

Ajuste de Protocolo para Detecção Molecular do Tipo de Macho- Esterilidade Citoplasmática em Milho



**Plantas de Milho com Pendão Estéril
(acima) e Espiguetas com Anteras
Estéreis (abaixo)**

ISSN 1679-0154

Setembro, 2013

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Milho e Sorgo
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 67

Ajuste de Protocolo para Detecção Molecular do Tipo de Macho-Esterilidade Citoplasmática em Milho

Isabel Regina Prazeres de Souza
Samanta Gabriela Medeiros Carvalho
Marcos de Oliveira Pinto
Lauro José Moreira Guimarães
Beatriz de Almeida Barros

Embrapa Milho e Sorgo
Sete Lagoas, MG
2013

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Milho e Sorgo

Rod. MG 424 Km 45

Caixa Postal 151

CEP 35701-970 Sete Lagoas, MG

Fone: (31) 3027-1100

Fax: (31) 3027-1188

Home page: www.cnpms.embrapa.br

E-mail: cnpms.sac@embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: Sidney Netto Parentoni

Secretário-Executivo: Elena Charlotte Landau

Membros: Dagma Dionísia da Silva, Paulo Eduardo de Aquino Ribeiro,

Monica Matoso Campanha, Maria Marta Pastina, Rosângela Lacerda

de Castro e Antonio Claudio da Silva Barros

Revisão de texto: Antonio Claudio da Silva Barros

Normalização bibliográfica: Rosângela Lacerda de Castro

Tratamento de ilustrações: Tânia Mara Assunção Barbosa

Editoração eletrônica: Tânia Mara Assunção Barbosa

Foto(s) da capa: Isabel Regina Prazeres de Souza

1ª edição

1ª impressão (2013): on line

Todos os direitos reservados

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Milho e Sorgo

Ajuste de protocolo para detecção molecular do tipo de macho-esterilidade citoplasmática em milho/ Isabel Regina Prazeres de Souza ... [et al.]. – Sete Lagoas : Embrapa Milho e Sorgo, 2013.

22 p. : il. -- (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Milho e Sorgo, ISSN 1679-0154; 67).

1. Genética molecular. 2. Citoplasma. 3. Genótipo. 4. *Zea mays*. L. Souza, Isabel Regina Prazeres de. II. Série.

CDD 572.8 (21. ed.)

© Embrapa 2013

Sumário

Introdução	4
Material e Métodos	8
Resultados e Discussão	10
Conclusões	16
Referências	17

Ajuste de Protocolo para Detecção Molecular do Tipo de Macho-Esterilidade Citoplasmática em Milho

*Isabel Regina Prazeres de Souza*¹

*Samanta Gabriela Medeiros Carvalho*²

*Marcos de Oliveira Pinto*³

*Lauro José Moreira Guimarães*⁴

*Beatriz de Almeida Barros*⁵

Introdução

A ausência de pólen e a incapacidade da planta em produzir grãos de pólen funcionais são denominadas de macho-esterilidade. A macho-esterilidade pode ser determinada por genes nucleares (macho-esterilidade genética) ou citoplasmáticos (macho-esterilidade genético-citoplasmática, do inglês: *Cytoplasmatic Male Sterility* - CMS). A esterilidade CMS é utilizada com sucesso na produção comercial de sementes híbridas de milho, visando a minimização de custos de produção das sementes e diminuindo danos às plantas advindos da emasculação manual ou mecânica (KAUL, 1988). Neste caso, o despendoamento (remoção do pendão das plantas) é substituído pela característica da macho-esterilidade.

¹Eng.-Agr., PhD. em Plant Science, Pesquisadora da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, isabel.prazeres@embrapa.br

²Graduanda em Ciências Biológicas, Centro Universitário de Sete Lagoas, Sete Lagoas, MG, sagmcarvalho@yahoo.com.br

³Bioquímico, Dr. em Genética e Melhoramento, Analista da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, marcos.deoliveira@embrapa.br

⁴Eng.-Agr., Dr. em Genética e Melhoramento, Pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, lauro.guimaraes@embrapa.br

⁵Bióloga, Dra em Genética e Melhoramento, Analista da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, beatriz.barros@embrapa.br

Autor correspondente, E-mail: isabel.prazeres@embrapa.br

Isto reduz a possibilidade de autopolinização e os custos com mão de obra na produção de sementes híbridas, evitando os problemas verificados com a emasculação mecânica ou manual (KAUL, 1988). No caso do milho, o custo da produção de sementes por meio de CMS pode ser reduzido em 2% (mencionado em KOHLS, 2010, como comunicação pessoal de W. Schmidt, 2008). Embora não se tenham dados oficiais no Brasil do uso atual de CMS na produção de sementes híbridas de milho, espera-se que este procedimento se amplie, uma vez que reduz custos por meio da diminuição da mão de obra utilizada no despendoamento, além de proporcionar maior segurança para a minimização da probabilidade de contaminação com pólen da linhagem fêmea no campo de produção.

Existem três tipos principais de citoplasma que induzem a macho-esterilidade em milho: citoplasma T (ou citoplasma Texas) (ROGERS; EDWARDSON, 1952), citoplasma S (USDA) (JONES; MANGLES DORF, 1957) e citoplasma C (Charrua) (BECKETT, 1971).

Nos anos de 1950 e 1960, o CMS-T foi utilizado extensivamente nos Estados Unidos por causa da sua estabilidade e da facilidade em encontrar genótipos restauradores apropriados. Entretanto, na década de 70, o CMS-T apresentou susceptibilidade específica ao fungo *Bipolaris maydis* raça T (ULLSTRUP, 1972). A epidemia por esse patógeno levou ao uso imediato de citoplasma normal e/ou citoplasmas S e C (WEIDER et al., 2009).

Os três tipos de CMS podem ser diferenciados por meio de genes nucleares, que revertem a esterilidade. Linhagens

testadoras contendo genes nucleares restauradores da fertilidade (*Rf*) são tradicionalmente usadas para identificar e classificar o tipo de CMS (BECKETT, 1971). Entretanto, estes testes envolvem cruzamentos que consomem tempo e mão de obra. O efeito conjunto de dois genes, *Rf1* e *Rf2* (DUVICK, 1966), é essencial para a restauração da fertilidade do CMS-T. Um único gene de efeito maior (*Rf3*) é requerido para fertilidade do pólen no sistema-S (DUVICK, 1966), enquanto *Rf4*, *Rf5* e *Rf6* estão envolvidos na restauração da fertilidade no tipo-C. Estes genes agem de forma complementar, e a restauração do tipo C ocorre não somente na presença dos três genes (*Rf4*, *Rf5* e *Rf6*) mas também de dois genes, *Rf4* e *Rf5* ou *Rf4* e *Rf6* (SOUZA, 1988; SOUZA; SARAIVA, 1989).

Mutações específicas no DNA mitocondrial (mtDNA), materno herdado, são responsáveis pela disfunção no metabolismo respiratório que condicionam fenótipos deletérios (CHASE, 2007). A macho-esterilidade é induzida por estas mutações, condicionando a ruptura no desenvolvimento do pólen funcional (SCHNABLE; WISE, 1998). A fertilidade feminina não é afetada e as plantas podem produzir sementes se receberem pólen viável (LAUGHNAN; GABAY-LAUGHNAN, 1983). A característica de macho-esterilidade é herdada materno e pode ser compensada por genes nucleares restauradores da fertilidade. Características únicas da mitocôndria, principalmente a estrutura do genoma e padrões de expressão gênica, foram identificados e utilizados em milho para distinguir os três maiores tipos de citoplasma (LEVINGS; PRING, 1976; FORDE et al., 1978). Estas características, exclusivas de regiões quiméricas do mtDNA, foram utilizadas para o desenvolvimento de diferentes marcadores moleculares. Dentre estes, temos: a quimera no gene *T-urf13* detectada no

mtDNA CMS-T (DEWEY et al., 1986); a quimera na região *atp6/atp9* no mtDNA do CMS-C (DEWEY et al., 1991) e uma região "R" repetida contendo duas ORFs quiméricas, ORF355 e ORF77, no mtDNA do CMS-S (ZABALA et al., 1997).

O conhecimento sobre a estrutura molecular e mecanismos que conferem CMS contribuem consideravelmente para a utilização de técnicas moleculares (LIU et al., 2002). Recentemente, a utilização de marcadores baseados em PCR foi sugerida para a identificação rápida, com custo relativamente baixo e confiável para classificação molecular dos três principais tipos de CMS (T, C e S) (SATO, 1998; NAKAJIMA et al., 1999). Liu et al. (2002) desenvolveram uma PCR multiplex, que combina, em uma única reação, três pares de *primers* específicos para cada um dos CMS. Os padrões de amplificação apresentaram fragmentos específicos de mtDNA de 398, 440 e 799 pares de base (pb) que correspondem, respectivamente, aos tipos de citoplasma C, T e S. Não houve amplificação de fragmento de mtDNA no tipo de citoplasma N (normal) porque não existe um DNA característico como nos CMS .

A técnica de PCR em multiplex, por ser um método simples, rápido e confiável, pode ser utilizada para seleção, em larga escala, de acessos de milho com CMS provenientes de bancos de germoplasma (DRINIC et al., 2012). Isso reduz para poucas semanas o tempo de caracterização do citoplasma que, tradicionalmente, demoraria anos. Indiretamente, isto também contribui para o processo de pré-melhoramento quando determinado tipo de CMS é requerido com a finalidade de produção comercial de milho híbrido. Face ao exposto, a técnica foi testada no laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Milho e Sorgo, em diferentes genótipos de milho com

o tipo de citoplasma previamente identificado. Entretanto, no decorrer das análises, verificou-se a necessidade de otimizações nas condições da reação de PCR na identificação do tipo de CMS-C, de forma a torná-la mais estrigente. Assim, o objetivo deste trabalho foi otimizar uma metodologia já existente para identificação e classificação de genótipos de milho quanto ao tipo de citoplasma macho-estéril.

Material e Métodos

Material Vegetal

Foram utilizados genótipos de milho, pertencentes à Embrapa Milho e Sorgo, como controle do tipo de citoplasma: N – genótipos com tipo de citoplasma normal (L18-1-N); C – genótipos com CMS-C (108-1-C, 109-3-C, 110-1-C, 110-2-C, 110-3-C); S – genótipos com CMS-S (111-1-S, 111-2-S, 111-3-S, 112-1-S e 123-1-S). Após o processo de otimização, foram realizadas reações de PCR em uma amostra de híbridos comerciais de milho denominados pela letra H, seguido de número identificador.

Extração de DNA

A extração de DNA nos controles foi realizada em sementes individuais seguindo o protocolo proposto por Maoteng et al. (2007). Nos híbridos, optou-se pela extração de DNA em *bulk* de folhas coletas de cinco plântulas de cada genótipo (LANA et al., 2010). A qualidade do DNA foi verificada em gel de agarose 1% (p/v) e a quantificação foi obtida por meio de leitura no equipamento *NanoDrop* (*Thermo Scientific, Wilmington, USA*).

Reações de PCR com *Primers* Específicos para Identificação do Tipo de Citoplasma Macho-Estéril (CMS)

Para as reações de PCR foram utilizados os *primers* (Tabela 1) e condições de amplificação descritos por Liu et al. (2002), com pequenas modificações: i) Foi utilizada a enzima comercial *Taq DNA polimerase Recombinant* (Invitrogen); ii) Não foi utilizado o aditivo *TaqMaster* (Brinkmann Instruments BioSystems Division, Westbury, NY); iii) As reações foram realizadas sempre em simplex para verificar a especificidade de cada reação. O produto de amplificação foi separado em gel de agarose 1,4% e revelado com GelRed 1:100 (Biotium).

Tabela 1. *Primers* descritos por Liu et al. (2002) e utilizados nas reações de PCR para identificação dos tipos de citoplasma macho-estéreis: T, C e S.

Nome do <i>Primer</i>	Sequência do <i>primer</i> 5` - 3`
CMSTF	5`-CATGAAATGGGTGAAGTCTCTTTC-3`
CMSTR	5`-AAGAGAAAGGGAGACTTTGGTCCC-3`
CMSCF	5`-ATGCTAATGGTGTTCGATTCC-3`
CMSCR	5`-AGCATCATCCACATTGCTAG-3`
CMSSF	5`-CAACTTATTACGAGGCTGATGC-3`
CMSSR	5`-AGTTCGTCCCATATAACCCGTAC-3`

Sequenciamento dos Fragmentos Amplificados

Os fragmentos amplificados foram purificados de gel de agarose 1% (p/v) utilizando-se o QIAquick Gel Extraction Kit

(Qiagen) de acordo com as recomendações do fabricante. O sequenciamento foi feito com o BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Life Technologies) em sequenciador automático ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Life Technologies). As sequências obtidas foram editadas utilizando o software Sequencher v 4.1.4 e suas identidades foram verificadas por meio de comparações com sequências disponíveis no *GenBank* (NCBI) utilizando-se o algoritmo BLAST.

Resultados e Discussão

Inicialmente avaliou-se o perfil de amplificação obtido a partir de reações de PCR utilizando *primers* específicos para cada tipo de CMS (S, T e C). Os genótipos 123-1-S, 108-1-C e L18-1-N foram utilizados como controles positivos para CMS S, C e Normal, respectivamente (Figura 1).

A reação para identificação do CMS-S apresentou o amplicon esperado de 799 pb no controle S. A reação com o *primer* para identificação de CMS-T não apresentou amplificação nos controles C e S testados (gel não apresentado). Não nos foi possível fazer os testes em um genótipo controle para CMS-T já que todos os genótipos foram descontinuados por causa da susceptibilidade a *Bipolaris maydis* raça T. Entretanto, é importante que se mantenha o teste para identificação do tipo de citoplasma T, pois caso seja identificado algum genótipo portador dele, este não deverá ser utilizado no desenvolvimento de híbridos.

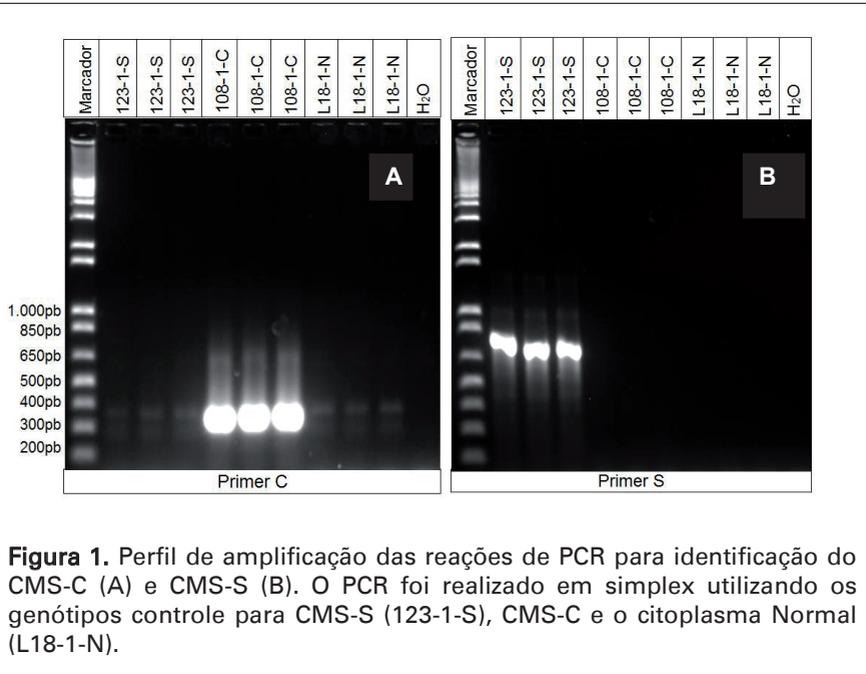


Figura 1. Perfil de amplificação das reações de PCR para identificação do CMS-C (A) e CMS-S (B). O PCR foi realizado em simplex utilizando os genótipos controle para CMS-S (123-1-S), CMS-C e o citoplasma Normal (L18-1-N).

A partir da análise inicial, verificou-se que as reações de PCR empregando-se os *primers* específicos para identificação do CMS-C estavam apresentando a amplificação de bandas inespecíficas mais fracas, nos controles N e S, (Figura 1A). O mesmo resultado foi observado com o uso de outros controles para CMS-S (111-1-S, 111-2-S, 111-3-S e 112-1-S) (Figura 2). Dessa forma, a utilização da reação nessas condições poderia levar à obtenção de resultados não conclusivos quanto ao tipo de citoplasma quando fosse realizada para identificação do tipo de citoplasma em híbridos.

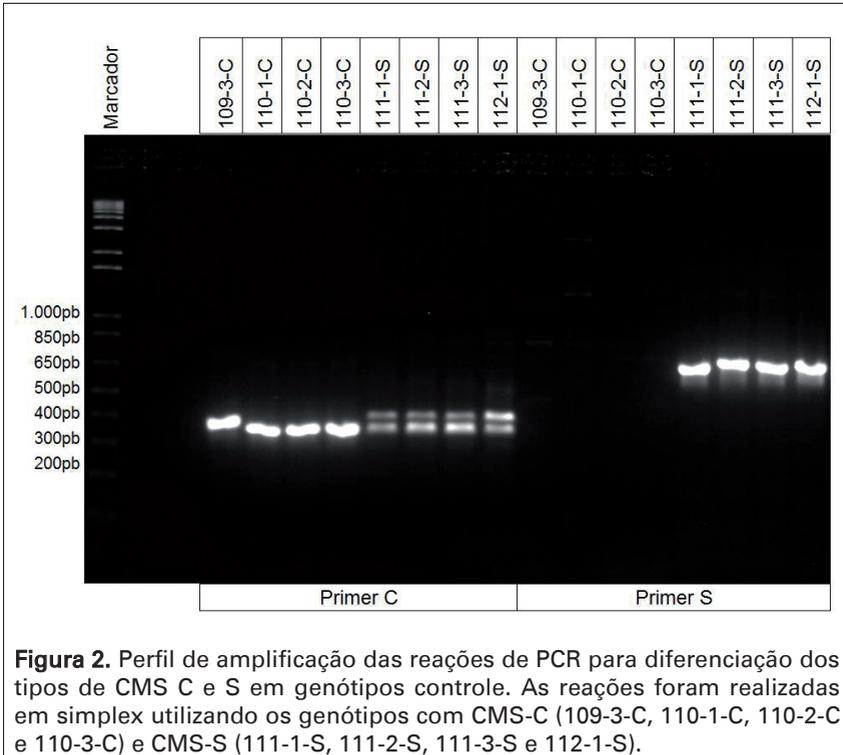


Figura 2. Perfil de amplificação das reações de PCR para diferenciação dos tipos de CMS C e S em genótipos controle. As reações foram realizadas em simplex utilizando os genótipos com CMS-C (109-3-C, 110-1-C, 110-2-C e 110-3-C) e CMS-S (111-1-S, 111-2-S, 111-3-S e 112-1-S).

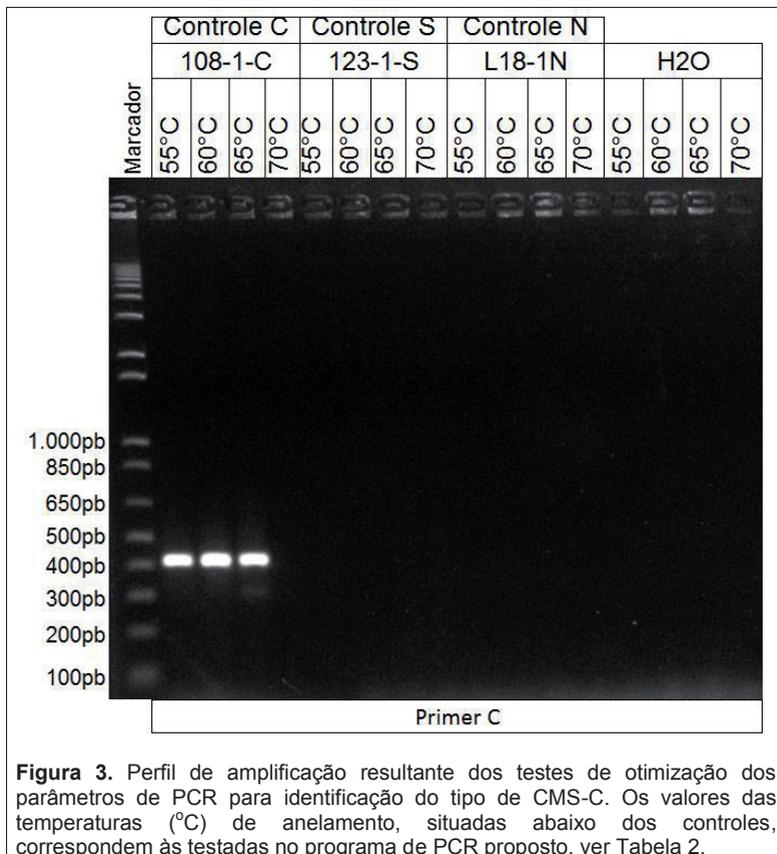
A amplificação de bandas inespecíficas nos controles de CMS-S e CMS-N, quando da utilização do *primer C*, talvez possa ter sido ocasionada pela não utilização do aditivo “TaqMaster” nas reações de PCR. Outros fatores podem influenciar na especificidade da *taq* DNA polimerase na reação de PCR, dentre os quais se destacam a concentração da enzima e os parâmetros de ciclagem utilizados nas reações de PCR (PHONEUTRIA BIOTECNOLOGIA E SERVIÇOS, 2013).

Dessa forma, optou-se pela otimização da PCR para o ensaio de identificação de CMS-C a partir do protocolo proposto por Liu et al. (2002). As modificações testadas foram redução na

concentração de *Taq* DNA polimerase de 1,0 U para 0,5 U por reação, e ajustes nos parâmetros de ciclagem: i) Redução do número de ciclos de 40 para 25; ii) Redução do tempo de anelamento do *primer* de 1 min para 20 s; iii) Redução do tempo de extensão de 1 min e 50 s para 30 s. Além disso, foi verificado o perfil de amplificação desse par de *primers* em quatro diferentes temperaturas de anelamento: 55 °C, 60 °C, 65 °C e 70 °C (Tabela 2 e Figura 3).

Tabela 2. Temperaturas testadas nas condições de PCR utilizadas por Liu et al. (2002), e no protocolo modificado para identificação do tipo de CMS-C.

Etapa do PCR	Liu et al. (2002)	Protocolo modificado
Desnaturação inicial	94 °C por 2 min	94 °C por 2 min
Nº de ciclos	40	25
Desnaturação	94 °C por 1 min	94 ° por 1 min
Anelamento do <i>primer</i>	55 °C por 1 min	i) 55 °C por 20 s ii) 60 °C por 20 s iii) 65 °C por 20 s iv) 70 °C por 20 s
Extensão	72 °C por 1 min e 50 s	72 °C por 30 s
Extensão final	72 °C por 5 min	72 °C por 5 min



Maior acurácia é obtida otimizando a temperatura de anelamento através do gradiente de temperatura (BIORAD BRASIL, 2013). Entretanto, com menor temperatura de anelamento, aumenta a probabilidade de amplificação inespecífica (PROTOCOLO ONLINE..., 2013). A partir dessas modificações, foi possível tornar a reação altamente específica, permitindo a obtenção de apenas um amplicon de 398 pb somente no controle C (Figura 3). Reações de PCR com maior temperatura de anelamento favorecem

a amplificação de amplicon específico. Dessa forma, optou-se pela utilização da temperatura de 65 °C para a realização dos ensaios de identificação do tipo de CMS-C. A partir destes dados, optou-se pela utilização da reação de PCR simplex, uma vez que a temperatura de otimização de anelamento do *primer C* passou a ser diferente da do *primer S*. Manteve-se a reação de PCR otimizada por Liu et al. (2002) para identificação do tipo de CMS-S, pois sua utilização resultava somente no amplicon esperado de 798 pb.

A confirmação da especificidade da reação de PCR para a identificação dos tipos de CMS-C e CMS-S foi realizada a partir do sequenciamento dos amplicons obtidos nas reações de PCR, fragmentos de 398 pb e 799 pb, respectivamente. O *blast* das sequências obtidas contra o banco de dados do NCBI (*Genbank*) identificou elevada identidade com o mtDNA contendo as quimeras dos tipos de citoplasma C e S. A identidade do amplicon resultante do CMS-C foi de 95%, com cobertura de 292/306 bases, com a sequência depositada sob número DQ6455361 de "*Zea mays* subsp. *Mays* genotype CMS-C mitochondrion". A identidade do amplicon resultante do CMS-S foi de 99%, com cobertura de 751/757 pb, com a sequência depositada sob número HM122424.1 de "*Zea mays* cultivar inbred line Mo17 ORF355 and ORF17 mRNAs, complete cds; mitochondrial". Os dados do sequenciamento confirmaram que os primers empregados nas reações de PCR para identificação dos tipos de citoplasma C e S, associados às concentrações de reagentes e aos parâmetros de ciclagem empregados, foram adequados e específicos para obtenção dos respectivos amplicons.

Referências

BECKETT, J. B. Classification of male-sterile cytoplasms in maize (*Zea mays* L.). **Crop Science**, Madison, v. 11, p. 724-727, 1971.

BIORAD BRASIL. **PCR Troubleshooting**. Disponível em: <<http://www.bio-rad.com/pt-br/applications-technologies/pcr-troubleshooting>>. Acesso em: 16 jul. 2013.

CHASE, C. D. Cytoplasmic male sterility: a window to the world of plant mitochondrial-nuclear interactions. **Trends in Genetics**, Amsterdam, v. 23, p. 81-90, 2007.

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

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

DRINIC, S. M.; ANDJELKOVIC, V.; MICIC, D. I. Genetic diversity of maize landraces as sources of favorable traits, the molecular basis of plant genetic diversity. In: CALISKAN, M. (Ed.). **The molecular basis of plant genetic diversity**. Rijeka: InTech, 2012. Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/the-molecular-basis-of-plant-genetic-diversity/genetic-diversity-of-maizelandraces-as-sources-of-favorable-traits>>. Acesso em: 28 maio 2013.

DUVICK, D. N. Cytoplasmic pollen sterility in corn. In: CASPARI, E. W. (Ed.). **Advances in genetics**. New York: Academic Press, 1966. p. 1-56.

FORDE, B. G.; OLIVER, R. J. C.; LEAVER, C. J. Variation in mitochondrial translation products associated with male-sterile cytoplasms in maize. **Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America**, Washington, v. 75, p. 3841-3845, 1978.

JONES, D.; MANGLESDORF, P. **The production of hybrid seed corn without detasseling**. New Haves: Connecticut Agricultural Experiment Station, 1957. (CAES. Bulletin, 550).

KAUL, M. **Male sterility in higher plants**. Berlin: Springer-Verlag, 1988.

KOHL, S. **Unraveling genetic factors controlling the restoration of fertility of C-type cytoplasmic male sterility in maize**. 2010. Thesis (Doctor of Sciences) - ETH Zurich, Zurich

LANA, U. G. de P.; GOMES, P. C.; TINOCO, C. F. da S.; OLIVEIRA, B. C. F. S.; GUIMARAES, C. T.; MAGALHAES, J. V. de; OLIVEIRA, B. C. F. S. **Procedimento da Embrapa Milho e Sorgo para extração de DNA de tecido vegetal em larga escala**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2010. 19 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Documentos, 104).

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

LEVINGS, C. S. III; PRING, D. R. Restriction endonuclease analysis of mitochondrial DNA from normal and Texas cytoplasmic male sterile maize. **Science**, Washington, v. 193, p. 158-160, 1976.

LIU, Z. Y.; PETER, S. O.; LONG, M. H.; WEINGARTNER, U.; STAMP, P.; KAESER, O. A PCR assay for rapid discrimination of sterile cytoplasm types in maize. **Crop Science**, Madison, v. 42, p. 566-569, 2002.

MAOTENG, L.; JIANMIN, L.; ZHANGYI, PEI W.; LU, G.; LONGJIANG, Y. A simple DNA extraction method for PCR amplification from dry seeds of *Brassica napus*. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 10, n. 7, p. 1122-1125, 2007.

NAKAJIMA, Y.; YAMAMOTO, T.; MURANAKA, T.; OEDA, K. Genetic variation of petalord male-sterile cytoplasm of carrots revealed by sequence-tagged sites (STSs). **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 99, p. 837-843, 1999.

PHONEUTRIA BIOTECNOLOGIA E SERVIÇOS. **Kit para calibração de PCR pht**. Disponível em: <<http://phoneutria.com.br/site2/wp-content/uploads/2012/09/Kit-para-calibra%C3%A7%C3%A3o-de-PCR-dNTP.pdf>>. Acesso em: 09 jul. 2013.

PROTOCOLO ONLINE: your lab's reference book. **Primers annealing temperature**. Disponível em: <<http://www.protocol-online.org/biology-forums-2/posts/10841.html>>. Acesso em: 16 jul. 2013.

ROGERS, J. S.; EDWARDSON, J. R. The utilization of cytoplasmic male-sterile inbreds in the production of corn hybrids.

Agronomy Journal, Madison, v. 44, p. 8-13, 1952.

SATO, Y. PCR amplification of CMS-specific mitochondrial nucleotide sequences to identify cytoplasmic genotypes of onion (*Allium cepa* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 96, p. 367-370, 1998.

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

SOUZA, I. R. P. de. **Análise genética da restauração da fertilidade em milho (*Zea mays* L.) com macho-esterilidade citoplasmática tipo C**. 1988. 83 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

SOUZA, I. R. P.; SARAIVA, L. S. Análise genética da restauração da fertilidade em milho (*Zea mays* L.) com citoplasma macho-estéril do tipo C. **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, v. 12, n. 2, p. 303-312, 1989.

ULLSTRUP, A. J. The impacts of the Southern Corn Leaf Blight epidemics of 1970-1971. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 10, p. 37-50, 1972.

WEIDER, C.; STAMP, P.; CHRISTOV, N.; HUSKEN, A.; FOUEILLASSAR, X.; CAMP, K. H.; MUNSCH, M. Stability of cytoplasmic male sterility in maize under different environmental conditions. **Crop Science**, Madison, v. 49, p. 77-84, 2009.

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

Embrapa

Milho e Sorgo

CGPE 10791



Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento

