

Uso da macho-esterilidade no melhoramento de híbridos comerciais em arroz

Use of male sterility in the breeding of commercial rice hybrids

Jefferson Luís Meirelles Coimbra¹, Juliano Garcia Bertoldo², Naine Martins do Vale²

Recebido em 17/07/2007; aprovado em 11/07/2008.

RESUMO

Com o rápido crescimento populacional, há a necessidade de um incremento dos atuais níveis de produtividade do arroz para satisfazer a necessidade das 8,9 bilhões de pessoas no planeta estimadas para 2010. Nos últimos 30 anos, a população dos países asiáticos, onde mais de 90% da produção mundial de arroz é efetivada e consumida, aumentou cerca de 30%. Felizmente, a produção de arroz nestes países dobrou devido à utilização de cultivares do tipo moderno e de cultivares de arroz híbrido com alto potencial produtivo. Esta revisão bibliográfica objetivou reunir temas de grande relevância para lograr êxito tanto em programas de melhoramento quanto no sistema de cultivo de arroz híbrido no Brasil. São discutidos temas como o melhoramento para o sistema três linhas e duas linhas, macho-esterilidade genética citoplasmática, macho-esterilidade causada pelo ambiente, genes restauradores e as vantagens e desvantagens particulares de cada método de modo prático e aplicado.

PALAVRAS-CHAVE: *Oryza sativa* L., rendimento, heterose.

SUMMARY

With the fast increase in plant population, there is a need to enhance current rice productivity levels to feed the 8.9 billion people estimated to live on earth by 2010. During the last 30 years, the population of Asian countries that grow and consume more than 90% of rice world production increased nearly 30%.

Fortunately, rice production on these countries doubled in the same period due to the use of modern cultivars and hybrids with high grain yield potential. This review aimed to discuss important issues to the future of breeding programs and the development of rice hybrids. It discusses subjects such as breeding for the three lines and two-line systems, genetic cytoplasmic male sterility, male sterility caused by the environment, restoring genes and the advantages and disadvantages inherent to each method.

KEY WORDS: *Oryza sativa* L., yield, heterosis.

INTRODUÇÃO

O arroz está entre os cereais mais cultivados do mundo. De acordo com dados da FAO (2007), divulgados em 2006, entre os continentes, a Ásia é o maior produtor mundial (90,5%), seguido das Américas (5,9%), África (3,0%), Europa (0,5%) e Oceania (0,1%). O Brasil é o nono produtor mundial de arroz e o primeiro fora do continente asiático. Só na China, no ano de 2006 foram produzidas cerca de 6.300 kgha⁻¹ (FAO, 2007).

Nos últimos 30 anos a população da Ásia, entre os países que cultivam arroz, onde mais de 90% da produção mundial de arroz é produzido e consumido, tem aumentado perto de 60%; felizmente, a produção de arroz nestes países dobrou devido aos cultivares do tipo moderno e, principalmente devido aos cultivares de arroz híbrido de alto potencial produtivo (LI e YUAN, 2000). O cultivo comercial de híbridos de arroz é uma realidade na China desde 1976, ano em que foram plantados os primeiros

¹ Departamento de Agronomia, Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC). Avenida Luiz de Camões, 2090. Bairro Conta Dinheiro. Lages, SC. CEP88520-000. E-mail: coimbrajefferson@cav.udesc.br.

² Acadêmicos do curso de Agronomia, Universidade do Estado de Santa Catarina.

150.000 ha (YUAN e VIRMANI, 1988). Segundo Coimbra et al. (2006), a produção comercial de arroz híbrido na China representa uma das maiores realizações para o melhoramento de plantas do último século. Ainda de acordo com Alcochete (2005), nos últimos 25 anos a tecnologia de híbridos em arroz tem contribuído significativamente para a segurança alimentar, proteção ambiental, e redução de desemprego em países como a China.

O arroz é uma planta autógama, que exige a utilização efetiva do sistema de macho-esterilidade para desenvolver e produzir híbridos F_1 em escala comercial. O método mais popular é o sistema de três linhas (A, B e R) utilizado no melhoramento de arroz híbrido em qualquer parte do mundo; apesar do sistema de macho-esterilidade causado pelo ambiente (sistema de duas linhas) estar aumentando, em virtude da comprovação de sua utilidade para a produção de híbridos de arroz. O sistema de duas linhas vem crescendo em razão da sua eficácia para incrementar o nível de heterose, por exemplo, permite a utilização de genitores *indica-japonica* para formar o híbrido comercial sem a necessidade de possuir genes restauradores da fertilidade, comparativamente ao sistema de três linhas onde os genes restauradores (Rf) são fundamentais. Finalmente, o sistema de uma linha (apomixia), é a última ferramenta utilizada pelos melhoristas de híbridos com uma heterose permanentemente fixa. Segundo Dall'AgnoI e Schifino-Wittmann (2005), com o progresso sobre o conhecimento da genética do fenômeno, a apomixia passou a ser o centro de atenção para os biólogos reprodutivos assim como para a indústria de sementes. Ainda de acordo com os autores, a partir da identificação de alguns indivíduos de reprodução sexual, os quais podem ser uma grande fonte de variabilidade, os apomíticos passaram a ser considerados como potencialmente importantes na história evolutiva das plantas e muito importantes para o melhoramento, já que a manipulação da apomixia pode ser uma ferramenta importantíssima para o melhorista.

Desta forma, devido a importância econômica e para o melhoramento de plantas, esta revisão tem por objetivo discutir a utilização da macho-esterilidade genética citoplasmática, macho-esterilidade genética causada pela sensibilidade a diferentes ambientes e

finalmente a apomixia aplicadas no melhoramento de arroz híbrido, apresentando suas vantagens e desvantagens e abordando as possibilidades de manipulação desta tecnologia no melhoramento genético de arroz híbrido.

SISTEMAS DE PRODUÇÃO DE HÍBRIDOS EM ARROZ

A. Sistemas de produção: três linhas, duas e uma

linha: (1) sistema três-linhas: Atualmente, a grande maioria dos híbridos de arroz comercial aplica o sistema de três linhas, com a utilização da heterose intercultivares. De acordo com Srivastava (2000), o sistema macho-estéril mais utilizado em programas de desenvolvimento de híbridos de arroz é o sistema de três linhagens que utiliza linhagens macho-esteréis citoplasmático. Os melhoristas estão tentando transferir gene (s) de ampla compatibilidade para as linhas genitoras A, B e R. Alguns programas de arroz híbrido inter-subespecífico e intra-subespecífico utilizam o sistema de três linhas com grande êxito na China. Segundo Alcochete (2005) comercialmente a heterose tem sido explorada na produção de híbridos de arroz resultantes de cruzamentos intra-subespecíficos, tais como *indica* × *indica* e *japonica* × *japonica*, e muito raramente interespecíficos. Bons híbridos têm um potencial de produtividade de 15-20% maior do que a melhor variedade autofecundada cultivada sob condições similares (SRIVASTAVA, 2000).

Assim, o melhoramento e a produção de sementes híbridas são bastante complicados, trabalhosos e onerosos. Provavelmente o sistema de três linhas pode ser substituído por um sistema menos complicado (LI e YUAN, 2000); (2) sistema duas-linhas: há duas técnicas que são utilizadas: emasculação química e o sistema T(P)GMS. A emasculação química de plantas foi noticiada próximo ao ano de 1950 na China, começando sua utilização para produção de arroz híbrido no ano de 1970. Alguns híbridos com alto potencial de rendimento de grãos foram lançados com sucesso com base nesta técnica, por exemplo, o '*Gan-Hua 2*'. O sistema T(P)GMS (thermo-sensitive genic male sterility) refere-se a macho-esterilidade genética causada pelo ambiente. O Sistema Gênico de Macho-Esterilidade Termo-sensível (TGMS) de arroz é o sistema em que

a fertilidade do pólen nas plantas é influenciada pelas flutuações de temperatura que ocorrem no ambiente de cultivo da espécie (ALCOCHETE, 2005). As linhas T(P)GMS podem ser utilizadas para multiplicação e produção de sementes F_1 sob diferentes temperaturas e/ou comprimento do dia. Segundo Zhang et al. (1992), o conhecimento da macho-esterilidade genética causada pelo ambiente tem contribuído para obtenção de linhas macho-estéreis sob baixas temperaturas, abrindo novas perspectivas para a exploração de híbridos de arroz. O arroz TGMS é usado na produção de híbridos do arroz na China e em alguns países asiáticos do Sul (DONG et al., 2000). O sistema T(P)GMS tem sido explorado comercialmente só em arroz devido ao trabalho pioneiro dos chineses (VIRMANI et al., 2003). Este sistema é controlado essencialmente por genes nucleares e assim não, tem nenhum efeito negativo do citoplasma e nenhum risco de quebra unilateral do mesmo. Destarte, há mais oportunidades para desenvolver híbridos de arroz com alto potencial produtivo utilizando o sistema T(P)GMS, comparativamente ao sistema de três linhas. A omissão da linha B, empregada para manter a macho-esterilidade para o sistema de três linhas, reduz drasticamente o custo da semente. Também, é mais fácil combinar gene(s) T(P)GMS com gene(s) de ampla compatibilidade; (3) uma-linha ou sistema apomítico: apomixia é reprodução assexuada via semente. Resulta em nenhuma perda de heterose ano após ano com a produção de semente, porque não ocorre segregação genética. A idéia para fixação da heterose pela apomixia foi proposta no ano de 1930, mas somente depois de passados 50 anos foi dado um exemplo proeminente (BASHAW, 1980). Neste sistema, não há necessidade de produção de semente híbrida a cada ano (ZHAO, 1977). Diplóides apomíticos são formados apenas por partenogênese, mas não por hibridação (DALL'AGNOL e SCHIFINO-WITTMANN, 2005).

Em arroz a utilização da apomixia foi proposta em 1987 por Yuan. Atualmente, as tentativas de introduzir, através de cruzamentos, o gene da apomixia de espécies poliplóides de *Tripsacum* para o milho (*Zea*), e de espécies silvestres de *Pennisetum* para milheto (*P. americanum*) não têm sido bem sucedidas até o momento, pois as plantas apomíticas

obtidas têm cromossomos a mais e alto grau de aborto de sementes (SAVIDAN, 2001).

B. Esterilidade masculina condicionada por genes nucleares: É controlado pela interação entre genes do núcleo e do citoplasma; este sistema tem sido propalado por muitos pesquisadores (RUTGER e SHINJYO, 1980). O primeiro desenvolvimento de uma linha com citoplasma macho-estéril foi realizado por Shinjyo e Omura (1966) no Japão, utilizando o citoplasma 'Chinsurah Boro II'. A primeira linha macho-estéril a ser produzida em escala comercial na China, próximo da década de 70 foi 'Er-Jiu-Nam IA' (LI e YUAN, 2000). Em alguns casos aplica-se o termo *esterilidade masculina genético-citoplasmática*, como por exemplo, em situações em que cruzamentos entre plantas macho-estéreis e outras normais resultam em plantas férteis, uma vez que certas plantas possuem alelos de genes que modificam a ação do citoplasma.

Morfologia, Citologia e histologia de linhas macho-estéreis e classificação da macho-esterilidade.

1. *Características morfológicas* – as linhas com citoplasma macho-estéreis (S), com genes nucleares recessivos (ff) mostram uma grande semelhança morfológica antes do florescimento pleno, comparativamente a linha mantenedora B que possui citoplasma normal com genes do núcleo recessivo (ff). Depois do florescimento, a esterilidade pode ser comprovada através de análises de caracteres morfológicos envolvendo as anteras e comportamento no florescimento. Muitos dos caracteres morfológicos das linhas T(P)GMS ou linhas macho-estéreis gametofíticas são aproximadamente os mesmos que aquelas encontrados nas linhas macho-estéreis esporofíticas.

2. *Características citológicas* – Laser e Lerstern (1972) sintetizaram alguns estudos citológicos conduzidos entre 1925 e 1972 analisando os resultados sobre macho-esterilidade através do grão de pólen. As linhas macho-estéreis são classificadas pelo estágio em que se encontra o grão de pólen abortivo: pólen livre abortivo, estágio abortivo uninucleado, estágio abortivo binucleado e estágio abortivo trinucleado.

3. *Características histológicas* – Estudos

citológicos e histológicos revelaram anormalidades nas anteras (GOVINDA e VIRMANI, 1988). As anormalidades histológicas seguintes foram encontradas nos estames de plantas de arroz macho-estéril: anormalidades nas paredes das anteras, anormalidades das paredes intercelulares, anormalidades dos filamentos vasculares (LI e YUAN, 2000).

4. *Classificação da macho-esterilidade* – Mais de 600 linhas macho-estéreis têm sido desenvolvidas na China (LI e YUAN, 2000). O sistema de classificação foi proposto entre 1970 a 1980 (ZHU, 1979). Este sistema é baseado em cinco passos taxionômicos fundamentais, são eles: (1) a herança da macho-esterilidade (macho-esterilidade esporofítica ou macho-esterilidade gametofítica); (2) o estágio em que o pólen é abortado (uninucleado, binucleado ou trinucleado); (3) a relação entre restaurado-mantenedor; (4) tipo de núcleo substituído, selvagem-cultivar; e cultivar-selvagem; e (5) diferenciação do cultivar baseado na fonte do citoplasma.

C. Restauração da fertilidade: para organizar o sistema de macho-esterilidade genético-citoplasmático no intuito de desenvolver um híbrido comercial, é essencial ter um programa de melhoramento genético para a linha restauradora da fertilidade (R) conduzido paralelamente. Felizmente, várias linhas restauradoras da fertilidade têm sido identificadas facilmente em arroz. Shinjyo (1969) encontrou apenas um gene dominante (Rf) responsável pela restauração da fertilidade nas linhas macho-estéreis. No entanto, alguns pesquisadores encontraram dois genes (RfRf) que controlavam a restauração (YUAN e VIRMANI, 1988). Shinjyo (1972) relatou que este gene (Rf) se encontra em genótipos tropicais, principalmente do tipo *indica*. Alguns cultivares de arroz oriundos do Japão e de outros países de clima temperado têm sido classificados como não restauradores para o sistema de três linhas (VIRMANI, 1996). No entanto, Yuan e Virmani (1988) encontraram mais de uma centena de linhas restauradoras, denominadas de elite, para o sistema de três linhas. A frequência de linhas restauradoras é maior para variedades de arroz desenvolvidas em baixas latitudes comparadas àquelas

linhas desenvolvidas em alta latitude; este mesmo fato também foi observado para o grupo *indica* em relação ao *japonico* (VIRMANI, 1996). Yuan e Virmani (1985) encontraram na China uma alta correlação entre genótipos de ciclo tardio comparado aos genótipos de ciclo precoce em uma alta frequência de linhas restauradoras.

A genética da restauração da fertilidade em arroz vem sendo desenvolvida para vários tipos de citoplasma (ZHOU, 1994) como, por exemplo, para os citoplasmas HL e DT e citoplasma macho-estéril-WA. O efeito dos genes restauradores para os citoplasmas HL (*indica* x *indica*) e DT (*indica* x *japonica*) diferem fundamentalmente no tipo de herança da fertilidade em relação ao citoplasma WA (selvagem x cultivar), sendo gametofítica (fertilidade do pólen parcial) e esporofítica (fertilidade do pólen normal), respectivamente.

Outros tipos de citoplasma têm sido desenvolvidos e testados, porém sem muito sucesso (pequena heterose, instabilidade do citoplasma, baixa taxa de alogamia, etc). Para Shu et al. (1996) mais de 95% de todas as linhas A utilizadas comercialmente na constituição do sistema três linhas possuem o mesmo tipo de citoplasma (*wild abortive* – Tipo WA-CMS). Este citoplasma estéril pode tornar-se vulnerável ao ataque de pragas e doenças, por exemplo.

Govinda e Virmani (1988) encontraram dois genes restauradores da fertilidade para o citoplasma WA com interação genética, predominantemente, do tipo dominante, onde poucos cruzamentos mostraram um efeito epistático dominante, recessivo ou com uma dominância parcial. Muitos estudos têm mostrado que um dos dois genes responsáveis pela restauração da fertilidade para citoplasma do tipo WA exerce uma forte ação sobre o outro. Teng e Shen (1994) também relataram a existência de dois genes (um gene dominante e outro dominante parcial) restauradores para o citoplasma WA (*wild abortive*). Govinda e Virmani (1988) conduziram vários testes alélicos para possíveis genes restauradores da fertilidade para o citoplasma WA presentes em seis cultivares restauradoras (IR 26, IR 36, IR 54, IR 9761-19-1, IR 2797-105-2-2-3 e IR 42) e identificados para quatro grupos de possíveis restauradores; a hipótese da existência de um grande número de genes R foi

explicada pela alta frequência de linhas R sobre os genótipos *indica* para o citoplasma WA. Bharaj et al. (1995) identificou os genes restauradores da fertilidade do citoplasma WA. O gene restaurador de ação mais pronunciada (Rf-WA-1) está localizado sobre o cromossomo 7 e genes de ação mais fraca (Rf-WA-2) foram encontrados sobre o cromossomo 10.

De modo geral pode ser concluído que a restauração da fertilidade para o citoplasma do tipo WA não é um ponto de impedimento para desenvolver híbridos de arroz em escala comercial, pelo menos para arroz do tipo *indica*. Para Virmani (1996) o problema existe em arroz do tipo *japonica* que são principalmente não restauradores, então exigem a incorporação de genes restauradores do tipo *indica*, porém este processo é bastante longo e complicado geneticamente (*indica* x *japonica*). A diversidade genética, conseqüentemente entre restauradores do tipo *japonica* é bem menor do que a diversidade genética entre restauradores do grupo *indica*, fato que comprova claramente que o grau de heterose no grupo *japonica* é menor, comparativamente ao grupo *indica*.

D. Macho-esterilidade genética causada pelo ambiente – apesar do sistema de macho-esterilidade citoplasmática ser um sistema efetivo para desenvolvimento e produção de híbridos em escala comercial, é um sistema bastante complicado e oneroso, principalmente por estar trabalhando com plantas macho-estéreis, que geralmente são pouco produtivas, gerando pouca quantidade de sementes. Segundo Virmani (1996), este sistema de macho-esterilidade citoplasmática também é restrito àqueles germoplasmas em que o número de mantenedores, principalmente, e de restauradores são abundantes. Outro fato relevante, em relação à dificuldade deste sistema, é devido ao sistema três linhas (A, B e R) ser utilizado na grande maioria dos híbridos comerciais atualmente, sendo que este fato chama atenção para a vulnerabilidade genética devido a um estresse biológico de ambiente e/ou biológico x ambiente. Shi e Deng (1986) informaram um moderno e eficiente sistema de macho-esterilidade genética em arroz que foi relatado como um sistema capaz de reverter a fertilidade sob determinadas condições de temperatura

e/ou fotoperíodo; ele foi denominado macho-esterilidade genética em virtude do ambiente (*photoperiod-sensitive genic male sterility* – PGMS). Subseqüentemente foi descoberto o sistema de macho-esterilidade genético induzido pela temperatura (*temperature-sensitive genic male sterility* – TGMS) por Zhou et al. (1988), e Virmani e Voc (1991), sendo que esta reverte parcialmente ou totalmente a fertilidade sob determinadas condições de temperatura. Temperaturas elevadas na floração inibem a intumescência dos grãos de pólen (MATSUI et al., 2000), que é a força motora da deiscência das anteras (MATSUI et al., 1999). Assim, as anteras não abririam durante a floração e o pólen não é liberado para polinizar o estigma, ocorrendo a macho-esterilidade. Tal tecnologia foi denominada sistema de duas linhas, pois não envolve a linha mantenedora (B) utilizada no sistema de três linhas. A grande vantagem deste tipo de sistema é que qualquer linha fértil pode ser utilizada como pai do híbrido F₁; tal fato sugere a grande possibilidade de ganhos em termos de heterose, pois este sistema de duas linhas não precisa possuir uma linha com genes de restauração.

Várias linhas T(P)GMS têm sido desenvolvidas na China, Japão, U.S.A e no IRRI nas Filipinas como por exemplo: Nongken 58 S (*japonica*) desenvolvida por mutação espontânea pela China, onde o comprimento de dia menor do que 13,75 h induz as condições de fertilidade; Norin PL 12 (*japonica*) desenvolvida por irradiação pelo Japão onde temperatura abaixo de 28°C induz a fertilidade; IVA (*indica*) desenvolvida por cruzamentos dirigidos pela China onde temperatura abaixo de 28°C induz a fertilidade e IR 32364-20-1-3-2B (*indica*) desenvolvida por mutação no IRRI, Filipinas onde temperatura abaixo de 29°C induz a fertilidade (LU et al., 1992). A cultivar M 201 (*japonica*) foi desenvolvida por mutação espontânea através do mutagênico EMS (etil metano sulfonate) onde comprimento de dia de 12 h induz a fertilidade (OARD e HU, 1995). Virmani (1996) relatou que as linhas PGMS Nongken 58S e X-88 apresentam a esterilidade completa sob dias longos (acima de 13,75 h) e mostram reversão da fertilidade sob dia curto (abaixo de 13,5 h). Similarmente, as linhas TGMS mostram completa esterilidade do pólen quando o

máximo da temperatura do dia é superior a 27-29°C e fertilidade parcial quando a temperatura máxima do dia está abaixo de 27 – 29°C; esta temperatura crítica tem variado bastante em virtude da origem genética destes genes TGMS (LU et al. 1992). Por exemplo, a linha TGMS IVA, desenvolvida na China, mostra esterilidade com temperatura abaixo de 24°C e fertilidade do pólen com temperatura acima de 27°C. Zhang et al (1992) observaram que a alteração da fertilidade em algumas linhas PGMA são reguladas tanto pelo comprimento do dia quanto pela temperatura. O estágio termosensível crítico para alteração da fertilidade nas linhas TGMS foi de 22 a 26 dias antes da maturação (MARUYAMA et al. 1991) e 6-15 dias depois da iniciação da formação da panícula (BORKAKATI e VIRMANI, 1993). Até mesmo 1 hora de alta temperatura durante o estágio crítico pode influenciar a fertilidade do pólen e assim afetar a fertilidade da semente (pureza da semente). Para ambos, PGMS (WANG et al., 1991) e TGMS (BORKAKATI e VIRMANI, 1993), um único gene recessivo controla a expressão dos caracteres. Genes TGMS foram designados por Sun et al. (1989) e Maruyama et al. (1991) como tms_1 e tms_2 , respectivamente.

Os melhoristas chineses descobriram um padrão para ser utilizado no melhoramento de arroz híbrido de duas linhas (T(P)GMS). Além da alta habilidade de combinação, alto potencial de fecundação cruzada uma alta resistência a insetos e pragas, há um sistema de fertilidade baseado nas condições de temperatura e fotoperíodo listado a seguir: (1) pelo menos 1000 plantas devem ser testadas e a proporção da esterilidade deve ser 100%; (2) esterilidade do pólen ou das plantas deve ser no mínimo não menor que 99,5%; (3) percentagem de pega (*seed set*) deve ser maior do que 30% durante a indução de fertilidade; (4) a temperatura crítica para induzir a esterilidade deve ser 23°C, ou abaixo para PGMS, e 23,5°C para TGMS; (5) as linhas devem ter claramente definidas as condições de alterações da fertilidade, no período contínuo para indução completa da esterilidade deve durar pelo menos 30 dias por ano (LU et al, 1992). Várias linhas T(P)GMS estão sendo melhoradas na China, Japão e pelo IRRI para desenvolvimento de arroz híbrido no sistema duas linhas. Este sistema tem dado um alto efeito heterótico

nos híbridos comparado com o sistema de três linhas, principalmente porque há uma menor restrição da escolha dos pais (LI e YUAN, 2000); por exemplo. Virmani (1996) comenta que foram testados em dois anos agrícolas (1993 e 1994) 209 e 246 cruzamentos totais para os sistemas de três-linhas e duas-linhas, respectivamente; sendo que o sistema de duas linhas superou, independentemente do ano, o sistema de três linhas em número de cruzamentos heteróticos.

Esterilidade masculina funcional – caso especial, onde as plantas produzem quantidades normais de pólen, viável, no entanto, ocorre uma deficiência no mecanismo de abertura das anteras, não havendo a liberação do pólen. Tal sistema pode, assim como a macho-esterilidade genética causada pelo ambiente, ser aplicado à produção de híbridos, apesar de haver certas limitações, como por exemplo, a aplicação a um número restrito de plantas, a não deiscência sensível a variações ambientais (em tomate, dependendo das condições ambientais de umidade, mais de 50% da autofertilização pode ocorrer nas linhas masculinas), estigma oculto (impedindo a polinização cruzada), entre outras.

CONSEQUÊNCIAS PARA O MELHORAMENTO

O desenvolvimento de híbridos de arroz depende de um método de esterilização do pólen que não altere a fertilidade do gameta feminino (célula-ovo). A macho-esterilidade genética e a macho-esterilidade citoplasmática são mecanismos estudados e usados para a produção de sementes híbridas, porém a utilização de emasculação e polinização manual em larga escala na produção de híbridos ainda predomina (SHIFRISS, 1995). Para Coimbra et al. (2006), a produção comercial de semente híbrida (F1) pela emasculação manual é impraticável em arroz. Ainda, segundo os autores, o descobrimento, a utilização das linhas que expressam a macho-esterilidade citoplasmática, genética ou Mendeliana e macho-esterilidade não herdável (resultante de agentes químicos ou físicos denominados de gameticidas) é fundamental para a exploração da heterose da cultura de arroz em nível comercial.

Nos anos 60, foi identificada uma planta de arroz *Oryza sativa* L.f. *spontanea* com o citoplasma macho-estéril, denominado de *wild abortive*

cytoplasm-wa. A estratégia empregada pelo *International Rice Research Institute* - IRRI, nas Filipinas, baseia-se no sistema de três linhas: linha macho-estéril (A), com o citoplasma estéril; linha mantenedora (B), quase isogênica a linha A, porém com o citoplasma fértil, usada para multiplicar a linha A; e finalmente, a linha restauradora (R), utilizada para polinizar as linhas A, produzindo assim, o híbrido F_1 comercial fértil.

De acordo com Bragantini et al. (2001) a produção de híbridos em arroz requer a participação de um sistema genético-citoplasmático de macho-esterilidade composto por três linhagens: uma, macho-estéril (linhagem A); uma, macho-fértil e com capacidade de manutenção da esterilidade da linhagem A, e que deve ser o mais semelhante possível à linhagem A, que é conhecida como linhagem B; e outra, também macho-fértil, mas com capacidade de restauração da fertilidade da linhagem A (linhagem R). A combinação das duas primeiras linhagens (A e B) produz sementes que originam plantas macho-estéreis (sementes da linhagem A), e o cruzamento entre as linhagens A e R produz as sementes híbridas, que originam plantas férteis.

Apesar da ampla utilização desta tecnologia de híbridos de arroz em outros países, no Brasil esta técnica tem sido usada apenas recentemente, há cerca de apenas 15 anos. Alguns testes em arroz híbridos têm mostrado rendimento de grãos acima de 9.000 kg ha⁻¹, com heterose de até 40% acima da média dos pais aliadas a densidade reduzida de semeadura é outro fator relevante; enquanto as variedades convencionais são semeadas com 150 kg ha⁻¹ em média para os híbridos são utilizados apenas 40 kg ha⁻¹. Porém, como em toda introdução de plantas, existem problemas como, por exemplo: ciclo tardio (genitores provindos da China não adaptados às condições de cultivo local), alto índice de debulha, pericarpo vermelho, alto grau de esterilidade, aroma, baixa teor de amilose no grão e, principalmente as qualidades agrônômicas da linha A (macho-estéril), por exemplo, baixa qualidade de grão, de modo geral, baixa teor de amilose, baixa produtividade, colmos fracos (acamamento), adaptabilidade e estabilidade de produção, o que não somente onera a produção de sementes híbridas, mas inibe também sua adoção pelos agricultores.

Uma maneira prática para começar a contornar estas dificuldades seria primeiramente caracterizar (em linhas restauradoras ou mantenedoras) algumas variedades convencionais e adaptadas à nossa região, a fim de conseguir identificar uma linha B adaptada e com boa qualidade de grão, o que possibilitaria, através de poucos retrocruzamentos, obter uma linha A com qualidades agrônômicas realmente superiores para as nossas condições.

A possibilidade de associar o método de retrocruzamento com a utilização de marcadores moleculares torna essa possibilidade ainda mais plausível. Alguns trabalhos têm estudado tal possibilidade. Alcochete (2005) selecionou marcadores microssatélites, para mapear as regiões genômicas associadas ao controle genético de macho-esterilidade termossensível (TGMS) em arroz. Em seus estudos, uma população F_2 , derivada do cruzamento entre linhagens *indica* fértil e TGMS, foi usada para construir um mapa genético de arroz, baseado em marcadores microssatélites. Em suas conclusões, os dados fenotípicos e genotípicos permitiram a identificação de três novos locos controladores de caracteres quantitativos (QTL) para a macho-esterilidade gênica termossensível em arroz *indica*. De acordo com os mesmos autores, a compreensão do controle genético de macho-esterilidade termossensível (TGMS) em arroz, é importante para o desenvolvimento de sementes híbridas sustentáveis para a indústria.

Contudo, no Brasil o conhecimento é limitado sobre a tecnologia de exploração da heterose em plantas de arroz (autógama). Esta tecnologia inovadora de produção de arroz híbrido comercial (F_1) está começando a ser explorada comedido no Brasil, apesar do seu grande potencial de desenvolvimento e ampla utilização em outros países.

CONSEQUÊNCIAS PARA O SISTEMA DE PRODUÇÃO

a) Melhoramento para o sistema de três linhas: o melhoramento genético para o sistema de três-linhas pode ser dividido em duas fases: desenvolvimento da linha R e avaliação da heterose.

Este procedimento de melhoramento é

flexível, e alguns passos rotineiros podem ser omitidos ou repetidos, dependendo do desempenho das linhas genitoras ou dos híbridos F_1 (LI e YUAN, 2000). De acordo com os mesmos autores, o desenvolvimento das linhas genitoras envolve alguns passos: (1) *bloco de cruzamento* - este bloco de cruzamento pode ser utilizado como uma fonte de “genes úteis” para o sistema de três linhas. Todo germoplasma, exceto A, B e R, podem ser cultivados na quantia de 10 a 20 plantas por parcela. As linhas A e B devem ser cultivadas isoladamente com o intuito de evitar contaminação por pólen estranho; (2) *testcross* – este passo é realizado fundamentalmente para determinar a fertilidade do híbrido F_1 e para fazer uma classificação das linhas testadas em R e B, podendo ser utilizadas de 10 a 20 plantas em uma fileira para cada *testcross*, com a cultivar padrão intercaladas com os híbridos. Se o híbrido F_1 testado for macho-estéril, ele pode ser utilizado para o desenvolvimento de uma linha A por sucessivos retrocruzamentos. Quando o F_1 mostrar fertilidade normal e bom desempenho de modo geral sobre os principais caracteres de importância agrônômica, o genitor utilizado como genitor masculino pode ser utilizado para desenvolver uma nova linha R re-testcross. Os cruzamentos testados que revelarem baixa capacidade de restauração ou baixa habilidade em manter a esterilidade deve ter sua respectiva linha R eliminada; (3) *re-testcross* – este passo é realizado para confirmar a habilidade de restauração e avaliar preliminarmente à heterose. Mais de 100 plantas devem ser desenvolvidas e comparadas com o híbrido ou com o cultivar principal da região; (4) *retrocruzamentos* – o objetivo principal é desenvolver novas linhas A incorporando o citoplasma macho-estéril, por exemplo, WA e também desenvolver novas linhas B. Ainda, tem como objetivo alcançar uma macho-esterilidade estável e uma alta uniformidade de caracteres agrônômicos numa população de 1000 plantas, quando isto é alcançado, a linha macho-estéril e a sua linha B correspondente estão prontas para avaliação comercial.

O desenvolvimento de novas linhas A e B é importante para o êxito do sistema de três linhas, visto que além do rendimento de grãos e qualidade do híbrido F_1 , estas linhas afetam diretamente o rendimento de grãos do híbrido comercial. A linha B

é uma linha isogênica da linha A, porém com uma diferença fundamental, isto é, o citoplasma é fértil para linha B e estéril para linha A. Caracteres com alta capacidade de combinação, características como frequência de alogamia e qualidade de grão também são metas do melhoramento para desenvolvimento de linhas B superiores (YUAN e VIRMANI, 1988).

A macho-esterilidade em arroz pode ser observada através da esterilidade do pólen, indeiscência das anteras, antera abortiva entre outras (RUTGER e SHINJYO, 1980). Constantes observações que expressam o nível de macho-esterilidade são fundamentais tanto para o melhoramento de arroz híbrido, quanto para a produção de sementes híbridas. A macho-esterilidade somente pode ser observada depois do florescimento por três métodos descritos por (YUAN et al. 1985); (1) inspeção visual – para as linhas macho-estéreis do tipo esporofítica, uma observação lógica, porém bastante eficiente, a panícula principal fica aproximadamente 1/3 dentro do cartucho, formado pela folha bandeira. Durante a antese, a cor das anteras pode ser visualizada para determinar a perfeita macho-esterilidade. Anteras amareladas e bem formadas indicam fertilidade; (2) ensacando a panícula – a mais precisa estimativa da macho-esterilidade: ensaca-se a panícula antes do florescimento, mas fundamentalmente antes de qualquer deiscência das anteras; (3) observação microscópica – anteras devem ser amostradas de diferentes partes da panícula, utilizando uma solução de iodeto de potássio (I-KI) podendo-se detectar a macho-esterilidade sob a luz do microscópio. A macho-fertilidade do pólen (bem manchado, cor escura) não pode exceder 1% para as linhas macho-estéreis do tipo esporofítica.

Melhoramento para as linhas A e B – existem vários métodos de melhoramento para as linhas A e B, porém aqui serão discutidos alguns métodos mais relevantes. (1) substituição nuclear – tem sido realizada com bastante sucesso no desenvolvimento de linhas macho-estéreis estáveis de uma planta ancestral macho-estéril, embora seja difícil em alguns casos a identificação de linhas mantenedoras com um valor agrônômico comprovado. Para a maioria dos cruzamentos selvagem-cultivar, *indica-japonica*, *indica-indica* e *japonica-japonica*, as linhas do genitor utilizado como pai são periodicamente retrocruzadas por várias

gerações até não haver segregação para a macho-esterilidade, e alguns caracteres indesejáveis não aparecerem na progênie. Macho-esterilidade pode ser difícil de ser estabilizada para alguns casos em algumas linhas genitoras masculinas; quando isto ocorrer, pode ser selecionado um cultivar novo de arroz como a linha parental recorrente; (2) cruzamentos interespecíficos – uma linha macho-estéril estável pode ser desenvolvida por cruzamentos e por retrocruzamentos, como por exemplo, *Oryza glaberrima* utilizada como fêmea e *Oryza sativa* L. como macho. Sano (1985) relatou que caso fosse realizado o cruzamento de *O. sativa* (citoplasma) x *O. glaberrima* (núcleo), a progênie deste cruzamento não fixa a semente, embora o teste com a solução de I-KI mancha o grão de pólen normalmente; (3) cruzamentos entre espécies selvagens e cultivares de arroz – Li e Yuan (2000) comentam que pode ser mais fácil desenvolver linha macho-estéril através do cruzamento entre espécies selvagens e cultivares; a primeira e mais importante linha com citoplasma do tipo WA 'Er-Jiu-Nam 1 A' foi desenvolvida através de quatro retrocruzamentos; (4) melhoramento e identificação de novas linhas mantenedoras – muitos cultivares de arroz com qualidades agrônomicas comprovadas não mostram capacidade para manter a esterilidade. Este processo é fundamental tanto para o desenvolvimento de novas linhas B quanto para a sustentabilidade do sistema de três linhas. Para criar uma nova linha mantenedora Li et al. (1982) comentam que devem ser respeitados alguns passos fundamentais (Figura 1).

b) Melhoramento para o sistema de duas-linhas: por simplificar o processo de produção de sementes híbridas de arroz, o sistema de duas-linhas vem ganhando cada vez mais espaço, mas o fato que preocupa bastante os pesquisadores é quanto a uma possível quebra do citoplasma em virtude de algum tipo de estresse tanto abiótico quanto biótico, sendo que 95% de todos os híbridos de arroz utilizados atualmente possuem o citoplasma do tipo WA.

Considerações gerais:

Vantagens: Lie Yuan (2000) citam algumas vantagens e desvantagens deste tipo de sistema para produzir semente de arroz híbrido: (1) simplicidade e

efetividade – não há necessidade da linha B para multiplicação de sementes híbridas (AxB), sendo que esta linha é fundamental para o sistema de três linhas. Deste modo, a multiplicação das linhas T(P)GMS são mais simples, pois não requer o sincronismo entre as linhas A e B, tornando-se assim um processo menos oneroso e mais rápido. Na China, o rendimento médio das linhas T(P)GMS é de 3 a 5 t ha⁻¹, comparadas com o sistema de três-linhas que é de 2 t ha⁻¹ para a multiplicação da linha A. Além disso, os genes nucleares da macho-esterilidade do sistema T(P)GMS são mais facilmente transferidos do que genes da macho-esterilidade genética citoplasmática, pois aqueles não são afetados pelos genes do citoplasma; (2) a não restrição de genes restauradores – no sistema de três-linhas, o híbrido F₁ entre as linhas A e R freqüentemente mostram vários níveis de restauração (fertilidade) ou macho-esterilidade entre 30-50% de “pega”. Somente uma pequena percentagem de cultivares de arroz são completamente restauradores. Portanto, o potencial de desenvolvimento de híbridos de arroz superiores no sistema de três linhas é limitado. Pelo contrário, a macho-esterilidade das linhas T(P)GMS é essencialmente controlada por genes nucleares recessivos, assim o F₁ entre linhas T(P)GMS e cultivares de mesma subespécie mostram fertilidade normal. A macho esterilidade de 'W6154' e 'An-Nong s-1' pode ser restaurada normalmente por 97,6% a 99,3% dos cultivares indica, respectivamente, e a cultivar 'Nong-Ken 58s' pode ser restaurada por mais de 96,6% dos cultivares *japonicas* (VIRMANI, 1996). Sendo assim, o potencial para desenvolvimento de arroz híbridos neste sistema é significativo; (3) fácil utilização da heterose em diferentes grupos *indica-japonica* – este sistema favorece a incorporação de genes de ampla compatibilidade nas linhas T(P)GMS, comparativamente, a linha A; (4) efeitos negativos da macho-esterilidade genética citoplasmática – o platô do rendimento de grãos pode ser rompido em virtude da ausência do efeito negativo do macho-esterilidade citoplasmática do sistema de três linhas (WANG e TANG, 1990; YOUNG e VIRMANI, 1990).

Desvantagens – a dependência da macho-esterilidade sob determinadas temperaturas específicas é atualmente motivo de preocupação para

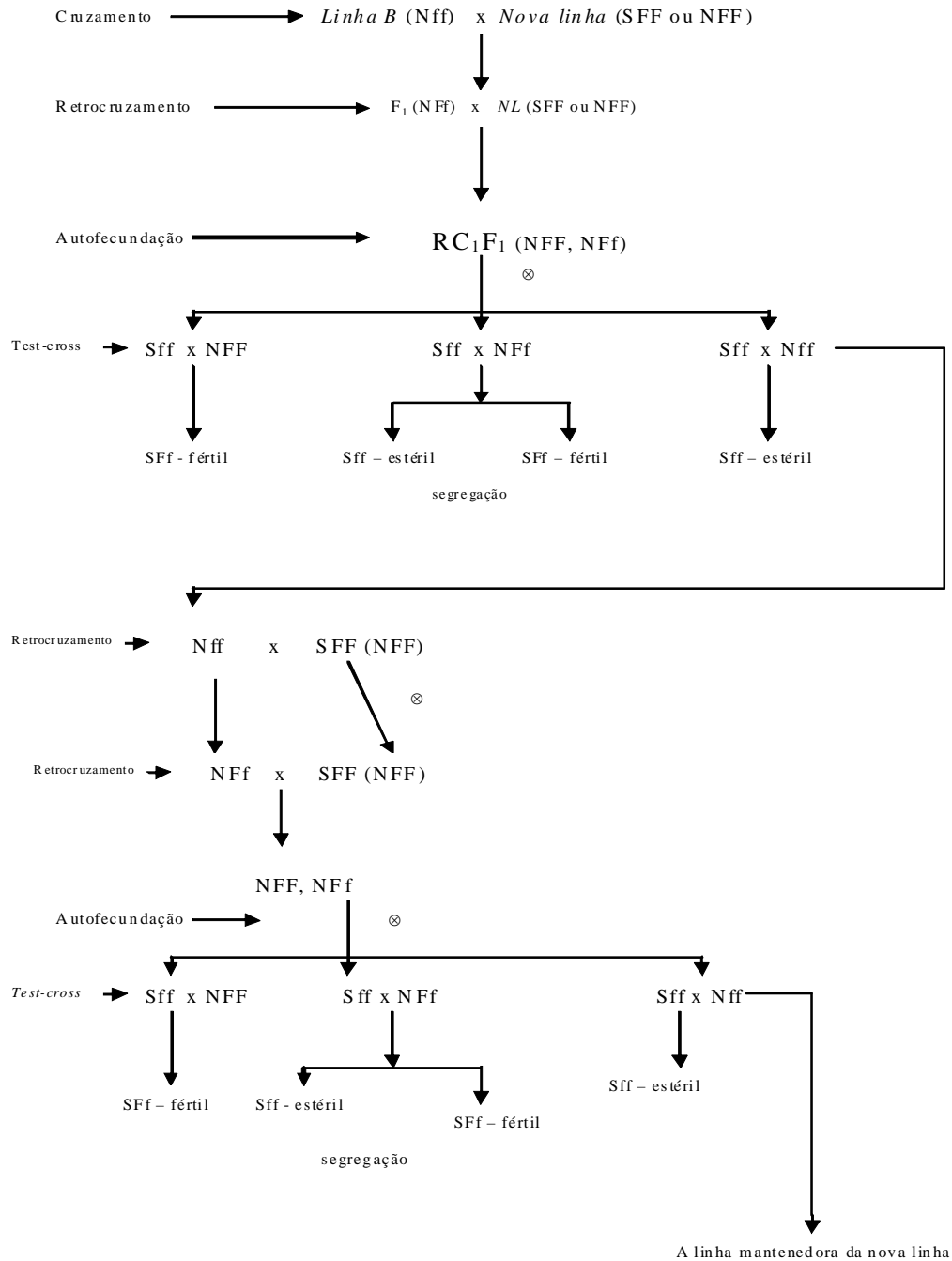


Figura 1 - Procedimento alternativo para o melhoramento de uma linha mantenedora em arroz (LI et al. 1982). Onde: (S) citoplasma estéril; (N) citoplasma fértil; (f) genes nucleares que não restauram a fertilidade; (F) genes do núcleo que restauram a fertilidade.

muitos pesquisadores. Para produzir sementes consistentemente neste sistema é necessário uma análise com grandes detalhes sobre uma série de dados climáticos para o local onde serão multiplicadas as sementes. Muitos cuidados e avaliações precisas são exigências fundamentais para comercialização de uma nova linha T(P)GMS.

Linhas T(P)GMS desenvolvidas: seis linhas T(P)GMS são utilizadas na China como a base genética para o desenvolvimento de híbridos de arroz no sistema de duas-linhas (Tabela 1).

de *brássica* quando expostas ao estresse por aumento de temperatura (HTS) na floração, reduzem consideravelmente o desenvolvimento de sementes e frutos. Ku et al., (2001) testaram várias linhagens TGMS quanto ao grau de fertilidade de pólen sob diferentes condições de temperatura, e verificaram que em duas linhagens ocorria a inativação do pólen apenas por efeito térmico, enquanto em outras linhagens foi constatado um efeito fotoperiodismo sugerindo que a esterilidade masculina é provavelmente controlada por mais de um gene.

Tabela 1- Algumas linhas T(P)GMS empregadas comercialmente na China (LI e YUAN, 2000).

Linha	Subespécie	A.I ⁽¹⁾	O.R	P.C.E (°C)	T.E	F.G
Pei'ai 64s	<i>japonica</i>	1991	Hunan	23,5	AT ⁽²⁾	Nong/ken58s
7001s	<i>japonica</i>	1989	Anhui	24,0	LDAT ⁽³⁾	Nong/ken58s
5088s	<i>japonica</i>	1992	Hubei	24,0	LDAT	Nong/ken58s
810s	<i>indica</i>	1995	Hunan	24,0	AT	Annong s
Xiang 125s	<i>indica</i>	1994	Hunan	23,5	AT	Annong s
GD 2s	<i>indica</i>	1995	Guangdong	23,0	AT	Nongken 58s

^{1/} (A.I) ano de identificação; (O.R) órgão responsável; (P.C.E) ponto crítico da esterilidade; (T.E) tipo da esterilidade predominante; (F.G) fonte do gene de interesse.

^{2/} alta temperatura;

^{3/} comprimento do dia longo e alta temperatura.

Linhas T(P)GMS – KAUL (1988) publicou uma extensa revisão sobre macho esterilidade causada pela temperatura, fotoperíodo e outros fatores ambientais desconhecidos no seu livro *Male sterility in higher plants*. Ele estimou que 44% dos casos o fator ambiente influenciou diretamente a macho esterilidade, em 12% foi o fotoperíodo, onde 44% foi atribuídos a fatores de ambiente desconhecidos. Em tomate (*Lycopersicon esculentum*) Rick (1948) noticiou a influência da temperatura controlando a macho-esterilidade nesta cultura. Macho-esterilidade no sorgo (*Sorghum vulgare*) foi relatada como sendo condicionada pelo fotoperíodo (BARABÁS, 1962). A macho esterilidade condicionada pelo ambiente já foi relatada também em pimenta e tomate (MARTIN e CRAWFORD, 1951) em couve (RUNDFELDT, 1960) em sorgo (BARABÁS, 1962), em cevada (AHOKAS e HOCKETT, 1977), ervilha (KAUL, 1988), soja (WEI et al. 1997), em arroz (OARD et al. 1991). Young et al. (2004) verificaram que plantas

A primeira fonte genética (NONG/KEN 58s) para o desenvolvimento de novas linhas T(P)GMS, foi descoberta no Município de Mian-Yang província de Hubei na China por Shi em 1973 (SHI e DENG, 1986). Exemplos de linhas T(P)GMS desenvolvidas fora da China, Maruyama et al. (1991) desenvolveu a linha 'Norin PL12' ou 'H89-1' por meio de irradiação oriundos de raios gama com uma dose de 200 Gy. Oard et al. (1991) relatou a influência do ambiente sobre a condição de macho-esterilidade de um material na geração M₇ do genótipo M201 tratada com o mutagênico químico EMS, sendo esta característica de macho esterilidade condicionada pelo ambiente é controlada por dois genes nucleares com efeito epistático. Rutger et al. (1980) desenvolveu a condição de macho esterilidade causada pelo ambiente na cultivar *japonica* 'Calrose-76' empregando cultura de tecido. Este genótipo mostrou a macho esterilidade sobre o comprimento de dia longo de 15 h, e com macho fertilidade abaixo de 12 h.

CONCLUSÕES

A perspectiva atual é o crescimento na utilização de citoplasmas macho-estéreis no melhoramento genético de plantas como uma alternativa para o incremento do vigor híbrido. Novas tecnologias vêm sendo amplamente pesquisadas e discutidas, como a introdução de genes através de técnicas biotecnológicas. O sistema duas linhas não é promissor em relação ao antecessor três linhas, exclusivamente para o Brasil, em virtude de que o Brasil não possui nenhuma região onde a temperatura e o comprimento do dia seja tão constante que não oscile, quesito fundamental para o desenvolvimento desta tecnologia.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHOKAS, H.; HOCKETT, E. A. Male sterile mutants of barley. IV. Different fertility levels of msggci (ev Vantage) an ecoclinal response. **Barley Genet**, Newsl, v.7, p.10-11, 1977.
- ALCOCHETE, A.A.N. **Diversidade genética e mapeamento de QTLs do sistema gênico de macho-esterilidade termossensível (TGMS) do genoma de arroz (*Oryza sativa* L.)**. 2005. 157p. (Doutorado em Biologia Molecular) – curso de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília.
- BARABÁS, Z. Observation of sex-differentiation in sorghum bu use of induced male sterile mutants. **Nature**, v.195, p. 257-259, 1962.
- BASHAW, E.C. Apomixis and its applications in crop improvement. In: FEHR, W. R.; HADLEY, H.H (ed.) **Hybridization of crop plants**. Wisconsin : American Society of Agronomy, 1980. p. 45-63.
- BHARAJ, T.S. et al. Chromosomal location of fertility restoring genes for ‘Wild abortive’ cytoplasmic male sterility using primary trisomics in rice. **Euphytica**, Netherlands, v. 83, p. 169-173, 1995.
- BORKAKATI, R.; VIRMANI, S.S. Inheritance of a thermo-sensitive genic male sterile mutant of indica rice. **Rice Genetics Newsletter**, Manila, v. 10, p. 92-94, 1993.
- BRAGANTINI, C.; GUIMARÃES, E.P.; CUTRIM, V.A. Produção de sementes macho-estéreis em arroz. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36, n. 2, p. 273-277, 2001.
- COIMBRA, J.L.M. et al. Heterose em arroz híbrido. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.12, n.3, p.257-264, 2006.
- DALL’AGNOL, M.; SCHIFINO-WITTMANN, M. Apomixia, genética e melhoramento de plantas. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.11, n.2, p.127-133, 2005.
- DONG, N.V. et al. Molecular mapping of a rice gene conditioning thermosensitive genic male sterility using AFLP, RFLP and SSR techniques. **Theoretical Applied Genetics** , v.100, p.727-734, 2000.
- FAO – Food and Agriculture Foundation. Database Statistics. Disponível em: <<http://www.fao.org>>. Acesso em :18 set. 2007.
- GOVINDA, R.K.; VIRMANI, S.S. Genetics of fertility restoration of wa type cytoplasmic male sterility in rice. **Crop Science**, Madison, v. 28, p. 787-792, 1988.
- KAUL, M. L. H. Male sterility in higher plants. Springer-Verlag, Berlin and Heidelberg, 1988.
- KU, S.J. et al. Cytological observation of two environmental genic male-sterile lines of rice. **Molecular cells**, v.12, n.3, p.403-406, 2001.
- KUMARI, S. L.; MAHADEVAPPA, M.; KULKARNI, R.S. Fertility restoration studies in four WA CMS lines of rice. **International Rice Research Institute**, Manilla, v. 1, p. 9, 1998.
- LASER, K. D.; LERSTERN, N.R. Anatomy and cytology of microsporogenesis in cytoplasmic male sterile angiosperms. **Botanical Reviews**, v.38, p. 425-454, 1972.
- LI, J.; YUAN, L. Hybrid rice: breeding, and seed production. **Plant Breeding Reviews**, Canada, v. 17, p. 15-158, 2000.
- LI, Z. B. et al. Study and practice of hybrid rice. **Shanghai Science Technology Press**, China, 1982.
- LIN, S.C.; YUAN, L.P. Hybrid rice breeding in China. In: Innovative Approaches to rice breeding. , Manilla : **International Rice Research Intitute**, 1980. p. 35-51.
- LU, X. G et al. Current status of two-line method of hybrid rice breeding. In: **HYBRID Rice Technology: new developments and future prospects**. Manila : IRRI, 1992. p.37-50.
- MARTIN, J. A.; CRAWFORD, J.H. Several types of sterility in *Capsicum frutesceus*. **Proc. Am. Soe**.

- Hort. Sei**, v. 57, p.335-338, 1951.
- MARUYAMA, K. et al. Thermosensitive genetic male sterility induced by irradiation. In: Rice Genetic II. Manila: IRRI, 1991. p.227-232.
- MATSUI, T.; OMASA, K.; HORIE, T. Mechanism of anther dehiscence in rice (*Oryza sativa* L.). **Annals of Botany**, v.84, n.1, p.501-506, 1999.
- MATSUI T, OMASA K, HORIE T. Mechanism of septum opening in anthers of two-rowed barley (*Hordeum vulgare* L.). **Annals of Botany**, v.86, n.3, p.47-51, 2000.
- OARD, J. H., HU, J.; RUTGER, J.N. Genetic analysis of male sterility in rice mutants with environmentally influenced levels of fertility. **Euphytica**, Netherlands, v. 55, p.179-186, 1991.
- OARD, J. H.; HU, J. G. Inheritance and characterization of pollen fertility in photo-periodically sensitive rice mutants. **Euphytica**, Netherlands, v. 82, p. 17-23, 1995.
- RICK, C. M. Genetics and development of nine male sterile tomato mutants. **Hilgardia**, v.18, p.599-633, 1948.
- RUNDFELDT, H. Untersuchungen zur Züchtung des kopfkohls (*R. oleracea* L. var. capitata). **Z. Pflanzenzücht**, v.44, p.30-62, 1960.
- RUTGER, J. N.; C. SHINJYO. Male sterility in rice and its potential use in breeding. In: Innovative approaches to rice breeding. Manila : IRRI, 1980. p.53-66.
- SANO, Y. Interspecific cytoplasm substitutions of an indica strain of *Oryza sativa* and *Oryza glaberrima*. **Euphytica**, Netherlands, v. 34, p. 587-592, 1985.
- SAVIDAN, Y.; CARMAN, J.G.; DRESSELHAUS, T. **The flowering of apomixis: from mechanisms to genetic engineering**. El Batan: CIMMYT, 2001. 243 p.
- SHI, M.S.; DENG, J.Y. The discovery, determination and utilization of the Hubei photosensitive genic male sterility rice (*Oryza sativa* subsp. Japonica). **Acta Genetic Sinica**, China, v. 13, n. 2, p. 107-112, 1986.
- SHIFRISS, C. Male sterility in *Capsicum*. **Capsicum and Eggplant Newsletter**, v.14, n.1, p.11-25, 1995.
- SHINJYO, C. Cytoplasmic-genetic male sterility in cultivated rice. *Oryza sativa* L. II. The inheritance of male sterility. **Japan Journal Genetic**, Japan, v. 44, p. 149-156, 1969.
- SHINJYO, C. Distributions of male sterility inducing cytoplasm of fertility restoring genes in rice. I. Commercial lowland rice cultivated in Japan. **Japan Journal Genetic**, Japan, v. 47, p. 237-243, 1972.
- SHINJYO, C.; OMURA, T. Cytoplasmic male sterility in cultivated rice, *Oryza sativa* L. I. Fertilities of F₁, F₂ and offspring obtained from their mutual reciprocal backcrosses and segregation of completely male sterile plants. **Japan Journal Breed**, v. 16(Suppl.1), p. 179-180, 1966.
- SHU, Q. et al. Marker-assisted elimination of contamination in two line hybrid rice seed production and multiplication. **Journal of Zhejiang Agricultural University**, China, v. 22, n. 1, p. 56-60, 1996.
- SRIVASTAVA, H.K. Nuclear control and mitochondrial transcript processing with relevance to cytoplasmic male sterility in higher plants. **Current Science**, v.79, n. 2, p. 176-186, 2000.
- SUN, Z. X. et al. A temperature-sensitive male sterile line found in rice. **Rice Genetics Newsletter**, Manila, v. 6, p. 116-117, 1989.
- TANKSLEY S.D. et al. Molecular Mapping of the Rice Genome: Recent Advances. In: KHUSH, G.S.; TOENNIESSEN, G.H. (ed.). **Rice Biotechnology**. [S.l. : s.n.], 1997.
- TENG, L.S.; SHEN, Z.T. Inheritance of fertility restoration for cytoplasmic male sterility in rice. **Rice Genetic Newsletter**, Manila, v. 11, p. 95-97, 1994.
- VIRMANI, S. S. Hybrid rice. **Advance Agronomy**, San Diego, v. 57, p.377-462, 1996.
- VIRMANI, S.S. et al. **Two-Line Hybrid Rice Breeding Manual**. Los Banhos, Phillipines : International Rice Research Institute, 2003. 88 p.
- VIRMANI, S.S.; VOC, P.C. Induction of photo and thermo-sensitive male sterility in indica rice. **Crop Science**, Madison, v. 14, p. 350-353, 1991.
- WANG, C. L.; TANG, Y. G. Studies on the genetic effects of sterile cytoplasm in hybrid rice (*Oryza sativa* L. subsp. sinica). **Acta Agronomy Sinica**, China, v.4, p.335-341, 1990.
- WANG, X. M. et al. Photoperiod-conditioned male sterility and its inheritance in rice. In: Rice genetics II, IRRI, Manila, p.217-226, 1991.
- YOUNG, J. B.; VIRMANI, S. S. Heterosis in rice over environments. **Euphytica**, Netherlands, v. 51, p. 87-93, 1990.
- YOUNG, L. W.; WILEN, R.W.; BONHAM-SMITH, P.C. High temperature stress of *Brassica*

napus during flowering reduces micro- and megagametophyte fertility, induces fruit abortion, and disrupts seed production. **Journal of Experimental Botany**, v.55, n.396, p.485-495, 2004.

YUAN, L. P.; VIRMANI, S. S. Status of hybrid rice research and development. In: Hybrid Rice (Proceedings of the International Symposium of Hybrid Rice, October 6-10, 1986, Changsha, Hunan, China. p. 7-24. 1988.

YUAN, L. P. VIRMANI, S. S. Wei You 64 – An early duration hybrid for China. IRRI, Manila, v. 10, n. 5, p. 11-12, 1985.

YUAN, L.P.; VIRMANI, S.S.; KHUSH, G.S. An early duration hybrid for China. International Rice Research Newsletter, Manilla, v. 10, n. 5, p. 11-12, 1985.

ZHANG, Z. G. et al. Studies on the model of photothermo reaction of fertility alteration in photo-sensitive genic male sterile rice. **Journal Huazhong Agriculture Universal**, China, v. 11, n. 1, p. 1-6, 1992.

ZHAO, S. X. How to fix heterosis? **Genetics and Breed**, v.3, p. 21-22, 1977.

ZHOU, K. Breeding of CMS lines in indica hybrid rice. **Hybrid Rice Journal**, Japan, v. 3, n. 4, p. 22-26, 1994.

ZHOU, K.D. et al. A comparisons of classification of cultivated rice. **Chinese Journal Rice Science**, China, v. 1, p. 1-7, 1988.

ZHU, Y. G. Studies on male sterile lines of rice with different cytoplasms. **Acta Agronomy Sinica**, China, v. 4, p. 29-38, 1979.