

Capítulo 4

Uso da macho-esterilidade no melhoramento genético do sorgo

Isadora Cristina Martins Oliveira
Cicero Beserra de Menezes
Rafael Augusto da Costa Parrella
Robert Eugene Schaffert

Introdução

O melhoramento genético é uma ferramenta essencial na busca por genótipos mais produtivos e adaptados às diferentes condições edafoclimáticas. Dada a intensificação das mudanças climáticas, com eventos extremos de secas e estiagens prolongadas, e os constantes relatos de grandes prejuízos agrícolas, estes estudos têm se tornado cada vez mais importantes. Neste âmbito o sorgo se destaca pela sua adaptação natural às condições ambientais adversas e pela sua versatilidade, tendo papel cada vez mais importante quando se tratam de segurança alimentar e bioenergias.

Dentre as utilidades do sorgo, destaca-se o uso de grãos e forragem na alimentação humana e animal, e o uso do caldo e da biomassa na produção de etanol, energia térmica e biogás, importantes componentes da matriz energética nacional.

Pela planta de sorgo ser autógama, com grande número de flores nas panículas, em que cada uma delas gera apenas uma semente, a síntese de híbridos em escala comercial na cultura seria inviável pelo elevado número de emascações manuais necessárias nas plantas a serem polinizadas. Entretanto, em razão da existência de mecanismos de macho-esterilidade, o melhoramento genético em sorgo pode ser conduzido semelhantemente ao de culturas alógamas. Dois tipos de macho-esterilidade são amplamente utilizados em sorgo, a macho-esterilidade genética (GMS) e a macho-esterilidade genético-citoplasmática (CMS). Em síntese, a GMS é utilizada em estratégias de melhoramento populacional e a CMS é utilizada na produção de híbridos. Estes dois tipos de macho-esterilidade serão descritas

neste capítulo, mostrando as etapas de desenvolvimento de linhagens e síntese de híbridos adotadas pelos programas de melhoramento de sorgo.

Macho-Esterilidade Genética

A macho-esterilidade genética é condicionada por dois alelos recessivos em homozigose no núcleo das células (Figura 1). As principais causas desta macho-esterilidade estão relacionadas à ausência ou degeneração dos grãos de pólen, falta de pólen viável, ou indeiscência da antera quando o estigma está receptivo (Reddy et al., 2003).

No melhoramento genético da cultura do sorgo, a utilização de genes de macho-esterilidade possibilitou o desenvolvimento de novas abordagens, por exemplo, a síntese de populações de intercruzamento ao acaso. Pela não necessidade de emascação das plantas durante os cruzamentos, os melhoristas de sorgo podem adotar a seleção recorrente para síntese de interpopulações, como ocorre nos programas de melhoramento de culturas alógamas, como o milho (*Zea mays* L.).

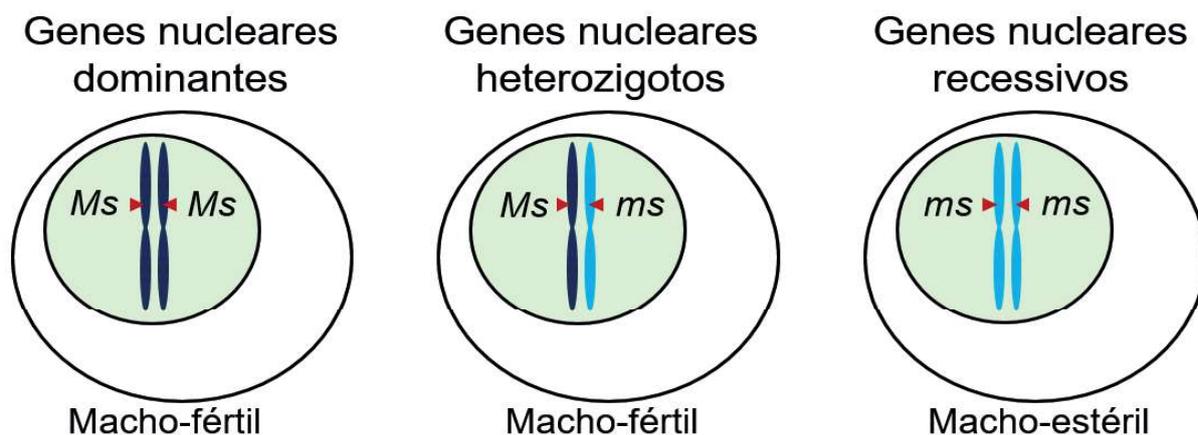


Figura 1. Genótipo e fenótipo de plantas com sistema de macho-esterilidade genética (GMS).

Os principais genes de macho-esterilidade GMS relatados no sorgo estão apresentados na Tabela 1. O gene *ms₃*, descoberto em 1965 por Webster (Webster, 1965), é o mais utilizado para o desenvolvimento de populações de intercruzamento ao acaso pelos programas de melhoramento de sorgo no mundo. Este gene apresenta boa e estável expressão da macho-esterilidade, possibilitando a produção de muitas sementes sob polinização aberta, além de ser facilmente identificado em campo. Além disso, o gene *ms₃* funciona em ambos os citoplasmas do sorgo, *Milo* e *Kafir*, possibilitando o desenvolvimento de populações R, restauradoras de fertilidade, e populações B, mantenedoras

de fertilidade. Outros genes úteis nos programas de melhoramento de sorgo são o ms_1 (Ayyangar; Ponnaiya, 1937) e o ms_7 (Andrews; Webster, 1971), e apresentam expressões semelhantes ao ms_3 .

Tabela 1. Genes de macho-esterilidade genética em sorgo.

| Fonte | Origem | Característica | Referências |
|------------------------|---------|--|---|
| ms_1 Indigenous line | Índia | Boa macho-esterilidade, altamente receptivo | Ayyangar e Ponnaiya (1937) Stephens e Holland (1954) |
| ms_2 Blackhull kafir | EUA | Esterilidade feminina, produz pouca semente | Stephens (1937) |
| ms_3 Goes | EUA | Boa macho-esterilidade, altamente receptivo | Webster (1965) |
| ms_4 Indigenous line | Índia | Anteras sem pólen | Ayyangar (1942) |
| ms_5 Rancher | Hungria | Aborto do pólen | Barabas (1962) |
| ms_6 Rancher | Hungria | Anteras sem pólen | Barabas (1962) |
| ms_7 Indigenous line | Nigéria | Boa macho-esterilidade, altamente receptivo | Andrews e Webster (1971) |
| ms_8 | EUA | Anteras sem pólen. Obtido através de mutação de BTx623 | Xin et al. (2017) |
| <i>al</i> | EUA | Antera sem estame | Karper e Stephens (1936) |

Fonte: Rooney (2000), Reddy et al. (2005), Dweikat (2014).

Alguns destes genes, citados na Tabela 1, foram utilizados em sínteses de populações, porém, apresentaram resultados insatisfatórios por causa da expressão variável da macho-esterilidade (Ross, 1973). Como exemplo tem-se o gene ms_2 que, em homozigose (ms_2ms_2), apresenta alto grau de esterilidade feminina, juntamente com esterilidade masculina, o que

promove uma baixa formação de grãos na panícula após a autofecundação destas plantas (Ross; Gardner, 1983). Além disso, quando há segregação para este gene nas famílias utilizadas, ocorre um viés no rendimento de grãos durante a avaliação das progênies, o que não é desejável pelo melhorista.

Problemas semelhantes são encontrados na utilização do gene *al* (*antherless*) para a síntese de populações de sorgo (Eckebil et al., 1977; Ross, 1973). Além dos genes listados na Tabela 1, ainda existem genes de esterilidade masculina relatados na literatura que não foram testados no melhoramento de sorgo (Xin et al., 2017), mostrando a importância de mais estudos neste âmbito (Dweikat, 2014).

Para utilização deste sistema de macho-esterilidade, as plantas macho-estéreis devem ser identificadas nas fases iniciais do florescimento, ou seja, quando as flores do topo da panícula estiverem em antese. Esta identificação pode ser facilmente realizada, pois as plantas macho-estéreis apresentam anteras menores, mais finas e com coloração amarelo-clara, e não liberam pólen viável (Figura 2 A). Após a identificação destas plantas, deve-se remover a ponta da panícula e protegê-la com saco de papel *Kraft*, a fim de evitar a polinização aberta e contaminação por pólen externo. Assim, após três a cinco dias, a panícula estará receptível e pode então ser polinizada com o pólen coletado do progenitor desejado. Os híbridos desses cruzamentos podem ser usados para melhorar a população ou para iniciar outro método de melhoramento, como a seleção por pedigree para síntese de linhas puras melhoradas.



Foto: Isadora Martins

Figura 2. Estrutura floral de plantas macho-estéreis (A) e macho-férteis (B). (A) Planta macho-estéril com anteras pálidas e estigmas plumosos (receptivo). (B) Planta macho-fértil com anteras produzindo pólen (amarelo intenso).

Melhoramento Populacional de Sorgo Utilizando Macho-Esterilidade Genética

O melhoramento populacional é normalmente realizado para características com herança quantitativa, ou seja, características controladas por muitos genes, e a seleção recorrente é o método de melhoramento mais utilizado no desenvolvimento de novas populações. Em síntese, a seleção recorrente é um esquema cíclico de recombinação e seleção de genótipos em que a frequência de alelos favoráveis é constantemente aumentada na população. Essas etapas são designadas para atingir dois objetivos, sendo eles o aumento do desempenho médio da população, dado o aumento da frequência gênica de alelos favoráveis da característica, ou de características, em seleção, e a manutenção da variabilidade genética, dada a recombinação de genótipos superiores, em quantidade de selecionados, que assegure a preservação desta variabilidade (Nath, 1982; Singh, 2004).

No caso do sorgo, a utilização da macho-esterilidade genética possibilitou a conversão de populações normalmente de autofecundação em populações de fecundação cruzada. Assim, estas populações podem ser melhoradas por métodos de seleção recorrente, que são utilizados com sucesso na cultura do milho, por exemplo (Doggett; Eberhart, 1968; Gardner, 1972). O sistema de macho-esterilidade utilizado na síntese de populações de sorgo envolve geralmente o gene ms_3 , da variedade Coes, de herança simples, que produz plantas macho-estéreis quando em homozigose recessiva (ms_3ms_3) e plantas macho-férteis em condições heterozigotas (Ms_3ms_3) ou homozigotas para o alelo dominante (Ms_3Ms_3). O desenvolvimento de uma população usando macho-esterilidade envolve três passos. Primeiro, deve-se selecionar os materiais genéticos que serão inter cruzados; em seguida, incorporar um gene de macho-esterilidade genética; e por fim inter cruzar ao acaso as linhagens selecionadas, que darão origem à nova população.

A seleção das linhagens mais adequadas para o desenvolvimento de uma população é uma importante decisão e depende principalmente do objetivo do melhorista. As populações de sorgo têm sido desenvolvidas utilizando-se somente linhagens B (mantenedoras da fertilidade), somente linhagens R (restauradoras da fertilidade) ou uma mistura de ambas as linhagens. As populações de linhagens do tipo B e do tipo R são sintetizadas separadamente, e uma vez que não sofrem a interferência dos alelos Rf e rf , do gene ligado à macho-esterilidade citoplasmática, a extração de cada tipo destas linhagens ocorre de forma fácil dentro de cada população

(Doggett; Eberhart, 1968; Gardner, 1972; Ross, 1973; Schaffert et al., 2016). De modo geral, nos programas de melhoramento, as populações têm sido desenvolvidas com um mínimo de oito e um máximo de 800 linhagens, e para a maioria dos objetivos, um total de 20 a 40 linhagens, selecionadas cuidadosamente, já são suficientes para suprir os principais objetivos dos programas de melhoramento.

Para síntese de uma nova população, individualmente as linhagens escolhidas são cruzadas manualmente, com uma fonte de macho-esterilidade genética *ms* (*msms*) (Figura 3). A geração F_1 possui plantas em heterozigose (*Msms*) para a macho-esterilidade, ou seja, plantas macho-férteis. Assim, é preciso uma geração de autofecundação para que os genótipos macho-estéreis (*msms*) possam ser formados. As plantas férteis F_1 de cada cruzamento são autofecundadas, e as sementes F_2 darão origem às plantas férteis (25%*MsMs* e 50%*Msms*) e estéreis (25%*msms*). As plantas F_2 macho-estéreis (*msms*) são identificadas durante o florescimento, e quando atingida a maturação dos grãos, as panículas são colhidas separadamente, e serão usadas em novos retrocruzamentos ou destinadas ao primeiro ciclo de recombinação.

Para a seleção recorrente, igual quantidade de sementes de cada uma destas panículas F_2 macho-estéreis é misturada para formar a primeira geração de recombinação, e o mesmo procedimento é realizado para obtenção da segunda e da terceira geração de recombinação. Em todos os ciclos de intercruzamentos as populações são plantadas em campo isolado (aproximadamente 1.000 m²), em baixa densidade populacional, e deve-se etiquetar de 600 a 1.000 plantas macho-estéreis, as quais serão colhidas e trilhadas panícula por panícula. Na terceira geração a proporção de plantas férteis (*Msms*) e de estéreis (*msms*) se aproxima de 1:1. As sementes colhidas do último ciclo de recombinação são chamadas de sementes S_0 , que significa sem nenhuma autofecundação. A manutenção da população é feita conforme o mesmo procedimento utilizado para a segunda e terceira gerações de recombinação, ou seja, quando do florescimento das plantas, identificam-se as panículas macho-estéreis e apenas sementes destas são colhidas para formação da nova população.

Um mínimo de três ciclos de intercruzamentos ao acaso deve ser realizado antes do início da seleção. No caso de caracteres mono ou oligogênicos, como resistência a doenças, formato de panícula, altura de plantas, teor de lisina, entre outros, são necessários poucos ciclos de recombinação. Entretanto, muitas gerações de cruzamento ao acaso são

requeridas para que grupos de ligação sejam quebrados, para características mais complexas, como produtividade de grãos ou tolerância à seca. Dessa forma, após o último ciclo de recombinação, a população pode ser utilizada para autofecundação e extração de linhagens, assim como seleção para novos ciclos de seleção recorrente. Vale ressaltar que para pleno sucesso do melhoramento populacional é imprescindível que as áreas de campos isolados não tenham contaminantes, principalmente sorgo selvagem (Schaffert et al., 2016). Além da seleção recorrente, o melhorista de sorgo pode utilizar as sementes F_2 macho-estéreis (*msms*) para dar início aos retrocruzamentos identificados, a fim de obter linhagens com características desejadas, já observadas na segunda geração.

O uso da macho-esterilidade genética facilita a hibridação, mas também requer alguns cuidados com a população durante a antese das plantas (Figura 3). Uma vez terminado o inter cruzamento, as linhagens devem ser extraídas por ciclos de autofecundações com seleção para que os alelos *ms* recessivos sejam eliminados, caso contrário, progênies estéreis seriam produzidas em gerações futuras. Por sua vez, linhagens segregantes para a macho-esterilidade genética podem ser mantidas por autofecundação de panículas selecionadas aleatoriamente, ou por polinização em *bulk* de panículas macho-estéreis com pólen de plantas macho-férteis heterozigotas (*Msms*).

Métodos de Melhoramento Intrapopulacionais

Os métodos intrapopulacionais estão entre os métodos de seleção recorrente mais eficientes para obtenção de progênies superiores. O uso destes métodos pode promover o aumento da média de uma característica na população *per se*, possibilitando a extração de linhagens superiores em ciclos futuros. Os métodos mais usuais são a seleção massal, a seleção entre famílias de meios irmãos, a seleção entre famílias de irmãos germanos e a seleção de famílias S1. Os métodos de seleção normalmente empregados em programas de melhoramento populacional de sorgo são os mesmos utilizados para plantas alógamas, porém a escolha de uma população e dos métodos a serem adotados para o desenvolvimento de intrapopulações depende da performance média da população e da magnitude dos efeitos (A-aditivo, D-dominância e I-epistasia) que compõem a variância genética ($G = A+D+I$).

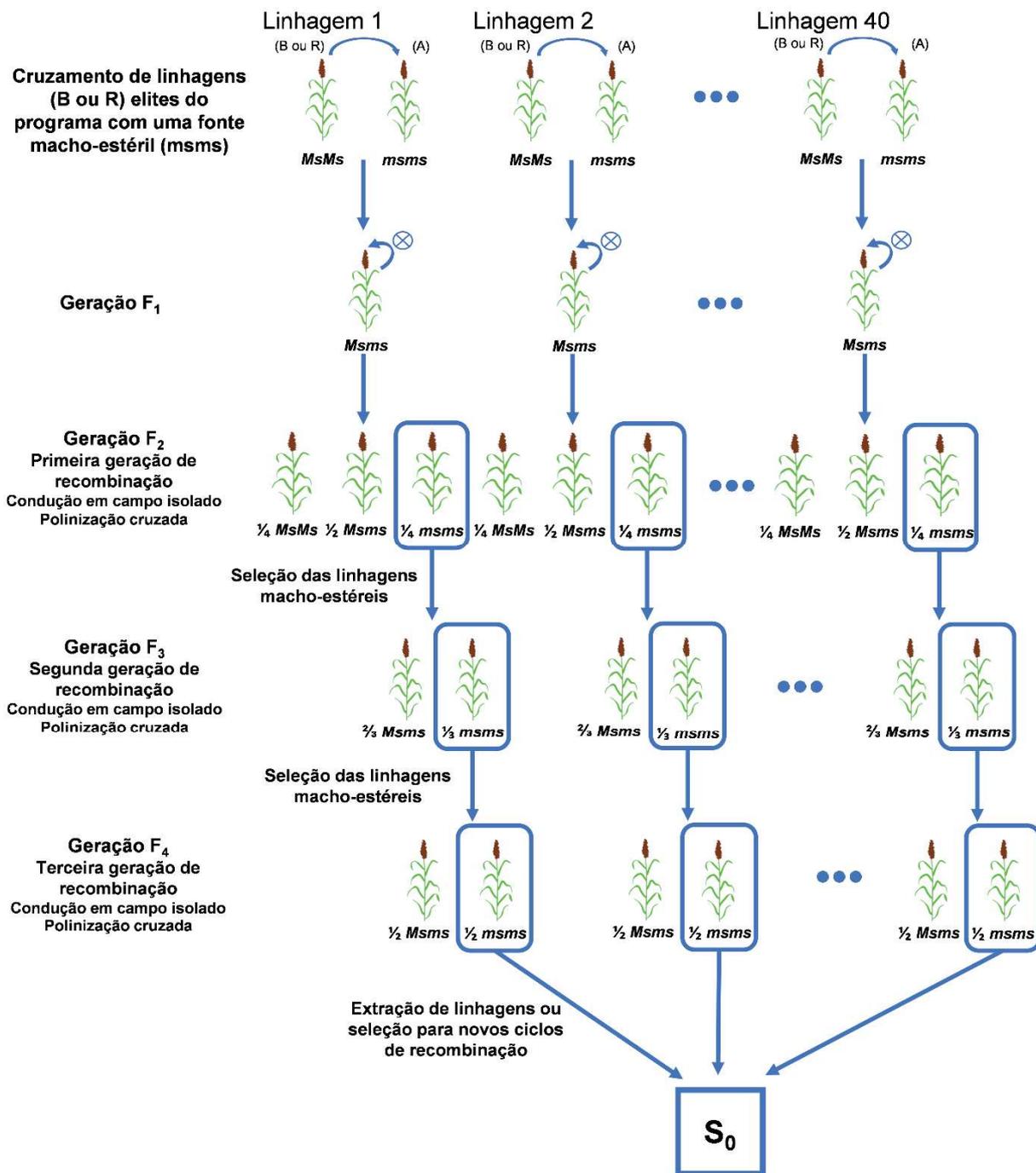


Figura 3. Esquema de síntese de populações de linhagens B e R, através do uso da macho-esterilidade genética e seleção recorrente em sorgo.

O método da seleção massal é o mais prático e eficiente para seleção de características de alta herdabilidade, ou seja, controladas por poucos genes, como resistência a doenças e teor de açúcares no colmo. Já para características controladas por muitos genes a seleção de famílias de irmãos germanos é o método mais eficiente, porém necessita de cruzamentos controlados, o que requer mão de obra especializada. A seleção de famílias

de meios-irmãos também pode ser utilizada para seleção de características quantitativas e, apesar de apresentar menor eficiência, tem como vantagem a não necessidade de cruzamentos controlados, o que torna uma vantagem sobre o método dos irmãos germanos, dados a escassez e os altos custos de mão de obra especializada para trabalhos de campo.

Contudo, para a seleção de linhagens superiores quanto a características de baixa herdabilidade, como a produtividade de grãos e produção de biomassa, são necessárias avaliações em experimentos com repetições e em maior número de locais, a fim de se obter maior eficiência no processo de seleção.

Métodos Interpopulacionais

Também conhecidos como método de seleção recorrente recíproca (SRR), os métodos interpopulacionais são usados com o objetivo de melhorar a performance de híbridos gerados pelo cruzamento de duas populações divergentes, ou seja, população de linhagens B e linhagens R. O método de seleção recorrente recíproca é o mais utilizado no melhoramento entre duas populações, sendo a seleção recorrente recíproca de meios-irmãos e a seleção recorrente recíproca de irmãos germanos os métodos mais utilizados.

Macho-Esterilidade Genético-Citoplasmática

A macho-esterilidade genético-citoplasmática em sorgo resulta da combinação de citoplasma *Milo*, que confere esterilidade citoplasmática, e gene *Kafir*, com alelos restauradores de fertilidade. A descoberta da macho-esterilidade genético citoplasmática (CMS) possibilitou a produção de híbridos comerciais em sorgo e se tornou importante para a indústria de sementes desta cultura. As linhagens macho-estéreis em sua maioria são muito similares, e os parentais machos são limitados àqueles que poderiam restaurar a fertilidade no sistema específico *Milo-Kafir* (Schertz, 1973; Secrist; Atkins, 1989). Outros sistemas de macho-esterilidade estão sendo estudados, e um dos propósitos é aumentar a diversidade genética para evitar riscos relacionados ao citoplasma. Assim, é necessário que novos sistemas sejam usados e que os híbridos a serem produzidos sejam tão produtivos quanto os já existentes (Schertz, 1973; Secrist; Atkins, 1989). Na Tabela 2 estão representados os dez tipos de citoplasmas descritos na literatura na atualidade.

Tabela 2. Diferentes sistemas de citoplasmas identificados em sorgo.

| Grupo | Fonte | Raça | Referências |
|-----------------------|------------|---------|--|
| A ₁ | Milo | D | Stephens e Holland (1954) Worstell et al. (1984) |
| | IS 6771C | G-C | |
| | IS 2266C | D | |
| | IS 6705C | G | |
| | IS 7502C | G | |
| | IS 3579C | C | |
| | IS 8232C | (K-C)-C | |
| | IS 1116C | G | |
| | IS 7007C | G | |
| A ₂ | IS12662C | G | Schertz e Ritchey (1978) Worstell et al. (1984) |
| | IS 2573C | C | |
| | IS 2816C | C | |
| A ₂ | IS3063C | - | Worstell et al. (1984) |
| | IS1056C | - | |
| A ₃ | IS1112C | D-(DB) | Quinby (1980), Worstell et al. (1984), Tang e Pring (2003) |
| | IS12565C | C | |
| | IS 6882C | K-C | |
| A ₄ | IS7920C | G | Worstell et al. (1984) |
| | M35-1A | D | |
| | VZM2A | D | |
| | G1A | D | |
| Indian A ₄ | - | - | Rao et al. (1984) |
| 9E | IS 7218 | - | Webster e Singh (1964) |
| | IS 112603C | G | |
| A ₅ | IS 7506C | B | Webster e Singh (1964) |
| A ₆ | IS 1056C | D | Webster e Singh (1964) |
| | IS 2801C | D | |
| | IS 3063C | D | |
| KS | | | Ross e Heckerott (1972) |

D = durra, G = guinea, C = caudatum, B = bicolor, K = Kafir. Adaptado de Schertz (1994) e Rooney (2004).

O citoplasma mais usado no melhoramento de sorgo é o A_1 . E a restauração da fertilidade do citoplasma A_1 é controlada por um ou dois alelos, denominados Rf_1 . Portanto, uma linhagem A (macho-estéril) possui citoplasma estéril (A) e o gene restaurador no núcleo em homozigose para os alelos recessivos (rf_1rf_1); a linhagem B (mantenedora) possui citoplasma fértil (N) e gene restaurador com alelos recessivos (rf_1rf_1); e a linhagem R possui citoplasma fértil (N) e gene restaurador com pelo menos um alelo na forma dominante (Rf_1Rf_1 ou Rf_1rf_1). Na Figura 4 pode-se notar a diferença entre as linhagens base dos programas de melhoramento de sorgo.

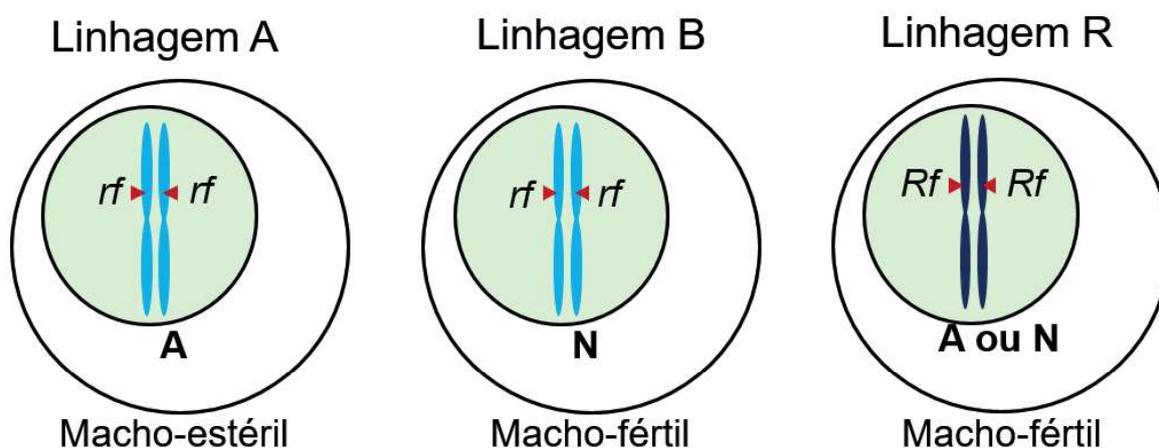


Figura 4. Genótipo e fenótipo de plantas com sistema de macho-esterilidade citoplasmática (CMS).

Na maioria dos países produtores de sorgo, os híbridos utilizados possuem citoplasma *Milo*, porém o uso de um único citoplasma é limitante, pois reduz as possibilidades de diferentes combinações entre parentais para a síntese de futuros híbridos. Hoffmann e Rooney (2013), em estudos com diferentes citoplasmas em sorgo, compararam o desempenho agrônômico de três híbridos sintetizados por um polinizador comum e um genitor feminino com citoplasmas A1, A2 e A3, e mostraram que o tipo do citoplasma não interferiu na performance final dos híbridos. Porém, poucos estudos estão sendo realizados neste âmbito, mostrando a necessidade de mais pesquisa a fim de fornecer leque maior de possibilidades aos melhoristas.

No melhoramento interpopulacional, ou seja, entre duas populações, os cruzamentos-testes de linhagens R são realizados através da polinização das linhagens A macho-estéreis, resultando em híbridos $A \times R$, que mostrarão o potencial das linhagens macho-férteis. Já os cruzamentos-testes para linhagens B são mais complexos, pois devem ser realizados com as

linhagens R como genitor feminino, requerendo emascação manual. Como abordado anteriormente neste capítulo, a esterilização de linhagens R não é muito usual nos programas de melhoramento, por causa das dificuldades da emascação manual. Além disso, melhoristas relatam a presença de incompatibilidade entre os citoplasmas das linhagens B e das linhagens R, o que gera híbridos estéreis, e dificulta o melhoramento das linhagens B. Uma alternativa para isto seria o desenvolvimento de linhagens macho-estéreis R (Rf_1Rf_1) no citoplasma A_3 , as quais podem ser usadas como testadoras de linhagens B (rf_1rf_1) no citoplasma A_1 . Vale ressaltar que neste tipo de cruzamento as linhagens precisam ter citoplasmas diferentes para que a fertilidade do híbrido seja restaurada. Com isso, após a avaliação dos híbridos R \times B, as melhores linhagens B são selecionadas e esterilizadas, para síntese das respectivas linhagens A isogênicas. Mesmo com o aumento do tempo para obtenção dos cruzamentos testes, ao final do processo há uma economia de tempo e dinheiro, em razão do menor número de linhagens a serem esterilizadas para a síntese de novas linhagens macho-estéreis A.

Desenvolvimento de Híbridos de Sorgo Utilizando Macho-Esterilidade Genético Citoplasmática

Na produção de híbridos simples de sorgo são necessárias três linhagens, sendo elas: linhagem A (macho-estéril), linhagem B (mantenedora) e linhagem R (restauradora), podendo-se destacar que as linhagens B e R são macho-férteis, ou seja, produtoras de pólen viável. As linhagens A e B são isogênicas, e se diferem apenas pelo citoplasma, estéril e fértil, respectivamente, como mostrado anteriormente. As linhagens B são chamadas de mantenedoras de fertilidade, pois, não são capazes de restaurar a fertilidade da linhagem A quando usadas como doadoras de pólen. Dessa forma, as linhagens A são multiplicadas pelo cruzamento com a sua linhagem B isogênica (Figura 5), uma vez que as plantas oriundas do cruzamento entre estas duas linhagens continuam macho-estéreis, assim como a linhagem A, em razão da herança materna do citoplasma. Já a linhagem R é chamada de restauradora, pois restaura a fertilidade sobre as linhagens A, ou seja, o cruzamento entre a linhagem A e R dará origem aos híbridos, que são plantas macho-férteis. As linhagens R e A são fenotipicamente distintas, e a combinação entre elas pode resultar em híbridos com alto potencial de rendimento, pela exploração da heterose ou vigor híbrido.

A multiplicação da linhagem A e a produção de sementes híbridas,

quando em larga escala, devem ser realizadas em campos isolados para garantir que não haja contaminação de pólen indesejado. Usa-se proporção básica de três fileiras da linhagem A para uma fileira da linhagem R, sendo mais usual a condução dos campos com 9 a 12 fileiras da fêmea para 3 a 4 fileiras do macho. A multiplicação da linhagem R também deve ser feita em campo isolado, utilizando-se os mesmos procedimentos com linhas puras. Um dos principais cuidados que devem ser tomados durante a condução dos campos isolados é a programação do *split* entre as linhagens produtoras e receptoras de pólen, ou seja, proporcionar a coincidência no florescimento das duas linhagens a serem cruzadas.

Desenvolvimento de Linhagens Parentais (A, B e R)

Síntese de Novas Linhagens A, B e R

O desenvolvimento de novas linhagens parentais é realizado com base na diversidade genética, no desempenho *per se*, e na capacidade combinatória das linhagens. Os programas de melhoramento dividem as linhagens em dois grupos distintos. Um grupo (par de linhagens A e B) compreende os pares de linhagens fêmeas (A) e suas respectivas mantenedoras (B), e o segundo grupo (linhagens R) correspondente das linhagens restauradoras de fertilidade (R). Sabe-se que o sorgo apresenta heterose para a maioria das características quantitativas, como rendimento de grãos e produtividade de biomassa, porém, para isso os parentais utilizados na produção dos híbridos devem ser contrastantes e complementares. Além disso, estudos dialélicos com sorgo mostram que a capacidade geral de combinação apresenta maior importância do que a capacidade específica de combinação entre as linhagens (Kenga et al., 2004; Menezes et al., 2014, 2017; Oliveira et al., 2019).

Primeiramente, linhagens fenotipicamente superiores são extraídas das intrapopulações melhoradas, como apresentado anteriormente. Para identificar se uma linhagem é mantenedora B ou restauradora R, ela é cruzada com uma linhagem macho-estéril, o chamado cruzamento teste, e o híbrido originado deste cruzamento é avaliado quanto à restauração da fertilidade do sistema reprodutor masculino. O híbrido é plantado em pequenas parcelas, geralmente uma ou duas linhas de dois metros de comprimento, para o exame da morfologia da antera no início do florescimento, ou seja, verifica-se a produção ou não de pólen viável por um avaliador treinado. Outra forma de se realizar esta avaliação seria a proteção de quatro a seis panículas com

sacolas de polinização, confeccionadas em papel Kraft, antes do início do florescimento, e após três a quatro semanas observar a formação, ou não, de sementes nas panículas protegidas. A proteção da panícula é similar ao realizado durante a autofecundação de plantas.

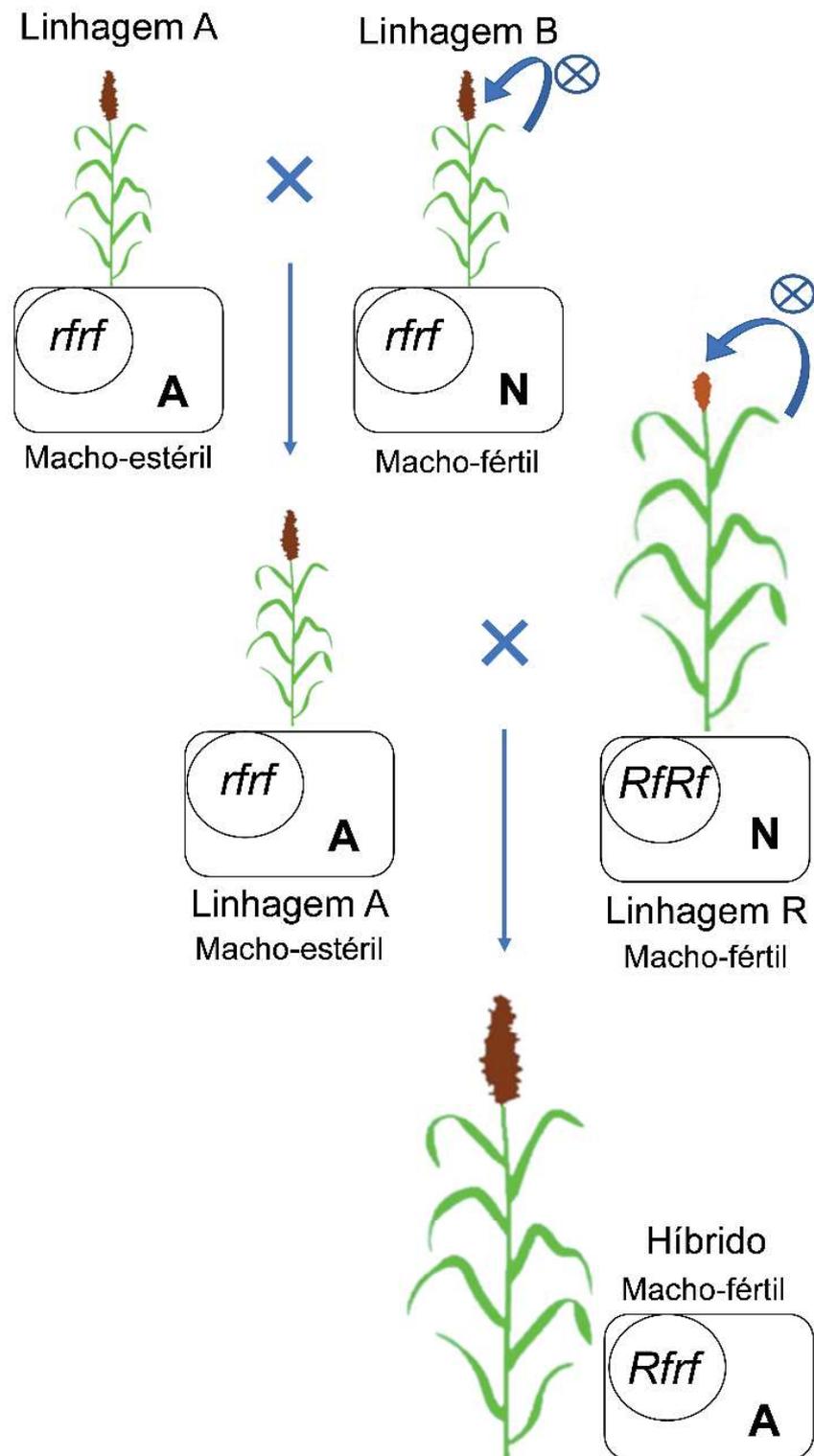


Figura 5. Uso da macho-esterilidade genética citoplasmática (CMS) na síntese de linhagem macho-estéril e híbridos em sorgo.

Estes cruzamentos-testes resultarão em híbridos de quatro tipos:

1. Híbridos sem formação de grãos em todas as panículas, ou seja, a macho-esterilidade foi mantida neste cruzamento. A linhagem usada como polinizadora é, portanto, classificada como mantenedora ou linhagem B.
2. Híbridos com completa formação de sementes em todas as panículas, ou seja, a macho-esterilidade foi restaurada. A linhagem que foi usada como polinizadora é, portanto, classificada como restauradora ou linhagem R.
3. Híbridos com formação parcial de grãos em partes da panícula. A linhagem que foi usada como polinizadora está segregando para restauração da fertilidade, portanto, necessita de mais tempo para torná-la homozigota.
4. Híbridos com formação completa de grãos em algumas panículas, e nada em outras panículas. A linhagem que foi usada como polinizadora é descartada, pois não serve nem como mantenedora nem como restauradora.

As linhagens B mantenedoras, identificadas através dos cruzamentos testes com linhagens A macho-estéreis, precisam ser esterilizadas para produzir a linhagem A isogênica a ela, ou seja, geneticamente idêntica, mas com o citoplasma macho-estéril. Para isso, a linhagem B é cruzada com uma linhagem A qualquer, que dará origem à progênie macho-estéril F_1 . Nesta etapa iniciam-se os retrocruzamentos com a linhagem B, genitor recorrente, que devem ser realizados por seis (RC_6) a sete (RC_7) gerações. Para se obter linhagens isogênicas ao final do processo, as linhagens devem ser plantadas lado a lado, e os cruzamentos devem ser individuais, ou seja, planta a planta, buscando sempre cruzar plantas morfológicamente mais semelhantes, até que ambas as linhagens se apresentem fenotipicamente similares. A realização do método planta a planta é importante, pois permite o descarte de linhagens com restauração parcial da fertilidade e seleção dos mantenedores de esterilidade parcial do programa. Além disso, o método permite a seleção mais rápida e eficiente de linhagens A com traços morfológicos similares às linhagens mantenedoras.

Após a obtenção, as linhagens A e B isogênicas podem ser mantidas e multiplicadas através do plantio de fileiras alternadas lado a lado das duas linhagens. Antes da polinização, as panículas macho-estéreis devem ser protegidas com sacola de papel *Kraft* para evitar contaminação com pólen de pais indesejados. Da mesma forma, as linhagens B também devem ser

ensacadas, para evitar contaminação da panícula. Quando as panículas macho-estéreis estiverem com o estigma emergente e plumoso, a planta está receptiva ao pólen da respectiva planta mantenedora. Com isso basta polinizar as panículas com o pólen desejado e mantê-las cobertas com saco de papel até o início da formação de grãos, a fim de evitar contaminação. A semente formada nas panículas das linhagens A são macho-estéreis, e a semente formada na linhagem B são mantenedoras das linhagens A. Deve-se ressaltar a importância de se realizar o *roguing* antes da autofecundação ou polinização das linhagens A. Assim, uma vez que as linhagens A e B uniformes são produzidas, a estabilidade masculina nas linhagens A pode ser avaliada em áreas onde as temperaturas podem atingir 42 °C ou mais, dado que as linhagens A instáveis tornam-se férteis a esta temperatura, fenômeno conhecido como restauração da fertilidade.

Produção de Sementes de Linhas A, B e R

Produção de Sementes em Pequena Escala

A produção de sementes em pequena escala de linhagens R pode ser conduzida com a semente da linhagem desejada em pequenas parcelas isoladas. Durante o desenvolvimento das plantas devem-se selecionar as mais semelhantes fenotipicamente, as quais terão as panículas cobertas com sacola de papel *Kraft* antes do início do florescimento até a formação dos grãos. A colheita das panículas selecionadas de um mesmo genótipo pode ser realizada conjuntamente, e elas constituirão o banco de semente desta linhagem. Parcelas de duas linhas de quatro metros de comprimento, com 10 plantas por metro linear, que, se mantidas corretamente, podem produzir de 2,0 a 2,5 kg de semente.

Já a produção de semente das linhagens A e B envolve várias operações, que devem ser cuidadosamente realizadas, conforme sequência abaixo:

1. Semear as linhagens A e B em parcelas lado a lado. Normalmente, para cada quatro fileiras da linhagem A, semeia-se duas linhas da linhagem B.
2. Conduzir regularmente o *roguing* nas linhas A e B antes e durante a antese, eliminando-se plantas atípicas. Além de plantas atípicas, como o sorgo selvagem, os dissipadores de pólen podem ser um problema para as linhagens A. Os dissipadores de pólen (*shedder*) são plantas férteis na

linha A que resultam em quebra da esterilidade masculina. E na prática, até as linhagens B que aparecem nas linhas A, por causa da mistura mecânica, também são tratadas como dissipadoras. Com isso, estas plantas devem ser removidas do campo antes e durante o florescimento, através de inspeções diárias.

3. Identificar as plantas, tanto das linhagens A, quanto das linhagens B, em início de florescimento, ou seja, com anteras e estigmas protuberantes na ponta das panículas, e cobrir com sacos de papel *Kraft* e anotar a data do ensacamento.
4. Após quatro a seis dias do início do florescimento, o pólen das panículas da linhagem B está viável. Podem ser utilizados os mesmos sacos usados para cobrir as linhagens mantenedoras, para a polinização das linhagens A que se encontram receptivas. Deve-se colocar os sacos cuidadosamente sobre as respectivas panículas da linhagem A, dobrando a planta ligeiramente e agitando as panículas juntamente com os sacos com pólen. Cada saco com pólen pode ser utilizado para polinizar de duas a três panículas da mesma linhagem A.
5. Deve-se cobrir as panículas polinizadas com o mesmo saco de pólen ou com um saco novo, e anotar a data do primeiro ensacamento e da polinização, fazendo também uma marca “A × B” indicando que foi polinizado por uma linhagem B. O saco de papel deve ser firmemente fixado em torno do pedúnculo, e grampeado para que não se solte.
6. A polinização das linhagens A com linhagens B pode ser repetida após seis ou sete dias da primeira derriça, a fim de promover a fecundação em todas as espiguetas da panícula.
7. Após a polinização das panículas das linhagens A, as panículas das linhagens B devem ser novamente ensacadas, para que não haja contaminação com pólen externo das panículas de autofecundação.
8. Após 15 a 20 dias, deve-se retirar os sacos de polinização e cobrir as panículas com sacolas confeccionadas com tela, do tipo mosqueteiro, e grampear no pedúnculo abaixo da base das panículas. A proteção com sacolas de tela é realizada para evitar, principalmente, o ataque de pássaros e insetos e permitir a ventilação, evitando doenças fúngicas.
9. No momento da colheita, com os grãos em maturação fisiológica, as panículas das linhagens A e B devem ser colhidas separadamente, e

devidamente identificadas para que não ocorra mistura de material genético.

10. A trilha dos materiais também deve ser realizada tomando os devidos cuidados para que não ocorra mistura de sementes e danificação dos grãos.

Vale ressaltar que o condutor dos cruzamentos deve fazer substituições periódicas de sacos de papel e tela danificados, para evitar contaminação e perda de sementes.

Produção de Semente em Larga Escala

A produção em grande escala das linhagens A, B e R geralmente é realizada em campos isolados (Chopra, 1982), e recomenda-se que apresente pelo menos 300 metros de distância de outros campos de sorgo. A produção das linhagens R é mais simples quando comparada à produção das linhagens A/B, pois apresenta apenas um material genético em campo. Porém, devem-se realizar os devidos cuidados, como *roguing* periódico de plantas atípicas ou fora do padrão, para uma boa condução dos campos. A colheita das sementes é realizada conjuntamente após atingir a maturação fisiológica dos grãos, e os cuidados necessários devem ser tomados para evitar mistura de sementes e perda da qualidade dos grãos.

Já a produção de sementes das linhagens A e B é feita através do plantio de quatro linhas da linhagem A, alternadas com duas linhas da linhagem B isogênica correspondente. Recomenda-se que, no final de todas as linhas em todo o campo, uma faixa de um metro de comprimento seja semeada com a linhagem B, o que garante o fornecimento de pólen para todas as panículas da linhagem A. O *roguing* das plantas atípicas e disseminadoras de pólen deve ser realizado todos os dias, para que não haja antese de produtores de pólen indesejáveis e contaminação dos campos de produção. A polinização pelo vento assegurará a formação de sementes nas linhagens A; já a polinização das linhagens B é realizada pela autofecundação. A colheita das sementes das linhagens A e B deve ser realizada separadamente e devidamente identificada para não haver mistura de sementes macho-estéreis e macho-férteis. Ainda, a fim de evitar a mistura mecânica de sementes durante a colheita, recomenda-se que sejam colhidas em diferentes épocas, de preferência uma após a outra.

Melhoramento de Linhagens A e B

Até agora, neste capítulo, foram tratados apenas os procedimentos de desenvolvimento de novas linhagens A através das linhagens B, dados os cruzamentos-teste. Mas é de extrema importância o conhecimento dos procedimentos envolvidos na melhoria das linhagens A e B em programas de melhoramento de híbridos.

Entre as principais características de interesse do melhorista podem ser citadas a resistência aos fatores bióticos ou abióticos e a maior produtividade de grãos. Neste capítulo vamos considerar como exemplo a piramidação da resistência/tolerância a uma determinada doença cuja linhagem A/B é suscetível. Mas os procedimentos a serem seguidos serão os mesmos para quaisquer características. Vale ressaltar, neste caso, a importância da presença do patógeno na área, caso contrário não será possível realizar a seleção. Com isso, as seguintes etapas são envolvidas no melhoramento destas linhagens:

1. Identificar as linhagens A/B que se deseja melhorar, e as linhagens que serão usadas como fonte da característica de interesse. As linhagens usadas como fonte da característica de interesse podem ser tanto restauradoras de fertilidade (R), quanto mantenedoras (B).
2. Deve-se cruzar a linhagem B com a linhagem fonte selecionada, e avançar a progênie até a geração F_2 , onde haverá segregação para as diferentes características.
3. Cultivar as plantas F_2 e observar a resistência/tolerância à doença em foco. Nesta etapa também se pode realizar a seleção para características monogênicas ou oligogênicas, de interesse dos melhoristas.
4. As sementes F_3 das plantas selecionadas na etapa anterior devem ser cultivadas e avaliadas para a característica de interesse. Devem ser selecionadas plantas com a combinação desejada de traços para compor a família selecionada para resistência, e que apresentem uniformidade entre si. Simultaneamente, estas linhagens segregantes F_3 selecionadas devem ser avaliadas em testcross com uma linhagem A qualquer, que será semeada separadamente perto do viveiro onde as plantas F_3 estão sendo avaliadas.
5. As sementes F_4 das plantas selecionadas na etapa anterior devem ser cultivadas e avaliadas para a característica de interesse. Simultaneamente,

as sementes originadas do testcross devem ser plantadas, nas proximidades do viveiro onde estão sendo realizadas as seleções, para avaliação do poder de restauração de fertilidade das linhagens selecionadas na etapa anterior. A macho-esterilidade pode ser analisada por um avaliador experiente ou através da proteção das panículas, como explicado anteriormente neste capítulo. Com isso, após identificar as progênies F_1 macho-estéreis, deve-se identificar as respectivas progênies F_4 no viveiro e selecionar dentro delas as plantas dentro do padrão, para dar continuidade ao processo.

6. Deve-se retrocruzar, planta a planta, duas a três panículas macho-estéreis F_1 com pólen de plantas da família F_5 , que devem ser também autofecundadas. Estes cruzamentos devem ser realizados entre as plantas que mais se assemelhem fenotipicamente. Identificar cada cruzamento realizado, e após a maturação fisiológica dos grãos deve-se colher as panículas separadamente.
7. Em casa de vegetação, plantar o par de panículas cruzadas lado a lado, e conduzir os retrocruzamentos entre os pares de linhagens A e B por seis a sete gerações. Deve-se, em todas as etapas, tomar os seguintes cuidados: verificar a esterilidade masculina das linhagens A, e realizar o retrocruzamento de planta a planta, sempre avaliando a semelhança morfológica entre as plantas macho-estéreis e os polinizadores selecionados.
8. No estágio em que as linhas macho-estéreis se assemelham às respectivas linhagens mantenedoras, e não segregam, elas então são chamadas de linhagens A e B. As linhagens B ainda podem ser selecionadas com base em seu desempenho *per se*, e em razão da resistência aos fatores de interesse.
9. A seleção adicional de linhagens A pode ser realizada com base em testes de capacidade geral de combinação, em cruzamentos com linhagens R elites, para características de interesse. Assim, as linhagens A e B selecionadas podem, portanto, ser nomeadas. Uma nomenclatura usual é a numeração com o ano, seguida do número de série e das letras A ou B para indicar que são macho-estéreis ou mantenedoras, respectivamente.
10. A manutenção das linhagens A selecionadas deve ser feita de acordo com os procedimentos descritos anteriormente.

A abordagem do melhoramento, de acordo com normas propostas pelo Instituto Internacional de Pesquisa de Cultivos para Trópicos Semiáridos (ICRISAT), facilitou o uso de linhagens de diversas origens genéticas e proporcionou o aumento da diversidade genética nos bancos de germoplasma dos programas de melhoramento genético pelo globo. Porém, estudos ainda devem ser realizados na busca por genótipos mais produtivos e resistentes ou tolerantes aos diferentes fatores bióticos e abióticos, a fim de produzir híbridos cada vez mais competitivos para o mercado. Além disso, diversos estudos buscam promover a disponibilidade e utilização de diferentes citoplasmas para maior diversificação das linhagens parentais e dos híbridos, o que diminuirá os riscos proeminentes, por causa da utilização em massa de um único citoplasma, como ocorre na atualidade.

Marcadores Moleculares Associados a Genes de Restauração da Fertilidade

Os programas de melhoramento de sorgo não realizam com frequência cruzamentos entre linhagem B e R. Geralmente, os grupos de genótipos em sorgo são mantidos separados como mantenedores ou restauradores, tipo B \times B ou R \times R (Andrews et al., 1997; House, 1985). Porém, quando características de interesse do melhorista estão presentes apenas nas linhagens R, e há a necessidade de transferir para as linhagens B, ou vice-versa, estes cruzamentos são inevitáveis. Com isso, torna-se necessária a síntese de gerações segregantes do cruzamento entre as linhagens B e R, para a identificação visual da restauração, ou não, da fertilidade em cruzamentos-teste, o que torna o processo moroso (Rooney, 2004).

O reduzido número de cruzamentos B \times R citado anteriormente se deve basicamente a esta dificuldade e morosidade em identificar as linhagens mantenedoras e, também, visando a manutenção da distância genética entre linhagens a serem utilizadas como fêmeas (Linhagens A) e as linhagens macho, restauradoras da fertilidade (linhagens R) em programas de produção de híbridos. Como existe uma maior variabilidade genética nas linhagens R, os melhoristas de sorgo sempre estão precisando cruzar B com R para melhorar alguma característica nas linhagens mantenedoras, principalmente para incorporação de genes de resistência a doenças. Assim, a utilização de marcadores para genes de restauração de fertilidade ampliará as possibilidades de desenvolvimento de linhagens B e, conseqüentemente, de linhagens A, o que aumenta as possibilidades para a produção de híbridos

cada vez mais vigorosos e produtivos.

Um exemplo disso é o que acontece com o programa de sorgo sacarino da Embrapa Milho e Sorgo. Para se obter híbridos com altos teores de açúcares no colmo, os melhoristas necessitam que ambos os parentais possuam esta característica, uma vez que se trata de uma característica de herança monogênica e aditiva, e apresentam efeitos de dominância. No entanto, altos teores de açúcares foram encontrados apenas nas linhagens R do programa. Com isso, tornou-se necessário o cruzamento entre linhagens B, elites do programa, e as linhagens R com altos teores de açúcares, para transferência desta característica para o germoplasma A/B.

O cruzamento entre linhagens B e R resultará em plantas $F_1(Rf_1rf_1)$, as quais não são mantenedoras. Na geração F_2 as plantas segregarão na proporção 75% restauradoras (25% Rf_1Rf_1 e 50% Rf_1rf_1) e 25% mantenedoras (rf_1rf_1). A mesma segregação ocorrerá para o loco Rf_2 . Portanto, a proporção de plantas $rf_1rf_1rf_2rf_2$ na população será de somente $1/16$. Como uma linhagem B precisa ter genótipo $rf_1rf_1rf_2rf_2$ (duplo recessivo), e não é possível diferenciar fenotipicamente entre uma linhagem $Rf_{1-}Rf_{2-}$ e $rf_1rf_1rf_2rf_2$, seria necessário o cruzamento de todas as plantas F_2 com uma linhagem A estéril, para identificar quais plantas restauram a fertilidade em cruzamentos com as linhagens A. Assim, as progênies que apresentarem todas as plantas macho-estéreis originaram-se de plantas B, da mesma forma que progênies que apresentaram plantas férteis originaram-se de plantas R.

Contudo, com a utilização de marcadores moleculares associados aos genes Rf_1 e Rf_2 é possível selecionar plantas mantenedoras já na geração F_2 do cruzamento $B \times R$, reduzindo a fenotipagem em até 16 vezes, o que reduz bastante a mão de obra e o tempo para o desenvolvimento de novas fêmeas (pares de linhagem A/B) para o programa de melhoramento. Além disso, descarta a necessidade de realizar o testcross com linhagens A, para a identificação das progênies mantenedoras. Considerando os trabalhos para aumentar o teor de açúcares nas linhagens B do programa de sorgo da Embrapa, este tipo de marcador seria de grande utilidade.

Outra situação frequente que ocorre nos programas de melhoramento de plantas é a introdução de novos germoplasmas oriundos de outros programas de melhoramento ou de bancos de germoplasma externos à instituição de pesquisa. No caso do sorgo é comum a importação de novos acessos dos Estados Unidos e da Europa. A maioria destes acessos não é identificada como B ou R. Assim, a única forma de identificar os genótipos

mantenedores é através de testcross com uma linhagem A, e avaliação da geração F_2 quanto à sua fertilidade ou macho-esterilidade.

Estudos estão sendo realizados na busca por estes marcadores. Klein et al. (2001) mapearam no cromossomo oito e posteriormente clonaram (Klein et al., 2005) o gene Rf_1 de restauração da fertilidade em sorgo. Após validação, os autores relataram que os marcadores ligados ao loco Rf_1 foram capazes de prever a restauração da fertilidade das progênies geradas no estudo. Resultados semelhantes a este foram encontrados por Pinto et al. (2014), porém, Jordan et al. (2010) relataram resultados conflitantes em estudo realizado com diferentes linhagens-elite de sorgo. Este fato se deve, principalmente, à existência de pelo menos dois genes dominantes restauradores de fertilidade em germoplasma de sorgo comercial (Miller; Pickett 1964).

Jordan et al. (2010) relataram o mapeamento fino do gene Rf_2 em sorgo no cromossomo dois, e identificaram marcadores moleculares que, quando utilizados em conjunto com os marcadores Rf_1 , poderão ser empregados para a seleção assistida por marcadores para a geração de linhagens parentais comerciais com maior acurácia. Além disso, Jordan et al. (2011) também descreveram a existência de um terceiro loco de efeito maior, denominado Rf_5 , que apresenta capacidade de restaurar a macho-esterilidade tanto nos citoplasmas do tipo A1 quanto no tipo A2.

Dessa forma, o desenvolvimento de um sistema de prospecção rápido e robusto para os genes de restauração de fertilidade é um dos maiores alvos dos programas de melhoramento e das indústrias de sementes. E a validação de polimorfismos no loco que liga a restauração da fertilidade fornecerá informações necessárias para classificar o germoplasma de sorgo sem a necessidade de demorados testes em campo.

Referências

ANDREWS, D. J.; WEBSTER, O. J. A new factor for genetic male-sterility in *Sorghum bicolor* (L.) Moench. **Crop Science**, v. 11, n. 2, p. 308-309, 1971.

ANDREWS, D. J.; EJETA, G.; GILBERT, M.; GOSWAMI, P.; ANAND KUMAR, K.; MAUNDER, A. B.; PORTER, K.; RAI, K. N.; RAJEWSKI, J. F.; REDDY, B. V. S.; STEGMEIER, W.; TALUKDAR, B. S. Breeding hybrid parents. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON THE GENETIC IMPROVEMENT OF SORGHUM AND PEARL MILLET, 1996, Lubbock, Texas. **Proceedings...** Lincoln: INTSORMIL, 1997. p. 173-187.

AYYANGAR, G. The description of crop plant characters and their ranges of variation. IV. Variability of Indian sorghum. **Indian Journal of Agricultural and Science**, v. 12, p. 528-563, 1942.

AYYANGAR, G. N. R.; PONNAIYA, B. W. X. The occurrence and inheritance of purple pigment on the glumes of sorghum close on emergence from the boot. **Current Science**, v. 5, n. 11, p. 590, 1937.

BARABAS, Z. Observation of sex differentiation in sorghum by use of induced malesterile mutants. **Nature**, v. 195, n. 4838, p. 257-259, 1962.

CHOPRA, K. R. **Technical guideline for sorghum and millet seed production**. Roma: FAO, 1982.

DOGGETT, H.; EBERHART, S. A. Recurrent selection in sorghum. **Crop Science**, v. 8, p. 119-121, 1968.

DWEIKAT, I. Sorghum breeding. In: WANG, Y.; UPADHYAYA, H. D.; KOLE, C. **Genetics, genomics and breeding of sorghum**. Boca Raton: CRC Press, 2014. p. 90-113.

ECKEBIL, J. P.; ROSS, W. M.; GARDNER, C. O.; MARANVILLE, J. W. Heritability estimates, genetic correlations, and predicted gains from S_1 progeny tests in three grain sorghum random-mating populations. **Crop Science**, v. 17, n. 3, p. 373-377, 1977.

GARDNER, C. O. Development of superior populations of sorghum and their role in breeding programs. In: RAO, N. G. P.; HOUSE, L. R. (ed.). **Sorghum in seventies**. New Delhi: Oxford and IBH Publishing, 1972. p. 180-196.

HOFFMANN JR., L.; ROONEY, W. L. Cytoplasm has no effect on the yield and quality of biomass sorghum hybrids. **Journal of Sustainable Bioenergy Systems**, v. 3, p. 129-134, 2013.

HOUSE, L. R. **A guide to sorghum breeding**. Patancheru: International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics, 1985. v. 2, 206 p.

JORDAN, D. R.; KLEIN, R. R.; SAKREWSKI, K. G.; HENZELL, R. G.; KLEIN, P. E.; MACE, E. S. Mapping and characterization of Rf5: a new gene conditioning pollen fertility restoration in A1 and A2 cytoplasm in sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench). **Theoretical and Applied Genetics**, v. 123, p. 383-396, 2011.

JORDAN, D. R.; MACE, E. S.; HENZEL, R. G.; KLEIN, P. E.; KLEIN, R. R. Molecular mapping and candidate gene identification of the Rf2 gene for pollen fertility restoration in sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench]. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 120, p. 1279-1287, 2010.

KARPER, R. E.; STEPHENS, J. C. Floral abnormalities in sorghum. **Journal of Heredity**, v. 27, n. 5, p. 183-194, 1936.

KENGA, R.; ALABI, S. O.; GUPTA, S. C. Combining ability studies in tropical sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench). **Field Crops Research**, v. 88, n. 2/3, p. 251-260, 2004.

KLEIN, R. R.; KLEIN, P.; CHHABRA, A.; DONG, J.; PAMMI, S.; CHILDS, K.; MULLET, J.; ROONEY, W.; SCHERTZ, K. Molecular mapping of the rf1 gene for pollen fertility restoration in sorghum (*Sorghum bicolor* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, v. 102, p. 1206-1212, 2001.

KLEIN, R. R.; KLEIN, P. E.; MULLET, J. E.; MINX, P.; ROONEY, W. L.; SCHERTZ, K. F. Fertility restorer locus Rf1 of sorghum (*Sorghum bicolor* L.) encodes pentatricopeptide repeat protein not present in the colinear region of rice chromosome 12. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 102, p. 994-1012, 2005.

MENEZES, C. B.; CARVALHO JÚNIOR, G. A.; SILVA, L. A.; BERNARDINO, K. C.; SOUZA, V. F.; TARDIN, F. D.; SCHAFFERT, R. E. Combining ability of grain sorghum lines selected for aluminum tolerance. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 14, n. 1, p. 42-48, 2014.

MENEZES, C. B.; SANTOS, C. V.; SALDANHA, D. C.; JÚLIO, M. P. M.; SILVA, K. J.; SILVA, C. H. T.; RODRIGUES, J. A. S. Capacidade combinatória de linhagens e seleção de híbridos de sorgo granífero. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 16, n. 3, p. 509-523, 2017.

MILLER, D. A.; PICKETT, R. C. Inheritance of partial male-fertility in *Sorghum vulgare Pers.* **Crop Science**, v. 4, n. 1, p. 1-4, 1964.

NATH, B. Population breeding techniques in sorghum: sorghum in the eighties. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON SORGHUM, 1982, Patancheru. **Proceedings...** ICRISAT Center, Patancheru: ICRISAT, 1982. v. 1.

OLIVEIRA, I. C. M.; MARÇAL, T. de S.; BERNARDINO, K. da C.; RIBEIRO, P. C. de O.; PARRELLA, R. A. da C.; CARNEIRO, P. C. S.; SCHAFFERT, R. E.; CARNEIRO, J. E. de S. Combining ability of biomass sorghum lines for agroindustrial characters and multitrait selection of photosensitive hybrids for energy cogeneration. **Crop Science**, v. 59, p. 1554-1566, 2019.

PINTO, M. D. O.; SANTOS, C. V.; MENEZES, C. B.; PARRELLA, R. D. C.; SCHAFFERT, R. E.; MAGALHÃES, J. V. **Mapeamento e validação de marcadores microssatélites associados à restauração da fertilidade em sorgo**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2014. 25 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 110).

QUINBY, J. R. Interaction of genes and cytoplasm in male sterility in sorghum. In: CORN AND SORGHUM RESEARCH CONFERENCE, 35., Chicago. **Proceedings...** Chicago: American Seed Trade Association, 1980.

RAO, N. G. P.; TRIPATHI, D. P.; RANA, B. S. Genetic analysis of cytoplasmic systems in sorghum. **Indian Journal Genetics**, v. 44, p. 480-496, 1984.

REDDY, B. V. S.; SANJANA, P.; RAMAIAH, B. Strategies for improving post-rainy season sorghum: a case study for landrace hybrid breeding approach. In: WORKSHOP ON HETEROSIS IN GUINEA SORGHUM, 2003, Sotuba, Mali. **Proceedings...** [S.l.: s.n.], 2003. p. 10-14.

REDDY, B. V. S.; RAMESH, S.; ORTIZ, R. Genetic and cytoplasmic-nuclear male-sterility in sorghum. **Plant Breeding Reviews**, v. 25, p. 139-172, 2005.

ROONEY, W. Genetics and cytogenetics. In: SMITH, C. W.; FREDERIKSEN, R. A. **Sorghum**: origin, history, technology, and production. New York: John Wiley & Sons, 2000.

ROONEY, W. L. Sorghum improvement: integrating traditional and new technology to produce improved genotypes. **Advances in Agronomy**, v. 83, p. 38-110, 2004.

ROSS, W. M. Use of population breeding in sorghum: problems and prospects. In: ANNUAL CORN AND SORGHUM RESEARCH CONFERENCE, 28., 1973, Chicago. **Proceedings...** Washington: ASTA, 1973. p. 205-209.

ROSS, W. M.; GARDNER, C. O. The mechanics of population improvement in sorghum. In: PLANT BREEDING METHODS AND APPROACHES IN SORGHUM WORKSHOP FOR LATIN AMERICA, 1983, El Batan, Mexico. **Proceedings...** Mexico: CIMMYT, 1983. p. 8-38.

ROSS, W. M.; HECKEROTT, H. L. Registration of seven isocyttoplasmic sorghum germplasm lines. **Crop Science**, v. 12, p. 720, 1972.

SCHAFFERT, R. E.; RODRIGUES, J. A. S.; PARRELLA, R. A. C.; MENEZES, C. B. **Síntese e melhoramento de populações de inter cruzamento para aumentar recombinação genética e facilitar seleção recorrente em sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench)**. Sete Lagoas, Embrapa Milho e Sorgo, 2016. 8 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Circular Técnica, 227).

SINGH, B. D. **Plant breeding**: principles and methods. 7th ed. New Delhi: Kalyani Publishers, 2004.

STEPHENS, J. Male sterility in sorghum: its possible utilization in production of hybrid seed. **Journal of America Society of Agronomy**, v. 29, n. 8, p. 690-696, 1937.

STEPHENS, J. C.; HOLLAND, P. F. Cytoplasmic male sterility for hybrid sorghum seed production. **Agronomy Journal**, v. 46, p. 20-23, 1954.

SCHERTZ, K. F. Male-sterility in sorghum: Its characteristics and importance. In: ODA PLANT SCIENCES RESEARCH PROGRAMME CONFERENCE, 29., 1993., Norwich, UK. **Use of molecular markers in sorghum and pearl millet breeding for developing countries: proceedings**. London: Overseas Development Administration, 1994. p. 35-37.

SCHERTZ, K. F. Possible new cytoplasmic-genic sterility systems in sorghum. In: ANNUAL CORN AND SORGHUM RESEARCH CONFERENCE, 1973. **Proceedings...** Washington: American Seed Trade Association, 1973. p. 7-14.

SCHERTZ, K. F.; RITCHEY, J. M. Cytoplasmic-genic male sterility systems in sorghum. **Crop Science**, v. 18, n. 5, p. 890-893, 1978.

SECRIST, R. R.; ATKINS, R. E. Pollen fertility and agronomic performance of sorghum hybrids with different male-sterility-inducing cytoplasm. **Journal of Iowa Academic Science**, v. 96, n. 3, p. 99-103, 1989.

TANG, H. V.; PRING, D. R. Conversion of fertility restoration of the sorghum IS1112C (A3) male-sterile cytoplasm from two genes to one gene. **Crop Science**, v. 43, n. 5, p. 1747-1753, 2003.

WEBSTER, O. J. Genetic studies in *Sorghum vulgare* (Pers.). **Crop Science**, v. 5, n. 3, p. 207-210, 1965.

WEBSTER, O. J.; SINGH, S. P. Breeding behavior and histological structure of non-dehiscent anther character in *Sorghum vulgare* pers. **Crop Science**, v. 4, n. 6, p. 656-658, 1964.

WORSTELL, J. V.; KIDD, H. J.; SCHERTZ, K. C. Relationships among male sterility inducing cytoplasm of sorghum. **Crop Science**, v. 24, n. 1, p. 186-189, 1984.

XIN, Z.; HUANG, J.; SMITH, A. R.; CHEN, J.; BURKE, J.; SATTLER, S. E.; ZHAO, D. Morphological characterization of a new and easily recognizable nuclear male sterile mutant of sorghum (*Sorghum bicolor*). **PLoS One**, v. 12, e0165195, 2017.

Literatura Recomendada

PEDERSEN, J. F.; TOY, J. J. Registration of 29 forage sorghum genetic stocks in A3 cytoplasm. **Crop Science**, v. 37, n. 4, p. 1408-1409, 1997.

PEDERSEN, J. F.; TOY, J. J. Registration of N316-N320 sorghum nuclear male-sterility genetic stocks. **Crop science**, v. 41, n. 2, p. 607-607, 2001.