas linhagens que nunca foram expostas ao citoplasma T. Isto sugere que o *Rf2* tem sido mantido durante a evolução por seleção e deve, desta forma, ter uma significativa função, independente da restauração (SCHNABLE; WISE, 1998).

Os genes *rf1*, *rf8* e *rf** se caracterizam pela redução dos níveis de expressão do gene *urf13* que codifica pelo fenótipo macho-estéril (WISE; DILL; SCHNABLE, 1996). Em contraste, o *rf2* é um gene regulatório do gene *rf1*, de expressão constitutiva (CUI; WISE; SCHNABLE, 1996). Este gene codifica uma aldeído desidrogenase (LIU et al., 2001), que, em plantas citoplasma T, tem a função de restauração da fertilidade e, em plantas de citoplasma normal, está envolvida no desenvolvimento das anteras (SOFI; RATHER; WANI, 2007).

Apesar da grande estabilidade em relação à manutenção da esterilidade, linhagens e híbridos com o citoplasma CMS-T são suscetíveis a toxina produzida pela raça T do fungo patogênico *Cochliobolus heterostrophus* responsável pela helmintosporiose (DUVICK, 1965). A virulência específica se deve a presença do gene mitocondrial URF13 presente no tipo CMS-T e que não está presente nos citoplasmas S e C (SOFI; RATHER; WANI, 2007). Sobretudo, as toxinas produzidas pelo *C. heterostrophus* afetam as mitocôndrias do CMS-T, mas não afetam as mitocôndrias de outros citoplasmas (LEVINGS, 1990).

Em função do citoplasma CMS-T ser considerado o mais estável e confiável sobre diferentes condições de ambiente (DEWEY; KORTH, 1994), por duas décadas (1950 a 70) foi a mais importante fonte de macho esterilidade na indústria de sementes. No início da década de 1970 estima-se que 85% de

todo o milho semeado nos EUA foi produzido com o citoplasma CMS-T (DEWEY; KORTH, 1994; LEVINGS, 1993), apesar do fato de ele ser suscetível a helmintosporiose, que já era conhecida desde o fim da década de 1950 (DUVICK, 1965). Nos anos de 1969 e 1970 uma epidemia de helmintosporiose nos EUA resultou em perda entre 1 e 1,5 bilhões de dólares devido à suscetibilidade do citoplasma T (BRAUN; BROWN; LEVINGS, 1992; WEINGARTNER, 2002). Como consequência, imediatamente o uso do citoplasma T foi descontinuado (LAUGHMAN; GABAY-LAUGHMAN, 1983) e passou-se a intensificar as pesquisas com os sistemas CMS-S e C para utilização na produção de sementes híbridas (WYCH, 1988).

A específica suscetibilidade do CMS-T a helmintosporiose mostrou os perigos da uniformidade genética (LEVINGS, 1990).

2.2.2.2 CMS-S

O tipo de citoplasma S é um exemplo de um sistema CMS gametofítico (KAMPS; MCCARTY; CHASE, 1996), associada com a expressão da quimera *orf355-orf77* localizada no genoma mitocondrial (ZABALA; GABAY-LAUGHMAN; LAUGHMAN, 1997). Um gene nuclear dominante (*Rf3*) localizado no cromossomo 2 é o responsável pela restauração da fertilidade para plantas que possuem o CMS-S (DUVICK, 1965; LAUGHMAN; GABAY-LAUGHMAN, 1983). Contudo, para algumas fontes de CMS-S, além do grande número de alelos para o *Rf3*, já foram descritos mais de 60 locos com efeitos menores na restauração da fertilidade para esse tipo citoplasmático, que estão presentes nos cromossomos 1, 3, 6 e 8 (GABAY-LAUGHMAN et al., 2004; JOSEPHSON; ARNOLD, 1978). Grande parte desses locos não possui valor agrônômico, pois condiciona para características como a letalidade ou efeitos deletérios quando em homozigose (WEN et al., 2003).

Recentemente um segundo gene restaurador da fertilidade foi caracterizado. Esse gene, nomeado *Rf9*, foi descrito como sendo altamente influenciável pelas condições ambientais (WEIDER et al., 2009).

O citoplasma S é caracterizado por apresentar frequentes reversões de fertilidade em plantas com este tipo de sistema macho-estéril (LAUGHMAN; GABAY-LAUGHMAN, 1983). Reversões podem ser consequências de mutações nucleares, que são transmitidas em uma maneira mendeliana, ou de mudanças citoplasmáticas, herdadas dos parentais femininos (GABAY-LAUGHMAN et al., 2004).

Há evidências de que elementos transponíveis podem estar relacionados à recuperação da fertilidade, tornando o processo mais instável (LAUGHMAN; GABAY-LAUGHMAN, 1983).

2.2.2.3 CMS-C

Da mesma forma que o tipo ?T, o CMS-Sé esporofítico e tem sido descrito como uma das fontes mais atrativas de macho esterilidade para produção de milho híbrido.

Inicialmente acreditava-se que apenas o gene *Rf4*, localizado no cromossomo 8, com dominância completa, era responsável pela restauração da fertilidade (DUVICK, 1965). Entretanto, estudos posteriores mostraram que pelo menos outros dois genes, *Rf5* e *Rf6* têm efeitos gênicos complementares no processo de restauração (GABAY-LAUGHMAN et al., 2004; JOSEPHSON; ARNOLD, 1978; SISCO et al., 1991; WEIDER et al., 2009). Entretanto, o sistema de restauração para este tipo de citoplasma não está totalmente claro.

A restauração da fertilidade de CMS-C tem sido descrita como mais complexa quando comparado ao CMS-T e CMS-S, por outro lado, também tem sido descrita como mais estável do que o CMS-S (DEWEY; KORTH, 1994;

WEIDER et al., 2009). Considerando essa característica e o fato de não estar associado a suscetibilidade a *C. heterostrophus*, esse citoplasma atualmente tem sido o preferido nos programas de melhoramento.

Com a descontinuidade na utilização de fontes macho estéreis do grupo T na década de 70, a indústria americana necessitava de substituir essa fonte. No ano de 1984, 11,8% dos híbridos registrados nos EUA eram CMS e desses 8,3% eram provenientes de CMS-C e 3,3% de CMS-S (DARRAH; ZUBER, 1986).

2.2.3 Caracterização do citoplasma macho-estéril

Um processo importante na utilização dos citoplasmas macho estéreis pelo melhoramento é a caracterização com confiança do tipo de citoplasma que está sendo utilizado.

O clássico método de caracterização dos diferentes sistemas CMS inclui a avaliação da fertilidade do pólen nas progênies obtidas dos cruzamentos das linhagens endogâmicas, utilizando linhagens testadoras contendo os diferentes genes restauradores (testadores) (BECKETT, 1971). Entretanto, esse método além de consumir tempo, requer a polinização de uma série de linhagens com os testadores, gerando uma grande quantidade de materiais testes (LIU et al., 2002), porém, mesmo assim ainda pode apresentar um confundimento devido aos subgrupos dentro do mesmo tipo de citoplasma (BECKETT, 1971).

O conhecimento da estrutura molecular do CMS aumentou com o desenvolvimento das pesquisas moleculares (LIU et al., 2002). Com os recentes estudos têm sido mostrado que as mutações responsáveis pelo CMS residem no DNA mitocondrial (mtDNA) (SCHNABLE; WISE, 1998) e que a macho esterilidade pode ser caracterizada em função das diferenças existentes na base de características moleculares da mitocôndria (KASER-SCHNEIDER, 2002).

Dessa forma, atualmente os sistemas macho estéreis podem ser caracterizados por meio de sua estrutura do genoma e a expressão do gene da mitocôndria.

O gene quimérico *urf-13* foi detectado em mtDNA de CMS-T (DEWEY; LEVINGS III; TIMOTHY, 1986) e uma ORF (Open Reading Frame) foi encontrada em regiões quiméricas do CMS-C (DEWEY; TIMOTHY; LEVINGS III, 1991). Uma sequência repetida de mtDNA contendo dois ORFs quiméricos foram encontrados em CMS-S (ZABALA; GABAY-LAUGHNAN; LAUGHNAN, 1997). Os subtipos de cada um dos CMS podem ser caracterizados por meios moleculares (SISCO et al., 1985).

Marcadores moleculares como os RFLPs e baseados em PCR foram desenhados para as características únicas das regiões quiméricas do mtDNA que podem ser usados para distinguir os principais tipos de CMS muito mais rapidamente do que pelo procedimento de cruzamento teste tradicional. Análises de RFLP consomem tempo para ser aplicada na rotina dos programas de melhoramento, enquanto marcadores baseados em PCR são conhecidos por serem rápidos e identificam o citoplasma definitivamente (NAKAJIMA et al., 1999; SATO, 1998).

Sequências multiplex de PCR mostraram ser um método rápido e confiável sendo que ainda podem combinar três pares de primers em uma simples reação, tornando possível a análise de um grande número de amostras (LIU et al., 2002). Estas sequências revelaram fragmentos específicos de DNA com 298, 440 e 799 bp para os citoplasmas C, T e S, respectivamente.

A técnica de PCR associada a microssatélites ou SSR (Simple Sequence Repeats) tem se mostrado eficiente em estudar polimorfismo entre as sequências de DNA. Essa técnica baseia-se no uso de pares de primers na reação de PCR para detectar variações em locos de sequências repetitivas (BUSO et al., 2003). Estas são constituídas de uma seisnucleotídeos que se repetem lado a lado no genoma.

Os marcadores SSRs revelam polimorfismo em um loco devido às diferenças no número de vezes (n) em que, por exemplo, um dinucleotídeo (AG)_n se repete naquele loco. Essas variações no número de repetições constituem-se, em última análise, em variações no comprimento do segmento detectado pela reação de polimerase em cadeia e na separação de fragmentos amplificados em gel de eletroforese.

Entre as principais características, os marcadores SSR são caracterizados por serem codominantes, abundantes, aparentemente distribuídos por todo o genoma, multialélicos e dependentes de pequena quantidade de DNA dos indivíduos analisados (BUSO et al., 2003).

A grande limitação do uso em larga escala de marcadores SSR é a obtenção dos primers que serão usados na PCR para amplificar alelos em cada loco. Trata-se de uma técnica de elevado custo e intensiva em mão-de-obra, considerando-se todas as etapas de seu desenvolvimento (incluindo construção da biblioteca genômica, seleção de clones positivos, desenho e teste de primers). Entretanto, para a caracterização de citoplasmas macho estéreis já existem primers desenvolvidos e os marcadores microssatélites vem sendo utilizado com eficiência (IGNJATOVIC-MICIC et al., 2006).

2.2.4 Obtenção e avaliação da linhagem macho-estéril

Nos programas de melhoramento o desenvolvimento de uma linhagem macho-estéril normalmente ocorre por meio do processo de introgressão que é realizado efetuando seguidas gerações de retrocruzamentos das linhagens elites (parental recorrente) com uma linhagem doadora do CMS.

Após cinco a seis gerações de retrocruzamentos o processo é finalizado e é então obtida uma linhagem isogênica a elite, diferenciada apenas pela presença da macho esterilidade. Entretanto, independente da semelhança

fenotípica a linhagem macho-estéril deve ser avaliada pelo seu desempenho *per se* e como parental fêmea no híbrido (DUVICK, 1965).

Na avaliação da linhagem macho-estéril, além das características agronômicas, é importante quantificar a macho esterilidade visando estudar a sua estabilidade em diferentes condições ambientais.

Analisando genótipos macho estéreis provenientes de diferentes citoplasmas, Weider et al. (2009) verificaram que fatores climáticos como temperatura, precipitação pluviométrica, radiação, umidade do ar e evapotranspiração, antes e durante o período de polinização, afetam a reversão da fertilidade, revelando a presença de interação genótipos x ambientes significativa.

Em função das condições ambientais, as linhagens obtidas podem apresentar diferentes padrões de restauração, que influenciarão na estratégia de sua utilização.

Avaliando linhagens CMS-S, Duvick (1965) observou que apenas de 5 a 10% das linhagens desenvolvidas com esse citoplasma eram completamente estéreis enquanto que as demais apresentaram uma restauração parcial. Entretanto, de acordo com o autor, estes resultados devem ser avaliados com cautela, pois além da interação com o genótipo, há a interação com o ambiente, mostrando a necessidade de avaliar os materiais em diferentes ambientes, especialmente onde os híbridos serão produzidos.

Alta umidade e baixa temperatura foram associadas com o aumento da fertilidade de milho, por outro lado, longos fotoperíodos, alta temperatura e baixa umidade do ar reduzem a fertilidade (DUVICK, 1965).

Na obtenção da linhagem macho-estéril, outro ponto importante a ser considerado, por ter grande impacto na eficiência e estabilidade da macho esterilidade na linhagem, é a presença de genes *Rf* nas linhagens que receberão o citoplasma macho-estéril.

Uma vez presentes os genes restauradores nas linhagens recorrentes, há a necessidade de promover a seleção contrária a estes genes, retirando os alelos dominantes das linhagens introgridas e também da linhagem isogênica macho estéril. Nesse sentido, é possível uma modificação no sistema de retrocruzamento, onde em cada geração de retrocruzamento deve-se selecionar pelos alelos recessivos dos genes restauradores. Por esse método, há a necessidade de realizar o mesmo processo na linhagem mantenedora que será utilizada para multiplicação da linhagem macho fértil. Para tornar o processo efetivo é importante a utilização de marcadores moleculares na seleção assistida.

Avaliando linhagens provenientes da América Latina, Edwardson (1955) identificou que 60% das linhagens apresentavam os genes de restauração para fertilidade, especialmente considerando o tipo CMS-T. Se a linhagem possuir os genes restauradores da fertilidade, fica impossibilitada a obtenção linhagem macho-estéril para aquele determinado citoplasma, a menos que seja realizado o processo de melhoramento contrário aos alelos dominantes.

Após a avaliação e a constatação da eficiência e estabilidade da macho esterilidade, a linhagem é selecionada para produção comercial. Entretanto, antes há a necessidade de multiplicação da semente da linhagem macho-estéril.

Para que seja multiplicada a semente e mantida a macho esterilidade, deve ser feito o cruzamento da linhagem macho-estéril com a linhagem isogênica, diferenciada apenas pela ausência da macho esterilidade. Essa linhagem normalmente é denominada mantenedora e serve apenas como doadora de pólen.

Dessa forma, o uso do CMS para produção comercial envolve a manutenção de três linhagens no melhoramento: a linha mantenedora, a linhagem macho-estéril (parental fêmea) e o parental macho do híbrido, que é a linhagem restauradora da fertilidade por conter os genes nucleares *Rf*.

Quanto ao híbrido há duas características importantes a serem avaliadas. Uma é o desempenho agrônômico, que deverá ser avaliado em experimentos inseridos na rede de ensaios para avaliação do potencial produtivo, adaptabilidade e estabilidade em diferentes condições ambientais. A outra característica que deve ser avaliada é a capacidade do parental macho restaurar a produção normal de pólen no híbrido, especialmente considerando a necessidade de polinização efetiva da lavoura envolvendo as plantas híbridas. Esta é uma etapa crítica porque a identificação dos genes restauradores *Rf* nas linhagens endogâmicas ainda é difícil, especialmente para os sistemas onde há vários genes envolvidos.

O parental macho deve ter os alelos *Rf* dominantes em homozigose sendo que o citoplasma pode ser fértil ou estéril, não alterando a fertilidade em função da presença dos genes restauradores. Entretanto, alguns híbridos não possuem alelos de restauração nuclear e como resultado podem não restaurar ou apresentar uma restauração parcial.

Nessas situações onde o parental macho não tem condições plenas de recuperar a fertilidade há duas alternativas para que o híbrido apresente produção normal de pólen. Uma alternativa sugerida por Everett (1960) é que na produção do híbrido sejam semeados como parental feminino a linhagem CMS e a isogênica de citoplasma normal (KASER-SCHNEIDER, 2002). Dentro desta alternativa, alguns campos de produção instalados têm sido planejados com blocos de 75% de plantas da linhagem CMS e 25% da linhagem macho fértil. Nesse sistema é importante considerar que as plantas fêmeas macho férteis necessitarão ser despendoadas.

Uma opção a este processo é o método conhecido como *Blend*. Esse sistema consiste em misturar sementes híbridas provenientes de linhagem CMS com sementes do híbrido isogênico, porém, produzido usando a linhagem macho-fértil, que foi despendoada. Como princípio, o híbrido produzido pelo

método tradicional fornecerá pólen suficiente para produção de grãos no campo (HAVEY, 2004). Alguns trabalhos têm sugerido a utilização de 95% de híbrido macho-estéril e 5% do isogênico com macho fértil (SANGOI; SALVADOR, 1996). Porém, há trabalhos sugerindo a utilização de 80% de semente proveniente de macho-estéril e 20% proveniente do híbrido normal (FEIL; WEINGARTNER; STAMP, 2003).

2.2.5 Efeito da macho esterilidade

O pendão pode dominar as espigas e desta forma limitar a produtividade de grãos por três diferentes mecanismos: sombreamento das folhas superiores (HUNTER; DAYNARD; HULME, 1969), atuando como um competidor (ANDERSON, 1972) e por modificar os suplementos de reguladores de crescimento, especialmente a auxina e aceptores de CO₂ (SEYDEIN; LAMOTTE; ANDERSON, 1980).

O nível de competição entre o pendão e a espiga está relacionado ao ambiente de desenvolvimento da planta. Sob condições favoráveis (água, luz e nutrientes) existe menor competição entre as inflorescências femininas e masculinas. Sob condições menos favoráveis, como estresse hídrico ou alta densidade de plantas, a dominância apical é aumentada e o desenvolvimento da espiga é diminuído (SANGOI; SALVADOR, 1996).

No fim do século XIX, portanto, antes da implementação da CMS na produção de sementes híbridas, Watson (1893) apresentou resultados de experimentos comparando despendoamento manual e fertilização de milho. Os resultados mostraram que o despendoamento aumentava consideravelmente a produtividade de grãos (20 a 50%) e tornou claro que a produção de pólen na planta é um processo com substancial demanda por água, energia e nitrogênio, aumentando consideravelmente o dreno da planta. Por consequência, se as

plantas de milho não estão sendo forçadas a produzir uma quantidade abundante de grãos de pólen, recursos como nitrogênio e água podem ser revertidos para outras partes das plantas, como, por exemplo, os órgãos femininos que tem grande relevância na produção (KASER-SCHNEIDER, 2002).

Com o potencial de produção de sementes híbridas, o interesse no comportamento dos materiais macho estéreis quanto a produção de grãos cresceu rapidamente. Os melhoristas iniciaram a investigação desta característica comparando o despendoamento e o CMS quanto à produção de grãos e outras características agrônômicas (DUVICK, 1959; ROGERS; EDWARDSON, 1952; SANFORD, 1965).

No início, o alvo dos melhoristas eram os híbridos, porém, em um segundo momento as linhagens passaram a ter uma grande importância nos estudos (GROGAN; FRANCIS; SARVELLA, 1971). O sucesso da utilização da macho esterilidade na produção comercial de sementes depende, em grande parte, da capacidade de incorporação da característica na linhagem fêmea e do potencial de multiplicação de forma eficiente e econômica (PEREZ-PRAT; CAMPAGNE, 2002).

Embora na literatura seja observada notável inconsistência, muitos estudos têm referenciado aumento na produtividade de grãos quando utilizado sistemas CMS. Entretanto, muitos pesquisadores encontraram grande dependência dos resultados em função do genótipo e/ou ambiente utilizado (BRUCE; SANFORD; MYHRE, 1996; DUVICK, 1965; SANGOI; SALVADOR, 1996).

Comparando genótipos de milho macho estéreis com os seus isogênicos macho férteis, Weingartner et al. (2002) verificaram que genótipos macho estéreis foram em média 7,4% mais produtivos para grãos em relação ao isogênico fértil. Os autores atribuíram essa superioridade a realocação do

nitrogênio que deixa de ser consumido pela inflorescência masculina e passa a ser utilizado nas espigas.

Em um estudo realizado comparando diferentes métodos de despendoamento e o uso da macho esterilidade em milho tropical, Magalhães et al. (1999) verificaram que a macho esterilidade propiciou um aumento de 10% na produção comparado ao uso do despendoamento, mostrando que parte do gasto energético na produção do pólen pode ser revertido para a produção de grãos da linhagem.

Esses resultados mostraram que a macho esterilidade pode aumentar a produtividade de grãos nos genótipos, corroborando com resultados obtidos por Duvick (1965), Feil, Weingartner e Stamp (2003), Kaeser et al. (2003), Kalman, Pinter e Pinter (1985), Munsch et al. (2010), Rogers e Edwardson (1952) e Stamp et al. (2000).

Embora a explicação fisiológica para o aumento na produtividade de grãos promovido pelos genótipos macho estéreis não seja muito claro, é aceito que genótipos CMS consomem menos energia e nutrientes em relação ao macho fértil, podendo propiciar uma vantagem para os materiais CMS sobre plantas totalmente férteis (CRISWELL et al., 1974; KASER-SCHNEIDER, 2002). Alguns estudos sugerem que com a ausência de pólen, de 10 a 30 kg.ha⁻¹ de N pode ser economizado e utilizado, nos órgãos femininos, durante o período de florescimento (UHART, 1995).

Por outro lado, estudos desenvolvidos por Duvick (1958), Everett (1960), Kaser-Schneider (2002), Lim et al. (1974), Sangoi e Salvador (1996) e Stringfield (1958) não observaram efeito de CMS ou até mesmo efeitos negativos.

Parece claro que o efeito positivo, nulo ou negativo da macho esterilidade na produtividade de grãos, independentemente se for linhagem ou híbrido, depende dos genótipos envolvidos, grupos heteróticos e das condições

ambientais (MUNSCH et al., 2010; STAMP et al., 2000; WEINGARTNER et al., 2002).

Após o ataque do fungo *C. heterostrophus* nos EUA, houve uma queda significativa na produção de híbridos com o citoplasma T, e por consequência houve uma grande redução no número de publicações sobre macho esterilidade.

Atualmente tem sido renovado o interesse no uso de CMS na produção de milhos comerciais, especialmente considerando outras fontes de macho esterilidade que não estejam vinculadas a suscetibilidade a helmintosporiose (STAMP et al., 2000; WEINGARTNER et al., 2002).

2.3 Estabilidade e adaptabilidade em milho

Em função das diferentes condições de cultivo as quais são possíveis o cultivo de milho. É fundamental o estudo da estabilidade e adaptabilidade dos híbridos de milho visando a recomendação de genótipos superiores que consigam expressar seu potencial genético em função do ambiente.

2.3.1 Interação genótipos x ambientes

Na maioria dos programas de melhoramento genético de plantas a seleção de cultivares superiores é realizada com base em informações obtidas a partir do desempenho do fenótipo para o caráter considerado, semeadas em diferentes localidades, com diferentes condições edafoclimáticas e de manejo, em diferentes safras, constituindo assim a rede de ensaios (BECKER; LEON, 1988; CARNEIRO, 1998).

O fenótipo é o resultado da expressão de um componente genético, de um componente do ambiente ao qual este indivíduo se desenvolve e de um fator

adicional, denominado interação genótipos x ambientes (ALLARD, 1971), que ocorre quando os genótipos apresentam comportamento relativo não coincidente em função do ambiente, mostrando que os efeitos genéticos e ambientais não são independentes (SOUZA JÚNIOR; VENCOVSKY, 1989).

As interações se enquadram em duas diferentes naturezas, podendo ser simples quando não há diferenças nas classificações dos genótipos em função dos ambientes, isto é, mantém sua posição relativa apesar da presença da interação; e complexas quando o padrão de comportamento é alterado em função do ambiente (CARNEIRO, 1998). Mesmo com interações complexas há a possibilidade de encontrar genótipos estáveis com adaptação ampla, embora, no geral, este tipo de interação faz com que os genótipos apresentem adaptação a ambientes específicos (favoráveis ou desfavoráveis).

Quanto aos fatores ambientais que podem contribuir para a interação, estes podem ser agrupados em previsíveis que são aqueles permanentes do ambiente, como clima, tipo de solo, latitude e altitude, tratos culturais, entre outros; e em imprevisíveis que são aqueles que ocorrem com as flutuações climáticas atípicas, como: quantidade e distribuição de chuvas, oscilações de temperatura, ocorrência de geadas, de doenças e pragas, entre outros (ALLARD; BRADSHAW, 1964). Portanto, o ambiente representa um confundimento entre efeitos fixos (previsíveis) e aleatórios (imprevisíveis), podendo ser representado por um único fator ou pela combinação deles.

Apesar de ser um componente mensurado pela biometria, a interação genótipos x ambientes deve ser entendida como um efeito biológico em suas aplicações no melhoramento de plantas (CHAVES, 2001). Entretanto, deve-se ressaltar que a mensuração da interação GxA ocorre por meio de modelos estatísticos, juntamente com o entendimento dos efeitos biológicos visando o seu melhor entendimento.

Do ponto de vista biológico, a interação surge quando ocorre a expressão diferenciada de um mesmo conjunto gênico (alelos) em função do ambiente, ou então, pela expressão de conjuntos gênicos diferentes em ambientes distintos. Esse efeito proporciona uma expressão não coincidente dos alelos dos diferentes genes em função do ambiente (KANG; GAUCH JUNIOR, 1996).

A interação pode ser constituída por duas partes: uma denominada simples, determinada pela diferença de variabilidade entre os genótipos nos ambientes, e outra chamada complexa, dada pela falta de correlação entre os genótipos (CRUZ; REGAZZI, 1994). A interação reduz a correlação entre o fenótipo e o genótipo. Uma correlação baixa indica que o genótipo superior em um ambiente, não terá o mesmo desempenho em outro ambiente.

O conhecimento da interação genótipos x ambientes é de suma importância para os melhoristas e agricultores. Para os melhoristas, a interação torna necessário o desenvolvimento de híbridos específicos para determinado ambiente, havendo a necessidade de considerar o desempenho das futuras cultivares, em diferentes anos e locais, a fim de se ter conclusões mais consistentes. Para os agricultores os híbridos devem ter o mínimo de interação com locais e/ou anos, implicando em redução nos riscos da produção agrícola e garantia de lucros com a safra. Entretanto, a interação não deve ser vista apenas como um problema, mas sim uma oportunidade, uma vez que é possível explorar genótipos altamente responsivos em ambientes específicos.

Diante da possibilidade de mudança da posição relativa dos genótipos, ou ainda, na alteração da magnitude de suas diferenças, em função do ambiente, o conhecimento das causas genéticas e ambientais da interação genótipos x ambientes é essencial para aumentar a eficiência do programa de melhoramento (YAN; HUNT, 2001). Isso porque a maioria das características de importância para o melhoramento, entre as quais produção de grãos, é métrica, de herança

poligênica e muito influenciada pelo ambiente, com freqüente efeito significativo para interação genótipos x ambientes, dificultando o processo de seleção e a indicação de híbridos adaptados e estáveis para essas características (LILLEMO et al., 2004).

Apesar de a interação interferir no comportamento do genótipo para a maioria dos caracteres agronômicos, especialmente a produção de grãos, dada a sua importância, estimativas e análises de estabilidade têm sido realizadas preferencialmente com essa característica.

Numerosos métodos têm sido usados para estudar as causas das interações genótipos x ambientes. Entretanto, a forma mais comum tem sido feita aplicando-se análise de variância conjunta (ANAVA) no grupo de experimentos, empregando-se o teste F para mensurar a magnitude e a significância dos efeitos.

Na literatura científica há diversos relatos da constatação de interações genótipos x ambientes significativas, em experimentos de milho (GARBUGLIO et al., 2007; RIBEIRO; RAMALHO; FERREIRA, 2000; SCHMILDT et al., 2011).

A interação torna-se mais evidente se forem consideradas a diversidade de condições edafoclimáticas e técnicas de manejo que são praticadas no cultivo de milho no Brasil.

De todas as fases de um programa de melhoramento de plantas, a avaliação dos genótipos em diferentes ambientes representa, em geral, a mais trabalhosa e de maior custo. Um bom entendimento das interações genótipos x ambientes contribui para um ganho em eficiência no processo de obtenção e indicação de cultivares (CHAVES, 2001).

2.3.2 Estabilidade e adaptabilidade

Estudos sobre a interação genótipos x ambientes apesar de serem de grande importância para o melhoramento, não proporcionam informações pormenorizadas sobre o comportamento de cada genótipo perante as variações ambientais (CRUZ; REGAZZI; CARNEIRO, 2004).

A partir da ocorrência de interações significativas surgem técnicas estatístico - genéticas visando estimar a adaptabilidade e estabilidade dos genótipos, na tentativa de identificar aqueles que apresentam comportamento agrônomico altamente previsível, em função das variações do ambiente, e que sejam responsivos à melhoria do ambiente, em condições específicas ou amplas (CRUZ; REGAZZI; CARNEIRO, 2004; VENCOVSKY; BARRIGA, 1992).

Genótipos com ampla adaptabilidade e alta estabilidade para produção de grãos tem sido apreciados pelos melhoristas.

Na literatura científica existem diversas definições e interpretações para adaptabilidade e estabilidade, bem como diferentes métodos que permitem estimá-las. As principais diferenças entre os métodos estão nos parâmetros adotados para a sua avaliação, nos procedimentos biométricos adotados para avaliá-los (CRUZ; CARNEIRO, 2003). No entanto, na aplicação de qualquer método o primeiro problema que se apresenta é o conceito de estabilidade (GARBUGLIO, 2010).

Entre as definições empregadas, o método de Eberhart e Russel (1966) permite entender a adaptabilidade como a capacidade de um genótipo em aproveitar vantajosamente o estímulo do ambiente de maneira a assegurar um alto nível produtivo em todos os ambientes (adaptabilidade ampla) ou ambientes específicos (favoráveis ou desfavoráveis). Estabilidade estaria relacionada com a capacidade que o genótipo tem de mostrar um comportamento altamente

previsível em função do estímulo do ambiente (CRUZ; REGAZZI; CARNEIRO, 2004).

A estabilidade também pode ser referida como a consistência do ranqueamento relativo dos genótipos em um dado grupo de ambientes (YUE; ROOZEBOOM; SCHAPAUGH JUNIOR, 1997).

Para Becker e Léon (1988), a estabilidade pode ser dividida em dois tipos: estática, associando aqueles genótipos que apresentam desempenho constante com as variações ambientais, e dinâmicas, associando genótipos que apresentam um comportamento previsível ao longo das variações ambientais.

Alguns grupos de pesquisadores usam o termo estabilidade para referir-se à habilidade apresentada por certos genótipos para se adaptarem às flutuações climáticas ao longo de anos agrícolas, dentro de uma localidade (VENCOVSKY; BARRIGA, 1992). O termo adaptabilidade é empregado para designar a adaptação ecológica a diferentes ambientes, tais como locais.

De modo prático, a adaptabilidade representa a capacidade do genótipo em exibir um bom desempenho em determinado ambiente de cultivo, enquanto que a estabilidade se refere à capacidade que estes genótipos têm de não apresentar diferenças significativas desse comportamento ao longo dos anos. Dessa forma, um mesmo genótipo pode ter adaptabilidade específica ou ampla, mas baixa ou alta estabilidade.

O ideal seria obter um híbrido altamente produtivo, com adaptabilidade ampla e estável, independente do ambiente de cultivo. Entretanto, este fato é de limitada ocorrência, fazendo-se necessário o estudo do comportamento destes genótipos nestes ambientes (RAMALHO; SANTOS; ZIMMERMANN, 1993).

As técnicas estatístico-genéticas, destinadas à avaliação da adaptabilidade e estabilidade de grupos de materiais, são fundamentadas na existência de interações e se distinguem quanto aos conceitos utilizados nos procedimentos e aos princípios biométricos empregados na estimativa dos

parâmetros, além de diferirem na interpretação dos resultados (CRUZ; REGAZZI; CARNEIRO, 2004).

Dos métodos existentes, Cruz, Regazzi e Carneiro (2004) descreveram a existência de procedimentos baseados na análise de regressão linear simples, na análise de regressão múltipla, métodos não paramétricos, métodos multivariados e métodos que integram análise comum de variância (univariado) com análise de componentes principais (multivariado), a exemplo da análise AMMI. É interessante que o melhorista tenha conhecimento de tais técnicas para que possa identificar a mais apropriada à sua espécie e aos seus objetivos.

A escolha de um método de análise depende dos dados experimentais, principalmente os relacionados ao número de ambientes disponíveis, ao número de genótipos avaliados, da precisão requerida e do tipo de informação desejada, podendo-se considerar um método individualmente ou mesmo utiliza outro em seu complemento (CRUZ; REGAZZI; CARNEIRO, 2004).

Na cultura do milho há diversos trabalhos visando estimar parâmetros de adaptabilidade e de estabilidade por diferentes métodos, para produção de grãos em diferentes condições ecológicas de cultivo, principalmente na avaliação final e na recomendação de híbridos provenientes dos programas de melhoramento.

Os métodos baseados em regressão tem sido os mais utilizados no estudo da estabilidade. A proposta inicial foi desenvolvida por Yates e Cochran (1938), porém recebeu maior expressão com os métodos desenvolvidos por Eberhart e Russel (1966) e Finlay e Wilkinson (1963).

Esses métodos baseiam-se na análise de regressão linear unisegmentada, que mensuram a resposta de cada genótipo às variações ambientais. Entretanto, apesar do uso comum, esses métodos vêm sofrendo algumas críticas da comunidade acadêmica especialmente pelo fato do índice ambiental (I_j) não ser independente da variável resposta (Y_{ij}), devido ao índice ser estimado a partir da resposta média do ambiente (TOLER; BURROWS,

1998). Uma segunda crítica está relacionada ao uso de estimadores viesados dos coeficientes de regressão devido à variável independente ser mensurada com erros (STORCK; VENCOVSKY, 1994).

Verma, Charal e Murty (1978) propuseram um método baseado em um potencial padrão não linear. Os ambientes são separados em dois grupos (favorável e desfavorável), considerando o índice ambiental, e então, é ajustado um modelo de regressão linear simples e separado para cada um. Um ponto importante é que a classificação de ambiente pode não ser representativa quando considerados poucos ambientes (FERREIRA et al., 2006).

Diante desses argumentos, Silva e Barreto (1985) apresentaram um modelo de regressão linear bissegmentada. Posteriormente, Cruz, Torres e Vencovsky (1989) apresentaram uma extensão desse modelo, tornando-o operacionalmente mais simples e com propriedades estatísticas mais adequadas ao propósito do melhoramento. Pelas modificações o modelo passa a ser descontínuo na junção dos dois segmentos de reta de ambientes favoráveis e desfavoráveis. Por esse modelo o genótipo ideal apresenta alto desempenho médio de produtividade, alta estabilidade, pouco responsivo às condições ambientais adversas e capaz de responder positivamente quando as condições ambientais são melhoradas.

Entretanto, apesar das modificações, permanece a crítica quanto ao índice ambiental não ser independente da variável resposta (Y_{ij}) e o modelo pode ser inapropriado se o número de ambientes é pequeno sendo que as inferências podem ser afetadas pela heterogeneidade das variâncias dos erros ambientais.

Tentando explorar melhor as informações contidas nos ambientes, Crossa (1990) sugere a aplicação de métodos multivariados. Desse modo, recomenda técnicas como a análise de componentes principais (ACP), a análise de agrupamentos e o procedimento Additive Main Effects and Multiplicative Interaction (AMMI). Segundo Vargas et al. (1999), a análise AMMI é mais

parcimoniosa que o modelo de análise de variância tradicional em descrever a interação GxA e fornece melhor escopo para modelar e interpretar interação GxA que a regressão linear simples com base nas médias ambientais, pois a interação GxA pode ser modelada em mais de uma dimensão.

Segundo Gauch e Zobel (1996), esta análise pode ajudar tanto na identificação de genótipos de alta produtividade e largamente adaptados, como no chamado zoneamento agrônômico, com fins de recomendação regionalizada e seleção de locais teste.

De acordo com Souza (2004), quando há informações adicionais de caracterização dos ambientes, tais como, por exemplo, meteorológicas ou níveis de adubação, elas podem ser correlacionadas com os escores genotípicos e ambientais estimados pelo AMMI por meio de sobreposição no biplot AMMI (EEUWIJK, 1995). Contudo, as informações de variáveis externas não podem ser utilizadas diretamente pelo modelo AMMI (GARBUGLIO, 2010).

Uma modificação da análise AMMI foi apresentada por Yan et al. (2000), que busca agrupar o efeito de genótipo, que é um efeito aditivo, com a interação GxA, efeito multiplicativo, e submeter estes efeitos à análise de componentes principais, chamadas de Sites Regression ou SREG.

A metodologia GGE (Genotype main effect plus genotype by environment interaction)biplot tem sido descrita como revolucionária na abordagem como análise gráfica bidimensional para melhoramento e pesquisa genética, incluindo, também, análise de estabilidade e adaptabilidade na recomendação de cultivares, destacando-se das demais técnicas pela sua alta eficiência estatística na explicação da interação GxA (SOUZA, 2004).

Esta técnica integra a análise de variância com componentes principais e demonstra eficiência superior na explicação de uma maior proporção da soma de quadrados da interação, quando comparada com a análise de variância e regressão conjunta (YAN et al., 2000).

Dentro do contexto de estudos da interação GxA por meio de técnicas multivariadas, outra metodologia que vem sendo utilizada nos últimos anos é a análise de fatores (AF). Entre outras vantagens, aplicação desta técnica nos estudos de estratificação dos ambientes permite reduzir um número elevado de variáveis originais a um pequeno número de variáveis abstratas, também chamadas fatores (CRUZ; CARNEIRO, 2003).

Em função dos estudos de estratificação do ambiente e de estabilidade e adaptabilidade estarem sendo feitas de maneira independentes, Murakami e Cruz (2004) propuseram um método que contempla, simultaneamente essas análises por meio do princípio da similaridade da performance fenotípica, baseada na técnica de análise de fatores (AF).

Na utilização da AF destinada à estratificação de ambientes, deve-se interpretar o significado de cada fator e avaliar o interesse por ele. São analisados os elementos ou cargas fatoriais, identificando, para cada variável (que neste caso representa um determinado ambiente), os fatores com coeficientes de ponderação próximo da unidade. O agrupamento de ambientes é realizado, portanto, a partir das informações sobre a magnitude das cargas fatoriais finais (obtidas após rotações). Cargas fatoriais maiores ou iguais a 0,7, em valor absoluto, indicam ambientes com altas correlações e são agrupadas dentro de cada fator; cargas fatoriais com valores baixos ($\leq 0,5$) indicam que o respectivo ambiente não deva pertencer ao grupo de cargas fatoriais com valores intermediários e não garantem nenhuma definição de agrupamento.

Antes de serem obtidas as cargas fatoriais que permitirão identificar o melhor agrupamento de ambientes, deve-se estabelecer o número de fatores a serem analisados. O número de autovalores devem ser maiores ou iguais a 1,0. No entanto, nos casos que a proporção da variabilidade explorada pelos autovalores maiores que 1,0 for baixa, podem ser considerados mais fatores até

que se atinja uma proporção adequada da variabilidade, geralmente próximo de 80% da variação total.

A análise de adaptabilidade fenotípica, baseada na análise de fatores, é realizada graficamente por meio de escores obtidos em relação aos fatores. De acordo com Murakami e Cruz (2004), nos quadrantes II e IV, estarão os genótipos com adaptabilidade específica ao ambientes, agrupados em cada um dos dois fatores utilizados na plotagem gráfica. No quadrante I, estarão os genótipos de adaptabilidade ampla, ou seja, apresentarão escores altos para os ambientes agrupados nos dois fatores, simultaneamente. No quadrante III estarão os genótipos de baixa performance, possíveis de não indicação de cultivo para os ambientes em estudo.

Garbuglio (2010) estudando a adaptabilidade de genótipos de milho e realizando a estratificação em dez ambientes no Estado do Paraná, constataram que a adaptabilidade, analisada por meio de plotagens gráficas a partir dos escores fatoriais, apresentadas pelo método FGGA mostrou-se eficiente tanto no processo de estratificação ambiental quanto nos estudos de adaptabilidade dos genótipos de milho.

REFERÊNCIAS

- AARTS, M. G. M. Molecular characterisation of the CER1 gene of *Arabidopsis* involved in epicuticular wax biosynthesis and pollen fertility. **Plant Cell**, Rockville, v. 7, n. 12, p. 2115-2127, Jan. 1995.
- ALLARD, R. W. **Princípios do melhoramento genético de plantas**. São Paulo: E. Blücher, 1971. 381p.
- ALLARD, R. W.; BRADSHAW, A. D. Implications of genotype-environmental interactions in applied plant breeding. **Crop Science**, Madison, v.4, n.5, p. 503-507, 1964.
- ANDERSON, I. C. Possible practical applications of chemical pollen control in corn and sorghum and seed production. In: ANNUAL CORN AND SORGHUM RESOURCES CONFERENCE, 26., 1972, Chicago. **Proceedings...** Chicago: University of Chicago, 1972. p.22-26.
- BECKER, H. C.; LEON, J. Stability analysis in plant breeding. **Plant Breeding**, Berlin, v. 101, n.1, p.1-23, Feb. 1998.
- BECKETT, J. B. Classification of male-sterile cytoplasm in maize (*Zea mays* L.). **Crop Science**, Madison, v. 11, p. 724-727, 1971.
- BRAUN, C. J.; BROWN, G. G.; LEVINGS, C. S. Cytoplasmic male sterility. In: HERMAN, R.G. (Ed.). **Cell organelles**. New York: Wien, 1992. p. 219-245.
- BRUCE, R. R.; SANFORD, J. O.; MYHRE, D. L. Soil water and nitrogen influence on growth and fruiting of a cytoplasmic male-sterile corn hybrid and its fertile counterpart. **Agronomy Journal**, Madison, v. 58, n. 6, p. 631-634, Nov./Dec. 1996.
- BUDAR, F.; TOUZET, P.; PAEPE, R. The nucleo-mitochondrial conflict in cytoplasmic male sterilities revisited. **Genetica**, Dordrecht, v.117, n. 12, p.3-16, Dec. 2003.
- BUSO, G. S. C. et al. Marcadores microssatélites em espécies vegetais. **Revista Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v. 1, n. 1, p. 36-50, jan./jun. 2003.

CARNEIRO, P. C. S. **Novas metodologias de análise da adaptabilidade e estabilidade de comportamento**. 1998. 168p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 1998.

CHAVES, L. J. Interação genótipos com ambientes. In: NASS, L. L. et al.(Ed.). **Recursos genéticos e melhoramento: plantas**. Rondonópolis: Fundação MT, 2001. p.430-460.

CRISWELL, J. G. Effect of cytoplasmic male sterility on accumulation and translocation of ^{14}C -labelled assimilates in corn. **Crop Science**, Madison, v.14, p.252-254, 1974.

CROSSA, J. Statistical analyses of multilocations trials. **Advances in agronomy**, San Diego, v.44, p. 55-85, Dec. 1990.

CROW, J.F. 90 years ago: the beginning of hybrid maize. **Genetics**, Austin, v. 148, n. 3, p. 923-928, Mar.1998.

CRUZ, C. D.; CARNEIRO, P. C. S. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. Viçosa, MG: UFV, 2003. v. 2, 585 p.

CRUZ, C. D.; REGAZZI, A. J. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. Viçosa, MG: UFV, 1994. 390p.

CRUZ, C. D.; REGAZZI, A. J.; CARNEIRO, P. C. S. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. Viçosa, MG: UFV, 2004. v. 1, 480p.

CRUZ, C. D.; TORRES, R. A.; VENCOVSKY, R. An alternative approach to the stability analysis proposed by Silva and Barreto. **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, v.12, n. 2, p. 567-580, maio 1989.

CUI, X.; WISE, R. P.; SCHNABLE, P. S. The rf2 nuclear restorer gene of male-sterile T cytoplasm maize. **Science**, New York, v. 272, n. 5, p.1334-1336, May 1996.

DARRAH, L. L.; ZUBER, M. S. United States farm maize germplasm base and commercial breeding strategies. **Crop Science**, Madison, v. 26, p. 1109-1113, 1986.

DEWEY, R. E.; KORTH, K. L. Molecular aspects of cytoplasmic male sterility in maize. In: BAJAJ, Y. P. S. (Ed.). **Maize**. Berlin: Springer-Verlag, 1994. p. 403-416.

DEWEY, R. E.; LEVINGS III, C. S.; TIMOTHY, D. H. Novel recombinations in the maize mitochondrial genome produce a unique transcriptional unit in the Texas male-sterile cytoplasm. **Cell**, Cambridge, v. 44, p.439-449, 1986.

DEWEY, R. E.; TIMOTHY, D. H.; LEVINGS III, C. S. Chimeric mitochondrial genes expressed in the C male-sterile cytoplasm of maize. **Current Genetics**, New York, v. 20, n. 6, p. 475-482, Dec. 1991.

DOEBLEY, J.; SISCO, P. On the origin of maize male sterile cytoplasm: it is completely unimportant, that is why it is so interesting. **Maize Genetics Cooperation Newsletter**, Illinois, v.6, p. 147-148, 1989.

DUVICK, D. N. Cytoplasmic pollen sterility in corn. **Advances in Genetics**, New York, v. 13, p. 1-56, 1965.

_____. The use of cytoplasmic male sterility in hybrid seed production. **Economic Botanic**, Bronx, v. 13, p. 167-195, 1959.

_____. Yields and other agronomic characteristics of cytoplasmically pollen sterile corn hybrids, compared to their normal counterparts. **Agronomy Journal**, Madison, v. 50, p. 121-125, 1958.

EBERHART, S. A.; RUSSEL, W. A. Stability parameters for comparing varieties. **Crop Science**, Madison, v.6, n.1, p.36-40, 1966.

EDWARDSON, J. R. The restoration of fertility to cytoplasmic male-sterile corn. **Agronomy Journal**, Madison, v. 47, p. 457-461, 1955.

EEUWIJK, F. A. van. Linear and bilinear models for the analyses of multienvironment trials: I., an inventory of models. **Euphytica**, Wageningen, v. 84, n. 1, p. 1-7, Feb. 1995.

EVERETT, H.L. Effect of cytoplasm and Rf gene in maize. **Agronomy Journal**, Madison, v. 52, p. 215-216, 1960.

EYEDIN, N.; LAMOTTE, C.E.; ANDERSON, I.C. Auxin levels in tassel of maize cultivars differ in tolerance to high population densities. **Canadian Journal Plant Science**, Ottawa, v.60, n. 5, p.1427-1430, May 1980.

FEIL, B.; WEINGARTNER, U.; STAMP, P. Controlling the release of pollen from genetically modified maize and increasing its grain yield by growing mixtures of male-sterile and male-fertile plants. **Euphytica**, Amsterdam, v. 130, n. 2, p. 163-165, Mar./Apr. 2003.

FERNANDES, J. S. C.; FRANZON, J. F. Thirty years of genetics progress in maize (*Zea mays* L.) in a tropical environment. **Maydica**, Bergamo, v.42, n.1, p.21-27, 1997.

FERREIRA, D. F. et al. Statistical models in agriculture: biometrical methods for evaluating phenotypic stability in plant breeding. **Cerne**, Lavras, v. 12, n. 4, p. 373-388, dez. 2006.

FINLAY, K. W.; WILKINSON, G. N. The analysis of adaptation in a plant breeding program. **Australian Journal of Agriculture Research**, East Melbourne, v. 14, n. 6, p. 742-754, Dec. 1963.

FLEMING, A. A. Effects of male cytoplasm on inheritance in hybrid maize. **Crop Science**, Madison, v. 15, p. 570-573, 1975.

FOOD AND AGRICULTURE OF THE UNITED NATIONS. **FAO STAT agriculture database**. Disponível em:
<<http://apps.fao.org/page/collections?subset=agriculture>>. Acesso em: 10 maio 2010.

GABAY-LAUGHNAN, S. et al. Molecular-genetic characterization of CMS-S restorer-of-fertility alleles identified in Mexican maize and teosinte. **Genetics**, Austin, v.166, n. 2, p. 959-970, Mar./Apr. 2004.

GARBUGLIO, D. D. **Metodologia de estratificação ambiental e adaptabilidade via análise de fatores associada aos efeitos genotípicos e de interação genótipos por ambientes**. 2010. 105 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.

GARBUGLIO, D. D. et al. Análise de fatores e regressão bissegmentada em estudos de estratificação ambiental e adaptabilidade em milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.42, n.2, p.183-191, fev. 2007.

GAUCH, H. G.; ZOBEL, R. W. AMMI analysis of yield trials. In: KANG, M. S.; GAUCH JUNIOR, H. G. (Ed.). **Genotype-by-environment proved and under what conditions this can be most environment interaction**. Boca Raton: CRC, 1996. p. 1-40.

GLOVER, J. et al. Cloning and characterisation of *MS5* from *Arabidopsis*: a gene critical in male meiosis. **Plant Journal**, Oxford, v.15, n. 8, p. 345-356, Aug. 1998.

GROGAN, C. O.; FRANCIS, C. A.; SARVELLA, P. A. Effects of cytoplasmic male sterility and restoring factors on yield and morphology in inbred and hybrid maize. **Crop Science**, Madison, v. 11, p. 295-297, 1971.

HAVEY, M. The use of cytoplasmic male sterility for hybrid seed production. In: DANIELL, H.; CHASE, C. (Ed.). **Molecular biology and biotechnology of plant organelles**. Berlin: Springer, 2004. p. 617-628.

HUNTER, R. B.; DAYNARD, T. B.; HULME, D. J. Effect of tassel removal on grain yield of corn (*Zea mays* L.). **Crop Science**, Madison, v.9, p.405-406, 1969.

IGNJATOVIC-MICIC, D. et al. Identification of sterile cytoplasm (CMS) in maize by using specific mtDNA primers. **Genetika**, Beograd, v. 38, n. 3, p. 227-233, 2006.

JANSKA, H. et al. Stoichiometric shifts in the common bean mitochondrial genome leading to male sterility and spontaneous reversion to fertility. **Plant Cell**, Rockville, v.10, n. 7, p. 1163-1180, July 1998.

JONES, D.F.; STINSON, H.T.; KHOO, U. Pollen restoring genes. **Connecticut Agricultural Experiment Station Bulletin**, New Haven, v.610, n. 1, p.1-43, Jan./Mar. 1957.

JOSEPHSON, L. M.; ARNOLD, M. T. Genetics and inheritance of fertility restoration of male sterile cytoplasm in corn. **Procedure Annual Corn Sorghum Research Conference**, Washington, v. 33, p. 48-59, 1978.

KAESER, O. et al. Impact of different CMS types on grains yield of dent x flint hybrids of maize (*Zea mays* L.). **Maydica**, Bergamo, v.48, n. 1, p.15-20, Jan./Mar. 2003.

KALMAN, L.; PINTER, L.; PINTER, Z. Comparative study on major agronomic characteristics of male fertile (normal) and cytoplasmic male sterile analogues in maize (*Zea Mays* L.). **Acta Agronomica Academiae Scientiarum Hungaricae**, Budapest, v. 34, p. 128-134, 1985.

KAMPS, T. L.; MCCARTY, D. R.; CHASE, C. D. Gametophyte genetics in *Zea mays* L.: dominance of a restoration of fertility allele (*Rf3*) in diploid pollen. **Genetics**, Austin, v. 142, n. 3, p. 1001-1007, Mar. 1996.

KANG, N. S.; GAUCH JUNIOR, H. G. **Genotype by environment interaction**. New York: CRC, 1996. 416p.

KASER-SCHNEIDER, O. **Physiological and agronomic traits of cytoplasmic male sterility in maize (*Zea mays* L.) and its molecular discrimination**. 2002. 89p. Thesis (Ph.D. in Natural Sciences) - Swiss Federal Institute of Technology Zurich, Zurich, 2002.

KAUL, M. L. H. **Male sterility in higher plants**. Berlin: Springer, 1988. 1005 p.

LAUGHNAN, J. R.; GABAY-LAUGHNAN, S. Cytoplasmic male sterility in maize. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, v. 17, p. 27-48, 1983.

LEVINGS, C. S. The Texas cytoplasm of maize: cytoplasmic male sterility and disease susceptibility. **Science**, New York, v. 250, n. 6, p. 942-947, June 1990.

_____. Thoughts on cytoplasmic male sterility in cms-T maize. **Plant Cell**, Rockville, v. 5, n. 10, p.1285-1290, Oct. 1993.

LILLEMO, M. et al. Associations among international CIMMYT bread wheat yield testing locations in high rainfall areas and their implications for wheat breeding. **Crop Science**, Madison, v.44, n. 1, p.1163-1169, Jan./June 2004.

LIM, S. M. et al. Comparative grain yields of corn hybrids in normal and in Texas male-sterile cytoplasm (cms-T) infected with *Helminthosporium maydis* race T and disease components of cms-T corn hybrids. **Crop Science**, Madison, v. 14, p. 190-195, 1974.

LIU, F. et al. Mitochondrial aldehyde dehydrogenase activity is required for male fertility in maize. **Plant Cell**, Rockville, v. 13, n. 5, p. 1063-1078, May 2001.

LIU, Z. et al. A PCR Assay for rapid discrimination of sterile cytoplasm types in maize. **Crop Science**, Madison, v. 42, n. 2, p. 566-569, Mar./Apr. 2002.

MACKENZIE, S. The influence of mitochondrial genetics in crop breeding strategies. **Plant Breeding Review**, Berlin, v. 25, n. 6, p. 115-138, June 2004.

MAGALHÃES, P. C. et al. Efeitos de diferentes técnicas de despendoamento na produção de milho. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 56, n. 1, p.77-82, jan. 1999.

MEER, I. M. van der et al. Antisense inhibition of flavonoid biosynthesis in *Petunia* anthers results in male sterility. **Plant Cell**, Rockville, v. 4, n. 3, p. 253-262, Mar. 1992.

MOFFATT, B. A.; SOMMERVILLE, C. R. Positive selection for male-sterile mutants of *Arabidopsis thaliana* lacking adenine phosphoribosyltransferase activity. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 86, p. 1150-1154, 1988.

MUNSCH, M. A. et al. Grain yield increase and pollen containment by plus-hybrids could improve acceptance of transgenic maize. **Crop Science**, Madison, v. 50, n. 3, p. 909-919, May/June 2010.

MURAKAMI, D. M.; CRUZ, C. D. Proposal of methodologies for environment stratification and analysis of genotype adaptability. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Londrina, v. 4, n. 1, p. 7-11, jan. 2004.

NAKAJIMA, Y. et al. Genetic variation of petaloid male-sterile cytoplasm of carrots revealed by sequence-tagged sites (STSs). **Theoretical Applied Genetic**, Berlin, v. 99, n. 2, p. 837-843, Mar./Apr. 1999.

NEWTON, K. Molecular correlates of cytoplasmic types. **Maize Genetics Crop Newsletter**, Illinois, v. 63, p. 197-200, 1989.

ORTIZ, R. **Science week**. Ciudad del Mexico: El Batan, 2008. 218 p.

PATERNIANI, E.; CAMPOS, M.S. Melhoramento do milho. In: BORÉM, A. (Ed.). **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa, MG: UFV, 1999. p. 510-581.

PEREZ-PRAT, E.; CAMPAGNE, M. M. L. Hybrid seed production and the challenge of propagating male-sterile plants. **Trends in Plant Science**, Oxford, v.7, n. 5, p. 199-203, May 2002.

POEHLMAN, J. M.; SLEPER, D. A. **Breeding field crops**. Ames: Iowa State University, 1995. 510 p.

RAMALHO, M.A.P.; SANTOS, J.B.; ZIMMERMANN, M.J.O. **Genética quantitativa em plantas autógamas**: aplicações ao melhoramento do feijoeiro. Goiânia: UFG, 1993. 271p.

RIBEIRO, P. H. E.; RAMALHO, M. A. P.; FERREIRA, D. F. Adaptabilidade e estabilidade de genótipos de milho em diferentes condições ambientais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.35, n.11, p.2213-2222, nov. 2000.

ROGERS, J. S.; EDWARDSON, J. R. The utilization of cytoplasmic male-sterile inbreds in the production of corn hybrids. **Agronomy Journal**, Madison, v. 44, p. 8-13, 1952.

ROY, A.; SARKAR, K. Cytoplasmic male sterility in maize. In: SARKAR, K.; SACHAN, J. K.; SINGH, N. N. (Ed.). **Maize genetics perspectives**. New Delhi: Indian Society of Genetics and Plant Breeding, 1991. p. 132-153.

RUIZ, O.; DANIELL, H. Engineering cytoplasmic male sterility viz., chloroplast genome by expression of ketothiolase. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 138, n. 7, p. 1232-1246, July 2005.

SANFORD, J.O. Influence of male-sterility on nitrogen utilization in corn, *Zea mays* L. **Agronomy Journal**, Madison, v. 57, p.580-583, 1965.

SANGOI, L.; SALVADOR, R. Agronomix performance of male-sterile and fertile maize genotypes at two plant populations. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.26, n.3, p.377-383, maio/jun. 1996.

SARRIA, R. et al. A cytoplasmic male sterility associated mitochondrial peptide in common bean is post transcriptionally regulated. **Plant Cell**, Rockville, v.10, n. 7, p. 1217-1228, July 1998.

SATO, Y. PCR amplification of CMS-specific mitochondrial nucleotide sequences to identify cytoplasmic genotypes of onion (*Allium cepa*L.). **Theoretical Applied Genetic**, Berlin, v. 96, n. 3, p. 367-370, Mar. 1998.

SCHMILDT, E. R. et al. Avaliação de metodologias de adaptabilidade e estabilidade de cultivares milho. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 33, n. 1, p. 51-58, 2011.

SCHNABLE, P. S.; WISE, R. P. The molecular basis of cytoplasmic male sterility and fertility restoration. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 3, n. 5, p. 175-180, May 1998.

SILVA, J.G. C.; BARRETO, J. N. Aplicação da regressão linear segmentada em estudos da interação genótipo x ambiente. In: SIMPÓSIO DE EXPERIMENTAÇÃO AGRÍCOLA, 1., 1985, Piracicaba. **Anais...**Piracicaba: ESALQ, 1985. p. 49-50.

SISCO, P. H. Duplications complicate genetic mapping of Rf4, a restorer gene for cms-C cytoplasmic male sterility in corn. **Crop Science**, Madison, v. 31, n. 5, p. 1263-1266, Sept. 1991.

SISCO, P. H. et al. Fertility restoration and mitochondrial nucleic acids distinguish at least five subgroups among Cms-S cytoplasmic male sterility of maize (*Zea mays* L.). **Theoretical Applied Genetic**, Berlin, v. 71, n. 1, p. 5-15, 1985.

SOFI, P. A.; RATHER, A. G.; WANI, S. A. Genetic and molecular basis of cytoplasmic male sterility in maize. **Communications in Biometry and Crop Science**, Meghalaya, v.2, n. 1, p. 49-60, July 2007.

SOUZA, H. N. **Análise AMMI e SREG da interação genótipos x ambientes em milho**. 2004. 106 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2004.

SOUZA JÚNIOR, C. J.; VENCOVSKY, R. Covariância entre parentes na presença da interação genótipos x ambientes. In: SIMPÓSIO DE ESTATÍSTICA APLICADA A EXPERIMENTAÇÃO AGRONÔMICA, 3., 1989, Lavras. **Resumos...**Lavras: ESAL, 1989. p.50-51.

STAMP, P. et al. Increase in the yield of cytoplasmic male sterile maize revisited. **Crop Science**, Madison, v.40, n. 1, p.1586-1587, Jan./Feb. 2000.

STORCK, L.; VENCOVSKY, R. Stability analysis based on a bi-segmented discontinuous model with measurement errors in the variables. **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, v. 17, n.1, p. 75-81, jan. 1994.

STRINGFIELD, G. H. Fertility restoration and yields in maize. **Agronomy Journal**, Madison, v. 50, p. 215-218, 1958.

TOLER, J. E.; BURROWS, P. M. Genotype performance over environmental arrays: a non-linear grouping protocol. **Journal of Applied Statistics**, Abingdon, v. 25, n.1, p. 131-143, Feb. 1998.

TROYER, A. F. Adaptedness and heterosis in corn and mule hybrids. **Crop Science**, Madison, v. 46, n. 2, p.528-543, Mar./Apr. 2006.

UHART, S.A. Nitrogen deficiency in maize: I, effects on crop growth, development, dry matter partitioning, and kernel set. **Crop Science**, Madison, v. 35, n. 12, p.1376-1383, Dec. 1995.

ULLSTRUP, A. J. The impact of the southern corn leaf blight epidemics of 1970-1971. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 10, p. 37-50, 1972.

VARGAS, W. et al. Using partial least squares regression, factorial regression, and AMMI models for interpreting genotype-by-environment interaction. **Crop Science**, Madison, v.39, n. 4, p. 955-967, July 1999.

VENCOVSKY, R.; BARRIGA, P. **Genética biométrica no fitomelhoramento**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1992. 486p.

VERMA, M. M.; CHAHAL, G.S.; MURTY, B. R. Limitations of conventional regression analysis: a proposed modification. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 53, n. 2, p. 89-91, Sept. 1978.

WANG, Y. F.; HUANG, J. Y.; YANG, J. S. Progress in the study of producing reversible male sterile line by genetic engineering. **Hereditas**, Lund, v.33, n. 4, p. 40-47, Apr. 2011.

WATSON, G. C. Corn-detasselling. **Experiment Station Bulletin**, Illinois, v.61, p.312-316, 1893.

WEIDER, C. **Analysis of multiple aspects of cytoplasmic male sterility (CMS) for its use in maize (*Zea mays* L.) cultivation**. 2008. 81 p. Thesis (Ph.D. in Sciences) - Swiss Federal Institute of Technology Zurich, Zurich, 2008.

WEIDER, C. et al. Stability of cytoplasmic male sterility in maize under different environmental conditions. **Crop Science**, Madison, v. 49, n. 1, p. 77-84, Jan. 2009.

WEINGARTNER, U. **Combined effect of male sterility and xenia on grain yield and yield components in maize (*Zea mays* L.)**. 2002. 134p. Thesis (Ph.D. in Sciences) - Swiss Federal Institute of Technology Zurich, Zurich, 2002.

WEINGARTNER, U. et al. Combining cytoplasmic male sterility and xenia increases grain yield of maize hybrids. **Crop Science**, Madison, v.42, n. 2, p. 1848-1856, Mar./Apr. 2002.

WEN, L. et al. A nuclear restorer-of-fertility mutation disrupts accumulation of mitochondrial ATP synthase subunit in developing pollen of S male-sterile maize. **Genetics**, Maryland, v. 165, n. 10, p. 771-779, Oct. 2003.

WISE, R. P.; DILL, C. L.; SCHNABLE, P. S. *Mutator*-induced mutations of the *rf1* nuclear fertility restorer of T-cytoplasm maize alter the accumulation of T-*urf13* mitochondrial transcripts. **Genetics**, Austin, v. 143, n. 3, p. 1383-1394, July 1996.

WISE, R. P. et al. Mitochondrial transcript processing and restoration of male fertility in T-cytoplasm maize. **Journal of Heredity**, Washington, v. 90, n. 3, p. 380-385, Mar. 1999.

WYCH, R. D. Production of hybrid seed corn. In: SPRAGUE, G. F.; DUDLEY, J. W. (Ed.). **Corn and corn improvement**. Madison: American Society of Agronomy, 1988. p. 565-608.

YAN, W. et al. Cultivar evaluation and mega-environment investigation based on the GGE biplot. **Crop Science**, Madison, v. 40, n. 3, p. 597-605, May 2000.

YAN, W.; HUNT, L. A. Interpretation of genotype x environment interaction for winter wheat yield in Ontario. **Crop Science**, Madison, v.4, n. 1, p.19-25, Jan. 2001.

YATES, F.; COCHRAN, W. G. The analysis of group of experiments. **Journal of Agricultural Science**, Cambridge, v.28, n.4, p. 556-580, Oct. 1938.

YUE, G. L. et al. Evaluation of soybeans cultivars using parametric and nonparametric stability estimates. **Plant Breeding**, Berlin, v.11, n.3, p.271-277, 1997.

ZABALA, G.; GABAY-LAUGHNAN, S.; LAUGHNAN, J. R. The nuclear gene *Rf3* affects the expression of the mitochondrial chimeric sequence R in S-type male sterility in maize. **Genetics**, Austin, v.147, n. 2, p.847-860, Oct. 1997.

CAPÍTULO 2 Eficiência e estabilidade da macho esterilidade em linhagens e híbridos de milho

RESUMO

O presente estudo foi realizado com o objetivo de avaliar quatro linhagens macho estéreis e cinco híbridos provenientes de linhagens macho estéreis, quanto à eficácia e a estabilidade da macho esterilidade em diferentes ambientes. Os genótipos foram avaliados em quatro ambientes, durante o ano de 2011. Os resultados revelaram diferenças significativas entre os genótipos e a presença de interação GxA. A caracterização molecular mostrou que todas as linhagens e os híbridos possuem o citoplasma macho-estéril S. As linhagens L1, L2, L3 e L4 se destacaram por apresentar acima de 92% em média de plantas macho estéreis, enquanto que os híbridos H1, H2, H3, H4 e H5 apresentaram baixas porcentagens de plantas machos estéreis (12,6% em média). A porcentagem de plantas macho estéreis das linhagens variou com o ambiente, porém, é elevada, e por isso as linhagens L1, L2, L3 e L4 podem ser utilizadas em campos de produção de sementes, associado a formas adicionais de despendoamento mais simples e menos danosas à planta. Os híbridos H1 e H5 destacaram-se quanto a quantidade de pólen viável, mostrandopotencial para ser utilizado em lavouras comerciais.

Palavras-chave: CMS-S. Interação GxA. Pólen.

ABSTRACT

This study was conducted with the objective of evaluating efficiency and male-sterility stability of four male-sterile inbred lines and five hybrids derived from the male-sterile inbred lines, in different environments. The genotypes were evaluated in four environments during the year 2011. The results revealed significant differences between genotypes and the presence of G x E interaction. Molecular characterization showed that all inbred lines and hybrids have the S cytoplasm male-sterile. The lines L1, L2, L3 and L4 were highlighted for presenting above 92% average of male-sterile plants, while the hybrids H1, H2, H3, H4 and H5 presented low percentages of male-sterile plants (12.6% average). The percentage of male-sterile plants of the inbred lines varied with the environment, however, it was elevated, and therefore the lines L1, L2, L3 and L4 may be used in seed production fields, associated with additional forms of simpler and less harmful detasseling. The hybrids H1 and H5 stood out due to the high amount of viable pollen produced, showing a potential for being used in commercial crops.

Keywords: CMS-S. G x E interaction. Pollen.

1 INTRODUÇÃO

O milho é um dos principais cereais produzidos e consumidos no mundo, sendo uma importante *commodity*, com grande representação na economia interna brasileira.

Atualmente a demanda por altos níveis de produtividade tem sido um desafio constante aos produtores, que em busca desse objetivo vem utilizando modernas tecnologias, que envolvem maquinários, produtos químicos para proteção das lavouras e uso de sementes híbridas com qualidade que propiciem um retorno ao investimento. Acima de 85% do milho semeado no Brasil na safra 2010/11 foiseamente híbrida, que entre outros benefícios, propiciam altos níveis de produção, resistência ao acamamento, às doenças e uniformidade da lavoura (PEREZ-PRAT; CAMPAGNE, 2002).

A produção da semente híbrida necessita de total controle no direcionamento da polinização (PEREZ-PRAT; CAMPAGNE, 2002). Nesse sentido, as técnicas que vem sendo empregadas pelas empresas produtoras de sementes são o despendoamento manual e/ou mecânico (MAGALHÃES et al., 1999). Entretanto, essas atividades além de terem um alto custo, a qualidade da semente pode ser comprometida em função dos materiais genéticos envolvidos e condições ambientais, podendo ainda acarretar em prejuízos quando ocorre o arranquio excessivo das folhas.

Como alternativa para a obtenção de sementes híbridas, tem sido considerado pelos programas de melhoramento o desenvolvimento de linhagens elites com macho esterilidade genético-citoplasmática. Por esse sistema, embora ocorra à formação da inflorescência masculina, não há a produção de grãos de pólen, ou os polens produzidos não são funcionais, enquanto que a fertilidade dos órgãos femininos não é afetada (SCHNABLE; WISE, 1998; WEIDER et al., 2009). Devido à ausência de grãos de pólen viáveis, conseqüentemente as

linhagens fêmeas não são autofecundadas e as sementes produzidas serão provenientes do cruzamento com o outro parental que preferencialmente deve ter os alelos restauradores.

Para alguns autores, a macho esterilidade tem sido descrita como o principal método a ser utilizado na produção de sementes híbridas, especialmente por facilitar na logística, por não danificar as plantas e por não necessitar de mão-de-obra para o despendoamento dos campos de produção (MAGALHÃES et al., 1999).

Em milho os tipos de macho esterilidade genético-citoplasmático são definidos de acordo com o gene restaurador específico (genes Rf) que está associado ao citoplasma macho-estéril. Existem três principais tipos de citoplasma: o T (ROGER; EDWARDSON, 1952), o S (JONES; STINSON; KHOO, 1957) e o C (BECKETT, 1971). Embora, o tipo T tenha sido o mais utilizado entre as décadas de 1950 e 70 do século XX, devido a sua suscetibilidade a toxina produzida pelo patógeno *Cochliobolus heterostrophus* e a grande epidemia de helmintosporiose nos EUA no início da década de 70 (ULLSTRUP, 1972), sua utilização foi descontinuada pelos melhoristas e passou-se a buscar outras fontes de macho esterilidade, entre as quais os tipos S e C (SCHNABLE; WISE, 1998).

Uma importante etapa no desenvolvimento de linhagens macho estéreis é a avaliação da eficiência e estabilidade da esterilidade na linhagem, e posteriormente, no híbrido produzido. Nas linhagens é necessário avaliar o seu desempenho *per se* em diferentes ambientes, como safras, anos e locais, visando comparar além do desempenho produtivo, a capacidade de “manter” a macho esterilidade em diferentes ambientes, especialmente considerando aqueles que são utilizados para produção comercial da semente híbrida. No híbrido, o desejável é que este apresente a restauração na produção de pólen em quantidades suficientes para garantir a polinização da lavoura.

Ao avaliar características relacionadas a macho esterilidade muitas vezes tem sido encontrada significativa interação com o ambiente proporcionando diferentes padrões na produção e viabilidade do pólen (DUVICK, 1965; MUNSCH et al., 2010; STAMP et al., 2000). Alta umidade e baixa temperatura foram associadas com o aumento na fertilidade de milho, por outro lado, longos fotoperíodos e altas temperaturas reduzem a fertilidade (DUVICK, 1965). Temperaturas médias diárias superiores a 26 °C podem promover a aceleração do período de florescimento e maturação, da mesma forma que temperaturas inferiores a 15,5 °C podem prontamente retardá-las (BERGER, 1962).

Ao trabalhar com macho esterilidade é importante o conhecimento do sistema CMS (*Cytoplasmic Male Sterility*) que está sendo utilizado. Nesse aspecto, a caracterização do citoplasma macho-estéril torna-se de suma importância. Antes do advento das técnicas moleculares a caracterização era feita usando testadores com diferentes genes restauradores da fertilidade. Esse método além de consumir tempo e recursos para obter os materiais testes, ainda assim pode apresentar um confundimento nos resultados devido aos subgrupos dentro do mesmo tipo de citoplasma (BECKETT, 1971). Atualmente, com o conhecimento da base molecular dos tipos de citoplasma é possível determinar qual o tipo de CMS utilizando técnicas moleculares, como, por exemplo, os marcadores de microssatélites (IGNJATOVIC-MICIC et al., 2006).

Marcadores microssatélites tem se mostrado eficientes na utilização, seleção e caracterização dos citoplasmas (IGNJATOVIC-MICIC et al., 2006). Estes marcadores têm como principais características o fato de serem codominantes, multialélicos, com boa repetibilidade entre diferentes laboratórios, sendo a técnica baseada em PCR (BUSO et al., 2003).

O autor tem por objetivo a avaliação de linhagens macho estéreis e híbridos, provenientes de linhagens macho estéreis, quanto a estabilidade da macho esterilidade em diferentes ambientes.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos de campo foram conduzidos em quatro ambientes, conforme descrito na tabela 1.

Tabela 1 Localidades de condução dos experimentos de avaliação das cinco linhagens e cinco híbridos, na safra de 2011

Local	Latitude	Longitude	Altitude	Data de semeadura
Centralina – MG	S 18° 29' 20"	W 49° 13' 39"	465	28/03/2011
Cristalina -GO 1ª Época	S 16° 15' 6"	W 46° 25' 23"	975	29/03/2011
Cristalina – GO 2ª Época	S 16° 14' 24"	W 46° 23' 25"	922	30/04/2011
Planura – MG	S 20° 02' 06"	W 48° 43' 04"	526	12/05/2011

Foram avaliadas quatro linhagens retrocruzadas para macho esterilidade (L1, L2, L3 e L4), cinco híbridos simples provenientes do cruzamento de linhagens macho estéreis (H1 = L2 x L6; H2 = L7 x L8; H3 = L9 x L8; H4 = L2 x L9 e H5 = L2 x L10) com linhagens de citoplasma fértil e uma linhagem com citoplasma fértil (L5).

2.1 Avaliações Moleculares

De cada genótipo macho-estéril do experimento localizado em Planura foram amostradas dez folhas no estágio vegetativo V4 visando à caracterização molecular do citoplasma macho-estéril. As amostras foram acondicionadas em gelo e direcionadas ao laboratório de análise de plantas em Uberlândia-MG.

As reações de amplificação dos locos microssatélites foram conduzidas seguindo metodologia proposta por Senior et al. (1996), com modificações.

Foram utilizados três iniciadores ou "primers" em função dos padrões polimórficos apresentados para as linhagens estudadas.

O programa de amplificação consistiu de uma etapa de 94 °C por 2 minutos para desnaturação inicial, seguida de 40 ciclos, cada um representado por 94 °C por 15s, 60° por 45s para anelamento do primer e 72 °C por 5 minutos para a extensão final (OGLIARI; BOSCARIOL; CAMARGO, 2000).

Os produtos amplificados foram separados por eletroforese horizontal em gel de agarose SFR® de alta resolução 3% preparado com TBE 0,5X (Tris-Borato) e corado com brometo de etídeo (0,5 µL/mL). Como referencial de pesos moleculares, foram empregados 5 µL de DNA marcador 25 pb. A corrida foi feita a uma voltagem constante de 170 V durante 90 minutos. Os fragmentos foram visualizados em transluminador UV e as imagens digitalizadas por meio do *software Multi-Analyst®* (CRESTE; TULMANN NETO; FIGUEIRA, 2001).

2.2 Avaliações Fenotípicas

Todos os genótipos foram avaliados em experimentos conduzidos em delineamento de blocos casualizados com três repetições por ambiente. A parcela experimental foi de duas linhas de 4 metros de comprimento, acrescidas 1 metro de carreador, sendo que em cada linha foram semeadas 28 sementes visando obter 20 plantas após o desbaste. O espaçamento entre linhas foi de 0,6 m.

Todas as práticas agrícolas visando controle de plantas infestantes, ataques de insetos e infecção por doenças foram realizados.

Em todas as parcelas de todos os ambientes foram avaliadas as características:

Período de Florescimento Masculino (PFM): refere-se à data e o número de plantas que apresentaram a abertura das anteras até o momento em que nenhuma planta apresentou o florescimento.

Plantas Macho Estéreis (PME em %): as plantas foram classificadas em macho estéreis quando não emitiram anteras e macho férteis quando apresentavam anteras. Posteriormente foi obtida a porcentagem de plantas macho estéreis por parcela.

Em Cristalina na 2ª Época de plantio e em Planura foram avaliadas as características:

a) Quantidade de Pólen por Planta (QPP): no pré-florescimento foram cobertas três inflorescências masculinas por parcela, escolhidas ao acaso. Visando armazenar o pólen liberado pela planta e evitar o acúmulo interno de umidade, cada inflorescência masculina foi coberta por sacos de plástico especiais microporosos. Os sacos de plásticos foram recolhidos logo após a constatação do encerramento da emissão de pólen no campo. Posteriormente, o pólen foi seco, retirado do saco e adicionado em uma solução iônica. O pólen foi peneirado junto com a solução em uma peneira de 120 μm e novamente foi adicionada solução completando 500 ml. Após o preparo foi retirada uma alíquota de 5 ml da solução e diluída em 150 ml de solução iônica. Procedeu-se a agitação e foi submetida à análise no Multisizer 4. O equipamento Multisizer 4 foi utilizado para contagem do número de grãos de pólen, utilizando o sistema conhecido como Zona de Sensibilidade Elétrica (ESZ - Electrical Sensing Zone).

b) Viabilidade do Pólen (VP em %): durante o florescimento, quando 50% da ramificação central da inflorescência masculina estavam emitindo pólen, foram coletados três pendões por parcela, ao acaso, no período da manhã, e acondicionados em sacos plásticos microporosos. No laboratório, com auxílio de uma pinça, os polens foram retirados da antera e depositados sobre uma lâmina. Sobre os grãos de pólen foi adicionado o corante azul de metileno (iodo 5%).

Após a solução foi colocado uma lamínula para que fosse observado no microscópio ótico. Na resolução de 100x foi feita a quantificação do número de grãos de pólen corados (viáveis) e não corados (inviáveis). Os dados foram transformados em porcentagem.

c) Quantidade de Pólen Viável: obtida pela multiplicação entre QPP e VP.

Todas as características foram submetidas às análises de variância individuais e conjuntas. Para a porcentagem de plantas macho estéreis, as análises de variância individuais tiveram o efeito de genótipos decompostos em efeitos de Linhagens, Híbridos e Linhagens vs Híbridos.

Posteriormente às análises, as médias foram agrupadas pelo teste de Scott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Caracterização molecular dos citoplasmas

A análise de caracterização dos citoplasmas revelou a presença do citoplasma S nas linhagens L1, L2, L3 e L4 e nos híbridos H1, H2, H3, H4 e H5 (Figura 1). Esses resultados confirmaram que os híbridos avaliados foram provenientes de fêmeas macho estéreis com esse citoplasma, sendo que os híbridos H1, H4 e H5 têm como parental feminino a linhagem L3, caracterizada como macho-estéril. A análise de microssatélite baseado em PCR mostrou-se eficiente na caracterização quanto ao tipo de citoplasma que as linhagens e os híbridos possuem. Essa técnica já foi utilizada anteriormente com esse mesmo propósito por Ignjatovic-Micic et al. (2006) e mostrou eficiência na caracterização do tipo de macho esterilidade.

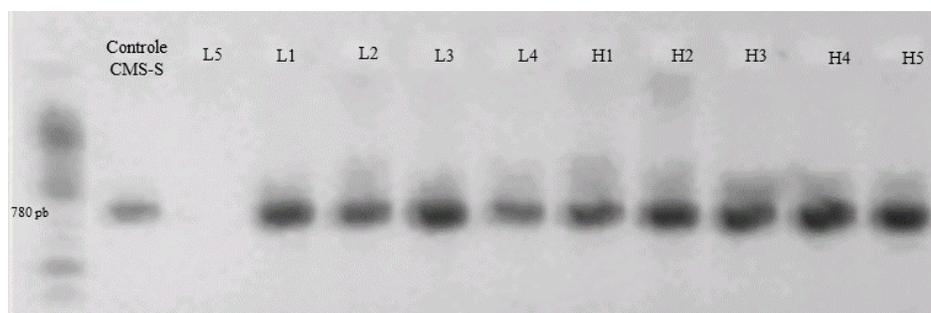


Figura 1 Amplificação da reação de PCR para a identificação do citoplasma macho-estéril S em quatro linhagens de milho e cinco híbridos

3.2 Análise Fenotípica

Com base nas análises de variância individuais e conjuntas obtidas para a porcentagem de plantas macho estéreis, pode-se verificar que houve efeito significativo para genótipos, em todos os ambientes e na análise conjunta, indicando diferenças significativas entre os genótipos avaliados (Tabela 2). Essa variabilidade pode ser explicada, em parte, por estarem sendo considerados como genótipos linhagens e híbridos, conforme dados médios apresentados na Tabela 3. Dessa forma, visando o seu melhor entendimento, em cada ambiente e na análise conjunta, os efeitos de genótipos foram desdobrados em efeitos de Linhagens (L), Híbridos (H) e L vs H.

Tabela 2 Resumo da análise de variância individual e conjunta para Plantas Macho Estéreis (%) de novegenótipos avaliados em Centralina (MG), Cristalina (GO), em duas épocas, e em Planura (MG), em 2011

F.V.	GL	Quadrados Médios				
		Centralina	Cristalina 1 ^a Época	Cristalina 2 ^a Época	Planura	Conjunta
Genótipos (G)	8	5334,58**	4139,43**	5318,0**	4408,15**	18912,29**
Linhagens(L)	3	95,11	52,56	62,89	51,42	30,30ns
Híbridos (H)	4	90,57	18,23	134,43**	419,4**	389,31**
L vs H	1	42029,07**	32884,81**	41817,6**	33433,34**	149650,20**
Ambiente (A)	3	-	-	-	-	416,80**
GxA	24	-	-	-	-	95,96*
LxA	9	-	-	-	-	91,11**
HxA	12	-	-	-	-	18912,29**
Erro	18 ¹ 72 ²	40,07	36,09	24,36	17,65	29,54

¹ GL do erro referente a ANAVA individual e ² GL do erro referente a ANAVA conjunta.

** : significativo a 1 e 5% de probabilidade, respectivamente, pelo teste F.

Após o desdobramento foram observadas diferenças significativas para híbridos apenas em Cristalina na 2^a época, em Planura e na análise conjunta. Não houve efeitos significativos para linhagens em nenhum local e na análise conjunta.

Em todos os ambientes e na análise conjunta foram constatados efeitos significativos para o contraste L vs H, mostrando que as linhagens avaliadas apresentaram diferenças em relação aos híbridos. As diferenças entre linhagens e híbridos eram esperadas, especialmente considerando que para as linhagens é importante a manifestação da macho esterilidade, não havendo polens viáveis ou que eles ocorreram em pouca quantidade. Para os híbridos é importante a

restauração da fertilidade, visando não ter problemas com falta de pólen viável em quantidade suficiente na lavoura comercial.

Nas análises de variância não foi considerada a linhagem L5 por não ter apresentado plantas macho-estéreis.

Também foi verificado efeito significativo para a interação GxA, GxL e GxH, evidenciando que os genótipos apresentaram um comportamento não coincidente em função dos ambientes considerados. Isso ocorre porque a expressão dos genes é influenciada ou regulada pelo ambiente. Interações significativas são comuns para avaliação da macho esterilidade quando são considerados ambientes com condições edafoclimáticas diferentes e mostram a importância da avaliação ocorrer em diferentes ambientes. Resultado semelhante foi observado por Weider et al. (2009) avaliando diferentes características relacionadas a macho esterilidade, concluindo que a macho esterilidade nos genótipos avaliados foi influenciada pelo ambiente

Tabela 3 Porcentagem de plantas macho estéreis para os genótipos avaliados em Centralina (MG), Cristalina (GO) em duas épocas e em Planura (MG), 2011

Genótipos	Centralina	Cristalina 1 ^a Época	Cristalina 2 ^a Época	Planura	Média Geral
L1	99,3 a	83,0 a	94,3 a	78,7 a	88,8 a
L2	88,6 a	91,3 a	96,7 a	79,0 a	88,9 a
L3	86,6 a	88,7 a	92,3 a	75,0 a	85,7 a
L4	93,3 a	83,0 a	86,0 a	85,0 a	86,8 a
H1	14,3 b	20,0 b	22,3 b	23,0 b	19,9 b
H2	20,0 b	14,3 b	16,0 b	20,0 b	17,6 b
H3	14,0 b	15,7 b	7,7 c	9,3 c	11,7 c
H4	5,6 b	17,3 b	14,0 b	17,7 b	13,7 c

“Tabela 3, conclusão”

Genótipos	Centralina	Cristalina 1 ^a Época	Cristalina 2 ^a Época	Planura	Média Geral
H5	9,0 b	14,0 b	5,7 c	13,3 c	10,5 c
Média Geral	43,1A	42,7 ^a	43,5A	40,1B	24,3
Média das linhagens machos estéreis	92,0	87,0	92,4	79,4	87,7
Médias dos híbridos	12,6	16,3	13,1	16,7	14,7
\hat{r}_{gg}	0,99	0,98	0,99	0,99	-

Agrupamento de médias, pelo teste Scott-Knott, 5% de probabilidade. Letras minúsculas referem-se a comparações entre genótipos no mesmo ambiente e letras maiúsculas comparam ambientes.

Apesar da presença de interação GxA significativa, esta é do tipo simples uma vez que a classificação dos genótipos não é alterada em função dos ambientes, sendo que ocorre apenas a modificação da magnitude das diferenças, ou seja, os genótipos apresentam uma correlação no desempenho nos ambientes.

As diferenças de localização, altitude e temperaturas durante o período de florescimento, contribuíram para que fosse constatado efeito significativo para ambientes na análise conjunta (Tabela 2).

As estimativas de acurácia para todos os experimentos foram acima de 0,98 indicando muito alta precisão segundo Resende (2007). Essa estimativa é importante porque contempla, simultaneamente, o coeficiente de variação experimental, o número de repetições e o coeficiente de variação genotípico.

As linhagens L1, L2, L3 e L4 destacaram-se pela alta porcentagem de plantas estéreis em todos os ambientes, enquanto que a linhagem L5 confirmou alto nível de restauração da fertilidade em todos os ambientes. O comportamento desta linhagem era esperado por se referir a uma testemunha com citoplasma normal (Figura 1). Os resultados obtidos para as demais linhagens confirmaram o efeito da macho esterilidade nas linhagens convertidas. Contudo, nenhuma linhagem avaliada apresentou total ausência de plantas

produzindo pólen. Em média as linhagens apresentaram 87,7% de plantas macho estéreis. Esse resultado em parte pode ser atribuído a presença de alelos restauradores da fertilidade nas linhagens e/ou pode ser resultado dos efeitos ambientais, evidenciado pelo efeito significativo das interações GxA e LxA e pelos diferentes níveis de recuperação da fertilidade em função do ambiente considerado, revelando a presença de uma reversão parcial da macho esterilidade de acordo com as condições edafoclimáticas.

É comum genótipos com macho esterilidade proveniente do citoplasma S apresentarem interações com o ambiente (WEIDER et al., 2009). Um exemplo são os resultados obtidos para a linhagem L1. Apesar de não diferir das demais linhagens macho estéreis em nenhum dos ambientes considerados, a L1 apresentou 99,3% de plantas macho estéreis em Centralina, 83% em Cristalina na Época 1, 94,3% no mesmo local na época 2, e 78,7% em Planura, mostrando diferenças na porcentagem de plantas macho estéreis conforme ocorre a mudança de ambiente.

Esses resultados tornam evidentes a importância das avaliações ocorrerem em diferentes locais e épocas de cultivo, uma vez que, entre a época 1 e 2 em Cristalina há diferença de apenas um mês na data de semeadura. Contudo, é importante verificar as alterações existentes entre esses dois ambientes, pois as temperaturas mínimas e máximas da 2ª época de Cristalina foram superiores quando comparados a este mesmo local na 1ª época (Figura 2). As diferenças são maiores na temperatura máxima sendo que se forem consideradas apenas as linhagens macho estéreis, na média a diferença foi de 5 °C. Outra característica que torna evidente a diferença entre os dois ambientes foi o número de dias que os genótipos ficaram florescendo. Considerando a média de todos os genótipos avaliados, em Cristalina na 2ª época os genótipos ficaram quatro dias a mais em florescimento. Considerando apenas as linhagens macho estéreis, a diferença é de sete dias.

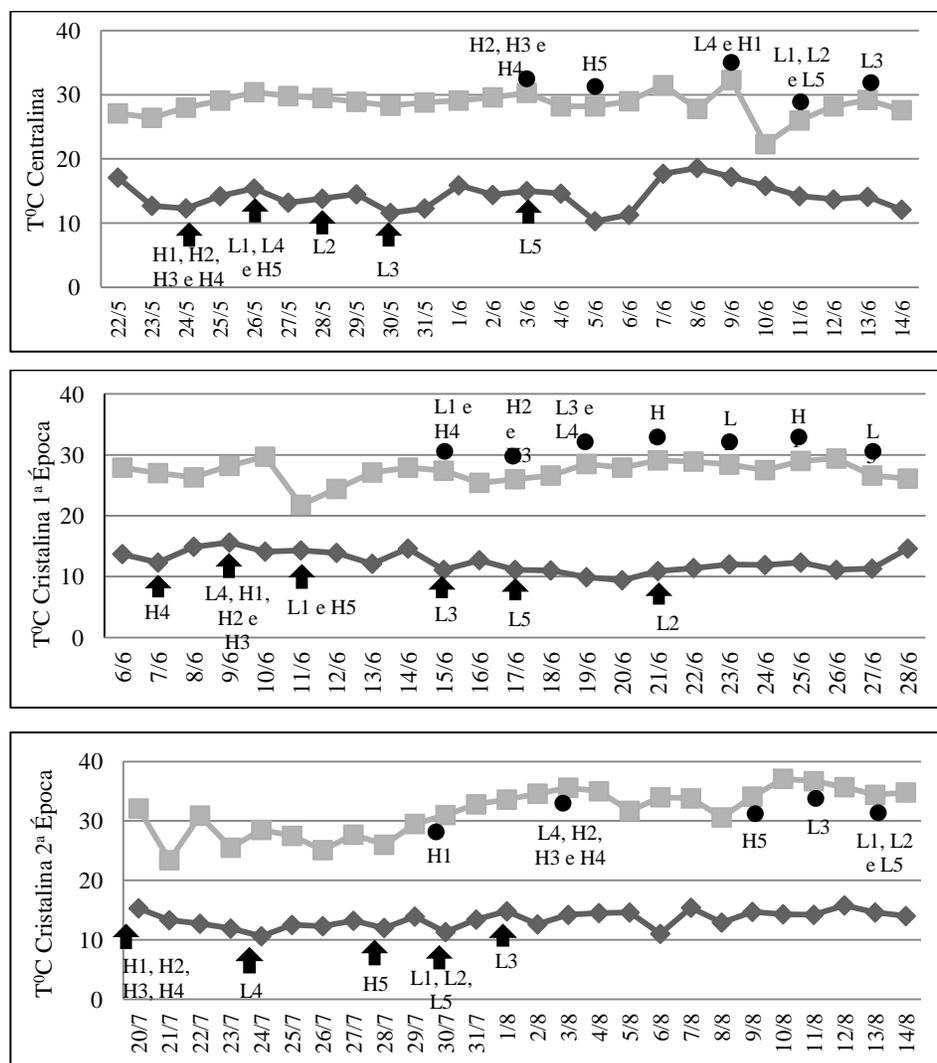
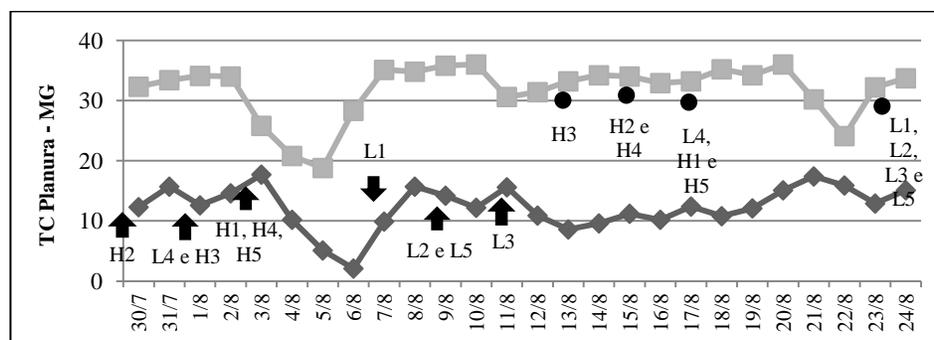


Figura 2 Período de Florescimento Masculino de dez genótipos avaliados em Centralina (MG), Cristalina (GO), em duas épocas, e em Planura (GO), em 2011

(...continua...)

Nota: Seta indica início do florescimento e círculo indica o final do florescimento. Linha inferior refere-se à temperatura mínima e a superior a temperatura máxima.



Linhagens provenientes de citoplasmas macho estéreis com recuperação parcial da fertilidade do pólen já foram observadas por diferentes autores (DUVICK, 1965; EDWARDSON, 1955). Além do componente genético relacionado ao grande número de genes e alelos envolvidos, localizados no núcleo, a recuperação da fertilidade pode estar associada a interações com ambiente. Conforme citado por Weider et al. (2009), os alelos do sistema CMS S apresenta grande sensibilidade dos à alterações ambientais. O Citoplasma S tem sido descrito por apresentar frequentes reversões de fertilidade em campos de avaliação (GABAY-LAUGHMAN et al., 2004; LAUGHMAN; GABAY-LAUGHMAN, 1983).

Todos os híbridos avaliados apresentaram baixas taxas de plantas macho estéreis, em todos os ambientes, diferindo significativamente das linhagens macho estéreis (Tabela 3). Entretanto, nenhum híbrido apresentou total restauração, sendo que para alguns híbridos, em determinados ambientes há diferenças significativas em relação à linhagem L5 que possui citoplasma fértil.

A restauração da fertilidade nos híbridos provavelmente está relacionada à presença de alelos dominantes dos genes *Rf* nos parentais macho que compõe os híbridos. Conforme mencionado anteriormente os genes *Rf* do citoplasma S podem apresentar forte interação com o ambiente. Dessa forma, a presença de interação HxA significativa mostra que há modificação relativa no

comportamento dos híbridos em função do ambiente. O H4, por exemplo, se destaca pela baixa taxa de plantas macho estéreis em Centralina, com 5,6 %, porém, apresenta comportamento intermediário nos outros três locais, com médias variando de 14 a 17,7%.

Variação na taxa de restauração da macho esterilidade de híbridos provenientes de linhagens com sistema macho estéreis do tipo S também foram observadas por Weider et al. (2009). Entretanto, essa característica não pode ser analisada isoladamente porque a produção de anteras não indica a quantidade e a qualidade do pólen produzido.

Nesse sentido foram avaliadas a quantidade de pólen e a viabilidade de pólen dos cinco híbridos e da linhagem L5(Tabela 4).

Tabela 4 Resumo da análise de variância individual e conjunta para a Quantidade de Pólen e Viabilidade do Pólen para seis genótipos avaliados em Centralina (MG) e em Planura (MG), 2011

FV	GL	Quadrados Médios					
		Quantidade de Pólen ($\times 10^{-3}$)			Viabilidade do Pólen (%)		
		Cristalina 2 ^a Época	Planura	Conjunta	Cristalina 2 ^a Época	Planura	Conjunta
Genótipos (G)	5	1.984,86**	71,77**	2.621,42**	3.918,93**	3.635,71**	7.502,82**
Ambiente (A)	1	-	-	1.970,75**	-	-	71,50*
GxA	5	-	-	235,21**	-	-	51,82*
Erro	$\frac{11^{11}}{42^{12}}$	24,23	18,78	20,03	12,95	19,04	16,54

¹¹ GL do erro referente a ANAVA individual e ¹² GL do erro referente a ANAVA conjunta.

** : significativo a 1 e 5% de probabilidade, respectivamente, pelo teste F.

Pelas análises de variância individuais e conjuntas para a quantidade de pólen e a viabilidade de pólen foram detectados efeitos significativos para G, A e para a interação G x A, mostrando diferenças significativas entre os

tratamentos que apresentaram comportamento diferenciado em função dos locais avaliados (Tabela 5).

Tabela 5 Dados médios para seis genótipos avaliados para a Quantidade de Pólen e Viabilidade do Pólen em Centralina (MG) e em Planura (GO), 2011

Genótipos	Quantidade de Pólen ($\times 10^{-2}$)			Viabilidade do Pólen (%)		
	Centralina	Planura	Média	Centralina	Planura	Conjunta
L5	2158,1 c	2084,0 b	2121,0 b	92,3 a	93,4 a	92,8 a
H1	6449,2 a	2747,9 b	4598,6 d	73,5 b	63,6 b	68,5 b
H2	1750,7 c	327,2 c	1038,0 d	7,7 e	3,5 d	5,6 f
H3	3390,3 b	1911,7 c	2651,0 c	9,5 e	17,9 c	13,7 d
H4	1929,8 c	1150,6 c	1540,2 d	25,8 d	20,6 c	23,2 e
H5	7084,7 a	5083,6 a	6084,1 a	64,8 c	58,7 b	61,7 c
Média	3.274,5 A	1904,5 B	2.589,5	39,8 A	37,2 B	38,5
\hat{r}_{gg}	0,99	0,86	-	1,0	1,0	-

Agrupamento de médias, pelo teste Scott-Knott, 5% de probabilidade. Letras minúsculas referem-se a comparações entre genótipos no mesmo ambiente e letras maiúsculas comparam ambientes.

As linhagens L1, L2, L3 e L4 não foram analisadas para contagem e viabilidade de pólen por apresentarem elevados níveis de esterilidade e, dessa forma, ser inviável a coleta do pólen para que fosse analisado.

Da mesma forma que para a porcentagem de plantas macho estéreis, embora tenha ocorrido interação GxA significativa, essa é do tipo simples, podendo ser observada por não ocorre a mudança na classificação dos genótipos em função dos locais.

Além das diferenças da localização geográfica e a altitude entre os dois locais, outro fator que pode contribuir com as diferenças entre os ambientes e a interação GxA foram as temperaturas mínimas e máximas durante o período de florescimento (Figura 2). Enquanto em Cristalinana segunda época a

temperatura mínima esteve acima de 10 °C, em Planura as temperaturas mínimas observadas foram menores, sendo registrado 2 °C em 06/08, afetando diretamente os híbridos H1,H2, H3, H4 e H5 que já tinham iniciado o florescimento antes desta data.

Para todos os genótipos avaliados para a quantidade de pólen, as maiores médias foram observadas em Centralina (Tabela 5). O híbrido H1 apresentou 175.000 polens por pendão em Centralina e apenas 27.300 polens por pendão em Planura, mostrando o comportamento diferenciado em função do ambiente. O híbrido H5 foi superior em relação aos demais para a quantidade de pólen produzido, nos dois locais de avaliação, apesar da presença de interação T x A significativa, superando a L5 que foi considerada referência nesse estudo por apresentar citoplasma fértil. Contudo, para viabilidade de pólen a L5 destacou-se pela alta porcentagem de polens viáveis enquanto que o H5 mostrou apenas valores intermediários.

Uma importante característica a ser considerada no processo de polinização é a quantidade de pólen viável (Tabela 6). Os resultados mostraram que os maiores valores para os dois locais foi obtido para o H5 e são próximos quando se considera apenas o pólen viável, apesar dos valores intermediários para a viabilidade de pólen.

Tabela 6 Dados médios para seis genótipos avaliados para a Quantidade de Pólen Viável em Centralina (MG) e em Planura (GO), 2011

Genótipos	Centralina	Planura	Média
L5	1991,9	1946,5	1968,3
H1	4740,2	1747,7	3150,0
H2	134,8	11,5	58,1
H3	322,1	342,2	363,2
H4	497,9	237,0	357,3
H5	4590,9	2984,1	3753,9
Média	2046,3	1211,5	1608,5

O híbrido H1 apresentou valores intermediários para a quantidade de pólen e a viabilidade de pólen, para os dois locais. A exceção foi em Centralina onde se destacou pela quantidade de pólen. Contudo, os resultados obtidos para a quantidade de pólen viável mostraram que o híbrido tem o comportamento muito próximo ao H5, podendo ser indicado para cultivo.

Os híbridos H2, H3 e H4 apresentaram baixas médias nos dois ambientes para a quantidade de pólen viável e também apresentaram baixa porcentagem de pólen viável (Tabela 5). Os valores também são baixos quando se considera a característica quantidade de pólen viável (Tabela 6). Na escolha desses híbridos para utilização em campos de produção de grãos deve-se avaliar a capacidade de polinização do campo, uma vez que associados a essas características, esses híbridos apresentaram em média 19,9%, 17,6% e 11,2% de plantas macho estéreis respectivamente (Tabela 3). Esta baixa capacidade de produção de pólen pode estar associada à ausência de genes nucleares restauradores da fertilidade no macho e/ou associados aos estresses do ambiente, especialmente com o registro de baixas temperaturas durante o florescimento. Entre os fatores que afetam a produção de polens viáveis em plantas macho estéreis, a interação dos genes restauradores (em função do citoplasma macho-

estéril) com fatores ambientais pode alterar o comportamento dos genótipos (DUVICK, 1965).

Híbridos com baixa porcentagem de pólen viável podem ser utilizados em campos visando à produção de grãos, porém, podem necessitar da mistura de sementes do híbrido isogênico proveniente de linhagens com o citoplasma fértil. Essa técnica é conhecida como *Blend* e é recomendada visando à produção de pólen viável no campo de produção. Entretanto, é importante assegurar a similaridade agrônômica, especialmente o período de polinização, e estudar na proporção que permita uma segurança na produção de pólen viável. Algumas recomendações indicam 80% de semente CMS e 20% do isogênico fértil (FEIL; WEINGARTNER; STAMP, 2003).

É importante ressaltar que o H5 tem como parental fêmea a L2 que conforme apresentado anteriormente apresenta alta porcentagem de plantas estéreis. Dessa forma, é bem provável que o parental macho tenha os genes nucleares restauradores da fertilidade do pólen. O híbrido H1 tem a mesma fêmea do H5 e apresentou maior porcentagem de plantas macho estéreis em relação ao H5 (Tabela 3), associado a baixa quantidade de polens produzidos, especialmente em Planura, e com baixa viabilidade, mostrando a importância do parental macho na formação do híbrido macho-estéril. Esses resultados revelam a necessidade de avaliar a contribuição do parental macho na constituição do híbrido proveniente de linhagem macho-estéril.

Os resultados mostraram que as linhagens L1, L2, L3 e L4 podem ser indicadas para utilização em campos de produção de sementes híbridas, porém devendo utilizar adicionalmente outro sistema de despendoamento (mecânico ou manual). Apesar da restauração parcial, essas linhagens representam uma grande vantagem operacional. Com a alta porcentagem de plantas macho estéreis, o despendoamento pode ser feito com mais cautela e mais próximo a eminência da

liberação do pólen, evitando assim o arranquio excessivo de folhas, ocasionando menores danos e perdas.

4 CONCLUSÕES

A porcentagem de plantas macho estéreis das linhagens varia com o ambiente, porém, é elevada, e por isso as linhagens L1, L2, L3 e L4 podem ser utilizadas em campos de produção de sementes, associado a formas adicionais de despendoamento mais simples e menos danosas à planta.

Os híbridos H1 e H5 destacam-se quanto à quantidade de pólen viável, mostrandopotencial para ser utilizado em lavouras comerciais.

REFERÊNCIAS

- BECKETT, J. B. Classification of male-sterile cytoplasm in maize (*Zea mays* L.). **Crop Science**, Madison, v. 11, p. 724-727, 1971.
- BERGER, J. Maize production and the manuring of maizes. **Center d'Estudo de l'Azote**, Geneva, v. 2, n.1, p.38-41, Jan. 1962.
- BUSO, G. S. C. et al. Marcadores microssatélites em espécies vegetais. **Revista Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v. 1, n. 1, p. 36-50, jan./jun. 2003.
- CRESTE, S.; TULMANN NETO, A.; FIGUEIRA, A. Detection of single sequence repeat polymorphism in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. **Plant Molecular Biology Reporter**, Athens, v. 19, n. 12, p. 299-306, Dec. 2001.
- DUVICK, D. N. Cytoplasmic pollen sterility in corn. **Advances in Genetics**, New York, v. 13, p. 1-56, 1965.
- EDWARDSON, J. R. The restoration of fertility to cytoplasmic male-sterile corn. **Agronomy Journal**, Madison, v. 47, p. 457-461, 1955.
- FEIL, B.; WEINGARTNER, U.; STAMP, P. Controlling the release of pollen from genetically modified maize and increasing its grain yield by growing mixtures of male-sterile and male-fertile plants. **Euphytica**, Amsterdam, v. 130, n. 2, p. 163-165, Mar./Apr. 2003.
- GABAY-LAUGHNAN, S. et al. Molecular-genetic characterization of CMS-S restorer-of-fertility alleles identified in Mexican maize and teosinte. **Genetics**, Austin, v. 166, n. 2, p. 959-970, Mar./Apr. 2004.
- IGNJATOVIC-MICIC, D. et al. Identification of sterile cytoplasm (CMS) in maize by using specific mtDNA primers. **Genetika**, Beograd, v. 38, n. 3, p. 227-233, 2006.
- JONES, D. F.; STINSON, H. T.; KHOO, U. Pollen restoring genes. **Connecticut Agricultural Experiment Station Bulletin**, New Haven, v. 610, n. 1, p. 1-43, Jan./Mar. 1957.

LAUGHNAN, J. R.; GABAY-LAUGHNAN, S. Cytoplasmic male sterility in maize. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, v. 17, p. 27-48, 1983.

MAGALHÃES, P. C. et al. Efeitos de diferentes técnicas de despendoamento na produção de milho. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 56, n. 1, p. 77-82, jan. 1999.

MUNSCH, M. A. et al. Grain yield increase and pollen containment by plus-hybrids could improve acceptance of transgenic maize. **Crop Science**, Madison, v. 50, n. 3, p. 909-919, May/June 2010.

OGLIARI, J. B.; BOSCARIOL, R. L.; CAMARGO, L. E. A. Optimization of PCR amplification of maize micosatellite loci. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v.23, n.2, p.395-398, Mar./Apr. 2000.

PEREZ-PRAT, E.; CAMPAGNE, M. M. L. Hybrid seed production and the challenge of propagating male-sterile plants. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 7, n. 5, p. 199-203, May 2002.

RESENDE, M. D. V. **Matemática e estatística na análise de experimentos de campo**. Colombo: EMBRAPA Florestas, 2007. 435 p.

ROGERS, J. S.; EDWARDSON, J. R. The utilization of cytoplasmic male-sterile inbreds in the production of corn hybrids. **Agronomy Journal**, Madison, v. 44, p. 8-13, 1952.

SCHNABLE, P. S.; WISE, R. P. The molecular basis of cytoplasmic male sterility and fertility restoration. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 3, n. 5, p. 175-180, May 1998.

SENIOR, M. L. et al. Simple sequence repeat markers developed from maize found in GENBANK database: map construction. **Crop Science**, Madison, v.36, n. 2, p.1676-1683, Mar./Apr. 1996.

STAMP, P. et al. Increase in the yield of cytoplasmic male sterile maize revisited. **Crop Science**, Madison, v. 40, n. 1, p. 1586-1587, Jan./Feb. 2000.

ULLSTRUP, A. J. The impact of the southern corn leaf blight epidemics of 1970-1971. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 10, p. 37-50, 1972.

WEIDER, C. et al. Stability of cytoplasmic male sterility in maize under different environmental conditions. **Crop Science**, Madison, v. 49, n. 1, p. 77-84, Jan. 2009.

CAPÍTULO 3 Estratificação ambiental e adaptabilidade de linhagens e híbridos de milho macho estéreis em diferentes ambientes

RESUMO

O objetivo com o presente estudo foi avaliar linhagens de milho quanto a estabilidade e eficiência da macho esterilidade e híbridos quanto ao potencial produtivo em distintos ambientes de cultivo. Foram avaliadas quatro linhagens macho estéreis, em dezesseis ambientes. Foram avaliados três híbridos macho estéreis, seus isogênicos e três testemunhas de produtividade. Os híbridos foram avaliados em 25 locais situados na região Sudeste e Centro Oeste do Brasil. Todos os genótipos macho estéreis avaliados possuem o citoplasma S. As linhagens e os híbridos foram avaliados em separado. Para os híbridos, a adaptabilidade e estabilidade foram avaliadas pelo método FGGA. Foram verificados efeitos significativos para a interação GxA na avaliação das linhagens e dos híbridos. Todas as linhagens apresentaram acima de 94% de macho esterilidade e foram estáveis a diferentes condições ambientais. As linhagens SYN-1, SYN-2, SYN-3 e SYN-4 podem ser utilizadas na produção comercial de híbridos, associado a outros métodos de despendoamento. Os híbridos B1 e B2 possuem ampla adaptabilidade na maioria dos ambientes avaliados e foram superiores para a produtividade de grãos.

Palavras-Chave: CMS. Interação Genótipo x Ambiente. FGGA.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the stability and efficiency of male-sterility of corn inbred lines, and yield potential of hybrids, in different cultivating environments. Four male-sterile inbred lines were evaluated in sixteen environments. Three male-sterile hybrids, their isogenics and three controls were evaluated in 25 sites in the Southeast and Midwest of Brazil. All male-sterile genotypes presented S cytoplasm. The inbred lines and hybrids were evaluated separately. For the hybrids, adaptability and stability were evaluated by the FGGA method. Significant effects were observed for G x E in the evaluation of inbred lines and hybrids. All inbred lines presented showed above 94% of male-sterility and were stable in different environmental conditions. The inbred lines SYN-1, SYN-2, SYN-3 and SYN-4 may be used for commercial production of hybrids, associated with other detasseling methods. The hybrids B1 and B2 have wide adaptability in most environments evaluated and were superior for grain yield.

Keywords: CMS. G x E Interaction. FGGA.

1 INTRODUÇÃO

O melhoramento de milho tem explorado a macho esterilidade citoplasmática, visando obter vantagens na produção de sementes híbridas de alta pureza (STAMP et al., 2000).

Sistemas macho estéreis referem-se ao fracasso da planta em produzir grão de pólen funcional (LEVINGS, 1990). Embora tenha sido descoberta por Roades em 1933, a utilização da macho esterilidade em milho vem ocorrendo desde a década de 1950, com o auge da utilização desta tecnologia ocorrendo no ano 1970 quando aproximadamente 85% do milho cultivado nos EUA foi proveniente de sistema macho estéril, especialmente o citoplasma macho-estéril do tipo T (ULLSTRUP, 1972).

Entretanto, apesar da ampla utilização do CMS-T, já era conhecido que esse citoplasma era sensível ao fungo *Cochliobolus heterostrophus*, causador da helmintosporiose (DUVICK, 1965; LEVINGS, 1993). No ano de 1970 ocorreu uma epidemia deste fungo, provocando significativas perdas na produção de milho americana e uma consequente decisão de não utilizar mais esse citoplasma na obtenção de novos híbridos. Com a descontinuação do uso do CMS-T, novas fontes de macho esterilidade passaram a ser estudadas, entre as quais os CMS-S e CMS-C que se tornaram alternativas na obtenção de plantas macho-estéreis.

Atualmente, diante dos desafios da agricultura moderna, sobretudo em função da crescente demanda de sementes híbridas, os sistemas macho estéreis voltaram a ganhar destaque nos programas de melhoramento. A utilização da macho esterilidade possibilita vantagens significativas nos campo de produção de sementes híbridas, especialmente relacionado a dispensa do despendoamento da linhagem fêmea que implica no aumento da qualidade da semente, redução no custo com mão de obra e nas perdas ocasionadas pelo arranquio excessivo de folhas (KASER-SCHNEIDER, 2002; MACKENZIE, 2004).

Para a produção de semente híbrida comercial usando um sistema de macho-esterilidade uma importante etapa é a obtenção da linhagem macho-estéril. Normalmente os programas de melhoramento têm utilizado com sucesso o método de retrocruzamentos de linhagens elites (parental recorrente) para a incorporação da característica (BOZINOVIC et al., 2010; STAMP et al., 2000; WEIDER et al., 2009). Após cinco a seis gerações de retrocruzamentos é obtida uma linhagem isogênica a elite, diferenciada apenas pela presença da macho esterilidade.

A linhagem obtida deve ser avaliada quanto ao seu potencial produtivo, eficiência e estabilidade da macho esterilidade em diferentes condições de cultivo, representativas das regiões utilizadas para multiplicação e produção dos híbridos. Entretanto, deve-se também avaliar o desempenho dos híbridos obtidos usando a linhagem macho-estéril. Os híbridos devem ser inseridos na rede de ensaios para que seja avaliado o seu potencial produtivo, a estabilidade e a adaptabilidade em diferentes condições de cultivo, representativas das regiões visando a sua indicação. Como parâmetro de comparação, normalmente além dos competidores pelo segmento de comercialização, são utilizados os híbridos obtidos pela linhagem macho fértil visando averiguar se houve mudanças nas principais características agrônômicas (STAMP et al., 2000; WEIDER et al., 2009).

Quando um genótipo é avaliado em diferentes ambientes, geralmente a contribuição dos alelos dos diferentes genes não é coincidente entre os ambientes, propiciando respostas diferenciadas dos genótipos à variação ambiental, resultando na interação genótipos por ambientes (GxA) (KANG; GAUCH JUNIOR, 1996). Embora este efeito deva ser entendido como um fenômeno biológico em suas aplicações no melhoramento, sua estimativa tem ocorrido por meio de modelos estatísticos, permitindo seu melhor entendimento para tirar proveito em benefício dos agricultores

Nesse sentido, diferentes métodos estatísticos têm sido utilizados ao longo dos anos. Entretanto, tem ocorrido uma notória reorientação quanto aos métodos utilizados, seja em função dos avanços nos procedimentos estatísticos computacionais, ou mesmo, devido a pouca eficácia dos métodos usuais de análise da interação (DUARTE; VENCOVSKY, 1999). Métodos univariados têm sido constantemente substituídos por uma abordagem que combina técnicas univariadas e multivariadas (GARBUGLIO, 2010).

Nesse sentido, a técnica de análise de fatores associada a efeitos genotípicos somados aos efeitos da interação GxA (FGGA) tem sido descrita como eficiente no processo de análise de adaptabilidade e, simultaneamente, estratificação ambiental (GARBUGLIO, 2010).

Este tipo de análise pode contribuir na melhor avaliação de linhagens e híbridos macho-estéreis, visando garantir maior confiança na decisão de sua utilização. Dessa forma, o autor do presente estudo teve como objetivo avaliar diferentes linhagens quanto a estabilidade e eficiência da macho esterilidade e diferentes híbridos quanto ao potencial produtivo em distintos ambientes de cultivo.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Avaliação das linhagens

Foram avaliadas quatro linhagens macho estéreis de milho em dezesseis ambientes, constituídos por locais e safras.

As linhagens foram desenvolvidas pelo método de retrocruzamentos de linhagens elites do programa de melhoramento da Syngenta, sendo utilizados doadores com citoplasma do tipo S.

As linhagens foram avaliadas no delineamento de blocos casualizados, com três repetições por ambiente. A parcela experimental utilizada foi de duas linhas de 4 m, espaçadas por 80 cm entre linhas, deixando-se 25 plantas por linha após o desbaste.

Em cada parcela foi realizada a contagem de plantas que apresentavam inflorescências masculinas com produção de polens viáveis. Os dados foram obtidos em porcentagem e submetidos às análises de variância individuais e conjuntas.

2.2 Avaliação dos híbridos

Foram avaliados três híbridos simples provenientes da linhagem fêmea macho fértil (A1, B1 e C1) e seus correspondentes isogênicos produzidos utilizando a linhagem fêmea macho-estéril (A2, B2 e C2) com citoplasma do tipo S. Como testemunhas de produtividade foram utilizados três híbridos (D, E e F), totalizando nove tratamentos. Estes híbridos foram avaliados em 25 locais situados na região central do Brasil que compreendem a região Sudeste e Centro Oeste do Brasil.

Os híbridos foram avaliados no delineamento de blocos casualizados, com três repetições por ambiente. A parcela experimental utilizada foi de duas linhas de 5 m de comprimento, espaçadas 80 cm entre linhas, deixando-se 25 plantas por linha após o desbaste.

Em cada local foi obtida a produtividade de grãos em $\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}$, corrigida para 13% de umidade.

Nas análises de variância todos os efeitos foram considerados fixos.

2.2.1 Estimação dos efeitos genotípicos e de interação GxA

Buscando a estimação do efeito genotípico e de interação GxA, a partir de uma análise de variância comum aplicada à matriz de médias ($Y_{(g \times a)}$) em que o modelo que descreve o desempenho fenotípico de uma dada cultivar i no ambiente j é representado por $Y_{ij} = \mu + g_i + a_j + (ga)_{ij} + \bar{\varepsilon}_{ij}$. Desse modo, foram estimados seus efeitos e aplicada à análise fatorial. Esses procedimentos estão descritos na sequência (GARBUGLIO, 2010).

A solução por quadrados mínimos ordinários para o sistema de equações normais correspondentes, sob as restrições de identificabilidade $\sum_i g_i = \sum_j a_j = 0$, é dada por (1):

média geral $\hat{\mu} = \bar{Y}_{..}$;

efeito genotípico: $\hat{g}_i = \bar{Y}_{i.} - \bar{Y}_{..}$;

efeito de ambiente: $\hat{a}_j = \bar{Y}_{.j} - \bar{Y}_{..}$;

considerando-se:

$$\bar{Y}_{..} = \sum_{i,j} Y_{ij}/ga; \quad \bar{Y}_{i.} = \sum_j Y_{ij}/a; \quad \bar{Y}_{.j} = \sum_i Y_{ij}/g \quad (1)$$

A aproximação de quadrados mínimos (\hat{Y}_{ij}) e seu respectivo resíduo, correspondente ao termo geral da interação, ambos invariantes, são dados por $\hat{Y}_{ij} = \bar{Y}_i + \bar{Y}_j - \bar{Y}_{..}$; portanto, $(\hat{g\hat{a}})_{ij} = Y_{ij} - \bar{Y}_i - \bar{Y}_j + \bar{Y}_{..}$.

A partir desse último resultado foi construída a matriz de interações (GA), bem como a matriz que inclui os efeitos genotípicos somados aos efeitos de interação (G+GA) que foi utilizada nessa proposta.

gen _p / amb _q	1	2	...	q	
1	$\begin{pmatrix} (g\hat{a})_{11} & (g\hat{a})_{12} & \dots & (g\hat{a})_{1q} \\ (g\hat{a})_{21} & (g\hat{a})_{22} & \dots & (g\hat{a})_{2q} \\ \vdots & \vdots & & \vdots \\ (g\hat{a})_{p1} & (g\hat{a})_{p2} & \dots & (g\hat{a})_{pq} \end{pmatrix}$				= GA _(pxq)
2					
⋮					
p					

G _p / A _q	1	2	...	q	
1	$\begin{pmatrix} g_1 + (g\hat{a})_{11} & g_1 + (g\hat{a})_{12} & \dots & g_1 + (g\hat{a})_{1q} \\ g_2 + (g\hat{a})_{21} & g_2 + (g\hat{a})_{22} & \dots & g_2 + (g\hat{a})_{2q} \\ \vdots & \vdots & & \vdots \\ g_p + (g\hat{a})_{p1} & g_p + (g\hat{a})_{p2} & \dots & g_p + (g\hat{a})_{pq} \end{pmatrix}$				= G+GA _(pxq)
2					
⋮					
p					

2.2.2 Aplicação da análise de fatores à matriz G+GA

O modelo fatorial pressupõe que cada variável pode ser expressa por uma combinação linear de fatores comuns, além do fator específico, sendo dado por (2):

$$\begin{aligned} x_1 &= l_{11}F_1 + l_{12}F_2 + \dots + l_{1m}F_m + \varepsilon_1 \\ x_2 &= l_{21}F_1 + l_{22}F_2 + \dots + l_{2m}F_m + \varepsilon_2 \end{aligned}$$

...

$$x_h = l_{h1}F_1 + l_{h2}F_2 + \dots + l_{hm}F_m + \varepsilon_h$$

ou

$$x_j = \sum_{k=1}^m l_{jk}F_k + \varepsilon_j \quad (2)$$

para $m < h$; em que l_{jk} é a carga fatorial para a j -ésima variável associada ao k -ésimo vetor; F_k é o k -ésimo fator comum; ε_j é o fator específico associado à j -ésima variável; sendo $h=p$ para genótipos ou $h=q$ para ambientes.

Para a utilização da análise de fatores em estudos de adaptabilidade e estratificação ambiental, deve-se destacar o fato de que $x_1, x_2 \dots x_h$ representam uma única variável como, por exemplo, produtividade de grãos, porém, avaliada em cada um dos “ q ” ambientes em que os genótipos foram avaliados ou dos “ p ” genótipos referentes aos q ambientes. No caso em questão, essas variáveis representam as colunas da matriz constituída pela soma dos efeitos genotípicos e de interação apresentada anteriormente.

A carga fatorial do fator F_k é dada pela correlação entre o fator e a variável correspondente, ou seja (3):

$$r_{x_j F_k} = \frac{Cov(x_j, F_k)}{\sqrt{V(x_j)V(F_k)}} = l_{jk} \quad (3)$$

Na análise de fatores são impostas as seguintes restrições em relação aos fatores comuns:

Média nula: $\bar{F}_k = 0$, para $k = 1, 2, \dots, m$

Variância unitária: $Var(F_k) = 1$

Covariância nula: $Cov(F_k, F_{k'}) = 0, (k \neq k')$, propriedade que garante que os fatores sejam ortogonais.

Também são apresentadas as seguintes propriedades relativas aos fatores específicos:

Média nula: $\bar{\varepsilon} = 00$

Sendo:

$$x_j = \sum_{k=1}^m l_{jk} F_k + \varepsilon_j \quad e \bar{x}_j = 0 \quad e \bar{F}_k = 0, \text{ portanto, } \bar{\varepsilon} = 0$$

Variância:

A variância de um fator específico é dada por: $Var(\varepsilon_j) = \sigma_{\varepsilon_j}^2$, esta variância é denominada especificidade ou unicidade.

Covariância entre fatores específicos: $Cov(\varepsilon_j, \varepsilon_{j'}) = 0$ com $(j \neq j')$.

Assim os fatores específicos são também não correlacionados.

Covariância entre fatores específicos e comuns:

$$Cov(\varepsilon_j, F_k) = 0 \text{ para } j = 1, 2, \dots, \text{ ve } k = 1, 2, \dots, m$$

Ou seja, os vetores de fatores específicos são ortogonais aos vetores de fatores comuns.

2.2.3 Comunalidade e especificidade

A comunalidade é a medida da eficiência da representação de uma variável x_j por uma parte comum, também envolvida nas demais variáveis analisadas. Souza (1998 citado por CRUZ; CARNEIRO, 2003) relata que tem sido aceitos valores de comunalidade superiores a 0,64, por ser equivalente a um coeficiente de correlação entre x_j e z_j superior a 0,80.

Define-se por comunalidade o componente quadrático dado por (4):

$$h_j^2 = \sum_{k=1}^m l_{jk}^2 = 1 - \sigma_{\varepsilon_j}^2 \quad (4)$$

Para cada variável x_j tem-se que $h_j^2 + \sigma_{\epsilon_j}^2 = 1$, em que h_j^2 , denominado comunalidade, representa a proporção da variância da variável padronizada “j” devida a fatores comuns. Considera-se, na análise de fatores, que cada variável possa ser explicada por uma parte comum ($\sum_{k=1}^m l_{jk} F_k$), determinada por “m” fatores (F_1, F_2, \dots, F_m) e por outra parte específica (ϵ_j). A forma funcional do modelo de análise de fatores é dada por (5):

$$X = Y\Lambda + \epsilon \quad (5)$$

em que: X: originalmente, é a matriz (g x a) de observações que apresenta valores obtidos para cada genótipo e variável analisada, destacando-se o fato de que a variável é representada por uma mesma característica medida em vários ambientes; Y: matriz (g x m) de fatores comuns; Λ : matriz (m x a) de cargas fatoriais; ϵ : matriz (g x a) de fatores específicos. Para cada vetor de variáveis tem-se (6) :

$$\tilde{x}_j = Y\tilde{l}_j + \tilde{\epsilon}_j \quad (6)$$

em que: \tilde{x}_j : vetor de observações da variável no ambiente j, de dimensão g x 1; Y: matriz de fatores comuns de dimensão g x m; \tilde{l}_j : vetor de cargas fatoriais, de dimensão m x 1; $\tilde{\epsilon}_j$: vetor de fatores específicos, associados à variável quantificada no j-ésimo ambiente, de dimensão g x 1.

No presente trabalho a matriz X de observações será substituída pela matriz de efeitos G+GA. Procurou-se, na análise de fatores, o estabelecimento de combinações lineares que permitissem a interpretação quanto aos grupos de ambientes com o mesmo padrão de discriminação genotípica, capazes de reter o máximo das associações originalmente disponíveis entre os ambientes

estudados. Como, nesta análise, procura-se relacionar conjunto de variáveis observáveis, representadas na matriz X , com outras que, em parte, são denominadas fatores comuns, representadas na matriz Y , e em outras, por fator específico, representada na matriz ε , tem-se também associação entre as respectivas matrizes de variâncias e covariâncias (7), como ilustrado a seguir:

$$R = \Lambda' \Lambda + \psi \quad (7)$$

Em que R : matriz ($a \times a$) de correlações entre os desempenhos dos genótipos em cada par de ambientes considerados. Por outro lado, pode ser obtido (8):

$$R_c = R - \psi = \Lambda' \Lambda \quad (8)$$

A matriz R_c é denominada matriz de correlações reduzidas dos modelos de análise fatorial e apresenta os mesmos elementos da matriz de correlação original à exceção da sua diagonal, cujos elementos são reduzidos de $\sigma_{e_j}^2$, a partir da matriz R conhecida.

Uma maneira de obter as cargas fatoriais é por meio da fatoração de R_c , usando o teorema da decomposição espectral, em que qualquer matriz simétrica R_c pode ser escrita como (9):

$$R_c = R - \psi = \Lambda' \Lambda = BAB' = \sum_{j=1}^h \lambda_j \tilde{\alpha}_j \tilde{\alpha}_j' \quad (9)$$

sendo

$\lambda_1 \geq \lambda_2 \geq \dots \geq \lambda_h$ os autovalores de R_c ;

$\tilde{\alpha}_1, \tilde{\alpha}_2, \dots, \tilde{\alpha}_h$ os autovetores correspondentes.

De outra forma, tem-se $R_c = \Lambda' \Lambda = (B' A^{1/2})(A^{1/2} B')$. Assim, $\Lambda = B A^{1/2}$

Na prática, não se dispõe de R_c , mas de R e utiliza-se um número $m < h$ de fatores comuns. O objetivo é explicar o máximo da variação em x_j com o menor número possível de fatores, tornado ε_j mínimo.

$$\Lambda = BA^{1/2} \quad (10)$$

Sendo

$$B = [\tilde{\alpha}_1 \tilde{\alpha}_2 \dots \tilde{\alpha}_m]: \text{matriz de cargas fatoriais.}$$

$$B = \begin{pmatrix} \alpha_{11} & \alpha_{12} & \dots & \alpha_{m1} \\ \alpha_{12} & \alpha_{22} & \dots & \alpha_{m2} \\ \vdots & \vdots & & \vdots \\ \alpha_{1h} & \alpha_{2h} & \dots & \alpha_{hm} \end{pmatrix}_{h \times m}$$

$$A^{1/2} = \begin{pmatrix} \sqrt{\lambda_1} & & & \phi \\ & \sqrt{\lambda_2} & & \\ & & \vdots & \\ \Phi & & & \sqrt{\lambda_m} \end{pmatrix}_{m \times m}$$

em que α_{jk} : elemento do autovetor $\tilde{\alpha}_k$ ($k=1,2,\dots,m$) que corresponde ao termo de ponderação da variável k , na análise de componentes principais;

$$l_{jk} = \sqrt{\lambda_k \alpha_{jk}}$$

2.2.4 Estratificação ambiental

Na utilização da análise de fatores destinada à estratificação ambiental, os resultados foram interpretados para cada fator e do potencial de seu interesse.

Foram analisados os elementos ou cargas fatoriais identificando, para cada variável, os fatores com coeficientes de ponderação próximos da unidade. Neste caso, cada variável foi representada por um determinado ambiente, porém em vez das médias dos genótipos dentro de cada ambiente, a matriz de dados foi composta pelos efeitos genotípicos somados aos efeitos da interação GxA.

O agrupamento dos ambientes foi realizado a partir das informações sobre a magnitude das cargas fatoriais finais, obtidas após rotações. Cargas fatoriais maiores ou iguais a 0,7, em valor absoluto, indicam ambientes com altas correlações e foram agrupados dentro de um mesmo fator. Cargas fatoriais finais de valores baixos ($\leq 0,50$) indicavam que o respectivo ambiente não deveria pertencer ao grupo. Cargas fatoriais com valores intermediários não garantiam nenhuma definição de agrupamento.

Antes de serem obtidas as cargas fatoriais que permitiram identificar o melhor agrupamento de ambientes, foi estabelecido o número de fatores a serem considerados no modelo. O número de fatores finais pode ser admitido como igual ao número de autovalores maiores ou iguais a 1,0. No entanto, nos casos em que a proporção da variabilidade explicada pelos autovalores maiores que 1,0 for baixa, podem ser considerados mais fatores até que se atinja, pelo menos, 80% da variação total.

Outro aspecto que foi considerado é o fato de que as cargas fatoriais não permitem clara definição dos ambientes mais similares, recomendando-se obter novos valores, denominados cargas fatoriais finais, que são obtidas por rotação via recursos computacionais.

Em determinados programas estatísticos, a análise é feita assumindo que os fatores que são não-correlacionados, com base no modelo de fatores ortogonais. A extração das cargas fatoriais é feita, então, pelo método dos componentes principais e os fatores são estabelecidos pelo método de rotação varimax (GOULD, 1996), com um máximo de 50 rotações, em que este permite

que os eixos de uma dada projeção representem a direção de máxima variância possível.

2.2.5 Análise de adaptabilidade

A análise de adaptabilidade baseada na análise de fatores é realizada graficamente por meio dos escores em relação aos fatores. Para isso, são traçados eixos paralelos, tomando-se a média dos escores, de modo a estabelecer quatro quadrantes. Nos quadrantes II e IV ficaram situados aqueles genótipos com adaptabilidade específica ao grupo e ambientes determinado pelo fator. No quadrante I ficaram situados aqueles genótipos de adaptabilidade ampla e, no quadrante III, os genótipos ruins, de baixo desempenho e passíveis de descarte ou não indicação para cultivo.

O número de gráficos usados na interpretação dos resultados depende do número de fatores utilizados. O número de gráficos correspondente à combinação de “n” regiões, tomadas duas a duas (C_2^n), de forma que as indicações de genótipos passaram a ser realizadas de modo mais eficiente do que os métodos tradicionais, pois, no método baseado em análise de fatores, não se consideram apenas ambientes favoráveis e desfavoráveis, como nos métodos de regressão linear uni ou bissegmentada, mas grupos de ambientes estabelecidos de acordo com suas similaridades.

Os escores fatoriais foram obtidos sabendo-se que $X = \hat{Y}\Lambda$ ou $X' = \Lambda'\hat{Y}'$, de modo que $\hat{Y}' = (\Lambda\Lambda')^{-1}\Lambda X' = \beta X'$, sendo \hat{Y}' : matriz de dimensões m x p em que cada linha apresenta os escores do k-ésimo fator (1, 2, ..., m); Λ : matriz de dimensões m x q das cargas fatoriais rotacionadas finais; X: originalmente é a matriz de dimensões p x q de observações, que será substituída pela matriz G+GA; β : matriz de dimensões m x q de coeficientes de ponderação dos caracteres para obtenção dos escores dos fatores.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A avaliação das linhagens CMS é uma etapa fundamental dos programas de melhoramento visando à produção de híbridos usando a macho-esterilidade. Antes da obtenção do híbrido é importante verificar a quantificação de plantas macho estéreis das linhagens e a sua estabilidade em diferentes ambientes.

Diante destas circunstâncias, os resultados obtidos nas análises de variância individuais para a porcentagem de plantas macho estéreis revelaram efeitos significativos para linhagens em 13 dos 16 ambientes avaliados, mostrando haver diferenças entre as linhagens nos diferentes ambientes considerados (Tabela 1). A análise de variância conjunta mostrou efeitos significativos para linhagens, ambientes e interação LxA, revelando que as linhagens apresentaram comportamento diferenciado em função do ambiente (Tabela 2).

É comum a presença de interação genótipos x ambientes significativas quando são consideradas características relacionadas a macho esterilidade (MUNSCH et al., 2010; WEIDER et al., 2009). Esse aspecto torna relevante a necessidade da avaliação ocorrer em diferentes ambientes, especialmente naqueles onde ocorrerá a multiplicação da linhagem em escala comercial e a sua posterior utilização na produção da semente híbrida.

Tabela 1 Quadrados médios de genótipos (QMG) e de resíduo (QMR), médias da porcentagem de plantas macho estéreis, acurácia experimental (\hat{r}_{gg}) em dezesseis ambientes e médias das linhagens macho estéreis SYN-1, SYN-2, SYN-3 e SYN-4

Ambientes	Safra	QMG	QMR	P ¹	Média	r_{gg}	SYN-1	SYN-2	SYN-3	SYN-4
Casa Branca-SP	2008/09	50,08	2,32	0,001	94,74	0,98	94,9	89,0	96,9	97,8
Casa Branca-SP	2009	5,10	0,32	0,003	98,55	0,97	97,1	98,3	99,0	100,0
Casa Branca-SP	2009/10	0,45	0,29	0,032	99,51	0,60	99,1	99,3	99,6	100,0
Goiatuba-GO	2008/09	0,02	0,01	0,455	100	0,71	100,0	100,0	100,0	100,0
Goiatuba-GO	2009	2,71	1,06	0,152	99,19	0,78	98,2	98,6	100,0	100,0
Goiatuba-GO	2009/10	0,84	0,05	0,002	99,54	0,97	99,1	99,2	100,0	100,0
Guaira-SP	2008/09	0,45	0,05	0,011	99,67	0,94	99,3	99,4	100,0	100,0
Guaira-SP	2009	19,27	0,13	0	98,63	1,00	97,1	99,8	100,0	99,8
Guaira-SP	2009/10	6,97	0,39	0,002	98,75	0,97	97,1	98,1	100,0	100,0
Morrinhos-GO	2009	5,04	0,17	0,001	99,16	0,98	97,3	99,6	99,8	100,0
Morrinhos-GO	2009/10	3,61	0,12	0,001	99,21	0,98	97,6	100,0	99,4	99,8
Parauna-GO	2009/10	0,52	0,32	0,278	99,13	0,62	98,7	99,5	99,5	99,3
São Gotardo-MG	2009/10	0,88	0,07	0,006	99,67	0,96	98,9	99,8	100,0	100,0
Uberlândia-MG	2008/09	3,36	0,23	0,004	99,02	0,97	97,8	98,5	100,0	99,7
Uberlândia-MG	2009	123,59	3,75	0,000	96,23	0,98	86,6	99,4	99,3	99,5
Uberlândia-MG	2009/10	7,34	0,34	0,001	98,30	0,98	96,3	98,0	98,9	100,0
Média		-	-	-	-	-	97,0 c	98,5 b	99,5 a	99,8 a

¹:Significância pelo teste F.

Os experimentos tiveram acurácia variando de 0,60 até 1,0, sendo classificadas de moderada até muito alta (RESENDE, 2007). A maioria dos experimentos apresentou acurácia acima de alta. A média geral de plantas macho estéreis foi de 98,71%, variando de 94,74% em Casa Branca-SP, na safra de 2008/2009, a 100% para Goiatuba-GO (Tabela 1).

Tabela 2 Resumo da análise de variância conjunta para porcentagem de plantas macho estéreis, assumindo locais e safras como ambientes, e estimativas do coeficiente de variação experimental e a média geral, das linhagens macho estéreis SYN-1, SYN-2, SYN-3 e SYN-4

FV	GL	QM
Blocos/Ambientes	32	
Linhagens (L)	3	74,52 (0)
Ambientes (A)	15	22,31 (0)
LxA	45	10,37 (0)
Resíduo	128	0,55
Média: 98,71%		
CV%: 0,75		

⁰: Em parêntese significância pelo teste F.

As linhagens SYN-3 e SYN-4 se destacaram pela alta porcentagem de plantas macho estéreis, 99,5% e 99,8%, na média dos ambientes, e diferenciando estatisticamente das linhagens SYN-1 e SYN-2 (Tabela 1). Entretanto, apesar das diferenças significativas, as linhagens SYN-1 e SYN-2 apresentaram médias de 97% e 98,5% de plantas macho estéreis, mostrando uma baixa restauração.

Apesar da superioridade das linhagens SYN-3 e SYN-4 nenhuma linhagem foi totalmente macho-estéril na média geral, mostrando uma reversão parcial da macho esterilidade. A linhagem SYN-3 teve porcentagem de 100% de plantas estéreis em oito ambientes e a SYN-4 apresentou essa porcentagem em dez ambientes.

Genótipos macho estéreis com o citoplasma do tipo S com recuperação parcial da fertilidade já haviam sido observados em outros trabalhos e podem estar associados a presença de grande número de alelos nos genes restauradores da fertilidade e a interação destes alelos com o ambiente (WEIDER et al., 2009). O sistema macho-estéril S tem sido caracterizado por apresentar frequentes

reversões da fertilidade, especialmente por ser mais propenso a interagir com o ambiente, tornando mais instável (DUVICK, 1965; GABAY-LAUGHMAN et al., 2004; LAUGHMAN; GABAY-LAUGHMAN, 1983).

De acordo com os resultados apresentados, todas as linhagens avaliadas podem ser indicadas para obtenção comercial do híbrido. Entretanto, é importante que a multiplicação das linhagens e a produção das sementes híbridas ocorram em ambientes onde houve as maiores taxas de esterilidade e deve-se considerar a utilização concomitante de outros métodos de emasculação da inflorescência masculina, como, por exemplo, o despendoamento manual e/ou mecânico. Apesar da restauração parcial da fertilidade, a utilização destas linhagens na produção de sementes comerciais pode trazer vantagens operacionais, facilitando o manejo do controle da polinização, reduzindo os custos e perdas por danos no arranquio excessivos de folhas.

Paralelo ao desempenho das linhagens, uma etapa importante no processo de obtenção de genótipos macho estéreis é a avaliação do desempenho produtivo dos híbridos obtidos por estas linhagens. Os híbridos são avaliados nas redes de ensaio distribuídas em diferentes regiões geográficas, que representam distintas condições de cultivo. No desenvolvimento de híbridos macho estéreis um ponto importante é a comparação destes genótipos em relação aos isogênicos provenientes de linhagens com fertilidade normal.

Nesse sentido, considerando as análises de variância individuais os híbridos avaliados apresentaram diferenças significativas entre si, em todos os locais considerados (Tabela 3), e também na análise conjunta ($p < 0,05$) (Tabela 4). Os CVs variaram de 3,23% para Planura-MG a 11,33% para o ambiente Joviânia-GO, mostrando boa precisão experimental. As médias obtidas foram de 8.598 kg.ha⁻¹ para Chapadão do Sul-MS a 11.880 kg.ha⁻¹ para Guaiá-SP, com média geral de 9.866 kg.ha⁻¹.

A análise de variância conjunta ainda constatou efeitos significativos para Locais e para a interação LxA, indicando que os híbridos apresentaram comportamento diferenciado em função do ambiente de cultivo e que os ambientes apresentaram diferenças entre si (Tabela 4). Também foram constatadas mudanças na magnitude das respostas para o caráter produtividade de grãos devido à variação ambiental, o que justifica a realização da estratificação ambiental.

Interações GxA significativas em avaliações da produtividade em milho são comuns, sobretudo em função da natureza poligênica desta característica, em especial quando são considerados ambientes com características distintas (GARBUGLIO et al., 2007; RIBEIRO; RAMALHO; FERREIRA, 2000). Alguns estudos também identificaram interação avaliando híbridos de milho macho estéreis (KAESER et al., 2003; STAMP et al., 2000; WEIDER et al., 2009).

Tabela 3 Quadrados médios de genótipos (QMG) e de resíduo (QMR), médias de produtividade de grãos e acurácia (\hat{r}_{gg}) de nove híbridos avaliados em 25 locais de diferentes estados da região Central do Brasil, conduzidos na safra 2009/2010

Locais	Altitude	QMG ¹	QMR ¹	P ²	Médias (kg ha ⁻¹)	\hat{r}_{gg}
1- Chapadão do Céu-GO	797	227,60	44,75	0,003	9021	0,90
2 - Lucas do Rio Verde - MT	399	136,74	35,03	0,010	9193	0,86
3 - Uberlândia – MG	843	185,79	60,86	0,027	8983	0,82
4 - Jataí-GO	731	181,09	19,88	0,000	8840	0,94
5 - Campo Verde – MT	749	377,45	36,66	0,000	9440	0,95
6 - José Bonifácio – SP	430	182,90	24,75	0,000	9385	0,93
7 - Araçatuba – SP	355	264,57	43,54	0,001	8813	0,91
8 - Santa Juliana – MG	849	188,32	34,95	0,002	9460	0,90
9 - Iraí de Minas – MG	1026	408,75	36,12	0,000	9852	0,95
10 - Planura-MG	526	423,44	6,00	0,000	9591	0,99

“Tabela 3, conclusão”

Locais	Altitude	QMG ¹	QMR ¹	P ²	Médias (kg ha ⁻¹)	\hat{r}_{gg}
11 - Cristalina-GO	975	438,99	51,99	0,000	9319	0,94
12 - Patos de Minas – MG	842	402,70	55,77	0,000	9529	0,93
13 - Casa Branca –SP	663	351,37	30,33	0,000	9639	0,96
14 - Campo Florido – MG	626	184,85	40,21	0,005	11029	0,88
15 - Centralina-MG	465	263,29	43,07	0,001	9703	0,91
16 - Caiapônia-GO	694	257,67	46,41	0,002	10224	0,91
17 - Joviânia – GO	842	279,89	87,25	0,023	10244	0,83
18 - Dom Aquino – MT	340	187,42	60,30	0,026	9822	0,82
19 - Goiatuba- GO	795	126,40	25,50	0,003	11374	0,89
20 - Montividiu – GO	797	315,81	32,21	0,000	10007	0,95
21 - Chapadão do Sul-MS	786	353,47	26,56	0,000	8598	0,96
22- Guaíra-SP	519	77,25	23,01	0,019	11880	0,84
23 - Morrinhos-GO	768	178,03	43,38	0,008	11418	0,87
24 - Holambra-SP	604	81,48	29,41	0,039	11208	0,80
25 - São Gotardo – MG	1083	458,41	63,68	0,000	10092	0,93

¹: QM ÷ 10⁵; ²: Significância pelo teste F.

Apesar de estudos sobre a interação genótipos x ambientes serem de grande importância para o melhoramento, não proporcionam informações pormenorizadas sobre o comportamento de cada genótipo nas variações ambientais. Nesse sentido foram realizadas as análises de adaptabilidade e estabilidade pelo método FGGA (GARBUGLIO, 2010).

Tabela 4 Resumo da análise de variância conjunta para produtividade de grãos (kg ha^{-1}), e estimativas do coeficiente de variação experimental e a média geral, avaliados em 25 locais de diferentes estados da região Central do Brasil, conduzidos na safra 2009/2010

FV	GL	QM x 10^{-5} ¹
Blocos/Ambientes	50	5,16 (0)
Genótipos (G)	8	104,32 (0)
Ambientes (A)	24	214,86 (0)
GxA	192	22,88 (0)
Resíduo	400	4,01
Média: 9.866 kg ha^{-1}		
CV%:8,05		

¹:Em parênteses significância pelo teste F.

Pelos dados apresentados na Tabela 5 constatou-se que os dois primeiros autovalores maiores do que 1 capturaram apenas 50,7% da variação. Tem sido descrito a necessidade de capturar pelo menos 70% da variação nos primeiros eixos para que seja capturada uma parte expressiva da variação (RAMOS; SANCHES; COTES, 2009; YAN et al., 2000; ZOBEL; WRIGHT; GAUCH JUNIOR, 1988). Adicionando o terceiro autovalor foi observada que a captura sobe para 66,7%, contudo torna-se ainda necessária a adição do quarto autovalor para que seja atingido 77,5% da variação de forma a tornar expressiva a captura da variação (RAMOS; SANCHES; COTES, 2009; YAN et al., 2000). Crossa (1990) comenta que uma característica marcante nos modelos multivariados é que eles buscam capitalizar grande parte do chamado “padrão” nos primeiros eixos principais, relegando aos eixos subseqüentes, cada vez menos “padrão” e mais “ruído”.

As comunalidades (h_j^2), ou seja, as medidas de eficiência na representação das variáveis por uma parte comum ficaram acima de 0,8, indicando alta eficiência do processo de fatoração para o agrupamento de ambientes (Tabela 6).

O primeiro fator agrupou os locais Uberlândia-MG, Patos de Minas-MG e São Gotardo. O segundo fator agrupou os ambientes Jataí-GO, Cristalina-GO, Goiatuba-GO, Montividiu-GO, Morrinhos-GO e Holambra-SP. No terceiro fator foram agrupados os ambientes Santa Juliana-MG, Iraí de Minas-MG, Joviânia-GO e Chapadão do Sul-MS, enquanto que o quarto fator agrupou apenas os ambientes José Bonifácio-SP e Araçatuba-SP.

Tabela 5 Porcentagem da variação acumulada e autovalores para cada fator obtido para análise de estratificação dos ambientes de nove híbridos avaliados em 25 locais de diferentes estados da região Central do Brasil, conduzidos na safra 2009/2010

Fator	Autovalores	Porcentagem Acumulada
1	6,531	26,1
2	6,155	50,7
3	3,988	66,7
4	2,691	77,5
5	2,523	87,6
6	1,783	94,7
7	1,000	98,7
8	0,329	100,0

É importante enfatizar que o método foi eficiente em agrupar fatores com similaridades em características geográficas e/ou com nível tecnológico de manejo. No fator 1 foram agrupados locais situados em Minas Gerais, com proximidade de localização geográfica e de altitude. Essa região ainda é caracterizada pelo alto investimento tecnológico no manejo, como maquinário para semeadura, aplicação de defensivos e colheita. Para o segundo fator novamente há uma proximidade geográfica entre os locais, propiciando similaridades em fatores como altitude, temperaturas e precipitação. A exceção nesse fator é Holambra que ao contrário dos demais locais está localizado em São Paulo, porém possui o mesmo padrão tecnológico e altitude dos demais

locais. No terceiro fator os ambientes são muito semelhantes entre si quanto à altitude, sendo este um dos prováveis fatores que levaram ao agrupamento. No fator 4 estão dois locais situados em São Paulo com altitude baixa e com características climáticas e de manejo tecnológico muito próximos entre si.

O processo de estratificação ambiental permitiu a subdivisão de regiões heterogêneas em sub-regiões mais uniformes, buscando reunir ambientes de classificação genotípica similar e que fossem independentes em qualidade ambiental, onde se exclui qualquer interação GxA significativa ou, em outras situações, uma interação significativa com predominância de porção simples, ou seja, que não venha a comprometer a recomendação das cultivares. A análise de fatores foi utilizada eficientemente por Garbuglio et al. (2007) que da mesma forma que neste trabalho considerou a quantidade de fatores suficiente para atingir acima de 70% de captação da variação total.

Tabela 6 Estratificação ambiental por meio da análise de fatores, de nove híbridos, avaliados em 25 locais de diferentes estados da região Central do Brasil, conduzidos na safra 2009/2010

Ambientes	Cargas Fatoriais Após Rotação				Comunalidades
	Fator 1	Fator 2	Fator 3	Fator 4	
1- Chapadão do Céu-GO	0,6970	0,1377	0,1840	0,5331	0,91
2 - Lucas do Rio Verde - MT	0,3558	-0,3673	0,6295	0,0315	0,93
3 - Uberlândia - MG	-0,7660	-0,1843	0,0275	0,2051	0,90
4 - Jataí-GO	-0,0594	0,8540	-0,1430	0,3227	0,93
5 - Campo Verde - MT	0,4499	0,3716	0,4631	0,3213	0,94
6 - José Bonifácio - SP	0,1234	-0,1289	-0,2449	0,8659	0,93
7 - Araçatuba – SP	-0,0789	-0,1767	-0,0881	0,9152	0,93
8 - Santa Juliana - MG	0,1044	-0,1172	0,8655	-0,0392	0,93
9 - Iraí de Minas - MG	0,0273	0,3446	0,7105	-0,0287	0,94
10 - Planura-MG	0,4070	0,5306	0,4507	-0,0283	0,93
11 - Cristalina-GO	0,2773	0,8835	0,1980	0,0871	0,94
12 - Patos de Minas - MG	0,7631	-0,1706	0,3588	0,2827	0,94

“Tabela 6, conclusão”

Ambientes	Cargas Fatoriais Após Rotação				Comunalidades
	Fator 1	Fator 2	Fator 3	Fator 4	
13 - Casa Branca - SP	0,1117	0,4940	0,6793	0,3711	0,94
14 - Campo Florido - MG	0,1502	0,1250	-0,6605	-0,4855	0,93
15 - Centralina-MG	0,5870	-0,2124	0,4102	0,6040	0,94
16 - Caiapônia-GO	0,2261	-0,5628	0,6924	-0,1352	0,93
17 - Joviânia-GO	-0,1554	-0,0270	0,8345	-0,2614	0,94
18 - Dom Aquino - MT	0,1397	0,2615	0,5071	-0,0598	0,92
19 - Goiatuba- GO	0,0966	0,7963	0,0262	-0,2342	0,93
20 - Montividiu - GO	0,1119	0,9031	-0,0836	-0,3833	0,94
21 - Chapadão do Sul-MS	-0,5606	-0,0993	0,7277	0,0536	0,93
22- Guaíra-SP	0,0218	0,4543	0,4575	0,4726	0,92
23 - Morrinhos-GO	-0,2462	0,7459	-0,0958	-0,4355	0,94
24 - Holambra-SP	-0,0846	0,7575	0,1068	-0,5799	0,94
25 - São Gotardo - MG	-0,8589	-0,0141	0,2268	0,0300	0,93

Para a análise de adaptabilidade por dispersão gráfica, a partir dos escores fatoriais finais (Figura 1), foram utilizados os quatro fatores que agruparam 15 dos 25 ambientes considerados.

Os híbridos B1 e B2 apresentaram adaptabilidades amplas aos ambientes agrupados nos fatores 1, 2 e 3, por estarem localizados no quadrante Q1 dos gráficos entre estes fatores. Esses híbridos ainda mostraram adaptabilidade específica aos ambientes agrupados nesses fatores quando comparado com os locais do fator 4 por terem sido classificados no quadrante IV em cada um dos contrastes. Estes híbridos ainda apresentaram as maiores médias gerais, destacando-se pela superioridade em relação aos demais híbridos avaliados, incluindo três testemunhas (Híbridos D, E e F), e por terem sido agrupados juntos pelo teste de comparação de médias de Scott-Knott, considerando a média de todos os locais (Tabela 7).

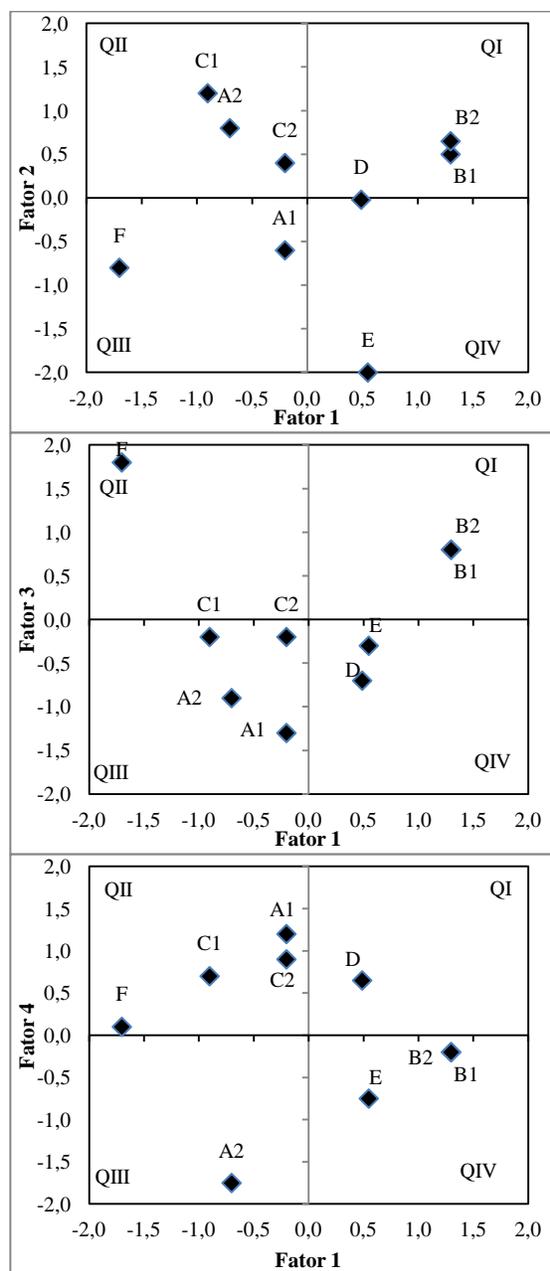
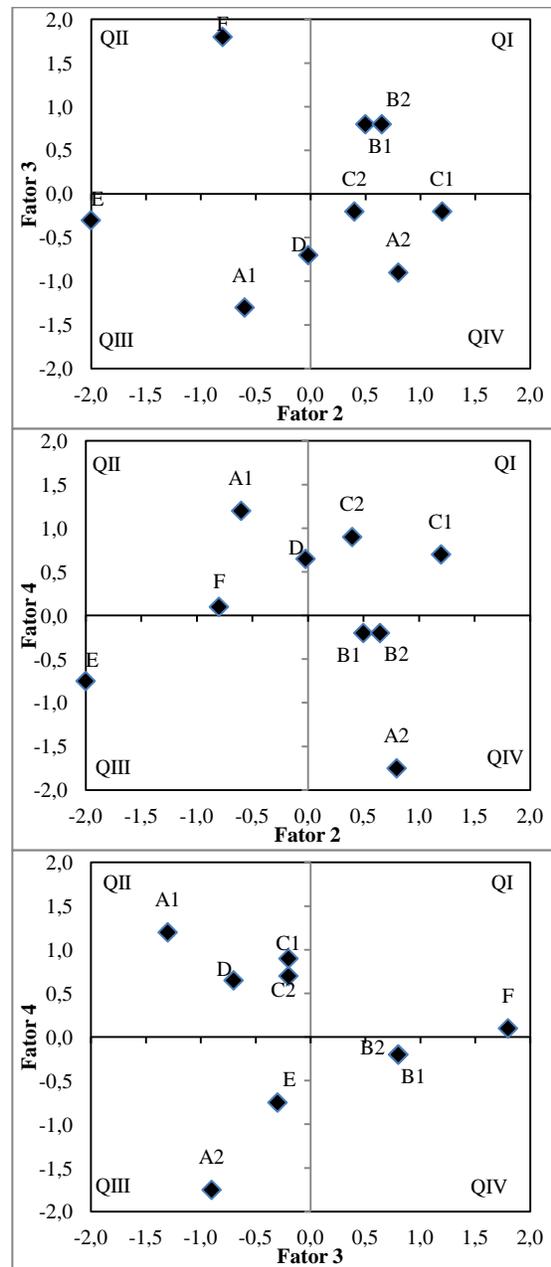


Figura 1 Análise Gráfica da adaptabilidade de nove híbridos de milho, a partir dos escores obtidos, considerando os ambientes envolvidos nos fatores 1, 2, 3 e 4 (...continua...)



Esses resultados mostraram que o processo de introgressão da característica macho esterilidade no híbrido B2 foi eficiente, uma vez que este

híbrido é isogênico ao B1, diferenciado apenas pela presença de macho esterilidade no primeiro. Os dois híbridos possuem o mesmo parental macho, sendo que o parental fêmea do B2 foi obtido por meio de introgressão da característica macho esterilidade na linhagem fêmea do híbrido B1. O processo ocorreu por sucessivos retrocruzamentos utilizando a linhagem fêmea do B1 como recorrente, dessa forma, no final do processo obteve-se a linhagem isogênica macho-estéril SYN-2, visando obter o híbrido isogênico a partir desta linhagem.

O objetivo final do processo de introgressão foi obter o híbrido isogênico, ou seja, com as mesmas características do híbrido original (B1), diferenciada apenas pela característica que está sendo introgridida. No caso da macho esterilidade o híbrido não foi afetado, uma vez que a característica deve manifestar apenas na linhagem fêmea. Nesse sentido, é muito importante que o comportamento do híbrido produzido pela linhagem isogênica macho-estéril seja semelhante ou superior ao híbrido original.

Esse processo tem sido comumente utilizado na incorporação da macho esterilidade em milho, especialmente porque no processo de multiplicação da linhagem macho-estéril é necessária a linhagem isogênica macho fértil (BOZINOVIC et al., 2010; STAMP et al., 2000; WEIDER et al., 2009).

Os híbridos C1 e C2 mostraram adaptabilidade amplaaos ambientes agrupados nos fatores 2 e 4 por estarem localizados no quadrante I ou IV quando foram considerados esses ambientes. Por outro lado, quando foram considerados os ambientes agrupados nos fatores 1 e 3, esses genótipos mostraram baixo desempenho, estando propensos a não serem indicados para estes ambientes.

Novamente fica evidente a eficiência na introgressão da macho esterilidade. O híbrido C1 e o seu isogênico macho-estéril C2 apresentaram desempenhos agronômicos similares, sendo classificados nos mesmos quadrantes pelo método FGGA e com as mesmas letras de classificação pelo

teste de comparação de média de Tukey, considerando todos os ambientes (Tabela 7). Dessa forma, o processo de introgressão foi eficiente para manter as principais características agrônômicas, da linhagem recorrente original.

Tabela 7 Produtividade média de nove híbridos avaliados em 25 locais de diferentes estados da região Central do Brasil, conduzidos na safra 2009/2010

Locais	Locais												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
A1	9299	8255	9023	8395	9310	9979	9710	7935	8712	9025	8068	9156	9444
A2	7485	8164	8958	8835	8338	8016	7184	8761	9632	9678	9497	7330	8656
B1	9361	9439	7589	9033	10949	9068	8105	9816	11023	11294	10572	10631	10941
B2	10511	9763	8537	8810	10667	8888	8371	10045	10817	10999	10354	11008	10720
C1	8947	9063	9692	10367	9002	9579	8830	8944	9563	8510	10227	9283	9680
C2	8919	8699	9856	9252	10943	10105	10189	9929	11298	9482	10583	9994	10247
D	9788	9744	8144	9155	8312	10640	9631	9588	8021	10191	9011	9053	8965
E	8536	9873	9165	7693	8338	9118	8272	9555	8875	7462	7462	10611	7638
F	8344	9737	9882	8017	9103	9070	9026	10568	10729	9677	8093	8699	10458
	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	Média ¹
A1	10864	9851	9279	8835	8826	10965	8972	8166	11621	10588	10351	9732	9374 c
A2	12484	7445	9100	10014	9833	11908	11485	8365	11143	12801	12073	10541	9509 c
B1	10802	10635	10845	10738	10175	11667	10789	8551	12412	11375	11464	9032	10252 a
B2	10622	10363	10620	10892	10451	12079	10610	8500	11998	11553	11456	8853	10299 a
C1	10312	9491	9616	10295	9140	12255	11023	8230	12829	12093	11710	11199	9995 b
C2	11559	9552	9311	10574	9646	10587	9915	8351	11731	10906	11138	9161	10077 b
D	11534	10422	10374	8644	11040	11477	9736	8293	11751	11905	10935	10570	9877 b
E	11266	9800	11396	10551	8794	10547	8794	7539	11435	10363	10820	9180	9323 c
F	9820	9772	11478	11656	10492	10880	8740	11384	12002	11177	10922	12558	10091 b

¹: Agrupamento de médias, pelo teste Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

Os resultados obtidos para os híbridos A1 e A2 mostraram baixo desempenho de produtividade de grãos nos locais compreendidos pelos fatores 1

e 3, sendo classificados no quadrante III. O A1 ainda mostrou baixo desempenho nos ambientes do fator 2 e o A2 para os ambientes do fator 4. Por outro lado, o A1 mostrou adaptabilidade específica aos ambientes correspondentes ao fator 4 e o A2 aos ambientes do fator 2.

Os híbridos A1 e A2 não apresentaram um comportamento consistente quando comparado o híbrido proveniente da linhagem macho fértil em relação ao híbrido proveniente da versão macho-estéril. O fraco desempenho para a produtividade de grãos nos ambientes considerados também pode ser visualizado considerando que os híbridos avaliados não diferiram do híbrido E pelo teste de comparação de médias que apresentou o pior desempenho (Tabela 7).

Parte da mudança no comportamento do híbrido A1 em relação ao seu isogênico macho-estéril A2 pode ser em função da interação entre o citoplasma macho-estéril com o germoplasma e o ambiente. Interações significativas em função da inserção do citoplasma macho-estéril já foram anteriormente descritas por Duvick (1965) e Stamp et al. (2000) e podem propiciar comportamento diferenciado entre os híbridos quando comparados entre si

Apesar dos resultados para a região Central do Brasil ter indicado adaptabilidade específica ou baixo desempenho produtivo, sugerindo um indicativo para não recomendação para estes locais. Os híbridos A1 e A2 também foram avaliados em locais da região Sul do Brasil e podem apresentar potencial produtivo nesses ambientes. Com objetivo de obter híbridos adaptados as condições específicas do mercado e visando diminuir a interação GxA, a Syngenta vem desenvolvendo programas de melhoramento específicos para a região Sul do Brasil, com redes de ensaio que compreendem condições representativas dessas regiões.

As testemunhas também tiveram desempenhos inconsistentes para produtividade de grãos. O híbrido D mostrou adaptabilidade específica aos

ambientes dos fatores 1 e 4, o híbrido E apenas aos ambientes que compõem o fator 1 e o F aos fatores 3 e 4. Para os demais fatores os referidos híbridos não tiveram bom desempenho para produtividade de grãos.

4 CONCLUSÕES

Todas as linhagens apresentam acima de 94% de macho esterilidade e são estáveis a diferentes condições ambientais

As linhagens SYN-1, SYN-2, SYN-3 e SYN-4 podem ser utilizadas na produção comercial de híbridos, associado a outros métodos de despendoamento.

Os híbridos B1 e B2 possuem ampla adaptabilidade na maioria dos ambientes avaliados e foram superiores para a produtividade de grãos.

REFERÊNCIAS

BOZINOVIC, S. et al. The plus-hybrid effect on the grain yield of two zp maize hybrids. **Genetika**, Beograd, v. 42, n. 3, p. 475-484, Mar. 2010.

CROSSA, J. Statistical analyses of multilocations trials. **Advances in agronomy**, San Diego, v. 44, p. 55-85, Dec. 1990.

CRUZ, C. D.; CARNEIRO, P. C. S. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. Viçosa, MG: UFV, 2003. v. 2, 585 p.

DUARTE, J.B.; VENCOVSKY, R. **Interação genótipos x ambientes: uma introdução à análise AMMI**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1999. 60p.

DUVICK, D. N. Cytoplasmic pollen sterility in corn. **Advances in Genetics**, New York, v. 13, p. 1-56, 1965.

GABAY-LAUGHNAN, S. et al. Molecular-genetic characterization of CMS-S restorer-of-fertility alleles identified in Mexican maize and teosinte. **Genetics**, Austin, v. 166, n. 2, p. 959-970, Mar./Apr. 2004.

GARBUGLIO, D. D. **Metodologia de estratificação ambiental e adaptabilidade via análise de fatores associada aos efeitos genotípicos e de interação genótipos por ambientes**. 2010. 105 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.

GARBUGLIO, D. D. et al. Análise de fatores e regressão bissegmentada em estudos de estratificação ambiental e adaptabilidade em milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, n. 2, p. 183-191, fev. 2007.

GOULD, S. **The mismeasure of man**. New York: W. W. Norton, 1996. 443p.

KAESER, O. et al. Impact of different CMS types on grains yield of dent x flint hybrids os maize (*Zea mays* L.). **Maydica**, Bergamo, v. 48, n. 1, p. 15-20, Jan./Mar. 2003.

KANG, N. S.; GAUCH JUNIOR, H. G. **Genotype by environment interaction**. New York: CRC, 1996. 416 p.

KASER-SCHNEIDER, O. **Physiological and agronomic traits of cytoplasmic male sterility in maize (*Zea mays* L.) and its molecular discrimination**. 2002. 89 p. Thesis (Ph.D. in Natural Sciences) - Swiss Federal Institute of Technology Zurich, Zurich, 2002.

LAUGHNAN, J. R.; GABAY-LAUGHNAN, S. Cytoplasmic male sterility in maize. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, v. 17, p. 27-48, 1983.

LEVINGS, C. S. The Texas cytoplasm of maize: cytoplasmic male sterility and disease susceptibility. **Science**, New York, v. 250, n. 6, p. 942-947, June 1990.

_____. Thoughts on cytoplasmic male sterility in cms-T maize. **Plant Cell**, Rockville, v. 5, n. 10, p. 1285-1290, Oct. 1993.

MACKENZIE, S. The influence of mitochondrial genetics in crop breeding strategies. **Plant Breeding Review**, Berlin, v. 25, n. 6, p. 115-138, June 2004.

MUNSCH, M. A. et al. Grain yield increase and pollen containment by plus-hybrids could improve acceptance of transgenic maize. **Crop Science**, Madison, v. 50, n. 3, p. 909-919, May/June 2010.

RAMOS, L. M.; SANCHES, A.; COTES, J. M. Teste multiambientais na seleção de genótipos de arroz utilizando o modelo de regressão nos sítios ou locais. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.39, n.1, p.52-57, jan. 2009.

RESENDE, M. D. V. **Matemática e estatística na análise de experimentos de campo**. Colombo: EMBRAPA Florestas, 2007. 435 p.

RIBEIRO, P. H. E.; RAMALHO, M. A. P.; FERREIRA, D. F. Adaptabilidade e estabilidade de genótipos de milho em diferentes condições ambientais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, n. 11, p. 2213-2222, nov. 2000.

STAMP, P. et al. Increase in the yield of cytoplasmic male sterile maize revisited. **Crop Science**, Madison, v. 40, n. 1, p. 1586-1587, Jan./Feb. 2000.

ULLSTRUP, A. J. The impact of the southern corn leaf blight epidemics of 1970-1971. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 10, p. 37-50, 1972.

WEIDER, C. et al. Stability of cytoplasmic male sterility in maize under different environmental conditions. **Crop Science**, Madison, v. 49, n. 1, p. 77-84, Jan. 2009.

YAN, W. et al. Cultivar evaluation and megaenvironment investigation based on the GGE biplot. **Crop Science**, Madison, v. 40, n. 3, p. 597-605, May 2000.

ZOBEL, R. W.; WRIGHT, M. J.; GAUCH JUNIOR, H. G. Statistical analysis of a yield trial. **Agronomy Journal**, Madison, v. 80, n. 3, p. 388-393, 1988.

CAPÍTULO 4 Avaliação comparativa da qualidade da semente híbrida em sistema de produção usando linhagens macho estéreis

RESUMO

Sistemas macho estéreis citoplasmáticos têm sido utilizados visando reduzir a operação do despendoamento e a obtenção de sementes com alta qualidade. Foram obtidos os híbridos SYN-MF proveniente de linhagens macho férteis e a versão isogênica macho-estéril SYN-ME utilizando a linhagem macho-estéril SYN-LC, com e sem despendoamento. Sete tratamentos foram obtidos envolvendo diferentes combinações de sementes: SYN-MF; SYN-ME com despendoamento; SYN-ME sem despendoamento; SYN-ME com despendoamento + 50% SYN-MF; SYN-ME sem despendoamento + 50% SYN-MF; SYN-ME com despendoamento + 75% SYN-MF; SYN-ME sem despendoamento + 75% SYN-MF. Cada um dos tratamentos foi semeado em um campo isolado visando à quantificação de plantas autofecundadas. A avaliação foi feita visual e por isoenzimas. Todos os tratamentos foram classificados quanto à forma e tamanho. As linhagens foram avaliadas quanto ao potencial produtivo. O híbrido SYN-ME macho-estéril produzido com ou sem despendoamento teve porcentagens de plantas autofecundadas menores do que o isogênico SYN-MF, considerando as diferentes porcentagens de combinação dos híbridos SYN-ME e SYN-MF. O despendoamento associado à utilização de linhagens macho estéreis contribuiu para a redução de plantas autofecundadas no híbrido. A linhagem macho-estéril SYN-ME é eficiente em evitar a autofecundação. Houve reduções no custo da semente híbrida produzida quando as linhagens macho estéreis estão envolvidas. Mesmo quando foi utilizado despendoamento em 40% da linhagem fêmea, houve redução no custo por saco em relação ao método tradicional.

Palavras-chave: CMS. Linhagens. Despendoamento. Produção de semente.

ABSTRACT

Male-sterile cytoplasmic systems have been used to reduce the detasseling operation and obtain high quality seeds. Hybrids SYN-MF were obtained from male-fertile inbred lines and its isogenic male-sterile version (SYN-ME) using male-sterile inbred line SYN-LC, with and without detasseling. Seven treatments were obtained with different seed combinations: SYN-MF; SYN-ME with detasseling; SYN-ME without detasseling; SYN-ME with detasseling + 50% MF-SYN, SYN-ME without detasseling + 50% SYN-MF; SYN-ME with detasseling + 75% MF-SYN, SYN-ME without detasseling + 75% SYN-MF. Each treatment was sown in an isolated field in order to quantify self-fertilized plants. The evaluation was performed visually and by isoenzymes. All treatments were classified in shape and size. The inbred lines were evaluated for yield potential. The SYN-ME male-sterile hybrid produced with and without detasseling presented the lowest percentages of self-fertilized plants in relation to its isogenic SYN-MF, considering the different percentages of the combination of hybrids SYN-ME e SYN-MF. The detasseling associated with the use of male-sterile inbred lines contributed to a reduction of self-fertilized plants in the hybrid. The SYN-MF male-sterile inbred line was efficient in avoiding self-fertilization. There was a decrease in the cost of hybrid seed produced when the male-sterile inbred lines were involved. Even when detasseling was used in 40% of the female inbred line, there was a reduction in the cost per sac compared to the traditional method.

Keywords: CMS. Inbred Lines. Detasseling. Seed production.

1 INTRODUÇÃO

O mercado brasileiro de produção de milho está baseado na utilização de sementes híbridas que entre outros benefícios, permitiu o incremento da produtividade de grãos, a expansão da área de produção e a resistência a fatores bióticos e abióticos (PATERNIANI; CAMPOS, 1999).

Na produção da semente híbrida uma importante etapa é efetuar o despendoamento da linhagem fêmea visando ter o direcionamento da polinização (MAGALHÃES et al., 1999). Além do alto custo da operação, se o despendoamento não for feito de forma segura pode permitir que as plantas se autofecundem, comprometendo a qualidade das sementes, podendo acarretar em prejuízos pelo descarte do lote, ou por perdas na produtividade de grãos do agricultor. Diante do exposto, as empresas produtoras de sementes têm empenhado esforços para o controle do despendoamento em campos de produção e uma alternativa que vem sendo considerada é a utilização de sistemas macho estéreis.

Sistemas macho estéreis por definição não produzem polens viáveis e vem sendo utilizados nos programas de melhoramento por propiciar vantagens competitivas na produção de sementes híbridas, especialmente considerando as facilidades no manejo, dispensando o despendoamento do parental fêmea e promovendo a redução no custo de produção de sementes (KASER-SCHNEIDER, 2002).

O sistema que mais tem sido utilizado é a macho esterilidade genético citoplasmática (CMS), sendo atualmente muito comum o uso dos citoplasmas C e S (WYCH, 1988). As linhagens macho estéreis normalmente são obtidas pelo método de retrocruzamento entre linhagens elites, utilizadas como recorrente, e um doador do citoplasma macho-estéril.

Ao obter uma linhagem macho-estéril é importante avaliar o comportamento dela em relação ao seu isogênico macho fértil e avaliar o híbrido, também em relação ao isogênico. Na linhagem é importante avaliar a sua capacidade em manter a esterilidade e no híbrido é necessário checar a capacidade do híbrido em restaurar a fertilidade.

Por vezes o híbrido F_1 mantém a esterilidade por falta de alelos restauradores no parental macho do híbrido. Como estratégia para evitar a baixa produção de pólen no campo do híbrido macho-estéril tem sido sugerida a mistura de sementes do híbrido isogênico proveniente de linhagens macho férteis. Nessa estratégia que é conhecida por *Blend*, tem sido sugerida a utilização de 80% de sementes do híbrido macho-estéril e 20% do híbrido macho fértil (FEIL; WEINGARTNER; STAMP, 2003). Entretanto, para a utilização desta técnica é necessária a certificação da semelhança entre as duas linhagens e seus respectivos híbridos, tanto para a produção do híbrido quanto para características relacionadas à semente, envolvendo o custo de cada.

O objetivo com o presente estudo foi avaliar a proporção de plantas autofecundadas nos campos de produção de semente híbridas em diferentes proporções de mistura de sementes macho estéreis e macho férteis.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Produção de Híbridos Experimentais

Foram instalados três campos de produção de sementes visando à produção de sementes do híbrido SYN-MF, SYN-ME com despendoamento e SYN-ME sem despendoamento.

A produção do híbrido SYN-MF foi realizada considerando as linhagens SYN-LA (fêmea) e SYN-LB (macho), ambas macho férteis. A relação utilizada foi de duas linhas de macho alternadas por quatro linhas da fêmea. As fêmeas foram semeadas com 80 cm entre linhas, com uma densidade de 65 sementes em 10 m lineares. O macho foi semeado com 60 cm entre linhas e a mesma densidade da fêmea. Quando restavam apenas de 4 a 3 folhas recobrimdo o pendão foi efetuado o processo de conhecido como despendoamento, que consiste na retirada da inflorescência masculina das linhas fêmeas (nos tratamentos com despendoamento). Após o completo florescimento foram cortadas as linhas de macho e ao final do ciclo foram colhidas as linhas fêmeas.

A produção do híbrido SYN-ME foi realizada utilizando o mesmo parental macho do híbrido SYN-MF. A linhagem fêmea utilizada foi a SYN-LC que é isogênica a linhagem SYN-LB e foi obtida após o processo de introgressão da característica macho esterilidade do tipo S. O processo foi efetuado realizando sucessivos retrocruzamentos utilizando a linhagem SYN-LB como parental recorrente. A relação macho e fêmea, a densidade de plantas e os espaçamentos utilizados foram os mesmos adotados para a produção do híbrido SYN-MF. Foram obtidos dois tipos de sementes híbridas SYN-ME, uma realizando o despendoamento da fêmea e o outro sem realizar o despendoamento da fêmea.

Posterior a obtenção das sementes SYN-ME em cada um dos dois tipos de sementes híbridas (com e sem despendoamento) foram realizadas misturas com sementes do híbrido isogênico SYN-MF. As proporções utilizadas foram sem mistura e com 50% e 75% de mistura. Dessa forma, ao final do processo foram obtidos sete tratamentos: SYN-MF; SYN-ME com despendoamento; SYN-ME sem despendoamento; SYN-ME com despendoamento + 50% SYN-MF; SYN-ME sem despendoamento + 50% SYN-MF; SYN-ME com despendoamento + 75% SYN-MF; SYN-ME sem despendoamento + 75% SYN-MF.

2.2 Avaliação da qualidade dos híbridos experimentais

Cada um dos sete tratamentos foi semeado em um campo isolado de 0,24 ha, distribuídos em 30 linhas de 80 m cada, espaçadas 0,8 m entre linhas e com uma densidade média de 65 plantas para cada 10 m. Os tratamentos foram semeados em áreas isoladas com pelo menos 400 m de isolamento entre um campo e outro. A instalação dos campos ocorreu em setembro do ano de 2009. A cada 10 linhas foi considerada uma repetição.

Em cada campo e repetição foi realizada a contagem do número de plantas autofecundadas. A contagem foi feita por identificação visual, analisando todas as plantas do campo no estágio vegetativo R3 (Grão leitoso), utilizando a escala proposta por Magalhães et al. (2002). As plantas identificadas pela baixa altura e desenvolvimento em relação às plantas híbridas não foram descartadas (potencial autofecundação), sendo que após a colheita foram amostradas 1.000 sementes de cada um dos campos para serem submetidos à análise de isoenzima visando à identificação das plantas autofecundadas.

As sementes colhidas dos híbridos SYN-MF e SYN-ME foram classificadas quanto à forma e tamanho. Quanto à forma foram classificadas em

redondas (R) e chatas (CH) e quanto ao tamanho foram classificadas entre as peneiras 16 e 24.

2.3 Análise da produtividade das linhagens

As linhagens SYN-LA e SYN-LC foram analisadas quanto à produtividade de grãos em cinco locais: Cruz Alta-RS, Holambra-SP, Mococa-SP, Morrinhos-GO e Uberlândia-MG, durante a safra de 2009/2010.

Os experimentos foram instalados com três repetições, sendo que cada parcela foi constituída de quatro linhas de 4 m de comprimento, espaçadas 0,80 cm entre linhas. Em cada parcela foi obtida a produtividade de grãos que foi posteriormente corrigida para 13% de umidade.

A produtividade média da linhagem SYN-LA foi considerada 100% e foi estimada a produtividade relativa para cada local e linhagem.

2.4 Estimativa do custo de produção relativo

Para estimativa do custo relativo foi considerado como referência de 100% o custo para um saco com 50.000 sementes do híbrido SYN-MF obtido com despendoamento. Posteriormente foram feitas as estimativas do custo de cada operação nos campos de produção considerando a utilização da linhagem SYN-ME nas porcentagens com 20% e 40% do campo despendoado.

Também foram estimados os custos considerando a mistura de sementes híbridas obtidas usando a linhagem macho-estéril (SYN-ME) com sementes provenientes de linhagens macho férteis (SYN-MF). Foram utilizados diferentes níveis de mistura, sempre utilizando a semente do híbrido SYN-MF produzida com 40% do campo despendoado. As misturas foram de 80% do híbrido SYN-

ME e 20% SYN-MF, nas proporções de 50% para cada híbrido e para a mistura de 25% do híbrido SYN-ME e 75% SYN-MF.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Um importante caráter que deve ser avaliado na semente híbrida por mensurar a qualidade do campo de produção da referida semente é a porcentagem de plantas autofecundadas.

A análise de variância revelou efeitos significativos para tratamentos (dados não mostrados), ou seja, há diferenças significativas na quantidade de plantas autofecundadas entre os tratamentos obtidos a partir dos diferentes campos de produção, considerando diferentes métodos de avaliação e materiais com e sem despendoamento, usando linhagens macho estéreis e com citoplasma macho fértil.

O coeficiente de variação foi de 4,9%, considerado baixo e mostrando uma alta precisão ambiental.

Foram observadas 0,33% de plantas provenientes de autofecundação na avaliação visual realizada a campo para o híbrido SYN-MF e 0,55% na avaliação realizada por Isoenzima, revelando diferenças significativas pelo teste de médias de Scott-Knott (Tabela 1). As plantas autofecundadas são provenientes de plantas da linhagem fêmea que não foram despendoadas durante o processo de produção do híbrido.

Tabela 1 Porcentagem de plantas autofecundadas durante a avaliação dos híbridos SYN-MF obtido pela linhagem fêmea macho fértil e SYN-ME obtido pela linhagem fêmea macho-estéril, em Uberlândia no ano de 2009

		SYN-MF ¹								
		Visual			Isoenzima			Média		
Com Despendoamento		0,33 h			0,55 k			0,44		
		SYN-ME ¹								
		Visual			Isoenzima			Média		
		Mistura (%)*			Mistura (%)*			Mistura (%)*		
		0	50%	75%	0	50%	75%	0	50%	75%
Com Despendoamento		0,17 d	0,11 c	0,08 b	0,2 e	0,15 d	0,1 c	0,18	0,13	0,09
Sem Despendoamento		0,28 g	0,06 a	0,27 g	0,36 i	0,41 j	0,2 e	0,32	0,23	0,24

*: Mistura com sementes do híbrido SYN-MF (em % de mistura no campo).

¹: Agrupamento de médias, pelo teste Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

Altas porcentagens de plantas autofecundadas em lotes de produção comercial de sementes do híbrido podem comprometer a qualidade do lote, acarretando em prejuízos pelo descarte do lote, ou ocasionando prejuízo ao agricultor por perdas na produtividade de grãos. Uma alternativa para evitar a autofecundação da linhagem fêmea nos campos de produção é a utilização de linhagens fêmeas macho estéreis. Entretanto, da mesma forma que a semente comercial obtida com despendoamento, é necessário avaliar a qualidade da semente produzida, especialmente quando a linhagem pode apresentar restauração parcial da fertilidade.

As avaliações realizadas para o híbrido SYN-ME, produzido utilizando a linhagem macho-estéril SYN-LC como parental fêmea, apresentou as menores porcentagens de plantas autofecundadas em relação ao seu isogênico SYN-MF,

independente se as sementes foram produzidas com ou sem despendoamento e se foram consideradas as avaliações realizadas por isoenzima ou visual (Tabela 1).

Os resultados obtidos mostraram que a linhagem macho-estéril foi eficiente em evitar a autofecundação da linhagem fêmea, permitindo o controle do direcionamento proposto para a polinização, mesmo quando não foi realizado o despendoamento da linhagem fêmea macho-estéril. Entretanto, a presença de plantas autofecundadas no híbrido SYN-ME revelou que houve a presença de plantas com restauração da fertilidade do pólen.

Apesar das sementes obtidas para o híbrido SYN-ME sem despendoamento apresentarem plantas autofecundadas menor do que o híbrido SYN-MF obtido pelos parentais macho férteis, o despendoamento contribuiu para a redução em média de 44% no número de plantas autofecundadas (0,32% para 0,18%). Embora o despendoamento tenha contribuído para redução no número de plantas autofecundadas, é importante avaliar o custo que a operação agrega ao saco de semente.

A alta qualidade da semente produzida do híbrido macho-estéril SYN-ME, mesmo sem despendoamento, em parte é resultado do desempenho da linhagem fêmea que compõe este híbrido (linhagem SYN-LC). Na média de cinco campos de multiplicação localizados em Uberlândia-MG, São Gotardo-MG, Goiatuba-GO, Casa Branca-SP e Guaíra-SP, durante o ano de 2009, foram observadas apenas 1,5% de plantas com restauração da produção de pólen viável (dados não apresentados), mostrando que apesar da reversão parcial da macho esterilidade a linhagem apresentou eficiência e estabilidade da macho esterilidade.

Deve-se considerar que a linhagem SYN-LC é caracterizada pela presença do sistema macho-estéril do tipo S, que tem sido descrito na literatura por apresentar grande interação com o ambiente e por ser sensível a reversões

parciais da fertilidade (LAUGHMAN; GABAY-LAUGHMAN, 1983; WEIDER et al., 2009).

Outra característica que mostra o potencial de utilização da linhagem SYN-LC foi o da capacidade produtiva em comparação com a linhagem isogênica macho fértil SYN-LA.

A análise de variância conjunta considerando os cinco locais de avaliação revelou a presença de efeitos significativos entre as linhagens e a presença de interação linhagens x locais (dados não mostrados). Os dados apresentados na Figura 1 evidenciam que na média de cinco locais a linhagem macho-estéril foi 2% mais produtiva em relação ao seu isogênico, havendo diferença significativa pelo teste de médias de Scott e Knott (1974). Analisando os locais, pode-se observar que apesar da superioridade média, em alguns locais a produtividade da linhagem SYN-LC foi menor do que a SYN-LA, evidenciado pela interação com o local de avaliação.

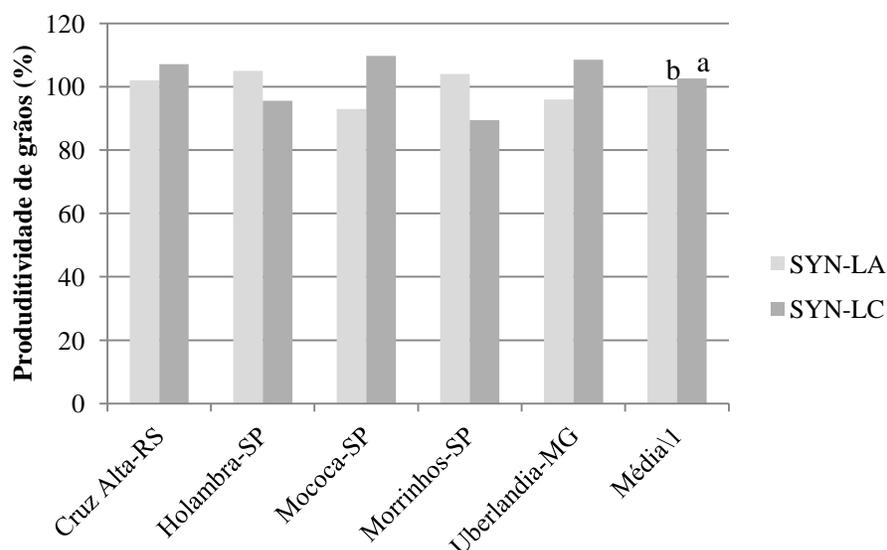


Figura 1 Produtividade média de grãos obtida para as linhagens SYN-LA e SYN-LC, em cinco locais durante a safra de 2009/2010.

¹: Agrupamento de médias, pelo teste Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

Interações significativas para produtividade de grãos na avaliação de genótipos macho estéreis têm sido observadas na literatura, especialmente considerando genótipos do tipo S (DUVICK, 1965; WEIDER et al., 2009).

Diante do exposto, essa linhagem pode ser recomendada para utilização em campos comerciais de produção de sementes híbridas. Entretanto, deve-se considerar a produção em locais onde é menos provável a restauração da fertilidade, devendo-se considerar a necessidade de acompanhamento do campo visando retirar plantas com potencial para restauração, com possibilidade de obter altos níveis de produtividade. Entretanto, apesar da restauração parcial, o uso de linhagens macho estéreis podem representar ganhos significativos na operação, na qualidade e na redução do custo final do saco de semente híbrida (MACKENZIE, 2004).

Linhagens macho estéreis para obtenção de sementes híbridas de milho vêm sendo utilizadas eficientemente em diferentes países (BOZINOCOVIC et al., 2010; STAMP et al., 2000; WEIDER et al., 2009). Em função do seu uso eficiente tem sido fortemente considerada a utilização de sistemas macho estéreis nos programas de melhoramento.

Em função da insegurança quanto a restauração da produção de polens viáveis nos campos de plantas híbridas F_1 provenientes de linhagens macho estéreis, especialmente pela ausência dos genes restauradores no parental macho, determinados materiais genéticos necessitam de misturar sementes do híbrido macho fértil (SYN-MF) com sementes do isogênico macho-estéril (SYN-ME). As misturas são realizadas visando garantir a produção de pólen viável no campo comercial de produção de grãos, sem que haja alteração na qualidade comercial da semente. Ao utilizar essa técnica, um fator importante é determinar as proporções de mistura do híbrido macho-estéril (SYN-ME) em relação ao macho fértil (SYN-MF).

Foram simulados dois níveis de mistura, 50 e 75% de sementes do híbrido SYN-MF misturadas às sementes do híbrido SYN-ME obtidas com e sem despendoamento (Tabela 1). Considerando todos os campos de avaliação, as maiores porcentagens de plantas autofecundadas foram observadas quando não houve o despendoamento da fêmea, independente da avaliação visual ou por isoenzima. A exceção ocorreu na combinação de 50% de sementes do híbrido SYN-ME e 50% do SYN-MF que na avaliação visual mostrou maior porcentagem de plantas autofecundadas no campo sem despendoamento (Tabela 1).

Apesar de o despendoamento contribuir para diminuir o número de plantas autofecundadas, todas as combinações de sementes dos híbridos SYN-ME e SYN-MF avaliadas, mesmo quando considerado os campos sem despendoamento, apresentaram porcentagens menores das obtidas para sementes

produzidas pelo método tradicional. Esses resultados indicaram que nenhuma proporção de mistura de sementes interferiu na qualidade da plantas híbridas na lavoura, possibilitando a indicação de misturas entre os dois híbridos visando garantir a produção de pólen viável na lavoura comercial.

Na literatura tem sido descrito que 20% de sementes do híbrido isogênico macho fértil foram suficientes para garantir a produção de pólen para o campo todo mesmo quando o híbrido obtido pela linhagem macho-estéril não apresentou restauração na produção do pólen (FEIL; WEINGARTNER; STAMP, 2003). Dessa forma, considerando a proporção mais baixa do presente estudo (50%) há garantia de polinização do campo mesmo se o híbrido apresentar macho esterilidade plena.

Ao utilizar linhagens macho estéreis na obtenção do híbrido, considerando o uso do despendoamento e a mistura de sementes do isogênico é importante considerar o custo do saco de semente obtido.

Visando estimar o custo considerando as diferentes combinações foi considerado o custo para um saco com 50.000 sementes do híbrido SYN-MF obtido com despendoamento como sendo 100%. Utilizando a linhagem macho-estéril, sem despendoamento, apenas considerando o repasse do campo, o custo final de um saco com 50.000 sementes foi de 87,1% em relação ao saco com sementes obtidas pelo método tradicional. Por outro lado, considerando a utilização da linhagem macho-estéril, porém com 20% do campo despendoado visando garantir a retirada de pendões que possam ter a reversão da macho esterilidade, o custo do saco com 50.000 sementes foi de 88,9% em relação ao saco com sementes obtidas pelo método tradicional. Com o despendoamento de 40% do campo o custo final do saco de sementes foi de 94,7%.

Dessa forma, mesmo considerando a produção de híbridos provenientes de linhagens macho estéreis com necessidade de despendoamento parcial do campo em 40% da linhagem fêmea, o custo por saco é menor do que o obtido

pelo método tradicional, justificando, portanto, a utilização da linhagem macho-estéril mesmo se esta apresentar restauração parcial da fertilidade. Quanto ao nível de despendoamento a ser adotado (20 ou 40%) deve-se considerar o local e safra de produção, uma vez que, conforme comentado anteriormente a linhagem SYN-LC pode apresentar elevada interação com o ambiente.

Diante da possibilidade de efetuar mistura de sementes híbridas obtidas usando a linhagem macho-estéril (SYN-ME) com sementes provenientes de linhagens macho férteis (SYN-MF) foram estimados os custos em diferentes níveis de mistura.

Considerando a utilização da semente do híbrido SYN-MF produzida com 40% do campo despendoado, na mistura de 80% do híbrido SYN-ME e 20% SYN-MF, o custo foi de 95,3%. Nas proporções de 50% para cada híbrido, o custo obtido foi de 97,3% e para a mistura de 25% do híbrido SYN-ME e 75% SYN-MF o custo foi de 98,7%, ou seja, mesmo com altas proporções de mistura com o híbrido SYN-MF, há uma redução no custo por sacco considerando a utilização da linhagem macho-estéril.

No momento da colheita dos grãos todos os campos de produção envolvendo os híbridos SYN-MF e SYN-ME e as diferentes combinações de misturas tiveram a classificação dos grãos como amarelo duro, confirmando não haver diferenças entre os grãos colhidos e as diferentes misturas entre os híbridos.

Embora os resultados mostrem a viabilidade na mistura de sementes entre os híbridos SYN-MF e SYN-ME, há a necessidade de verificar a classificação quanto a distribuição de forma e tamanho das sementes híbridas produzidas.

Conforme os dados apresentados na Figura 2 não houve diferenças entre os padrões de peneiras entre as sementes produzidas dos híbridos SYN-MF e SYN-ME, ambos com despendoamento. A similaridade entre os híbridos torna-se

evidente quando considerado que 90,4% e 91,1%, respectivamente, das sementes do híbrido SYN-ME e SYN-MF foram classificadas entre as peneiras 18 e 22.

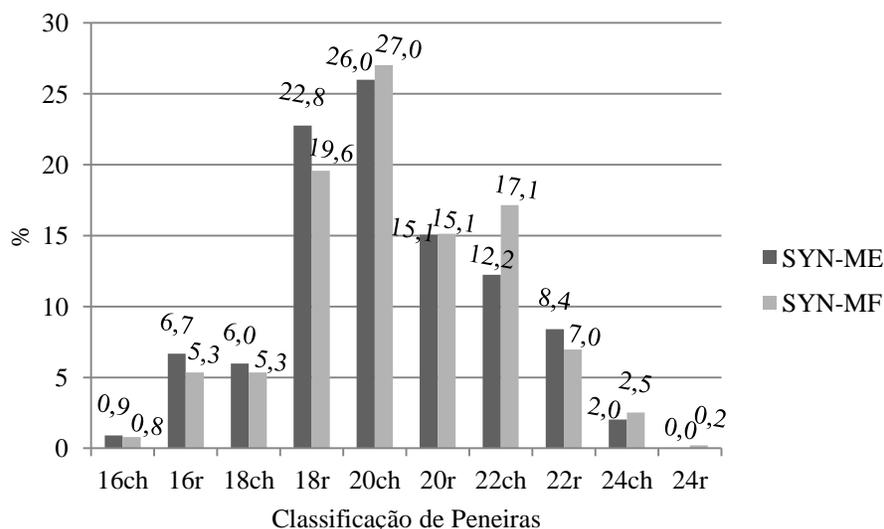


Figura 2 Distribuição da classificação por tipo de peneira das sementes dos híbridos SYN-MF e SYN-ME produzidos utilizando despendoamento das linhagens fêmeas

A ausência de diferenças na distribuição e classificação de peneiras tem grande importância na comparação entre o híbrido e seu isogênico. As diferenças no formato e peso das sementes estão relacionadas às diferenças na fertilização dos óvulos que não ocorrem simultaneamente, resultando em desenvolvimento diferenciado das sementes (BATISTELLA FILHO; VITTI MORO; CARVALHO, 2002). Dessa forma, apesar da influência da polinização, esta característica está relacionada à linhagem fêmea e é desejável que não ocorra mudanças no padrão de peneira entre o híbrido e a sua versão isogênica macho-estéril, sendo interessante que a maior concentração de sementes esteja

entre as peneiras 18 e 22, em função da preferência dos agricultores pela facilidade do manejo.

A utilização de linhagens macho estéreis proporcionou a produção de sementes híbridas comerciais com padrões comerciais de qualidade relacionados à baixa porcentagem de plantas autofecundadas, distribuição de peneiras, mesmo quando considerado a mistura de sementes e com custo abaixo da semente produzida usando parentais macho férteis.

4 CONCLUSÃO

O híbrido SYN-ME macho-estéril produzido com ou sem despendoamento tem porcentagens de plantas autofecundadas menores do que o isogênico SYN-MF, considerando as diferentes porcentagens de combinação dos híbridos SYN-ME e SYN-MF.

O despendoamento associado à utilização de linhagens macho estéreis contribui para a redução de plantas autofecundadas no híbrido. A linhagem macho-estéril SYN-ME é eficiente em evitar a autofecundação.

Há reduções no custo da semente híbrida produzida quando as linhagens macho estéreis estão envolvidas. Mesmo utilizando o despendoamento em 40% da linhagem fêmea, há redução no custo por saco em relação ao método tradicional.

REFERÊNCIAS

- BATISTELLA FILHO, F.; VITTI MORO, F.; CARVALHO, N.M. Relationships between physical, morphological, and physiological characteristics of seeds developed at different positions of the ear of two maize (*Zea mays* L.) hybrids. **Seed Science and Technology**, Zürich, v.30, n.1, p.97-106, Mar. 2002.
- BOZINOVIC, S. et al. The plus-hybrid effect on the grain yield of two zp maize hybrids. **Genetika**, Beograd, v. 42, n. 3, p. 475-484, Mar. 2010.
- DUVICK, D. N. Cytoplasmic pollen sterility in corn. **Advances in Genetics**, New York, v. 13, p. 1-56, 1965.
- FEIL, B.; WEINGARTNER, U.; STAMP, P. Controlling the release of pollen from genetically modified maize and increasing its grain yield by growing mixtures of male-sterile and male-fertile plants. **Euphytica**, Amsterdam, v. 130, n. 2, p. 163-165, Mar./Apr. 2003.
- KASER-SCHNEIDER, O. **Physiological and agronomic traits of cytoplasmic male sterility in maize (*Zea mays* L.) and its molecular discrimination**. 2002. 89 p. Thesis (Ph.D. in Natural Sciences) - Swiss Federal Institute of Technology Zurich, Zurich, 2002.
- LAUGHNAN, J. R.; GABAY-LAUGHNAN, S. Cytoplasmic male sterility in maize. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, v. 17, p. 27-48, 1983.
- MACKENZIE, S. The influence of mitochondrial genetics in crop breeding strategies. **Plant Breeding Review**, Berlin, v. 25, n. 6, p. 115-138, June 2004.
- MAGALHÃES, P. C. et al. Efeitos de diferentes técnicas de despendoamento na produção de milho. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 56, n. 1, p. 77-82, jan. 1999.
- _____. **Fisiologia do milho**. Sete Lagoas: EMBRAPA, 2002. 23 p.
- PATERNIANI, E.; CAMPOS, M. S. Melhoramento do milho. In: BORÉM, A. (Ed.). **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa, MG: UFV, 1999. p. 510-581.

SCOTT, A.; KNOTT, M. Cluster-analysis method for grouping means in analysis of variance. **Biometrics**, Washington, v. 30, n. 3, p. 507-512, Mar. 1974.

STAMP, P. et al. Increase in the yield of cytoplasmic male sterile maize revisited. **Crop Science**, Madison, v. 40, n. 1, p. 1586-1587, Jan./Feb. 2000.

WEIDER, C. et al. Stability of cytoplasmic male sterility in maize under different environmental conditions. **Crop Science**, Madison, v. 49, n. 1, p. 77-84, Jan. 2009.

WYCH, R. D. Production of hybrid seed corn. In: SPRAGUE, G. F.; DUDLEY, J. W. (Ed.). **Corn and corn improvement**. Madison: American Society of Agronomy, 1988. p. 565-608.