

ISABEL REGINA PRAZERES DE SOUZA

Análise genética da
1988 TS - T.31/88



3030 - 1

ANÁLISE GENÉTICA DA RESTAURAÇÃO DA FERTILIDADE EM MILHO
(Zea mays L.) COM MACHO-ESTERILIDADE CITOPLASMÁTICA TIPO C

T
31/88

Tese Apresentada à Universidade
Federal de Viçosa, como Parte das
Exigências do Curso de Genética e
Melhoramento, para Obtenção do Tí-
tulo de "Magister Scientiae".

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
JANEIRO - 1988

Ficha catalográfica preparada pela Área de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV

T

S729a
1988 Souza, Isabel Regina Prazeres de.
Análise genética da restauração da fertilidade
em milho (Zea mays L.) com macho-esterilidade ci-
toplasmática tipo C. Viçosa, UFV, Impr. Univ.,
1988.
83p.

Tese (M.S.) - UFV

1. Milho - Melhoramento genético. 2. Milho - Res-
taurção da fertilidade. 3. Milho - Macho - Esteri-
lidade citoplasmática tipo C. 4. Melhoramento gêné-
tico. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Títu-
lo.

CDD 18.ed.: 633.153
CDD 19.ed.: 633.153

EMBRAPA/DDT	
Valor Aquisição Cr\$
Data Aquisição	19-10-95
N.º M. Fiscal Fatura
Fornecedor
N.º Cr.º m Compra
Origem	doação
N.º do Tombo	T.39/95

ISABEL REGINA PRAZERES DE SOUZA

ANÁLISE GENÉTICA DA RESTAURAÇÃO DA FERTILIDADE EM MILHO
(Zea mays L.) COM MACHO-ESTERILIDADE CITOPLASMÁTICA TIPO C

Tese Apresentada à Universidade
Federal de Viçosa, como Parte das
Exigências do Curso de Genética e
Melhoramento, para Obtenção do Tí-
tulo de "Magister Scientiae".

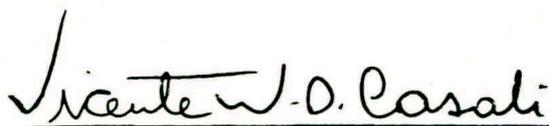
APROVADA: 3 de agosto de 1987



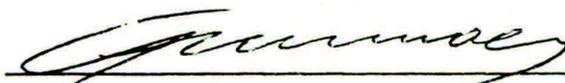
Prof. José Carlos Silva
(Conselheiro)



Prof. Hélio Morais Barbosa
(Conselheiro)



Prof. Vicente Wagner Dias Casali



Prof. Carlos Floriano de Moraes



Prof. Luiz Sérgio Saraiva
(Orientador)

Aos meus pais, Olavo e Regina.

Aos meus irmãos.

Ao Camilo.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa, por intermédio do Departamento de Biologia Geral, pela oportunidade de realização do Curso de Mestrado.

Ao CNPq, pela ajuda financeira.

Ao Professor Luiz Sérgio Saraiva, pela orientação, pelo apoio e pela amizade dispensados durante o curso.

A todos os funcionários do campo experimental de genética da U.F.V.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

ISABEL REGINA PRAZERES DE SOUZA, filha de Olavo Rodrigues de Souza e Maria Regina Prazeres de Souza, nasceu no dia 11 de abril de 1959, em Juiz de Fora, MG.

Concluiu o segundo grau no Colégio Objetivo SP-B, em Brasília, DF. Graduou-se em Engenharia Agrônômica pela Universidade Federal de Viçosa - U.F.V., Viçosa-MG, em julho de 1982.

Em 1984, trabalhou, como bolsista do Programa de Integração Ensino Pesquisa-PIEP, no Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo - CNPMS/EMBRAPA, Sete Lagoas, MG, na área de Melhoramento de Milho.

Em março de 1985, iniciou o curso de Mestrado em Genética e Melhoramento, na Universidade Federal de Viçosa - U.F.V.

CONTEÚDO

	Página
EXTRATO	vii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. Macho-Esterilidade Citoplasmática	4
2.2. Macho-Esterilidade Genética	6
2.3. Principais Grupos de CME	6
2.4. Genes Restauradores da Fertilidade	7
2.5. Análise Citológica da Microsporogênese em Plantas com CME	9
2.6. Análise dos CMEs a Nível Molecular	11
2.7. Efeitos do Ambiente em Plantas com CME	15
2.8. Efeitos do Citoplasma na Morfologia da Planta	16
3. MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1. Restauração da Fertilidade em Citoplasma Ma- cho-Estéril do Tipo C, em Milho	18
3.2. Efeito de Dois Anos sobre a Restauração da Fer- tilidade de Plantas com Citoplasma C	21

	Página
3.3. Quebra Tardia da Esterilidade Masculina de Plan <u>tas</u> com Citoplasma C	21
3.4. Efeito de Diferentes Níveis de Adubação Nitro <u>genada</u> sobre a Restauração da Fertilidade de Plantas com Citoplasma C	23
3.5. Número de Folhas Acima e Abaixo da <u>Primeira</u> Es <u>piga</u> em Plantas MF e ME Oriundas de um mesmo RC ₁	24
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
4.1. Sistema Gênico Controlador da Restauração da Fertilidade em Plantas com Citoplasma C	25
4.2. Efeito de Dois Anos sobre a Restauração da <u>Fer</u> tilidade em Plantas com Citoplasma C	45
4.3. Quebra Tardia da Esterilidade Masculina	49
4.4. Influência de Diferentes Níveis de Adubação <u>Ni</u> trogenada sobre a Restauração da Fertilidade	54
4.5. Número de Folhas Acima e Abaixo da <u>Primeira</u> Espiga de Plantas MF e ME Oriundas de um mesmo RC ₁	57
5. RESUMO E CONCLUSÕES	60
BIBLIOGRAFIA	64
APÊNDICE	72

EXTRATO

SOUZA, Isabel Regina Prazeres de, M.S., Universidade Federal de Viçosa, janeiro de 1988. Análise Genética da Restauração da Fertilidade em Milho (*Zea mays* L.) com Macho-Esterilidade Citoplasmática Tipo C. Professor Orientador: Luiz Sérgio Saraiva. Professores Conselheiros: Hélio Moraes Barbosa e José Carlos Silva.

Pretendeu-se, nesta pesquisa, determinar o sistema gênico controlador da restauração da fertilidade de plantas com macho-esterilidade citoplasmática do tipo C, em milho. Foram analisadas as proporções de plantas macho-férteis (MF) + parcialmente férteis (PF) : macho-estéreis (ME) na segregação da geração F_2 e do RC_1 de híbridos MF e PF, oriundos dos cruzamentos entre linhagem com citoplasma normal e linhagem macho-estéril com citoplasma C. Essas proporções mostraram o envolvimento de três genes independentes (Rf_4/rf_4 , Rf_5/rf_5 e Rf_6/rf_6) na restauração da fertilidade. A hipótese que melhor se ajustou ao conjunto dos dados indica que a restauração da fertilidade do citoplasma C é um caso de interação gênica, com genes complementares e duplicados, em

que o gene dominante Rf_4 complementa-se com os dominantes duplicados Rf_5 e/ou Rf_6 . Assim, tem-se que os genótipos $Rf_4-Rf_5-Rf_6^-$, $Rf_4-Rf_5-rf_6rf_6$ e $Rf_4-rf_5rf_5Rf_6^-$ são férteis ou parcialmente férteis e $Rf_4-rf_5rf_5rf_6rf_6$, $rf_4rf_4Rf_5-rf_6rf_6$, $rf_4rf_4rf_5rf_5Rf_6^-$, $rf_4rf_4Rf_5-Rf_6^-$ e $rf_4rf_4rf_5rf_5rf_6rf_6$ são es téreis. Para a completa restauração da fertilidade é necessária, além da complementaridade entre os genes restauradores, a presença de um complexo gênico de modificadores para cada um desses restauradores, bem como de condições ambientais. Os resultados permitiram propor os prováveis genótipos das seguintes linhagens: 264ME-C : $rf_4rf_4rf_5rf_5Rf_6Rf_6$, 870 MF : $Rf_4Rf_4Rf_5Rf_5rf_6rf_6$, 964MF : $Rf_4Rf_4Rf_5Rf_5rf_6rf_6$, $Rf_4Rf_4rf_5rf_5rf_6rf_6$ e $Rf_4Rf_4Rf_5rf_5rf_6rf_6$. O efeito de dois anos sobre a segregação dos tipos de pendões da geração F_2 mostrou que a expressão do grau de fertilidade parcial é influenciada pelo genótipo e condições ambientais. Três níveis diferentes de adubação nitrogenada com os totais de 13, 27 e 40 kg de nitrogênio/ha mostraram não ter nenhum efeito sobre a segregação dos tipos de pendões da geração F_2 . A segregação da geração F_2 , resultante da autofecundação de híbridos PF_2 (parcialmente férteis com, aproximadamente, 20% de anteras viáveis), oriundos de um mesmo cruzamento, que apresentaram início de liberação de pólen cedo ou quebratar dia da esterilidade masculina, não diferiu com relação ao número de dias após plantio para início da liberação de pólen. O número de folhas acima e abaixo da primeira espiga foi determinado em plantas MF e ME, resultantes do RC_1 de híbridos MF, PF_2 e PF_3 (parcialmente férteis com, aproximadamente, 60% de anteras viáveis), oriundos de um mesmo cruzamento. O número de folhas acima da primeira espiga foi superior em plantas ME. Com relação ao número de folhas abaixo da primeira espiga, não houve diferença entre as plantas MF e ME.

1. INTRODUÇÃO

A macho-esterilidade citoplasmática foi, primeiramente, descrita por RHOADES (48) na década de 1930. A manifestação dessa esterilidade depende da natureza do citoplasma e da ação de genes do núcleo, razão por que o fenômeno da esterilidade resulta de uma interação genético-citoplasmática (13, 53, 56).

Em milho, a macho-esterilidade citoplasmática tem sido utilizada na produção de sementes híbridas, substituindo o despendoamento mecânico ou manual do progenitor feminino (3, 4, 12, 13, 49). Com isto elimina-se a necessidade de mão-de-obra antes da dispersão do pólen nas fileiras femininas, reduzindo, conseqüentemente, o custo de produção. Para a produção de híbridos, o caráter macho-estéril é inicialmente introduzido no progenitor feminino por meio de sucessivos retrocruzamentos, utilizando-se a linhagem como progenitor recorrente e efetuando-se a seleção fenotípica.

A linhagem resultante depois de seis gerações será considerada isogênica à linhagem macho-fértil original, exceto para o caráter em questão (53).

As fontes de citoplasma macho-estéril em milho podem ser classificadas em três grupos principais (T, S e C) por meio da reação diferencial da restauração da fertilidade por genes nucleares (3, 20, 39).

O citoplasma T foi, em 1950, o primeiro a ser introduzido nas linhagens de uso comercial e, após ser utilizado durante 20 anos, foi descartado, em 1970, em virtude de severo ataque do fungo Bipolaris maydis raça T (anteriormente conhecido como Helminthosporium maydis), que causou drástica redução nos campos de produção de milho dos EUA, em decorrência da susceptibilidade das plantas portadoras desse tipo de citoplasma ao fungo (6, 8, 19, 20, 29, 41). No Brasil, também ocorreu essa epifítia, tornando-se necessário, a partir de então, utilizar outros tipos de citoplasmas resistentes à doença (6).

Para obter o híbrido através de macho-esterilidade, é necessário que o progenitor masculino contenha genes restauradores da fertilidade. A restauração do citoplasma T a nível esporofítico depende de dois genes restauradores, Rf_1 e Rf_2 , ambos dominantes e complementares (20, 27, 39). Além desses genes dominantes, são necessários genes modificadores, para assegurar a completa fertilidade (12).

A restauração do citoplasma S é dependente do gene restaurador denominado Rf_3 (12, 58). A restauração dá-se a nível gametofítico, isto é, a constituição do gameta determinará o fenótipo em relação à fertilidade (12).

A herança da restauração da fertilidade do citoplasma macho-estéril do grupo C ainda não foi intensivamente estudada, apesar de ser esse tipo de citoplasma amplamente

empregado na produção de milho híbrido, por apresentar maior estabilidade à variação do meio ambiente do que o tipo S. As análises do número de genes envolvidos na restauração da fertilidade de plantas com citoplasma C têm apresentado resultados controvertidos. Com o objetivo principal de determinar o mecanismo genético controlador da restauração da fertilidade em plantas com citoplasma C, realizou-se o presente trabalho.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Macho-Esterilidade Citoplasmática

A macho-esterilidade citoplasmática foi descrita, pela primeira vez, por Rhoades, em 1931, em uma variedade de milho oriunda de Arequipa, no Peru (12, 43, 48), e, após ser estudada detalhadamente, tornou-se de grande importância econômica na produção de sementes de milho híbrido, por eliminar a necessidade de despendimento mecânico ou manual do progenitor feminino (3, 4, 12, 13, 49). A planta incapaz de produzir ou liberar grãos de pólen funcionais é denominada macho-estéril (34, 39).

COCHRAN (8) apontou as seguintes vantagens na utilização da esterilidade masculina na produção de sementes híbridas: preservação da boa qualidade da semente, segurança e estabilidade no suprimento de sementes e diminuição dos problemas de manejo envolvidos na produção de sementes.

A fonte de citoplasma macho-estéril denominada Texas foi isolada, em 1944, na Estação Experimental Agrícola do

Texas, por J.S. Rogers, em linhagem oriunda da variedade Golden June. Nesse mesmo ano, no Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA), foi isolada por D.F. Jones a fonte S em progênie resultante do cruzamento "lojap" x "Teapod" (12). A fonte C foi isolada por MATTOS (43), em 1953, na cidade de Carazinho-RS, em duas plantas da variedade de milho duro Charrua.

A fonte de citoplasma macho-estéril tipo Texas foi a primeira a ser utilizada na produção de sementes de milho híbrido, tendo sido amplamente usada até 1970, quando ocorreu um severo ataque do fungo Bipolaris maydis, raça T (anteriormente conhecido como Helminthosporium maydis), que ataca, especificamente, esse tipo de citoplasma, causando enormes prejuízos e resultando no retorno à utilização do citoplasma normal e na busca de outras fontes de citoplasmas macho-estéreis resistentes à referida doença (6, 8, 19, 20, 29, 41). Essa epifítia, em 1970, provou que o uso quase exclusivo de uma única fonte de CME aumenta a vulnerabilidade genética (8, 19, 20, 28, 34).

Phyllostica maydis e Bipolaris maydis, ambos patógenos e suas respectivas toxinas, são especificamente virulentos em plantas com CME-T, causando sintomas de inibição do crescimento das raízes de plântulas, clorose foliar e mudanças estruturais na mitocôndria: inchamento irreversível, de sacoplamento da fosforilação oxidativa e estimulação ou inibição da respiração, dependendo do substrato respiratório adicionado (9, 21), e, em grãos de pólen, reduzem a porcentagem de germinação e quase inibem completamente o crescimento do tubo polínico (38). Plantas com citoplasma normal (N), CME-C e CME-S somente são afetadas, quando submetidas a altas concentrações das toxinas (9, 21).

O citoplasma C, por ser resistente ao fungo Bipolaris maydis raça T, tornou-se a melhor alternativa à esterilidade de tipo T, quando da epifítia no ano de 1970. Hoje é amplamente utilizado nos sistemas de obtenção de milho híbrido (20, 27, 28, 34). Embora seja influenciada pelas condições ambientes, a esterilidade conferida pelo CME-C é mais estável que a do CME-S (27).

O maior problema encontrado com o CME-C é a tendência de as plantas macho-estéreis, em certas linhagens, exibirem uma quebra tardia da esterilidade, 5 a 10 dias após florescimento feminino (20, 27, 32, 34).

2.2. Macho-Esterilidade Genética

Vários genes recessivos (ms) que condicionam a macho-esterilidade já foram identificados, mas a utilização desses genes na produção de sementes de milho híbrido não é considerada viável, porque a manutenção das plantas com esterilidade masculina é obtida pelo seu cruzamento com plantas férteis heterozigotas (Msms). Na progênie, metade dos indivíduos resultantes é macho-estéril (msms), metade macho-fértil (Msms), havendo necessidade de que os últimos sejam eliminados antes que se inicie a liberação de grãos de pólen e haja contaminação do campo de produção de sementes (8, 53).

2.3. Principais Grupos de CME

Originalmente, os principais grupos de CME em milho foram identificados com base no padrão de restauração da fertilidade por genes nucleares (Quadro I). Segundo esse método, as fontes de esterilidade citoplasmática são retrocruzadas com uma série de linhagens, aproximadamente seis vezes,

até obter um padrão de fertilidade, condicionado pelos genes restauradores do pai recorrente, por meio do qual seriam reconhecidos os três principais grupos de CME: C, S e T (3, 12, 19).

QUADRO I - Citoplasmas Macho-Estéreis, Agrupados de acordo com a Reação da Restauração da Fertilidade, segundo GRACEN *et alii* (20)

Grupo	Fonte
T	T, P, Q, HA, RS, SC
C	C, RB, PR, Bb, ES (Cuarentenos, Italy IB, IR-1, IR-2, IR-3, P)
S	S, CA, F, G, H, I, IA, J, K, L, LF, M, ME, ML, MY, PS, R, SD, TA, VG, W
Outros	B, CH, D, EP, LF, NT, OY, SG, TC, V

2.4. Genes Restauradores da Fertilidade

Embora seja, primariamente, determinada por fatores extranucleares, a macho-esterilidade citoplasmática pode ser suprimida por genes nucleares dominantes, denominados restauradores da fertilidade (Rf). Assim, nos homozigotos recessivos (rfrf), a esterilidade depende somente da natureza do citoplasma (39, 56). Plantas com CME e apropriados genes Rf produzem pólen funcional e esses genes não ocasionam nenhuma mudança herdável no citoplasma (39).

Para o CME-T, dois genes restauradores, Rf₁ e Rf₂, ambos dominantes e complementares, são requeridos para restauração da fertilidade, que se dá a nível esporofítico (20,

27, 39). O gene Rf_1 está localizado no cromossomo 3(4, 11) e Rf_2 no cromossomo 9(4, 54). Além desses genes dominantes, são necessários genes modificadores para assegurar a completa fertilidade (12). Alguns desses genes já foram localizados nos cromossomos 2, 3, 4, 7, 9 e 10 (2).

A presença dos genes restauradores Rf_1 e Rf_2 reduz a sensibilidade de mitocôndrias do CME-T à toxina produzida por *B. maydis* raça T, possivelmente devida à alteração dessas mitocôndrias (1, 61).

A restauração do CME-S depende do gene restaurador denominado Rf_3 (12, 58), o qual está localizado no cromossomo 2 (39). A restauração dá-se a nível gametofítico, isto é, a constituição do gameta determinará o fenótipo em relação à fertilidade; portanto, grãos de pólen férteis carregam o alelo dominante Rf_3 e os abortados o alelo recessivo rf_3 (12). A restauração do grupo S é mais complexa, visto que algumas fontes de CME-S parecem necessitar de outros genes restauradores, além do Rf_3 (19, 27, 40), ou então existem alelos múltiplos desse gene que condicionam pequenas diferenças nos efeitos de restauração (20).

O citoplasma S apresenta restauração parcial da fertilidade com frequência, o que limita, de certa forma, o uso na produção de sementes de milho híbrido. A restauração da fertilidade é também mais influenciada pelas condições ambientes do que a do citoplasma T (20, 27).

As análises do número de genes envolvidos na restauração da fertilidade em plantas macho-estéreis com citoplasma do tipo C têm apresentado resultados contraditórios. A maioria das linhagens estudadas por KHEYR-POUR e GRACEN (32) apresentou segregação que indicava a presença de apenas um gene, o mesmo ocorrendo com os dados de KHEYR-POUR *et alii* (33, 34). No entanto, para algumas linhagens que produziram

progênies parcialmente férteis, com liberação tardia de pólen, os resultados foram atribuídos à ausência de um segundo gene dominante necessário para a completa restauração da fertilidade, também influenciada por vários genes modificadores e por condições ambientes (32).

Segundo JOSEPHSON et alii (27), a restauração da fertilidade dá-se a nível esporofítico e, provavelmente, três genes dominantes (Rf_4 , Rf_5 e Rf_6), diferentes daqueles descritos para os citoplasmas T e S, estão envolvidos, embora essa hipótese não explique os resultados para algumas linhagens por eles estudadas.

Em estudo recente, MIRANDA (44) também concluiu que três genes independentes estão envolvidos na restauração da fertilidade em plantas com citoplasma C. Ela propôs que para a restauração da fertilidade é necessária a presença do alelo dominante Rf_4 . Todavia, o gene dominante Rf_6 teria efeito epistático sobre os outros dois genes, inibindo a restauração da fertilidade. Esse efeito não ocorreria na presença simultânea de alelos dominantes nos dois outros locos. Assim, tem-se que os genótipos $Rf_4-Rf_5-Rf_6^-$, $Rf_4-Rf_5-rf_6rf_6$ e $Rf_4-rf_5rf_5rf_6rf_6$ são férteis e parcialmente férteis. $Rf_4-rf_5rf_5Rf_6^-$, $rf_4rf_4Rf_5-Rf_6^-$, $rf_4rf_4rf_5rf_5Rf_6^-$, $rf_4rf_4Rf_5-rf_6rf_6$ e $rf_4rf_4rf_5rf_5rf_6rf_6$ são os genótipos das plantas com macho-esterilidade C.

2.5. Análise Citológica da Microsporogênese em Plantas com CME

Em plantas com CME-T, as primeiras anormalidades detectadas no desenvolvimento da microsporogênese ocorrem na camada média e no tapete da antera, durante o estágio de tetrades, quando são verificadas nas mitocôndrias as seguintes alterações estruturais: inchamento, perda das cristas e

da densidade de matriz (59, 60). Vacuolização precoce e degeneração das células do tapete ocorrem no estágio seguinte, no de microsporo intermediário. Subseqüentemente, essas alterações na estrutura mitocondrial também são verificadas nos microsporos mononucleados, que são, então, abortados (60).

O grupo de CME-C apresenta dois tipos de aborto do pólen. No primeiro tipo, as células do tapete, no estágio de tétrades, contêm citoplasma denso, numerosos pequenos vacúolos e são binucleadas, demonstrando desenvolvimento normal das anteras. A partir desse estágio, o desenvolvimento da exina é reduzido e/ou atrasado, as células do tapete apresentam citoplasma menos denso, o retículo endoplasmático torna-se dilatado e ocorre deposição irregular e menor quantidade de corpos Ubish. A desintegração do tapete e o aborto dos microsporos ocorrem no estágio de microsporo intermediário.

No segundo tipo de anteras C, as células do tapete são distintamente mais vacuoladas, na fase inicial do estágio de tétrades, com citoplasma denso e, em maioria, mononucleadas. O tapete permanece até o florescimento, mas não há desenvolvimento de exina e os microsporos são abortados no estágio de tétrades. Em antera C, não foi observada nenhuma anormalidade organelar, tal como as mudanças mitocondriais verificadas no CME-T (41).

No grupo de CME-S, a microsporogênese é indistinta daquela em anteras normais até um estágio tardio no desenvolvimento do pólen. O comportamento tapetal é normal e os microsporos passam por cariocinese para formar grãos de pólen binucleados, com paredes e citoplasma espessos. Esses grãos de pólen não degeneram até estarem próximos à maturação, demonstrando, assim, um controle gametofítico (40).

2.6. Análise dos CMEs a Nível Molecular

Por meio da análise eletroforética das proteínas sintetizadas pelas mitocôndrias foram classificadas diversas fontes de citoplasma, dentro dos principais grupos de CME, de acordo com o polipeptídeo variante característico de cada grupo. Dessa maneira, têm-se CME-C: síntese do polipeptídeo de 17.500 d e ausência do polipeptídeo de 15.500 d presente nos outros tipos de citoplasmas; CME-T: síntese do polipeptídeo de 13.000 d; CME-S: síntese de sete polipeptídeos de alto peso molecular (58.000 a 84.000 d) (16).

Forde e Leaver, citados por LAUGHNAN e GABAY-LAUGHNAN (39), verificaram não só a ausência de um polipeptídeo de 21.000 d no CME-T, que está presente nos outros tipos de citoplasmas, mas também a supressão da síntese do polipeptídeo variante de 13.000 d pela presença dos genes restauradores Rf_1 e Rf_2 . O gene Rf_3 , restaurador do CME-S, e os restauradores do CME-C não alteram a síntese dos polipeptídeos variantes característicos desses grupos.

A análise eletroforética dos DNAs mitocondriais demonstrou a presença de vários DNAs de baixo peso molecular, possibilitando a diferenciação dos principais grupos de CMEs. O DNA circular de 1940 pb é comum aos citoplasmas N, CME-C, CME-S e CME-T, e o DNA linear de 2.350 pb é ausente apenas no CME-T. O CME-C contém dois DNAs circulares de 1.570 e 1.420 pb, os quais não são encontrados nos outros tipos de citoplasmas; o CME-S caracteriza-se pela presença de dois DNAs lineares de 6.200 e 5.200 pb, denominados S_1 e S_2 , respectivamente. Várias linhas com citoplasmas C, S e T, nas quais a fertilidade foi restaurada por genes restauradores, apresentaram os mesmos mt-DNAs, de baixo peso molecular, característicos do macho-estéril correspondente (30, 31).

Testes de hibridação mostraram a ausência de homologia de seqüência entre as espécies de DNA circulares, comum a todos os citoplasmas, e as espécies de DNA específicas do tipo C e S (30).

KEMBLE e BEDBROOK (30) relataram que, embora seus dados não mostrem uma relação direta entre a presença desses mt-DNAs de baixo peso molecular e a macho-esterilidade, várias linhas evidenciam esse envolvimento, pois a mais estável expressão da esterilidade é conferida pelo CME-T, sendo o único em que falta uma banda de DNA, quando comparado ao citoplasma normal. Os citoplasmas C e S, que apresentam espécies adicionais de mt-DNA, exibem, freqüentemente, macho-esterilidade incompleta, podendo-se apontar alguns tipos S que apresentam reversão completa para fertilidade, na ausência de genes restauradores nucleares.

Os DNAs mitocondriais de baixo peso molecular, S_1 e S_2 , característicos do CME-S, apresentam replicação autônoma (14, 15, 25, 29, 36, 42). Análises heteroduplex mostraram que quase 1/3 da seqüência de S_2 é homóloga com o S_1 em um segmento de 1.350 pb em uma extremidade e 200 pb em "tandem" reverso na outra (36).

Seqüências homólogas a S_1 e S_2 estão presentes em maior extensão no mt-DNA de citoplasma N e em menor extensão no CME-C, CME-S e CME-T. Estima-se que essas seqüências, correspondentes a S_1 e S_2 , estejam presentes como cópias únicas em diferentes sítios no mt-DNA de citoplasma N (39).

A quantidade relativa de S_1 e S_2 está sob controle nuclear. Uma linhagem macho-estéril com citoplasma S, apresentando quantidade equimolar de S_1 e S_2 , ao ser retrocruzada, como progenitor feminino, com a linhagem M825, que, quando com citoplasma S, apresenta quatro vezes mais S_1 do que S_2 , mostra na terceira geração de retrocruzamento mudanças

no nível de S_2 , apresentando quantidade equivalente àquela da M825 com citoplasma S (35).

A reversão de macho-estéril a macho-fértil, verificada em diversas fontes de CME-S, foi relacionada com o desaparecimento dos DNAs semelhantes a plasmídeos com o aparecimento de mt-DNAs alterados, indicando a possibilidade de inserção de S_1 e/ou S_2 no mt-DNA; todavia, foi demonstrada somente a participação de S_2 na reorganização do genoma mitocondrial (42). Outros resultados indicaram que a mudança citoplasmática de macho-estéril em macho-fértil foi associada ao rearranjo do mt-DNA, e não ao desaparecimento dos DNAs semelhantes a plasmídeos S_1 e S_2 (14, 25). O genoma nuclear tem maior influência na retenção ou perda dos plasmídeos livres na mitocôndria durante a reversão citoplasmática à fertilidade (14). A frequência dessa reversão no CME-S, seja de origem nuclear, seja citoplasmática, é fortemente influenciada pelo genótipo nuclear. Na linhagem M825, a reversão ocorre sob alta frequência, sendo citoplasmática, enquanto na linhagem WB4 é verificada a baixa frequência e segrega tipicamente à maneira mendeliana (39).

Heterogeneidade no mt-DNA de fontes do grupo C foi detectada por meio da análise de fragmentos, obtidos pelo emprego de cinco endonucleases de restrição. Foram propostos três subgrupos dentro do grupo C, CI (citoplasma C), CII (citoplasmas RB, BB e E) e CIII (citoplasma ES). Essa separação foi baseada em menos de 1% da sequência de bases do mt-DNA; entretanto, o estabelecimento de subgrupos dentro do grupo C pode fornecer potencial para ampliar a base citoplasmática de milho híbrido (46).

A mesma técnica descrita anteriormente foi empregada na análise do mt-DNA e ct-DNA de citoplasma N, CME-C, CME-S e CME-T. Para cada grupo foi obtido um padrão característico

de mt-DNA e distinto dos outros citoplasmas. Esses padrões de distinção do mt-DNA não foram alterados pelo genótipo do macho-estéril. As análises dos fragmentos de restrição do ct-DNA não demonstraram diferenças entre citoplasmas, exceto para o CME-S, que apresentou uma banda a mais, quando fragmentado pela enzima de restrição Hind III. A marcada variação no mt-DNA e a pequena variação no ct-DNA adicionam evidências de que o mt-DNA possa estar envolvido na macho-esterilidade e na susceptibilidade a doenças (47).

A hipótese da relação entre atividade mitocondrial e expressão da macho-esterilidade foi estudada, por OHMASA et alii (45), em antera de milho de CME-C, CME-S e CME-T, tendo sido as atividades das enzimas mitocondriais, citocromo oxidase e malato desidrogenase analisadas durante o desenvolvimento do pólen. Nas plantas normais, ambas as enzimas aumentaram a atividade rapidamente após o estágio de pólen binucleado, enquanto, nas plantas macho-estéreis, essa atividade enzimática decresceu após o estágio de pólen mono ou binucleado, dependendo do tipo de citoplasma, tendo sido esse decréscimo mais acentuado no CME-T.

Fontes de CME-T mostraram-se susceptíveis à raça T de B. maydis e à sua toxina. Cultura de tecido de "callus" de milho com CME-T crescido na presença da toxina possibilitou a seleção de células resistentes, as quais regeneraram em plantas adultas. Essas plantas eram resistentes e macho-férteis e exibiram herança maternal dessas características (10, 17). Plantas férteis que apresentaram resistência ao B. maydis foram também resistentes à toxina de P. maydis (17). A comparação do mt-DNA de várias linhas regeneradas demonstrou que cada uma exibe um mt-DNA distinto e característico (10). O crescente número de evidências indica que a mitocôndria talvez seja o sítio primário de ação das toxinas

produzidas por esses patógenos (21).

Em situações onde uma epifitias é ou pode ser específica a determinado citoplasma, GROGAN *et alii* (22) propuseram o uso de citoplasma múltiplo (multiplasma), isto é, mais de um CME com um sistema restaurador comum para a linhagem a ser utilizada, como fêmea, na produção de sementes híbridas.

2.7. Efeitos do Ambiente em Plantas com CME

Restaurações parciais variam na expressão, desde esterilidade à fertilidade praticamente normal, e comportam-se como independentes dos fatores que condicionam a restauração total (2). Interações do genótipo e o ambiente são, geralmente, pronunciadas; um genótipo, restaurador parcial, apresentando boa fertilidade em condições de frio e umidade, pode produzir pouco ou nenhum pólen em condições de calor e seca (2, 11, 12, 27).

Experimento em casa de vegetação com suprimento adicional de luz, embora não conclusivo, mostra que fotoperíodo longo e, possivelmente, temperatura alta têm efeito inibitório na restauração da fertilidade de plantas com citoplasma T (4). Sem conhecimento da variação ambiente no qual um genótipo no CME-T tenha sido testado, não se pode afirmar que este deveria ser classificado como restaurador, não-restaurador (estéril) ou restaurador parcial (12).

Poucos estudos têm sido conduzidos, visando à análise da influência de condições ambientes sobre a restauração da fertilidade e são limitados ao CME-T. Existe, portanto, a necessidade da condução de pesquisas para conhecer as interações de diferentes condições ambientes, como níveis de adubação nitrogenada e efeito de ano, e a restauração da

fertilidade de plantas com a macho-esterilidade citoplasmática do tipo C.

2.8. Efeitos do Citoplasma na Morfologia da Planta

Vários autores (12, 23, 26, 37, 51, 59) verificaram diminuição no tamanho de plantas macho-estéreis com citoplasma T, quando comparadas com a sua versão no citoplasma normal. Essa diferença resultou de menor comprimento dos entrenós acima da primeira espiga, embora, em alguns casos, tenha sido também observada redução no comprimento do colmo abaixo da primeira espiga. Esse encurtamento do colmo do macho-estéril resulta, aparentemente, da redução do número de células (52).

No milho, as folhas são produzidas a partir dos nós acima do solo (56), portanto, número de folhas equivale ao de nós. O número de folhas acima da primeira espiga em híbridos simples, macho-estéril e fértil com citoplasma T, foi reduzido em comparação com a sua versão normal (12, 37). O citoplasma T reduziu em 1-2% o número de folhas por planta nas versões restaurada e não-restaurada de híbridos simples (12).

Plantas macho-estéreis com citoplasma T, quando comparadas com a sua versão no citoplasma N, apresentaram maior acúmulo de matéria seca nos pendões, palhas e espigas, mas não em folhas e colmos. Essa diferença é, em grande parte, medida de competição por nutrientes e água no período crítico da planta, podendo o macho-estéril acumular maiores quantidades de matéria seca nas espigas, em detrimento da produção de pólen. Nas partes envolvidas indiretamente na reprodução, não seriam esperadas diferenças, pois não exibem dominância fisiológica como os órgãos reprodutivos (24).

Os dados existentes acerca de produtividade são conflitantes, quando se comparam plantas macho-estéreis no citoplasma T com a sua versão no citoplasma normal. Entretanto, essa comparação realizada em condições de estresse, resultante da elevada densidade populacional (7), ou de leve estresse, imposto por uma tensão de água no solo de 6 bars (5), durante o período de frutificação, mostrou, consistentemente, que o macho-estéril produziu mais grãos que sua versão fértil. A maior produção das plantas macho-estéreis sob densidades populacionais altas parece estar associada à competição por nutrientes entre o desenvolvimento do grão e do pólen e, na planta macho-estéril, parece que o maior suprimento de nutrientes estaria disponível para o desenvolvimento da espiga (7, 50). Sob estresse na forma de tensão de água no solo, a maior produção do macho-estéril foi, primariamente, devida ao grande número de segunda espiga. Na versão fértil, o comprimento e o diâmetro da espiga foram seriamente afetados pelos reduzidos níveis de nitrogênio e água no solo (5).

A condição de estresse hídrico imposta durante a antese reduziu, significativamente, a produção de grãos, tanto no macho-estéril com citoplasma T quanto em sua versão fértil; o macho-estéril, porém, manteve o turgor foliar por maior período de tempo, graças à sua melhor capacidade de absorção de água do solo (57).

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos para estudos dos diferentes objetivos do projeto foram conduzidos na área experimental da Genética na Universidade Federal de Viçosa-U.F.V., município de Viçosa-MG.

3.1. Restauração da Fertilidade em Citoplasma Macho-Estéril do Tipo C, em Milho

As linhagens macho-férteis (MF) da U.F.V., identificadas por 7, 870 e 964, foram cruzadas com a linhagem 264 macho-estéril com citoplasma C (ME-C), também da U.F.V. Os híbridos simples macho-férteis (MF) e parcialmente férteis (PF), assim obtidos, foram autofecundados para obtenção da geração F_2 . Foi também feito o primeiro retrocruzamento (RC_1) entre o híbrido F_1 264ME-C x 964MF(MF e PF) com a linhagem 264ME-C. Todos os cruzamentos foram realizados manualmente e de acordo com o procedimento-padrão de cruzamentos controlados, tomando-se os devidos cuidados para evitar contaminações nas polinizações. Esses cruzamentos controlados para

obtenção de geração F_2 e RC_1 foram realizados por MIRANDA (44), na U.F.V., em janeiro de 1982.

Em outubro de 1985, foram plantadas as gerações F_2 , provenientes dos cruzamentos entre as linhagens 264ME-C x 7MF e 264ME-C x 870MF, e, em setembro de 1986, a geração F_2 e RC_1 , provenientes das linhagens 264ME-C e 964MF.

A área experimental foi preparada de forma convencional (aração, gradagem leve e sulcamento). A adubação consistiu de 40 kg de nitrogênio/ha, 40 kg de fósforo/ha e 30 kg de potássio/ha. Foram aplicados 1/3 do adubo nitrogenado no plantio e 2/3 em cobertura, 40 dias após. O número de fileiras que constituíram as parcelas foi variável, dependendo do número de sementes provenientes de cada espiga. As parcelas receberam os tratamentos culturais, capinas manuais, irrigação suplementar e controle de lagartas do cartucho e rosca.

As plantas da geração F_2 e do RC_1 foram submetidas à avaliação do grau de fertilidade dos pendões, seguindo-se a escala elaborada por BECKETT (3), com algumas modificações:

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

b) parcialmente fértil (PF): Anteras parcialmente férteis protraídas, com pouca liberação de pólen. Essa classe foi subdividida em PF_1 , PF_2 e PF_3 , por ser a proporção de anteras protraídas altamente variável: PF_1 , com, aproximadamente, até 5% de anteras com liberação de pólen; PF_2 , acima de 5 até 20% e PF_3 , acima de 20% e, aproximadamente, até 70% com liberação de pólen;

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

A avaliação dos pendões foi efetuada, diariamente, por todo o período do florescimento. Os pendões MF foram

cortados assim que se apresentaram como tal, e as plantas despendoadas foram contadas no final do período de avaliação. Essa metodologia foi adotada por ser mais eficiente para evitar a inclusão de plantas MF como PF no final do florescimento, quando grande número de anteras já se havia desprendido das espiguetas.

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

As razões de segregação formuladas para as gerações F_2 e RC_1 foram testadas pelo método do Qui-Quadrado ajustado (χ^2 ajustado), segundo as recomendações de YATES, citado por STRICKBERGER (55), através da seguinte fórmula:

$$\chi^2 \text{ ajustado} = \sum \left[\frac{(|O - E| - 0,5)^2}{E} \right], \text{ em que:}$$

O = número de plantas observadas

E = número de plantas esperadas

As hipóteses formuladas sobre o número de genes envolvidos na restauração da fertilidade e sobre os prováveis genótipos das linhagens estudadas foram baseadas nas razões de segregação das gerações F_2 e RC_1 , que abrangiam maior número de famílias e apresentavam qui-quadrado pequeno, cuja probabilidade estava acima do nível predeterminado de 0,05.

3.2. Efeito de Dois Anos sobre a Restauração da Fertilidade de Plantas com Citoplasma C

O material utilizado constituiu-se da geração F_2 , resultante da autofecundação dos híbridos simples MF, oriundos dos cruzamentos das linhagens 352MF e 966MF com a 264ME-C, pertencentes à U.F.V.

As espigas representativas dessas famílias da geração F_2 foram divididas em duas partes, tendo sido as sementes de uma das partes plantadas em novembro de 1982 e o restante em outubro de 1983. A classificação dos pendões em MF, PF e ME, referentes a esses plantios, foi realizada, durante os períodos 1 e 2, respectivamente (Quadro 2).

Para estudar a influência ambiente sobre a restauração da fertilidade de plantas com citoplasma C foram anotadas, diariamente: a temperatura, a umidade relativa do ar, a insolação e a precipitação durante o período de florescimento (Quadro 2).

A análise de variância utilizada foi a de experimentos inteiramente casualizados (18), em que os tratamentos consistiram de dois anos para cada uma das classes MF, PF e ME separadamente.

3.3. Quebra Tardia da Esterilidade Masculina de Plantas com Citoplasma C

Plantas da geração F_1 , oriundas do cruzamento das linhagens 7MF e 923MF com a linhagem 264ME-C, pertencentes a U.F.V., foram classificadas quanto ao tipo de pendão e data do início de liberação de pólen. Essas plantas da geração F_1 dos dois cruzamentos foram autofecundadas, visando à classificação dos tipos de pendões da geração F_2 , para comparar a segregação resultante de híbridos PF_2 , com e sem

QUADRO 2 - Médias e Respectiveiros Desvios-Padrão da Temperatura, Umidade Relativa do Ar, Insolação e Precipitação, Considerando Quatro Diferentes Períodos em Viçosa-MG

Período de Florescimento Masculino	Temperatura (°C)	Umidade (%)	Insolação (horas dia ⁻¹)	Precipitação (mm dia ⁻¹)
1	22,0 ± 1,0	83,4 ± 4,3	5,4 ± 3,7	5,8 ± 11,8
2	22,5 ± 1,0	76,7 ± 9,1	8,1 ± 3,6	3,2 ± 6,6
3	21,6 ± 0,8	85,8 ± 5,0	4,2 ± 3,9	5,2 ± 7,7
4	23,2 ± 1,4	78,8 ± 10,1	5,5 ± 3,3	8,0 ± 14,2

1 = 24/01/1983 a 21/02/1983

2 = 28/12/1983 a 30/01/1984

3 = 29/12/1985 a 19/01/1986

4 = 01/12/1986 a 14/12/1986

quebra tardia da esterilidade masculina. Para tanto, as sementes da geração F_2 foram plantadas e as plantas resultantes classificadas com relação ao tipo de pendão e liberação do pólen, através de análise diária e anotação na etiqueta de cada planta. Diariamente, mesmo as plantas com etiquetas já classificadas eram conferidas para observação de possíveis mudanças na classificação inicial.

3.4. Efeito de Diferentes Níveis de Adubação Nitrogenada sobre a Restauração da Fertilidade de Plantas com Citoplasma C

Foram utilizados três tratamentos que consistiram na adubação de 13 kg de nitrogênio/ha, 40 kg de fósforo/ha e 30 kg de potássio/ha no plantio; entretanto, a adubação em cobertura de 0, 13 e 27 kg de nitrogênio/ha correspondeu aos tratamentos "ausência de adubação em cobertura", "metade da adubação em cobertura" e "adubação normal", respectivamente.

Para testar a influência dessas adubações, foram utilizadas as gerações F_2 , resultantes da autofecundação de híbridos simples MF, oriundos do cruzamento das linhagens 914 MF e 894MF com a linhagem 264ME-C. As espigas das famílias da geração F_2 foram divididas em três partes, tendo sido as sementes de cada parte plantadas e submetidas a um dos tratamentos.

Na época do florescimento masculino, as plantas da geração F_2 foram classificadas com relação aos tipos de pendões em MF, PF e ME.

A análise de variância utilizada foi a de blocos casualizados (18), tendo sido cada bloco constituído por uma família da geração F_2 submetido aos três tratamentos.

3.5. Número de Folhas Acima e Abaixo da Primeira Espiga em Plantas MF e ME Oriundas de um mesmo RC₁

Híbridos simples MF, PF₂ e PF₃, oriundos do cruzamento entre as linhagens 264ME-C e 964MF, foram retrocruzados com a linhagem 264ME-C. As plantas MF e ME, resultantes deste RC₁, foram submetidas à contagem do número de folhas existentes acima e abaixo da primeira espiga, ao final do período de florescimento.

A análise de variância utilizada foi a de experimento inteiramente casualizado (18), e os tratamentos consistiram das plantas MF e ME, nas quais foram contadas as folhas acima e abaixo da primeira espiga.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Sistema Gênico Controlador da Restauração da Fertilidade em Plantas com Citoplasma C

A linhagem 964 macho-fértil, ao ser cruzada com a linhagem 264 macho-estéril com citoplasma C, resultou na geração F_1 em plantas MF e PF. No total de 160 plantas da geração F_1 , classificadas com relação ao tipo de pendão, 139 foram macho-férteis e 21 parcialmente férteis, mais especificamente PF_2 e PF_3 .

A geração F_2 analisada constituiu-se de 13 famílias correspondentes às espigas oriundas de plantas F_1 macho-férteis, que foram autofecundadas (Quadro 3). As famílias F_2 produziram plantas das classes MF, PF_1 , PF_2 , PF_3 e ME. A classe mais freqüente, exceto nas famílias 10 e 11, foi a MF, vindo, em seguida, a ME, cujas freqüências variaram de 42,50 a 68,12% e 23,92 a 46,90%, respectivamente. Entre as classes PF, houve uma tendência de a PF_1 ser mais freqüente,

QUADRO 3 - Número e Porcentagem de Plantas na Segregação da Geração F₂, Resultante da Autofecundação dos Híbridos MF² entre as Linhagens 264ME-C e 964MF, U.F.V. - 1986

Família	Classes Fenotípicas					Total das Plantas PF
	MF	PF ₁	PF ₂	PF ₃	ME	
1 (N.º)	142	19	10	8	84	37
(%)	54,00	7,20	3,80	3,00	32,00	14,00
2 (N.º)	123	16	4	3	67	23
(%)	57,70	7,50	1,90	1,40	31,50	10,80
3 (N.º)	55	1	4	0	26	5
(%)	63,95	1,17	4,65	0,00	30,23	5,82
4 (N.º)	94	6	2	2	61	10
(%)	56,97	3,64	1,21	1,21	36,97	6,06
5 (N.º)	40	6	4	2	27	12
(%)	50,63	7,59	5,07	2,53	34,18	15,19
6 (N.º)	91	12	4	2	57	18
(%)	54,82	7,23	2,41	1,20	34,34	10,84
7 (N.º)	63	4	1	2	42	7
(%)	56,25	3,57	0,89	1,79	37,50	6,25
8 (N.º)	94	5	3	3	33	11
(%)	68,12	3,62	2,17	2,17	23,92	7,96
9 (N.º)	92	5	3	8	45	16
(%)	60,13	3,27	1,96	5,23	29,41	10,46
10 (N.º)	68	10	4	3	75	17
(%)	42,50	6,20	2,50	1,90	46,90	10,60
11 (N.º)	95	6	7	12	101	25
(%)	42,99	2,71	3,17	5,43	45,70	11,31
12 (N.º)	118	5	5	6	116	16
(N.º)	47,20	2,00	2,00	2,40	46,40	6,40
13 (N.º)	104	4	3	1	80	8
(%)	54,16	2,10	1,56	0,52	41,66	4,18

seguida pela PF_2 , e a menos freqüente foi a PF_3 . Apesar da análise minuciosa no campo, os dados não se ajustaram a nenhuma relação fenotípica testada.

O agrupamento das classes PF_1 , PF_2 e PF_3 em uma única classe PF , com freqüência variando de 4,18 a 15,19%, também não permitiu enquadrar os dados de MF , PF e ME em nenhuma proporção conhecida. Desse modo e considerando ter a geração F_2 , resultante da autofecundação de híbridos PF_1 , PF_2 e PF_3 , segregado produzindo os tipos de pendões MF , PF e ME (Quadros 6 e 11), à semelhança do que ocorreu com a autofecundação dos híbridos MF , indicando que os híbridos PF possuem os genes restauradores da fertilidade, procedeu-se, então, ao agrupamento das classes PF s a MF , para testar, estatisticamente, as razões de segregação, visando a identificar o número de genes envolvidos na restauração da fertilidade de plantas com citoplasma macho-estéril tipo C e os genótipos das linhagens utilizadas. Para isto foram, então, consideradas duas classes fenotípicas: ($MF + PF$) e ME (Quadro 4), conforme procedimento também utilizado por JOSEPHSON *et alii* (27) e MIRANDA (44).

O Quadro 4 apresenta a segregação da geração F_2 , resultante da autofecundação dos híbridos MF entre as linhagens 264ME-C e 964MF. A razão de segregação de 45($MF + PF$):19ME foi a que melhor se ajustou para nove das treze famílias e indica a ocorrência de interação gênica de três genes independentes e a restauração da fertilidade. A probabilidade de erro, ao rejeitar a proporção de 45($MF + PF$):19ME, é de 2 a 5% e, ao rejeitar a hipótese de homogeneidade, é de 30 a 50%. Essa probabilidade pequena de 2 a 5% de erro não é condição suficiente para que a proporção seja descartada, primeiramente pelos qui-quadrados pequenos apresentados pelas famílias segregantes da geração F_2 e, principalmente,

QUADRO 4 - Segregação da Geração F₂, Resultante da Autofecundação dos Híbridos MF entre as Linhas 264ME-C e 964MF, e Valores dos Qui-Quadrados e das Probabilidades de Erro ao Rejeitar a Razão de Segregação, U.F.V. - 1986

Família	N.º de Plantas (Observado)		Razão de Segregação	N.º de Plantas (Esperado)		χ ²	P (%)
	(MF+PF)	ME		(MF + PF)	ME		
1	179	84	45:19	184,92	78,08	0,535	30-50
2	146	67	45:19	149,77	63,23	0,240	50-70
3	60	26	45:19	60,47	25,53	0,000	99
4	104	61	45:19	116,02	48,98	3,850	2-5
5	52	27	45:19	55,55	23,45	0,563	30-50
6	109	57	45:19	116,72	49,28	1,504	20-30
7	70	42	45:19	78,75	33,25	2,911	5-10
8	105	33	45:19	97,03	40,97	1,936	10-20
9	108	45	45:19	107,58	45,42	0,000	99
Desvio	933	442	45:19	966,80	408,20	3,863	2-5
Heterogeneidade						7,678	30-50
10	85	75	36:28	90,00	70,00	0,514	30-50
11	120	101	36:28	124,31	96,69	0,267	50-70
12	134	116	36:28	140,63	109,37	0,610	30-50
13	112	80	36:28	108,00	84,00	0,259	50-70
Desvio	451	372	36:28	462,94	360,06	0,646	30-50
Heterogeneidade						1,005	70-80

pela pequena variação existente (as famílias são homogêneas) no que diz respeito ao agrupamento das classes (MF + PF). A causa dessa variação deve residir na menor estabilidade da classe PF às condições ambientes. A razão de $36(MF+PF):28ME$ apresentada por quatro famílias dessa mesma geração F_2 também resulta da ação de três genes independentes na restauração da fertilidade, porém apenas dois deles estariam segregando. Essa razão de $36(MF+PF):28ME$ mostra-se com 30 a 50% de probabilidade de erro, ao ser rejeitada, e de 70 a 80% de chance de erro, ao rejeitar a hipótese de serem tais resultados homogêneos.

No Quadro 5, observa-se que a segregação do RC_1 de híbridos MF(264ME-C x 964MF) com a linhagem 264ME-C expressou, uniformemente, para todas as famílias a razão de $1(MF+PF):1ME$. A probabilidade de erro, ao rejeitar essa razão de $1(MF+PF):1ME$, é de 10 a 20% e, ao rejeitar a hipótese de homogeneidade, é de 95 a 99%. Nota-se que oito dessas famílias segregantes apresentaram probabilidade de erro ao rejeitar essa razão acima de 50%.

No Quadro 6, tem-se a segregação da geração F_2 , resultante da autofecundação de híbridos PF_3 entre as linhagens 264ME-C e 964MF. Todas as famílias produziram as cinco classes fenotípicas, à semelhança do que se verificou na autofecundação de híbridos MF entre as mesmas linhagens (Quadro 3). As classes MF e ME foram as mais freqüentes, com porcentagens aproximadamente iguais, variando de 39,29 a 50,00% e de 36,76 a 50,00%, respectivamente. As classes PF foram as menos freqüentes, com a PF_2 tendendo a apresentar a mais baixa freqüência e variando apenas de 0,81 a 2,35%. O agrupamento das classes PF_1 , PF_2 e PF_3 em uma única classe PF, com freqüência variando de 6,07 a 13,24%, apresentou variação semelhante à de 4,18 a 15,19% apresentada na

QUADRO 5 - Segregação do RC₁ de Híbridos MF(264ME-C x 964MF) com a Linhagem 264ME-C e Valores dos Qui-Quadrados e das Probabilidades de Erro ao Rejeitar a Razão de Segregação, U.F.V. - 1986

Família	N.º de Plantas (Observado)		N.º de Plantas (Esperado)		χ^2	P (%)
	(MF + PF)	ME	I (MF + PF) :	I ME		
1	21	29	25,00	25,00	0,980	30-50
2	53	66	59,50	59,50	1,210	20-30
3	8	11	9,50	9,50	0,210	50-70
4	33	29	31,00	31,00	0,145	70-80
5	19	30	24,50	24,50	2,041	10-20
6	44	41	42,50	42,50	0,047	80-90
7	25	24	24,50	24,50	0,000	99
8	13	14	13,50	13,50	0,000	99
9	12	13	12,50	12,50	0,000	99
10	26	23	24,50	24,50	0,082	70-80
11	25	24	24,50	24,50	0,000	99
12	7	14	10,50	10,50	1,714	10-20
13	29	37	33,00	33,00	0,742	30-50
Desvio	315	355	335,00	335,00	2,270	10-20
Heterogeneidade					4,902	95-99

QUADRO 6 - Número e Porcentagem de Plantas na Segregação da Geração F₂, Resultante da Autofecundação dos Híbridos PF₃ entre as Linhagens 264ME-C e 964MF, U.F.V. - 1986

Família	Classes Fenotípicas					Total Plantas PF
	MF	PF ₁	PF ₂	PF ₃	ME	
1 (N.º)	74	14	4	2	76	20
(%)	43,53	8,24	2,35	1,18	44,70	11,77
2 (N.º)	47	6	2	2	46	10
(%)	45,63	5,83	1,94	1,94	44,66	9,71
3 (N.º)	68	8	3	7	50	18
(%)	50,00	5,88	2,21	5,15	36,76	13,24
4 (N.º)	55	3	3	9	70	15
(%)	39,29	2,14	2,14	6,43	50,00	10,71
5 (N.º)	113	4	2	9	119	15
(%)	45,75	1,62	0,81	3,64	48,18	6,07

autofecundação do híbrido MF (Quadro 3), além de ser a classe PF a menos freqüente na segregação de todas as famílias desses híbridos PF_3 e MF. Foi surpreendente o fato de ter o híbrido PF_3 autofecundado produzido apenas 3,67%, média entre as famílias de plantas também PF_3 na geração F_2 .

Pelo Quadro 7, percebe-se que a razão de $36(MF+PF):28ME$ foi a que melhor se ajustou a todas as famílias segregantes da geração F_2 , oriunda da autofecundação de híbridos PF_3 . A probabilidade de erro, ao rejeitar essa razão, é de 30 a 50% e, ao rejeitar a hipótese de homogeneidade, é de 20 a 30%. Essa razão de $36(MF+PF):28ME$ foi também apresentada por quatro entre treze famílias segregantes da geração F_2 , oriunda da autofecundação de híbridos MF, resultantes do cruzamento entre as mesmas linhagens 264ME-C e 964MF (Quadro 4). Os RC_1 tanto desses híbridos MF quanto PF_3 (Quadros 5 e 8) com a linhagem 264ME-C produziram na segregação a mesma razão de $1(MF+PF):1ME$.

O Quadro 9 apresenta o resultado da segregação da geração F_2 , resultante da autofecundação de híbridos MF entre as linhagens 264ME-C e 870MF. Para quase todas as famílias houve um bom ajustamento dos dados observados à razão de segregação de $45(MF+PF):19ME$. Para seis das doze famílias, a probabilidade de erro, ao rejeitar essa hipótese, foi superior a 50%. Observa-se que as dez primeiras famílias segregantes ajustaram-se melhor a essa razão, com probabilidade de de 70 a 80% de erro, ao rejeitar a hipótese de homogeneidade. A proporção indica o envolvimento de três genes, reforçando a hipótese de interação gênica na determinação da restauração da fertilidade, como visto anteriormente na análise dos cruzamentos entre as linhagens 264ME-C e 964MF (Quadro 4).

QUADRO 7 - Segregação da Geração F₂, Resultante da Autofecundação dos Híbridos PF₃ entre as Linhagens 264ME-C e 964MF, e Valores dos Qui-Quadrados e das Probabilidades de Erro ao Rejeitar a Razão de Segregação, U.F.V. - 1986

Família	N.º de Plantas (Observado)		N.º de Plantas (Esperado)		χ^2	P (%)
	(MF + PF)	ME	36(MF + PF)	: 28ME		
1	94	76	95,62	74,38	0,030	80-90
2	57	46	57,94	45,06	0,008	90-95
3	86	50	76,50	59,50	2,420	10-20
4	70	70	78,75	61,25	1,976	10-20
5	128	119	138,94	108,06	1,792	10-20
Desvio	435	361	447,75	348,25	0,766	30-50
Heterogeneidade					5,459	20-30

QUADRO 8 - Segregação do RC_1 de Híbridos PF_3 (264ME-C x 964MF) com a Linhagem 264ME-C e Valores dos Qui-Quadrados e das Probabilidades de Erro ao rejeitar a Razão de Segregação, U.F.V. - 1986

Família	N.º de Plantas (Observado)		N.º de Plantas (Esperado)		χ^2	P (%)
	(MF + PF)	ME	1(MF + PF) : IME	IME		
1	17	26	21,50	21,50	1,488	20-30
2	21	23	22,00	22,00	0,023	80-90
3	47	53	50,00	50,00	0,250	50-70
4	14	20	17,00	17,00	0,735	30-50
5	32	19	25,50	25,50	2,824	5-10
Desvio	131	141	136,00	136,00	0,298	50-70
Heterogeneidade					5,022	20-30

QUADRO 9 - Segregação da Geração F₂, Resultante da Autofecundação dos Híbridos MF entre as Linhagens 264ME-C e 87OMF, e Valores dos Qui-Quadrados e das Probabilidades de Erro ao Rejeitar a Razão de Segregação, U.F.V. - 1986

Família	N.º de Plantas (Observado)		N.º de Plantas (Esperado)		χ^2	P (%)
	(MF + PF)	ME	45(MF + PF)	: 19ME		
1	287	121	286,87	121,13	0,002	95-99
2	188	77	186,33	78,67	0,025	80-90
3	168	70	167,34	70,66	0,000	99
4	152	63	151,17	63,83	0,002	95-99
5	203	75	195,47	82,53	0,852	30-50
6	133	48	127,26	53,73	0,725	30-50
7	206	80	201,09	84,91	0,325	50-70
8	207	84	204,61	86,39	0,059	80-90
9	126	71	138,52	58,48	3,511	5-10
10	314	116	302,34	127,66	1,387	20-30
Desvio	1984	805	1961,00	828,00	0,868	30-50
Heterogeneidade					6,020	70-80
11	141	134	193,36	81,64	46,851	*
12	119	101	154,69	65,31	26,962	*
Desvio	2244	1040	2309,10	1802,90	6,081	1-2
Heterogeneidade					74,620	*

* Menor que 0,1.

A razão de 45(MF + PF):19ME, obtida na segregação da geração F_2 , resultante da autofecundação de híbridos MF (264 ME-C x 964MF) e (264ME-C x 870MF) (Quadros 4 e 9), e a razão de 1(MF + PF):1ME, que foi a mais adequada à segregação do RC_1 dos híbridos MF(264ME-C x 964MF) com a linhagem 264 ME-C (Quadro 5), permitiram propor os seguintes genótipos que mais se ajustaram aos resultados: $Rf_4-Rf_5-Rf_6^-$, $Rf_4^-Rf_5^-rf_6rf_6$ e $Rf_4^-rf_5rf_5Rf_6^-$ como férteis e parcialmente férteis e $Rf_4^-rf_5rf_5rf_6rf_6$, $rf_4rf_4Rf_5^-rf_6rf_6$, $rf_4rf_4rf_5rf_5Rf_6^-$, $rf_4rf_4Rf_5-Rf_6^-$ e $rf_4rf_4rf_5rf_5rf_6rf_6$ como estéreis.

Essa hipótese indica que a restauração da fertilidade do citoplasma C resulta de interação gênica, com genes complementares e duplicados, em que o dominante Rf_4 complementa-se com os dominantes duplicados Rf_5 e/ou Rf_6 , para que haja a restauração da fertilidade. Na ausência do dominante Rf_4 (rf_4rf_4), não há restauração, mesmo em presença dos duplicados dominantes Rf_5 e Rf_6 , uma vez que não há complementação necessária para expressar-se a restauração.

A razão de 36(MF + PF):28ME, obtida na segregação de quatro entre as treze famílias da geração F_2 , oriunda da autofecundação de híbridos MF(264ME-C x 964MF), foi também a encontrada na segregação de todas as famílias da geração F_2 , oriunda da autofecundação de híbridos PF_3 entre as mesmas linhagens (Quadros 4 e 7). Além disso, a segregação do RC_1 dos híbridos MF e PF_3 apresentou a relação de 1(MF + PF):1ME (Quadros 5 e 8), o que indica que o genótipo de híbridos PF_3 está no mesmo grupo dos híbridos MF. Logo, para que ocorra a restauração parcial ou total da fertilidade, é necessária a complementaridade entre os genes dominantes Rf_4 com o Rf_5 e/ou Rf_6 , e a manifestação de MF ou PF_3 seria o resultado de diferenças genotípicas associadas, provavelmente, a genes modificadores que estariam segregando nas linhagens 264ME-C e/ou 964MF.

Comparando o conjunto de resultados dos Quadros 4, 5, 7, 8 e 9, podem-se propor os genótipos para as linhagens abaixo relacionadas:

264ME-C - $rf_4rf_4rf_5rf_5Rf_6Rf_6$.

870MF - $Rf_4Rf_4Rf_5Rf_5rf_6rf_6$.

964MF - $Rf_4Rf_4Rf_5Rf_5rf_6rf_6$, $Rf_4Rf_4rf_5rf_5rf_6rf_6$ e

$Rf_4Rf_4Rf_5rf_5rf_6rf_6$.

Os resultados obtidos indicam que a linhagem 964MF está segregando para o gene Rf_5 , podendo ter três genótipos com relação a esse gene: Rf_5Rf_5 , Rf_5rf_5 e rf_5rf_5 . Seria esperado apenas um genótipo único, considerando a linhagem homozigótica, porém, durante os ciclos de autofecundação para obtenção da linhagem e de multiplicação por "sib", não foram realizadas seleções a favor do caráter macho-estéril, e a linhagem, por ser portadora de citoplasma normal, manifestava apenas a macho-fertilidade, independentemente do genótipo relacionado com os genes para a restauração da fertilidade.

MIRANDA (44) propôs que a linhagem 264ME-C era homozigótica recessiva para todos os genes envolvidos na restauração da fertilidade, o que não foi confirmado neste trabalho. O novo genótipo proposto para a referida linhagem macho-estéril com citoplasma C é $rf_4rf_4rf_5rf_5Rf_6Rf_6$.

O Quadro 10 apresenta a segregação da geração F_2 , resultante da autofecundação de híbridos PF_1 , PF_2 e PF_3 entre as linhagens 264ME-C e 870MF. Para as famílias PF_1 , ajustaram-se as diferentes razões de segregação 20(MF + PF):

QUADRO 10 - Segregação da Geração F₂, Resultante da Autofecundação de Híbridos PF₁, PF₂ e PF₃, entre as Linhagens 264ME-C e 87OMF, e Valores dos Qui-Quadrados e das Probabilidades de Erro ao Rejeitar a Razão de Segregação, U.F.V. - 1986

Híbrido PF	N.º de Plantas (Observado)		Razão de Segregação (MF + PF):ME	N.º de Plantas (Esperado)		χ^2	P (%)
	(MF + PF)	ME		(MF + PF)	ME		
PF ₁	66	143	20:44	65,31	143,69	0,000	99
PF ₁	88	127	27:37	90,70	124,30	0,093	70-80
PF ₁	31	55	27:37	36,28	49,72	1,090	20-30
PF ₁	66	71	32:32	68,50	68,50	0,117	70-80
PF ₁	61	69	32:32	65,00	65,00	0,377	50-70
PF ₂	149	145	32:32	147,00	147,00	0,031	80-90
PF ₂	59	128	20:44	58,44	128,56	0,000	99
PF ₃	118	80	38:26	117,56	80,44	0,000	99
PF ₃	136	87	39:25	135,90	87,10	0,003	95-99
PF ₃	59	33	41:23	58,94	33,06	0,009	90-95

44ME, 27(MF + PF):37ME e 32(MF + PF):32ME e, para as duas famílias de híbridos PF_2 , as razões de 20(MF + PF):44ME e 32(MF + PF):32ME. Observa-se que tanto para o híbrido PF_1 quanto para o PF_2 ocorreram as razões de 20(MF + PF):44ME e 32(MF + PF):32ME, mostrando, conseqüentemente, um comportamento semelhante na segregação de híbridos PF_1 e PF_2 . O híbrido PF_3 comportou-se diferentemente dos híbridos PF_1 e PF_2 , apresentando as razões de segregação de 38(MF + PF):26ME, 39(MF + PF):25ME e 41(MF + PF):23ME, predominando a frequência de plantas (MF + PF) na geração F_2 , porém isso não ocorreu com as famílias de geração F_2 , originária de híbridos PF_1 e PF_2 . O fato de os híbridos PF_1 , PF_2 e PF_3 terem produzido, por autofecundação, razão de segregação de três genes, mais uma vez sugere que eles diferem apenas com relação ao conjunto de genes modificadores que atuam sobre os genes principais, Rf_4 , Rf_5 e Rf_6 . Desse modo, para a restauração completa da fertilidade seria necessário, além dos genes restauradores (Rf_4 e Rf_5 ou Rf_6), um conjunto completo de genes modificadores para cada um desses restauradores. A falta de alguns modificadores pode permitir que o genótipo $Rf_4rf_4Rf_5rf_5Rf_6rf_6$ seja apenas PF(PF_1 , PF_2 ou PF_3), dependendo dos modificadores presentes.

A segregação da geração F_2 , resultante da autofecundação de híbridos PF_1 e PF_2 entre as linhagens 264ME-C e 7MF, encontra-se no Quadro II. As três famílias PF_1 e uma das quatro famílias PF_2 segregaram, produzindo as cinco classes fenotípicas. A classe mais freqüente foi a ME, variando de 55,36 a 63,74% e de 53,62 a 57,25%, para os híbridos PF_1 e PF_2 , respectivamente. Observa-se serem esses intervalos muito próximos. Entre as classes PF a mais freqüente foi a PF_1 ,

QUADRO 11 - Número e Porcentagem de Plantas na Segregação da Geração F_2 , Resultante da Autofecundação dos Híbridos PF_1 e PF_2 entre as Linhagens 264ME-C e 7MF, U.F.V. - 1986

Híbrido PF	Classes Fenotípicas					Total Plantas PF
	MF	PF_1	PF_2	PF_3	ME	
PF_1 (N.º)	25	14	6	5	62	25
PF_1 (%)	22,32	12,50	5,36	4,46	55,36	22,32
PF_1 (N.º)	43	19	7	3	105	29
PF_1 (%)	24,29	10,74	3,96	1,69	59,32	16,39
PF_1 (N.º)	8	22	2	1	58	25
PF_1 (%)	8,79	24,17	2,20	1,10	63,74	27,47
PF_2 (N.º)	27	30	7	0	74	37
PF_2 (%)	19,57	21,74	5,07	0,00	53,62	26,81
PF_2 (N.º)	33	18	8	0	79	26
PF_2 (%)	23,91	13,04	5,80	0,00	57,25	18,84
PF_2 (N.º)	15	17	3	0	43	20
PF_2 (%)	19,23	21,79	3,85	0,00	55,13	25,64
PF_2 (N.º)	6	20	6	3	45	29
PF_2 (%)	7,50	25,00	7,50	3,75	56,25	36,25

seguida pela PF_2 , e a menos freqüente foi a PF_3 , principalmente na segregação dos híbridos PF_2 , em que apenas uma entre quatro famílias produziu a classe PF_3 . As classes PF_1 , PF_2 e PF_3 , ao serem agrupadas numa única classe PF, apresentaram variação de 16,39 a 27,47% e de 18,84 a 36,25%, para os híbridos PF_1 e PF_2 , respectivamente. Essa única classe PF apresentou, na maioria das famílias segregantes, maior freqüência, quando comparada à da classe MF. A média da classe PF_1 entre as famílias segregantes, oriundas da autofecundação dos híbridos PF_1 , foi de 15,8%, e a média da classe PF_2 entre as famílias segregantes, oriundas da autofecundação dos híbridos PF_2 , foi de 5,56%. Do mesmo modo, como ocorreu com os dados da geração F_2 de híbridos MF (Quadro 3), os dados da geração F_2 , oriunda da autofecundação de híbridos PF_1 e PF_2 , também não se ajustaram a nenhuma relação fenotípica conhecida, nem mesmo quando as três classes PF foram agrupadas numa única classe; portanto, foram consideradas duas classes fenotípicas: (MF + PF) e ME, quando se testaram estatisticamente as razões de segregação (Quadro 12).

O Quadro 12 apresenta o resultado da segregação da geração F_2 , resultante da autofecundação de híbridos PF_1 e PF_2 entre as linhagens 264ME-C e 7MF. Tanto para as quatro famílias segregantes da geração F_2 de híbridos PF_1 quanto para as quatro famílias de híbridos PF_2 , os resultados ajustaram-se à relação de 27(MF + PF):37ME, reforçando, mais uma vez, o comportamento semelhante entre os híbridos PF_1 e PF_2 , quando autofecundados, conforme observado anteriormente para o cruzamento entre as linhagens 264ME-C e 870MF (Quadro 10). Foi observada na segregação da geração F_2 a predominância da freqüência da classe de plantas ME. A relação de segregação de três genes obtida indica que, na progênie de geração F_2 , oriunda do cruzamento entre as linhagens 264ME-C e 7MF, só

QUADRO 12 - Segregação da Geração F₂, Resultante da Autofecundação dos Híbridos PF₁ e PF₂, entre as Linhagens 264ME-C e 7MF, e Valores dos Qui-Quadrados e das Probabilidades de Erro ao Rejeitar a Razão de Segregação, U.F.V. - 1986

Híbrido PF	N.º de Plantas (Observado)		N.º de Plantas (Esperado)		χ^2	P (%)
	(MF + PF)	ME	27(MF + PF)	: 37ME		
PF ₁	50	62	47,25	64,75	0,185	50-70
PF ₁	72	105	74,67	102,33	0,109	70-80
PF ₁	33	58	38,39	52,61	1,078	20-30
PF ₁	37	70	45,14	61,86	2,237	10-20
PF ₂	64	74	58,22	79,78	0,829	30-50
PF ₂	59	79	58,22	79,78	0,002	95-99
PF ₂	35	43	32,91	45,09	0,133	70-80
PF ₂	35	45	33,75	46,25	0,029	80-90
Desvio	385	536	388,55	532,45	0,041	80-90
Heterogeneidade					4,562	70-80

ocorre a restauração da fertilidade total ou parcial, na presença simultânea no genótipo de alelos dominantes nos três locos ($Rf_4-Rf_5-Rf_6^-$). Os genótipos $Rf_4-Rf_5-rf_6rf_6$, $Rf_4-rf_5rf_5Rf_6^-$, $rf_4rf_4Rf_5-Rf_6^-$, $Rf_4-rf_5rf_5rf_6rf_6$, $rf_4rf_4Rf_5-rf_6rf_6$, $rf_4rf_4rf_5rf_5Rf_6^-$ e $rf_4rf_4rf_5rf_5rf_6rf_6$ produzem a macho-esterilidade. Isso significa que os genótipos $Rf_4-Rf_5-rf_6rf_6$ e $Rf_4-rf_5rf_5Rf_6^-$, embora apresentem os genes complementares para a restauração da fertilidade Rf_4 e Rf_5 ou Rf_6 , produzem plantas ME. Isso indica a falta do conjunto de genes modificadores necessários para que os genes duplicados Rf_5 e Rf_6 possam complementar-se, separadamente, com o Rf_4 , produzindo a restauração da fertilidade. O genótipo $Rf_4-Rf_5-Rf_6^-$ causaria a restauração da fertilidade, mesmo os genes Rf_5 e Rf_6 , separadamente, não tendo o complexo gênico de modificadores necessários para que eles levem à restauração da fertilidade. Todavia, como Rf_5 e Rf_6 são genes duplicados, os genes modificadores presentes de Rf_5 e Rf_6 somariam seus efeitos, resultando em presença de Rf_4 plantas com pendão que apresentam restauração total ou parcial da fertilidade. O fato de ter sido a segregação da geração F_2 de 27(MF + PF):37ME indica que tanto os híbridos PF_1 quanto o PF_2 , que deram origem à geração F_2 , eram heterozigóticos para os três genes ($Rf_4rf_4Rf_5rf_5Rf_6rf_6$) e que, provavelmente, a ausência de alguns modificadores dos dominantes não permitiu que os híbridos fossem completamente férteis, mas parcialmente férteis (PF_1 e PF_2). Desse modo e comparando com os resultados dos cruzamentos entre as linhagens 264ME-C e 964MF (Quadros 4 e 7), pode-se concluir que os genótipos F_1 heterozigóticos para três ou dois genes ($Rf_4rf_4Rf_5rf_5Rf_6rf_6$ e $Rf_4rf_4rf_5rf_5Rf_6rf_6$) podem ser MFs ou PFs (PF_1 , PF_2 ou PF_3), dependendo da presença dos genes modificadores necessários para que esses genes principais produzam efeitos sobre a restauração

da fertilidade, que pode ser total (MF) ou parcial (PF).

O conjunto de resultados permitiu propor os seguintes genótipos para as linhagens correspondentes:

$$264ME-C = rf_4 rf_4 rf_5 rf_5 Rf_6 Rf_6$$

$$870MF = Rf_4 Rf_4 Rf_5 Rf_5 rf_6 rf_6$$

$$964MF = Rf_4 Rf_4 Rf_5 Rf_5 rf_6 rf_6, Rf_4 Rf_4 rf_5 rf_5 rf_6 rf_6 \text{ e} \\ Rf_4 Rf_4 Rf_5 rf_5 rf_6 rf_6$$

7MF = a ausência de geração F_2 , resultante da autofecundação de híbridos MF, não permitiu definir o genótipo dessa linhagem.

Com relação ao número de genes envolvidos na restauração da fertilidade no citoplasma C, MIRANDA (44) também detectou a existência de três genes, porém com interação diferente da encontrada neste estudo. A autora considerou que o alelo dominante Rf_4 é necessário para a restauração da fertilidade e que o gene dominante Rf_6 tem efeito epistático sobre os outros dois genes, inibindo a restauração da fertilidade, mas não atuando na presença simultânea dos alelos dominantes nos outros dois locos. Assim, $Rf_4^- Rf_5^- Rf_6^-$, $Rf_4^- Rf_5^- rf_6 rf_6$ e $Rf_4^- rf_5 rf_5 rf_6 rf_6$ são férteis e parcialmente férteis e $Rf_4^- rf_5 rf_5 Rf_6^-$, $rf_4 rf_4 Rf_5^- Rf_6^-$, $rf_4 rf_4 rf_5 rf_5 Rf_6^-$, $rf_4 rf_4 Rf_5^- rf_6 rf_6$ e $rf_4 rf_4 rf_5 rf_5 rf_6 rf_6$ são estéreis. O envolvimento de três genes também foi encontrado por JOSEPHSON *et alii* (27), porém os resultados foram insuficientes para determinar o modo de ação desses genes.

KHEYR-POUR e GRACEN (32) verificaram, na maioria das linhagens por eles estudadas, o envolvimento de um gene

restaurador. Segundo eles, poucas linhagens produziram progênie parcialmente fértil, em virtude da ausência de um segundo gene restaurador complementar.

KHEYR-POUR et alii (34) novamente citaram que o sistema CME-C representa outro exemplo claro da interação do citoplasma e um único gene nuclear.

4.2. Efeito de Dois Anos sobre a Restauração da Fertilidade em Plantas com Citoplasma C

O Quadro 13 apresenta o resultado da segregação da geração F_2 , resultante da autofecundação de híbridos MF entre as linhagens 264ME-C e 966MF, avaliada em dois anos. Observa-se nas três famílias que a frequência das plantas MF foi maior no segundo do que no primeiro ano, tendo sido esse aumento acompanhado pela redução na porcentagem de plantas PF e ME no segundo ano. O decréscimo na porcentagem de plantas PF foi maior do que na de plantas ME, que, para a família três, mostrou decréscimo desprezível de apenas 0,56%.

Tais resultados foram reforçados pelos dados da geração F_2 , oriunda da autofecundação de híbridos MF entre as linhagens 264ME-C e 352MF (Quadro 14). Na segregação das oito famílias F_2 analisadas, a porcentagem de plantas MF foi maior no ano 2 do que no ano 1, o acréscimo no ano 2 variando de 13,01 a 35,46%. O aumento na frequência de plantas MF no ano 2 deveu-se, principalmente, à redução entre 6,01 e 27,92% de plantas PF do que de plantas ME, cuja redução variou de 3,61 a 15,57%.

A análise de variância para o efeito de ano foi significativa, pelo teste F, para as classes MF e PF, sendo de 1% para a geração F_2 , resultante da autofecundação de híbridos MF entre as linhagens 264ME-C e 966MF, e de 5% para a

QUADRO 13 - Número e Porcentagem de Plantas na Segregação da Geração F₂, Resultante da Autofecundação de Híbridos MF entre as Linhagens 264ME-C e 966MF, em Dois Anos, U.F.V. - 1983 e 1984

Família	Ano 1			Ano 2			Variação entre os Anos		
	MF	PF	ME	MF	PF	ME	MF	PF	ME
1 (N.º)	117	39	61	81	16	26			
(%)	53,92	17,97	28,11	65,86	13,00	21,14	+11,94	-4,97	-6,97
2 (N.º)	124	41	74	59	11	27			
(%)	51,88	17,16	30,96	60,82	11,34	27,84	+8,94	-5,82	-3,12
3 (N.º)	106	27	63	45	7	24			
(%)	54,08	13,78	32,14	59,21	9,21	31,58	+5,13	-4,57	-0,56

Ano 1: 24/01/1983 a 21/02/1983 (Período de florescimento masculino).

Ano 2: 28/12/1983 a 30/01/1984 (Período de florescimento masculino).

QUADRO 14 - Número e Porcentagem de Plantas na Segregação da Geração F₂, Resultante da Autofecundação dos Híbridos MF entre as Linhagens 264ME-C e 352MF, em Dois Anos, U.F.V. - 1983 e 1984

Família	Ano 1			Ano 2			Variação entre os Anos		
	MF	PF	ME	MF	PF	ME	MF	PF	ME
1 (N. ^o) (%)	119 44,10	14 15,20	110 40,70	63 58,90	8 7,50	36 33,60	+14,80	-7,70	-7,10
2 (N. ^o) (%)	92 36,95	82 32,93	75 30,12	65 64,36	13 12,87	23 22,77	+27,41	-20,06	-7,35
3 (N. ^o) (%)	131 54,80	43 18,00	65 27,20	77 72,64	4 3,77	25 23,59	+17,84	-14,23	-3,61
4 (N. ^o) (%)	73 36,70	74 37,20	52 26,10	70 72,16	9 9,28	18 18,56	+35,46	-27,92	-7,54
5 (N. ^o) (%)	98 48,28	32 15,76	73 35,96	73 62,93	6 5,17	37 31,90	+14,65	-10,59	-4,06
6 (N. ^o) (%)	109 44,13	42 17,00	96 38,87	52 57,14	10 10,99	29 31,87	+13,01	-6,01	-7,00
7 (N. ^o) (%)	85 38,81	35 15,98	99 45,21	56 54,37	5 4,85	42 40,78	+15,56	-11,13	-4,43
8 (N. ^o) (%)	53 24,88	58 27,23	102 47,89	56 56,57	11 11,11	32 32,32	+31,69	-16,12	-15,57

geração F_2 , resultante da autofecundação de híbridos MF entre as linhagens 264ME-C e 352MF. Isso indica que ocorreu menor estabilidade às condições ambientes da geração F_2 originária da linhagem 352MF do que da 966MF. Para a classe ME o efeito de ano não foi significativo, evidenciando maior estabilidade dessa classe quando em diferentes condições ambientes.

Quando a análise de variância foi efetuada, agrupando-se em uma única classe os tipos de pendões MF e PF, os dados da geração F_2 , originária da autofecundação tanto dos híbridos MF(264ME-C x 966MF) quanto dos híbridos MF(264ME-C x 352MF), não foram significativos, indicando que a significância das classes MF e PF, quando analisadas separadamente, foi devida, principalmente, à conversão de plantas PF em MF no segundo ano. Isto é, alterações nas condições ambientes fizeram com que, no segundo ano, algumas plantas que se deveriam manifestar com pendões PF convertessem-se em MF.

Os dados climáticos temperatura, umidade relativa do ar, insolação e precipitação foram considerados durante o período de florescimento masculino neste estudo (Quadro 2). Comparando os períodos 1 e 2, observa-se que a umidade relativa do ar foi de 83,4 e 76,7%, respectivamente, não podendo ser responsável pela variação na porcentagem de plantas MF e PF nos dois anos, assim como a temperatura média que nos dois anos foi de 22°C. A precipitação média de 3,2 mm dia⁻¹, no período 2, foi inferior à do período 1 (5,8 mm dia⁻¹), o que não caracteriza déficit hídrico. Através dessas comparações, destaca-se a insolação como fator diferencial, sendo suas médias de 5,4 e 8,1 horas dia⁻¹ para os períodos 1 e 2, respectivamente. É provável que a maior insolação verificada no período 2 tenha sido responsável pela manifestação de plantas que seriam PF no ano 1 em MF no ano 2.

A restauração parcial é variável na expressão, podendo manifestar-se desde a esterilidade à fertilidade praticamente normal e comporta-se como independente de fatores condicionantes da restauração total. Interações da restauração parcial e o ambiente são geralmente pronunciadas (2); condições de calor e seca na época do florescimento fazem com que restauradores parciais expressem-se menos férteis e condições de frio e umidade nesta época favorecem os restauradores parciais a apresentarem uma alta porcentagem de pólen fértil (2, 12, 27).

JOSEPHSON *et alii* (27) analisaram a geração F_1 e RC_1 de híbridos entre linhagens restauradoras e macho-estéreis que continham fontes de citoplasma C, RB e EL, pertencentes ao grupo C, plantados em diferentes locais e em duas épocas de plantio. Na segregação dessas gerações, foram consideradas as classes MF e ME, sendo a PF agrupada à MF. A porcentagem de plantas MF e ME foi variável entre locais e datas de plantio. A porcentagem de plantas MF variou com o citoplasma e com a linhagem restauradora. Diferenças na segregação devidas ao local sugerem que o comprimento do dia possa ser um fator controlador (4). DUVICK (12) mencionou que, sem um conhecimento das condições ambientes em que determinado genótipo no citoplasma macho-estéril T tenha sido testado, não se pode afirmar que ele deveria ser classificado como um restaurador, não-restaurador (estéril) ou restaurador parcial. Essa afirmação também é válida para genótipos no citoplasma C, uma vez que os trabalhos mostram a influência do ambiente na restauração da fertilidade.

4.3. Quebra Tardia da Esterilidade Masculina

A análise diária dos tipos de pendões de híbridos da geração F_1 , oriunda do cruzamento entre linhagens ME e MF,

mostrou a existência de algumas plantas que foram, inicialmente, classificadas como ME, por não liberarem pólen e apresentar pendões tipicamente estéreis, mas que, no entanto, mostraram uma quebra tardia da esterilidade masculina em comparação com a das outras plantas dos mesmos cruzamentos. Desse modo, observou-se, na geração F_1 do cruzamento entre as linhagens 264ME-C e 923MF, uma planta que era aparentemente ME, mas, por ter liberado, posteriormente, certa quantidade de pólen, passou a ser classificada como PF_2 . Essa planta PF_2 iniciou a liberação de pólen aos 78 dias, enquanto outra planta também PF_2 e do mesmo cruzamento iniciou aos 73 dias a liberação de pólen. À semelhança do que ocorreu para o cruzamento entre as linhagens 264ME-C e 923MF, verificou-se também na geração F_1 do cruzamento entre as linhagens 264ME-C x 7MF uma planta PF_2 que apresentava a quebra tardia da esterilidade aos 80 dias e que já havia sido classificada como ME, pelas características do pendão. Outra planta PF_2 do mesmo cruzamento tinha iniciado a liberação de pólen aos 74 dias.

Pela análise do Quadro 15, observa-se que o híbrido PF_2 , oriundo do cruzamento entre as linhagens 264ME-C e 923MF, que iniciou a liberação de pólen aos 73 dias, quando autofecundado, produziu geração F_2 , cujas plantas iniciaram a liberação de pólen no período de 70 a 78 dias, exatamente o mesmo período para a geração F_2 , oriunda de híbrido de quebra tardia da esterilidade (78 dias). Comportamento semelhante ocorreu para o híbrido PF_2 , oriundo do cruzamento entre as linhagens 264ME-C e 7MF, que iniciou a liberação de pólen aos 74 dias e, ao ser autofecundado, produziu geração F_2 , que apresentou início de liberação de pólen variando de 70 a 79 dias, enquanto a planta PF_2 , que apresentou quebra tardia da esterilidade masculina aos 80 dias, produziu, ao ser autofecundada,

QUADRO 15 - Segregação da Geração F₂, Oriunda da Autofecundação de Híbridos PF₂ com Início de Liberação de Pólen Cedo e com Quebra Tardia da Esterilidade Masculina, U.F.V. - 1984

F ₂	Início da Liberação de Pólen do Híbrido PF ₂ da Geração F ₁ (Dias Após Plantio)	Geração F ₂											Total de Plantas	
		Nº de Plantas MF para PF nos Respectivos Dias após Plantio											MF:PF	ME
		70	71	72	73	74	75	76	77	78	79			
(264ME-C x 923MF) ⊗	73	4:1	5:2	2:5	3:6	2:4	1:3	0:2	0:2	0:2	-	17:27	38	
(264ME-C x 923MF) ¹ ⊗	78	8:3	3:1	3:1	2:1	3:3	2:3	0:3	0:1	0:3	-	21:19	39	
(264ME-C x 7MF) ⊗	74	1:0	3:0	8:2	4:4	5:2	2:6	1:3	0:3	0:2	0:1	24:23	45	
(264ME-C x 7MF) ¹ ⊗	80	2:0	5:1	4:1	5:3	5:3	2:6	0:3	0:2	0:3	-	23:22	36	

(1) Quebra tardia da esterilidade masculina.

geração F_2 , que iniciou a liberação de pólen entre 70 e 78 dias. Desse modo, tanto os híbridos F_1 que iniciaram produção de pólen mais cedo quanto os de quebra tardia da esterilidade mostraram o mesmo comportamento na descendência da geração F_2 , não havendo tendência de os híbridos de quebra tardia da geração F_1 transmitirem essa característica, produzindo geração F_2 , que liberasse pólen por um período maior do que o da geração F_2 , oriunda de híbridos F_1 , que apresentaram liberação de pólen cedo.

Uma análise mais detalhada dos dados do Quadro 15 mostra que, aos 70 dias, para todos os cruzamentos, a maior frequência foi sempre de plantas MF com poucas ou nenhuma planta PF tendo iniciado a liberação de pólen. Até aos 71 dias, a frequência de MF foi sempre bem maior que a de PF, mas, a partir de 72 dias, começou a se inverter a tendência, tendo o cruzamento 264ME-C x 923MF apresentado 2 plantas MF e 5 PF no F_2 . A partir dos 75 dias, a frequência de plantas PF foi sempre maior do que a de plantas MF, tanto para os cruzamentos de quebra tardia quanto para os de início de liberação de pólen cedo; aos 77 dias, só ocorria o tipo PF; aos 79 dias, apenas uma planta havia liberado pólen e era do tipo PF. As plantas PF que liberaram pólen aos 77, 78 e 79 dias eram tipicamente de quebra tardia da esterilidade, com pendões classificados, inicialmente, como ME, para as plantas resultantes de híbridos F_1 de quebra tardia ou não. Desse modo, híbridos da geração F_1 que apresentaram quebra tardia da esterilidade ou liberaram pólen cedo não mostraram comportamento diferente com relação à segregação da geração F_2 . No entanto, os dois tipos de híbridos F_1 produziram na geração F_2 plantas PF de quebra tardia da esterilidade masculina. A causa dessa quebra tardia da esterilidade é ainda

desconhecida, sendo necessário o aprofundamento de mais estudos para analisar se condições de ambiente têm algum efeito sobre essa característica. Pode ser que a condição fisiológica de determinadas plantas PF requiera um mínimo de insolação, fotoperiodismo ou umidade necessários para que a planta inicie a liberação de pólen.

Quebra tardia da esterilidade masculina foi verificada por KHEYR-POUR et alii (34) nos cruzamentos entre os tipos $N(rfrf)$ e $C(rfrf)$, explicada, provavelmente, como o resultado de fatores herdados quantitativamente, que agem na ausência do gene dominante Rf e expressam uma restauração diferente da conferida por este gene.

KHEYR-POUR et alii (32) observaram que, nos cruzamentos entre genótipos $C(Rfrf)$ e $C(rfrf)$, a quebra tardia foi exibida na progênie pela maioria das plantas PF. Seleção contra essa característica mostrou ser efetiva na linhagem A632-PR; porém, por ter sido realizada em apenas um local, não se tem conhecimento se a esterilidade obtida através dessa seleção manter-se-á em outras condições ambientes. Essa quebra tardia em linhagens como a A632 foi atribuída à falta do gene restaurador Rf , que, possivelmente, estaria sendo influenciado por vários genes modificadores, bem como pelas condições ambientes.

Os poucos trabalhos existentes acerca de quebra tardia da esterilidade masculina em plantas com citoplasma C não são conclusivos. É possível que esse fenômeno esteja associado a um rearranjo do mt-DNA, em plantas macho-estéreis, razão por que se faz necessária a realização de estudos mais detalhados em nível molecular, para comparação do mt-DNA de plantas macho-estéreis com o de plantas com quebra tardia da macho-esterilidade, oriundas do cruzamento entre os tipos $C(rfrf)$ e seu respectivo mantenedor $N(rfrf)$.

4.4. Influência de Diferentes Níveis de Adubação Nitrogenada sobre a Restauração da Fertilidade

Na tentativa de detectar o efeito de condições ambientais sobre a restauração da fertilidade, foi testada a influência de diferentes níveis de adubação nitrogenada sobre a segregação da geração F_2 , oriunda da autofecundação de híbridos MF, resultantes dos cruzamentos 264ME-C x 894MF e 264ME-C x 914MF. Os níveis de adubação nitrogenada de 13, 27 e 40 kg de nitrogênio/ha, corresponderam aos tratamentos: "ausência de adubação em cobertura" (só a adubação do plantio), "metade da adubação em cobertura" (adubação no plantio foi normal) e "adubação normal" (1/3 do adubo nitrogenado no plantio e 2/3 em cobertura), respectivamente.

Conforme se pode observar nos Quadros 16 e 17, para cada família segregante da geração F_2 houve constância na distribuição da porcentagem de plantas MF, PF e ME submetidas aos três níveis de adubação nitrogenada, não se detectando, portanto, efeito de níveis de nitrogênio sobre a restauração da fertilidade, o que foi confirmado por meio da análise de variância, mostrando a não-significância dos tratamentos, pelo teste F, a 5% de probabilidade. Verifica-se, dessa forma, que a adubação normal que vem sendo empregada nos experimentos de estudo da restauração da fertilidade, bem como um déficit de, aproximadamente, 27 kg de nitrogênio/ha na adubação, não interfere na segregação das diversas famílias.

DUVICK (12), baseado em número limitado de testes, concluiu que excesso de adubação nitrogenada tende a reduzir a fertilidade do pólen de restauradores parciais.

QUADRO 16 - Número e Porcentagem de Plantas na Segregação da Geração F₂, Resultante da Autofecundação de Híbridos MF entre as Linhagens 264ME-C e 894MF, Considerando Diferentes Níveis de Adubação Nitrogenada, U.F.V. - 1985

Família	Adubação Normal			Metade da Adubação de Cobertura			Ausência de Adubação de Cobertura		
	MF	PF	ME	MF	PF	ME	MF	PF	ME
1 (N.º)	61	6	14	76	7	16	53	4	12
(%)	75,30	7,40	17,28	76,77	7,07	16,16	76,81	5,80	17,39
2 (N.º)	131	14	32	161	20	37	112	9	28
(%)	74,00	7,90	18,10	73,86	9,17	16,97	75,17	6,04	18,79

QUADRO 17 - Número e Porcentagem de Plantas na Segregação da Geração F₂, Resultante da Autofecundação de Híbridos MF entre as Linhagens 264ME-C e 914MF, Considerando Diferentes Níveis de Adubação Nitrogenada, U.F.V. - 1985

Família	Adubação Normal			Metade da Adubação de Cobertura			Ausência de Adubação de Cobertura		
	MF	PF	ME	MF	PF	ME	MF	PF	ME
1 (N.º)	56	6	14	35	5	10	61	3	16
(%)	73,70	7,90	18,40	70,00	10,00	20,00	76,25	3,75	20,00
2 (N.º)	66	5	12	28	1	4	49	3	9
(%)	79,52	6,02	14,46	84,85	3,03	12,12	80,33	4,92	14,75
3 (N.º)	80	4	10	28	1	4	56	3	11
(%)	85,10	4,26	10,64	84,85	3,03	12,12	80,00	4,29	15,71
4 (N.º)	72	6	16	129	9	37	118	12	27
(%)	76,60	6,38	17,02	73,70	5,15	21,15	75,16	7,64	17,20
5 (N.º)	79	7	16	111	6	30	106	6	19
(%)	77,45	6,86	15,69	75,51	4,08	20,41	80,92	4,58	14,50

4.5. Número de Folhas Acima e Abaixo da Primeira Espiga da Plantas MF e ME Oriundas de um mesmo RC₁

No Quadro 18, encontram-se as médias do número de folhas acima e abaixo da primeira espiga de plantas MF e ME, oriundas do RC₁ de híbridos 264ME-C x 964MF (Classes fenotípicas MF, PF₂ e PF₃) com a linhagem 264ME-C. Conforme se pode observar, o RC₁ do híbrido MF produziu plantas ME que apresentaram a média do número de folhas acima da primeira espiga de 5,70, enquanto a média para as plantas MF foi de 4,90. Com relação ao número de folhas abaixo da primeira espiga, a média foi de 8,20 para as plantas ME e de 7,95 para as plantas MF. O RC₁ do híbrido PF₂ produziu a média de 5,60 folhas acima da primeira espiga para as plantas ME e de 4,70 para as plantas MF. Já para o número de folhas abaixo da primeira espiga, a média foi de 7,50 para as plantas ME e 7,80 para as plantas MF. O RC₁ de híbridos PF₃ produziu a média de 5,50 folhas acima da primeira espiga para as plantas ME e de 4,85 para as plantas MF. Para as folhas abaixo da primeira espiga a média foi de 7,70 para as plantas ME e de 8,05 para as plantas MF.

As análises de variância dos dados mostraram que o maior número de folhas acima da primeira espiga para as plantas ME foi significativo, pelo teste F, a 1% de probabilidade, tanto para o RC₁ de híbridos MF quanto de PF₂ e PF₃. Por outro lado, para o número de folhas abaixo da primeira espiga não houve diferença significativa entre as plantas MF e ME, oriundas do RC₁ de plantas MF, PF₂ ou PF₃.

A diferença no número de folhas acima da primeira espiga entre as plantas MF e ME não está unicamente associada ao citoplasma, visto que tanto as plantas MF quanto as ME apresentavam o citoplasma C, uma vez que o RC₁ foi efetuado

QUADRO 18 - Médias do Número de Folhas Acima e Abaixo da Primeira Espiga de Plantas MF e ME, Oriundas do RC₁ de Híbridos 264ME-C x 964MF(MF, PF₂ e PF₃) com a Linhagem 264ME-C, U.F.V. - 1986

Tipo Pendão		N.º de Folhas Acima da 1. ^a Espiga		N.º de Folhas Abaixo da 1. ^a Espiga	
		MF	ME	MF	ME
Híbrido	F ₁				
	MF	4,90	5,70	7,95	8,20
	PF ₂	4,70	5,60	7,80	7,50
	PF ₃	4,85	5,50	8,05	7,70

usando a linhagem 264ME-C como progenitor recorrente. É possível que isso esteja associado à diferença entre as interações Genótipo não-restaurador (ME) x Citoplasma C e Genótipo restaurador (MF) x Citoplasma C. Essa diferença no número de folhas acima da primeira espiga entre plantas MF e ME é um efeito indireto da esterilidade masculina, uma vez que o número de folhas já está definido antes da meiose da célula-mãe do grão de pólen.

Diferenças dessa natureza foram também obtidas por GROGAN e SARVELLA (23), ao comparar linhagens com citoplasma normal e suas versões de genótipo restaurador e não-restaurador com citoplasma T. Embora o efeito da restauração no citoplasma estéril sobre a morfologia das plantas tenha produzido alguns resultados irregulares com consideráveis influências genotípicas e ambientes, foi verificado que, na maioria dos casos, o complexo genótipo restaurador-citoplasma T foi efetivo em reduzir o número de entrenós acima da primeira espiga.

Híbridos simples com citoplasma T mostraram redução no número de folhas acima da primeira espiga, quando

comparados com a sua versão com citoplasma normal (12, 37). DUVICK (12) mencionou que essa redução no número de folhas varia de 1-2%, sendo devida ao citoplasma T e não sendo afetada pelo genótipo do híbrido (versão restaurada ou não-restaurada).

5. RESUMO E CONCLUSÕES

Este trabalho, conduzido na Universidade Federal de Viçosa, compreendeu o estudo de:

a) Mecanismo genético controlador da restauração da fertilidade em plantas com citoplasma macho-estéril tipo C, em milho. Para isto, foram utilizados a geração F_2 e o RC_1 de híbridos MF e PF, oriundos do cruzamento entre linhagem com citoplasma normal e linhagem macho-estéril com citoplasma C. Por meio da segregação da geração F_2 e do RC_1 foram analisadas, pela fórmula do χ^2 ajustado, as proporções de plantas (MF + PF):ME que permitiram determinar quantos genes estão envolvidos na restauração da fertilidade de plantas com citoplasma macho-estéril do tipo C.

b) Efeito de dois anos sobre a segregação dos tipos de pendões da geração F_2 . As espigas das famílias de geração F_2 , oriundas de um mesmo cruzamento, foram divididas ao meio e plantadas em épocas distintas.

c) Efeito de três níveis diferentes de adubação nitrogenada (13, 27 e 40 kg de nitrogênio/ha) sobre a segregação dos tipos de pendões da geração F_2 . As espigas das famílias de geração F_2 foram divididas em três partes, tendo sido cada uma submetida a um dos níveis de adubação.

d) Início de liberação de pólen em plantas da geração F_2 , oriunda da autofecundação de híbridos PF_2 , que apresentaram início de liberação de pólen cedo ou quebra tardia da esterilidade masculina. A avaliação do início de liberação de pólen e tipo de pendão na progênie de geração F_2 desses híbridos PF_2 , com e sem quebra tardia da esterilidade masculina, foi realizada, diariamente, por todo o período de florescimento.

e) Efeito do citoplasma na morfologia da planta por meio da determinação do número de folhas acima e abaixo da primeira espiga em plantas MF e ME na progênie do RC_1 de híbridos MF, PF_2 e PF_3 . A contagem do número de folhas foi efetuada ao final do florescimento masculino.

Pela análise, interpretação e discussão dos resultados, concluiu-se que:

1) A restauração da fertilidade em plantas com citoplasma C resulta da interação de três genes independentes (Rf_4/rf_4 , Rf_5/rf_5 e Rf_6/rf_6). A hipótese que melhor se ajustou ao conjunto dos dados obtidos indica que o mecanismo de restauração do citoplasma C é um caso de interação gênica de genes complementares e duplicados, em que o gene dominante Rf_4 complementa-se com os dominantes duplicados Rf_5 e/ou Rf_6 . Na ausência do dominante Rf_4 (rf_4rf_4), mesmo em presença dos duplicados dominantes Rf_5 e Rf_6 , não há a restauração, uma vez que não existe a complementação necessária para expressar a fertilidade. Assim, tem-se que os genótipos

$Rf_4^-Rf_5^-Rf_6^-$, $Rf_4^-Rf_5^-rf_6rf_6$ e $Rf_4^-rf_5rf_5Rf_6^-$ são férteis ou parcialmente férteis e $Rf_4^-rf_5rf_5rf_6rf_6$, $rf_4rf_4Rf_5^-rf_6rf_6$, $rf_4rf_4rf_5rf_5Rf_6^-$, $rf_4rf_4Rf_5^-Rf_6^-$ e $rf_4rf_4rf_5rf_5rf_6rf_6$ são estéreis. Para a completa restauração da fertilidade em plantas com citoplasma C é necessária, além da complementaridade entre os genes restauradores, a presença de um complexo gênico de modificadores para cada um desses restauradores.

Os resultados permitiram propor os prováveis genótipos das seguintes linhagens:

264ME-C: $rf_4rf_4rf_5rf_5Rf_6Rf_6$

870MF: $Rf_4Rf_4Rf_5Rf_5rf_6rf_6$

964MF: $Rf_4Rf_4Rf_5Rf_5rf_6rf_6$, $Rf_4Rf_4rf_5rf_5rf_6rf_6$ e
 $Rf_4Rf_4Rf_5rf_5rf_6rf_6$

2) O efeito de dois anos sobre a segregação dos tipos de pendões da geração F_2 , resultante da autofecundação dos híbridos MF, entre as linhagens 264ME-C x 966MF e 264ME-C x 352MF, mostrou que a expressão do grau de fertilidade parcial é altamente influenciada pelo genótipo e condições ambientes.

3) Três níveis diferentes de adubação nitrogenada: a adubação normal, metade da adubação em cobertura e ausência de adubação em cobertura, correspondendo, respectivamente ao total de 13, 27 e 40 kg de nitrogênio/ha, mostraram não ter nenhum efeito sobre a segregação dos tipos de pendões da geração F_2 , resultante da autofecundação dos híbridos entre as linhagens 264ME-C x 894MF e 264ME-C x 914MF.

4) Híbridos PF_2 , oriundos dos mesmos cruzamentos 264 ME-C x 923MF e 264ME-C x 7MF, com início de liberação de pólen cedo ou quebra tardia da esterilidade masculina, quando autofecundados, produziram geração F_2 que não diferiu com relação à segregação, no que se refere ao número de dias após plantio para início da liberação de pólen.

5) O número de folhas acima e abaixo da primeira espiga foi determinado em plantas ME e MF, resultantes do RC_1 de híbridos 264ME-C x 964MF (MF, PF_2 e PF_3) com a linhagem 264ME-C. As plantas ME apresentaram maior número de folhas acima da primeira espiga, tendo sido essa diferença significativa, pelo teste F, a 1% de probabilidade. Isto possivelmente seria explicado pela diferença entre as interações genótipo restaurador (MF) x Citoplasma C e genótipo não-restaurador (ME) x Citoplasma C. Com relação ao número de folhas abaixo da primeira espiga, não houve diferença significativa entre as plantas ME e MF.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

1. BARRATT, D.H.P. & FLAVELL, R.B. Alterations in mitochondria associated with cytoplasmic and nuclear genes concerned with male sterility in maize. Theor. Appl. Genet., 45:315-21, 1975.
2. BECKETT, J.B. Inheritance of parcial male fertility in maize in the presence of Texas sterile cytoplasm. Crop Sci., 6:183-4, 1966.
3. BECKETT, J.B. Classification of male-sterile cytoplasm in maize (Zea mays L.). Crop Sci., 11:724-7, 1971.
4. BLICKENSTAFF, J.; THOMPSON, D.L. & HARVEY, P.H. Inheritance and linkage of pollen fertility restoration in cytoplasmic male-sterile crosses of corn. Agron. J., 50:430-4, 1958.
5. BRUCE, R.R.; SANFORD, J.O. & MYHRE, D.L. Soil water and nitrogen on growth and fruiting of a cytoplasmic male-sterile corn hybrid and its fertile counterpart. Agron. J., 58:631-4, 1966.

6. CAMPOS, V.P. & CARVALHO, M.G. Caracterização das raças de H. maydis e comportamento de linhagens de milho frente à raça T. Rev. Ceres, 21:329:43, 1974.
7. CHINWUBA, P.M.; GROGAN, C.O. & ZUBERT, M.S. Interaction of detasseling, sterility, and spacing on yields of maize hybrids. Crop Science, 1:279-80, 1961.
8. COCHRAN, D.E. Progress of cytoplasmic and genetic sterility in hybrid seed production. Proc. Ann. Corn & Sorghum Res. Conf., 30:116-30, 1975.
9. COMSTOCK, J.C.; MARTINSON, C.A. & GENGEBACH, B.G. Host specificity of a toxin from Phyllosticta maydis for Texas cytoplasmically male-sterile maize. Phytopathol., 63:1357-61, 1973.
10. CONDE, M.F.; PRING, D.R. & GENGEBACH, B.G. Mitochondrial DNA analysis of cytoplasmic mutants of T male-sterile maize derived from tissue culture. J. Cell Biol., 83:368, 1979.
11. DUVICK, D.N.; SNYDER, R.J. & ANDERSON, E.G. The chromosomal location of Rf₁, a restorer gene for cytoplasmic pollen sterile maize. Genetics, 46:1245-52, 1961.
12. DUVICK, D.N. Cytoplasmic pollen sterility in corn. Adv. Genet., 13:1-56, 1965.
13. EDWARDSON, J.R. The restoration of fertility to cytoplasmic male-sterile corn. Agron. J., 47:457-61, 1955.
14. ESCOTE, L.J.; GABAY-LAUGHNAN, S. & LAUGHNAN, J.R. Cytoplasmic reversion to fertility in cms-S without loss of linear mitochondrial plasmids. Maize Genet. Coop. Newsl., 59:100, 1985.
15. ESCOTE, L.J.; GABAY-LAUGHNAN, S. & LAUGHNAN, J.R. Changes in nuclear genomic background bring about reorganization of mitochondrial DNA. Maize Genet. Coop. Newsl., 60:127-8, 1985.

16. FORDE, B.G.; OLIVER, R.J.C.; LEAVER, C.J.; GUNN, R.E. & KEMBLE, R.J. Classification of normal and male-sterile cytoplasm in maize. I. Electrophoretic analysis of variation in mitochondrially synthesized proteins. Genetics, 95:443-50, 1980.
17. GENGEBACH, B.G. & CONNELLY, J.A. Mitochondrial DNA variation in maize plants regenerated during tissue culture selection. Theor. Appl. Genet., 59:161-67, 1981.
18. GOMES, F.P. Curso de estatística experimental. Piracicaba, Livraria Nobel S.A., 1982. 430 p.
19. GRACEN, V.E. & GROGAN, C.O. Diversity and suitability for hybrid production of different sources of cytoplasmic male sterility in maize. Agron. J., 66:654-7, 1974.
20. GRACEN, V.E.; KHEYR-POUR, A.; EARLE, E.D. & GREGORY, P. Cytoplasmic inheritance of male sterility and pest resistance. Proc. Ann. Corn & Sorghum Res. Conf., 34:76-91, 1979.
21. GREGORY, P.; EARLE, E.D. & GRACEN, V.E. Effects of purified Helminthosporium maydis race T toxin on the structure and function of corn mitochondria and protoplasts. Plant Physiol., 66:477-81, 1980.
22. 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 (Zea mays L.). Crop Sci., 11:295-97, 1971.
23. GROGAN, C.O. & SARVELLA, P. Morphological variation in normal, cytoplasmic male-sterile, and restored counterparts in maize, Zea mays L. Crop Sci., 4:567-70, 1964.
24. GROGAN, C.O.; SARVELLA, P.; SANFORD, J.O. & JORDAN, H.V. Influence of cytoplasmic male sterility on dry matter accumulation in maize. Crop Sci., 5:365-67, 1965.
25. ISHIGE, T. & GENGEBACH, B.G. Fertile revertants possessing S-1 and S-2 DNAs in cms-S. Maize Genet. Coop. Newsl., 59:98-9, 1985.

26. JOSEPHSON, L.M. & KINGER, H.C. Effects of male-sterile cytoplasm on yields and other agronomic characteristics of corn inbreds and hybrids. Crop Sci., 2:41-3, 1962.
27. JOSEPHSON, L.M.; MORGAN, T.E. & ARNOLD, J.M. Genetics and inheritance of fertility restoration of male-sterile cytoplasm in corn. Proc. Ann. Corn & Sorghum Res. Conf., 33:48-59, 1978.
28. KÁLMÁN, L.; PÁRDUCZ, Á. & PINTÉR, L. RB cytoplasmic male sterility in maize: fertility restoration and histology of anther development. Maydica, 27:1-10, 1980.
29. KEMBLE, R.J. A rapid single leaf assay for detecting the presence of 'S' male-sterile cytoplasm in maize. Theor. Appl. Genet., 57:97-100, 1980.
30. KEMBLE, R.J. & BEDBROOK, J.R. Low molecular weight circular and linear DNA in mitochondria from normal and male-sterile Zea mays cytoplasm. Nature, 284:565-6, 1980.
31. KEMBLE, R.J.; GUNN, R.E. & FLAVELL, R.B. Classification of normal and male-sterile cytoplasm in maize. II. Electrophoretic analysis of DNA species in mitochondria. Genetics, 95:451-8, 1980.
32. KHEJR-POUR, A. & GRACEN, V.E. Genetics of cms-C fertility restoration. Maize Genet. Coop. Newsl., 54:57-9, 1980.
33. KHEJR-POUR, A.; GRACEN, V.E. & EVERETT, H.L. Genetics of cms-C fertility restoration. Maize Genet. Coop. Newsl., 53:48-51, 1979.
34. KHEJR-POUR, A.; GRACEN, V.E. & EVERETT, H.L. Genetics of fertility restoration in the C-group of cytoplasmic male sterility in maize. Genetics, 98:379-88, 1981.
35. KIDWELL, K.K.; LAUGHNAN, J.R.; GABAY-LAUGHNAN, S. & ESCOTE, L.J. A possible basis for the lag phenomenon observed in M825 conversion of cms-S strains with equimolar S1:S2 rations. Maize Genet. Coop. Newsl., 60:128-9, 1985.

36. KIM, B.D.; MANS, R.J.; COND, M.F.; PRING, D.R. & LEVINGS, C.S. III. Physical mapping of homologous segments of mitochondrial episomes from S male-sterile maize. Plasmid, 7:1-14, 1982.
37. KOVÁCS, I. Some methodological achievements of the hungarian hybrid maize breeding. Budapest, Akademiai Kiadó, 1970. 385 p.
38. LAUGHNAN, J.R. & GABAY-LAUGHNAN, S.J. Reaction of germinating maize pollen to Helminthosporium maydis pathotoxins. Crop Sci., 13:681-4, 1973.
39. LAUGHNAN, J.R. & GABAY-LAUGHNAN, S.J. Cytoplasmic male sterility in maize. Ann. Rev. Genet., 17:27-48, 1983.
40. LEE, S.L.J.; EARLE, E.D. & GRACEN, V.E. The cytology of pollen abortion in S cytoplasmic male-sterile corn anthers. Am. J. Bot., 67:237-45, 1980.
41. LEE, S.L.J.; GRACEN, V.E. & EARLE, E.D. The cytology of pollen abortion in C-cytoplasmic male-sterile corn anthers. Am. J. Bot., 66:656-67, 1970.
42. LEVINGS, C.S. III.; KIM, B.D.; PRING, D.R.; CONDE, M.F.; MANS, R.J.; LAUGHNAN, J.R. & GABAY-LAUGHNAN, S.J. Cytoplasmic reversion of cms-S in maize: association with a transpositional event. Science, 209:1021-3, 1980.
43. MATTOS, J.A. Como foi obtida a esterilidade Charrua. J. Agroceres, 3:5-6, 1974.
44. MIRANDA, L.A. Herança da restauração da fertilidade em citoplasma macho-estéril do tipo C em milho (Zea mays L.). Viçosa, U.F.V., Imprensa Universitária, 1985. 70 p. (Tese M.S.).
45. OHMASA, M.; WATANABE, Y. & MURATA, N. A biochemical study of cytoplasmic male sterility of corn: alteration of cytochrome oxidase and malate dehydrogenase activities during pollen development. Japan J. Breed., 26:40-50, 1976.

46. PRING, D.R.; CONDE, M.F. & LEVINGS, C.S. III. DNA heterogeneity within the C group of maize male-sterile cytoplasm. Crop Sci., 20:159-62, 1980.
47. PRING, D.R. & LEVINGS, C.S. III. Heterogeneity of maize cytoplasmic genomes among male-sterile cytoplasm. Genetics, 89:121-36, 1978.
48. RHOADES, M.M. Cytoplasmic inheritance of male sterility in Zea mays. Science, 73:340-1, 1931.
49. ROGERS, J.S. & EDWARDSON, J.R. The utilization of cytoplasmic male-sterile inbreds in the production of corn hybrids. Agron. J., 44:8-13, 1952.
50. SANFORD, J.O.; GROGAN, C.O.; JORDAN, H.V. & SARVELLA, P. A. Influence of male sterility on nitrogen utilization in corn, Zea mays L. Agron. J., 57:580-3, 1965.
51. SARVELLA, P. & GROGAN, C.O. Morphological variations at different stages of growth in normal, cytoplasmic male-sterile, and restored versions of Zea mays L. Crop Sci., 5:235-8, 1965.
52. SARVELLA, P. & GROGAN, C.O. Stem morphology and anatomy in Zea mays as influenced by cytoplasmic male sterility and restorer genes. Can. J. Plant Sci., 56:249-55, 1976.
53. SNEEP, J.; MURTY, B.R. & UTZ, H.F. Current breeding methods. In: Plant breeding perspectives. Wageningen, Centre for Agricultural Publishing and Documentation, 1979. p. 104-233.
54. SNYDER, R.J. & DUVICK, D.N. Chromosomal location of Rf_2 , a restorer gene for cytoplasmic pollen sterile maize. Crop Sci., 9:156-7, 1969.
55. STRICKBERGER, M.W. Genética. Barcelona, Ediciones Omega, 1974. 880 p.
56. VIEGAS, G.P. & MIRANDA F^o, J.B. Milho híbrido. In: Melhoramento e produção de milho no Brasil. Piracicaba, ESALQ, 1978. p. 257-309.

57. VINCENT, G.B. & WOOLEY, D.G. Effect of moisture stress at different stages of growth: II. Cytoplasmic male-sterile corn. Agron. J., 64:599-602, 1972.
58. VOZDA, J. Genetics of the restoration of pollen fertility in the S and M-type of cytoplasmic pollen sterility of maize. Genet. Slechteni, 9:181-9, 1973.
59. WARMKE, H.E. & LEE, S.L.J. Mitochondrial degeneration in Texas cytoplasmic male-sterile corn anthers. J. Hered., 68:213-22, 1977.
60. WARMKE, H.E. & LEE, S.L.J. Pollen abortion in T cytoplasmic male-sterile corn (Zea mays): A suggested mechanism. Science, 200:561-3, 1978.
61. WATRUD, L.S.; HOOKER, A.L. & KOEPPE, D.E. The effects of nuclear restorer genes of Texas male-sterile cytoplasm on host response to Helminthosporium maydis race T. Phytopathol., 65:178-82, 1975.

APÊNDICE

QUADRO 1A - Temperatura (T), Umidade Relativa do Ar (UR), Insolação e Precipitação (PPT) durante o Período I (24/01/83 a 21/02/83)

Data	T (°C)	UR (%)	Insolação (Horas)	PPT (mm)
24/1/83	21,3	87	3,9	6,8
25/1/83	20,5	80	0,9	0,2
26/1/83	21,4	84	3,6	0,0
27/1/83	22,0	82	6,5	0,0
28/1/83	22,1	80	11,5	0,0
29/1/83	22,3	77	10,9	0,0
30/1/83	21,8	79	11,0	0,0
31/1/83	22,4	80	6,8	0,0
01/2/83	21,2	76	0,3	0,2
02/2/83	20,9	89	0,0	19,0
03/2/83	19,8	92	0,0	1,7
04/2/83	22,5	85	5,6	0,0
05/2/83	22,8	86	6,3	5,6
06/2/83	22,6	84	4,3	0,0
07/2/83	22,1	83	5,0	0,0
08/2/83	21,7	86	1,4	18,7
09/2/83	20,6	88	0,2	7,4
10/2/83	21,2	95	0,0	50,0
11/2/83	22,8	85	4,4	0,3
12/2/83	23,8	83	7,3	39,0
13/2/83	22,6	86	2,7	0,7
14/2/83	24,1	77	8,0	0,0
15/2/83	22,0	82	8,3	0,0
16/2/83	21,8	80	11,6	0,0
17/2/83	23,2	79	11,5	0,2
18/2/83	23,0	84	6,3	0,1
19/2/83	22,5	86	6,0	7,6
20/2/83	21,6	84	4,6	7,0
21/2/83	22,7	81	7,2	4,8
Média	22,05	83,45	5,38	5,83
Desvio-Padrão	±0,95	±4,31	±3,69	±11,76

QUADRO 2A - Temperatura (T), Umidade Relativa do Ar (UR),
Insolação e Precipitação (PPT) durante o Período 2 (28/12/83 a 30/01/84)

Data	T (°C)	UR (%)	Insolação (Horas)	PPT (mm)
28/12/83	21,3	81	3,7	10,4
29/12/83	21,5	82	5,2	0,0
30/12/83	22,2	75	9,8	0,0
31/12/83	21,8	74	9,5	0,0
01/01/84	21,8	76	9,4	0,0
02/01/84	22,2	71	9,2	0,2
03/01/84	22,4	72	11,6	0,0
04/01/84	23,5	74	10,8	0,0
05/01/84	23,7	73	6,6	5,1
06/01/84	22,6	87	6,8	3,2
07/01/84	23,3	81	10,4	0,0
08/01/84	22,8	83	4,8	0,0
09/01/84	22,6	78	9,5	0,0
10/01/84	22,9	78	11,8	0,0
11/01/84	23,3	71	9,8	0,0
12/01/84	23,2	58	12,3	0,0
13/01/84	23,6	60	12,2	0,0
14/01/84	22,5	57	12,1	0,0
15/01/84	24,3	59	12,3	0,0
16/01/84	23,7	66	12,2	0,0
17/01/84	23,3	70	10,4	7,4
18/01/84	23,3	77	10,2	4,0
19/01/84	23,7	76	11,8	0,0
20/01/84	23,5	84	7,6	0,2
21/01/84	21,6	88	1,6	0,0
22/01/84	22,7	93	5,2	33,0
23/01/84	20,0	90	0,0	8,1
24/01/84	20,9	85	2,5	18,3
25/01/84	20,9	87	1,6	3,2
26/01/84	21,3	88	2,5	5,8
27/01/84	21,1	83	6,0	9,1
28/01/84	23,4	77	5,5	0,0
29/01/84	22,5	75	9,3	0,0
30/01/84	22,5	79	11,9	0,0
Média	22,53	76,71	8,12	3,18
Desvio-Padrão	± 1,00	± 9,67	± 3,64	± 6,62

QUADRO 3A - Temperatura (T), Umidade Relativa do Ar (UR), Insolação e Precipitação (PPT) durante o Período 3 (29/12/85 a 15/01/86)

Data	T (°C)	UR (%)	Insolação (Horas)	PPT (mm)
29/12/85	19,9	91	0,0	2,9
30/12/85	20,8	90	2,3	0,4
31/12/85	22,1	85	3,3	184,8
01/01/86	21,0	92	1,7	8,2
02/01/86	22,3	87	5,7	9,4
03/01/86	21,0	76	10,4	0,0
04/01/86	21,5	83	7,3	0,0
05/01/86	22,5	93	0,9	6,5
06/01/86	21,1	86	0,2	0,0
07/01/86	20,7	85	1,2	18,5
08/01/86	21,0	94	0,0	30,0
09/01/86	21,7	90	2,2	4,4
10/01/86	22,7	89	2,0	0,1
11/01/86	22,3	86	4,7	1,2
12/01/86	22,9	82	4,9	16,0
13/01/86	22,6	87	3,4	7,9
14/01/86	21,3	86	0,9	2,8
15/01/86	21,2	87	0,8	0,0
Média	21,60	85,76	4,23	5,16
Desvio-Padrão	±0,84	±5,04	±3,88	±7,68

QUADRO 4A - Temperatura (T), Umidade Relativa do Ar (UR),
Insolação e Precipitação (PPT) durante o Período 4 (01/12/86 a 14/12/86)

Data	T (°C)	UR (%)	Insolação (Horas)	PPT (mm)
01/12/86	22,1	82	0,2	1,3
02/12/86	23,2	59	3,2	0,0
03/12/86	25,2	73	9,1	0,0
04/12/86	25,9	63	9,6	0,0
05/12/86	25,7	66	10,6	0,0
06/12/86	24,4	76	7,2	1,4
07/12/86	22,9	89	6,1	10,7
08/12/86	22,9	82	3,7	5,6
09/12/86	21,3	90	0,2	9,8
10/12/86	22,1	89	3,8	1,0
11/12/86	22,6	82	7,3	55,8
12/12/86	23,1	79	5,5	0,0
13/12/86	23,2	79	8,2	15,8
14/12/86	21,9	94	1,7	10,4
Média	23,32	78,79	5,46	7,99
Desvio-Padrão	±1,39	±10,15	±3,29	±14,21

QUADRO 5A - Número de Folhas, Acima e Abaixo da Primeira Espiga, de Plantas MF e ME, Oriundas do RC₁ de Híbridos MF(264ME-C x 964MF) com a Linhagem 264 ME-C

N.º de Folhas Acima da 1.ª Espiga		N.º de Folhas Abaixo da 1.ª Espiga	
MF	ME	MF	ME
4	5	9	9
5	6	7	7
5	5	9	10
4	6	10	7
5	5	9	10
5	6	9	9
5	6	8	10
5	6	8	8
4	6	8	8
5	6	9	9
5	6	7	7
5	5	7	8
4	5	7	7
4	6	8	7
5	6	8	8
5	6	7	9
5	6	8	8
6	6	8	7
6	5	6	9
6	6	7	7
Média	4,90	5,70	7,95
			8,20

QUADRO 6A - Número de Folhas, Acima e Abaixo da Primeira Espiga, de Plantas MF e ME, Oriundas do RC₁ de H₁ híbridos PF₂ (264ME-C x 964MF) com a Linhagem 264 ME-C

N.º de Folhas Acima da 1. ^a Espiga		N.º de Folhas Abaixo da 1. ^a Espiga	
MF	ME	MF	ME
5	5	7	8
5	5	8	7
5	6	7	8
5	6	7	9
6	5	9	7
4	6	8	7
4	5	8	7
3	6	9	7
5	6	8	8
5	6	7	7
Média	4,7	5,6	7,8
			7,5

QUADRO 7A - Número de Folhas, Acima e Abaixo da Primeira Espiga, de Plantas MF e ME, Oriundas do RC₁ de H₁bridos PF₃ (264ME-C x 964MF) com a Linhagem 264ME-C

N.º de Folhas Acima da 1. ^a Espiga		N.º de Folhas Abaixo da 1. ^a Espiga	
MF	ME	MF	ME
6	5	10	6
4	5	7	6
4	6	9	7
3	5	8	10
5	6	9	9
5	5	8	10
4	7	8	9
5	5	7	6
5	5	12	7
6	6	7	8
5	5	8	7
6	6	7	7
5	6	9	9
4	6	8	8
5	5	7	8
5	5	6	8
5	6	9	6
5	5	8	9
5	5	7	7
5	6	7	7
Média	4,85	8,05	7,70

QUADRO 8A - Análise de Variância dos Parâmetros N.º de Folhas, Acima e Abaixo da Primeira Espiga, de Plantas MF e ME, Oriundas do RC₁ do Híbrido MF(264ME-C x 964MF) com a Linhagem 264ME-C

FV	G.L.	QM	
		N.º de Folhas Acima da 1. ^a Espiga	N.º de Folhas Abaixo da 1. ^a Espiga
Tratamentos (MF, ME)	1	6,40 **	0,63
Resíduo	38	0,32	1,11

** Significativo, a 1% de probabilidade, pelo teste F.

QUADRO 9A - Análise de Variância dos Parâmetros N.º de Folhas, Acima e Abaixo da Primeira Espiga, de Plantas MF e ME, Oriundas do RC₁ do Híbrido PF₂ (264ME-C x 964MF) com a Linhagem 264ME-C

FV	G.L.	QM	
		N.º de Folhas Acima da 1. ^a Espiga	N.º de Folhas Abaixo da 1. ^a Espiga
Tratamentos (MF, ME)	1	10,55 **	0,45
Resíduo	18	0,47	0,56

** Significativo, a 1% de probabilidade, pelo teste F.

QUADRO 10A - Análise de Variância dos Parâmetros N.º de Folhas, Acima e Abaixo da Primeira Espiga, de Plantas MF e ME, Oriundas do RC₁ do Híbrido PF₃ (264ME-C x 964MF) com a Linhagem 264ME-C

FV	G.L.	QM	
		N.º de Folhas Acima da 1. ^a Espiga	N.º de Folhas Abaixo da 1. ^a Espiga
Tratamentos (MF, ME)	1	4,22 **	1,22
Resíduo	38	0,46	1,77

** Significativo, a 1% de probabilidade, pelo teste F.

QUADRO 11A - Análise de Variância dos Dados do Quadro 13, para as Classes MF, PF e ME, em Dois Anos

F.V.	G.L.	QM		
		MF	PF	ME
Anos	1	112,75 *	39,32 *	18,9
Resíduo	4	6,77	4,27	16,13

* Significativo, pelo teste F, a 5% de probabilidade.

QUADRO 12A - Análise de Variância dos Dados do Quadro 14, para as Classes MF, PF e ME, em Dois Anos

F.V.	G.L.	QM		
		MF	PF	ME
Anos	1	1815,19 **	880,84 **	200,61
Resíduo	14	64,64	44,19	59,12

** Significativo, pelo teste F, a 1% de probabilidade.

QUADRO 13A - Análise de Variância dos Dados do Quadro 13, para o Agrupamento das Classes MF e PF, em Dois Anos

F.V.	G.L.	QM
		MF
Anos	1	18,90 ^{1/}
Resíduo	4	16,14

^{1/} Não-significativo, pelo teste F, a 5% de probabilidade.

QUADRO 14A - Análise de Variância dos Dados do Quadro 14, para o Agrupamento das Classes MF e PF, em Dois Anos

F.V.	G.L.	QM
		MF
Anos	1	200,65 ^{1/}
Resíduo	14	59,12

^{1/} Não-significativo, pelo teste F, a 5% de probabilidade.

QUADRO 15A - Análise de Variância dos Dados do Quadro 16, para as Classes MF, PF e ME dentro de Cada Família Segregante, Considerando Três Níveis Diferentes de Adubação Nitrogenada

F.V.	G.L.	QM		
		MF	PF	ME
Blocos (Famílias)	1			
Tratamentos	2	0,92 ^{1/}	4,49 ^{1/}	1,63 ^{1/}
Resíduo	2	1,20	1,69	0,215

^{1/} Não-significativo, pelo teste F, a 5% de probabilidade.

QUADRO 16A - Análise de Variância dos Dados do Quadro 17, para as Classes MF, PF e ME dentro de Cada Família Segregante, Considerando Três Níveis Diferentes de Adubação Nitrogenada

F.V.	G.L.	QM		
		MF	PF	ME
Blocos (Famílias)	4			
Tratamentos	2	0,87 ^{1/}	2,56 ^{1/}	4,68 ^{1/}
Resíduo	8	8,78	3,53	5,03

^{1/} Não-significativo, pelo teste F, a 5% de probabilidade.