

## Avaliação Molecular da Macho Esterilidade Citoplasmática em Milho



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

## **Documentos 87**

# **Avaliação Molecular da Macho Esterilidade Citoplasmática em Milho**

Sílvia Neto Jardim Belicuas  
Lauro José Moreira Guimarães

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 1888

Home page: [www.cnpms.embrapa.br](http://www.cnpms.embrapa.br)

E-mail: [sac@cnpms.embrapa.br](mailto:sac@cnpms.embrapa.br)

### **Comitê de Publicações da Unidade**

Presidente: Antônio Álvaro Corsetti Purcino

Secretário-Executivo: Flávia Cristina dos Santos

Membros: Elena Charlotte Landau, Flávio Dessaune Tardin,

Eliane Aparecida Gomes, Paulo Afonso Viana e Clenio Araujo

Revisor de texto: Clenio Araujo

Normalização bibliográfica: Rosângela Lacerda de Castro

Editoração eletrônica: Communique Comunicação

### **1a edição**

1a impressão (2009): 200 exemplares

#### **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

---

Belúcuas, Sílvia Neto Jardim.

Avaliação molecular da macho esterilidade citoplasmática em milho / Sílvia Neto Jardim Belúcuas, Lauro José Moreira Guimarães. -- Sete Lagoas : Embrapa Milho e Sorgo, 2009.

16 p. : il. -- (Documentos / Embrapa Milho e Sorgo, ISSN 1518-4277; 87).

1. Biologia molecular. 2. Milho. 3. Zea mays. I. Guimarães, Lauro José Moreira. II. Título. III. Série.

CDD 572.8 (21. ed.)

# Autores

**Sílvia Neto Jardim Belicuas**

Bióloga, doutora em Genética.

Pesquisadora da Embrapa Milho e Sorgo

Sete Lagoas, MG

[silvia@cnpms.embrapa.br](mailto:silvia@cnpms.embrapa.br)

**Lauro José Moreira Guimarães**

Engenheiro Agrônomo, doutor em Melhoramento de Plantas.

Pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo

Sete Lagoas, MG

[lauro@cnpms.embrapa.br](mailto:lauro@cnpms.embrapa.br)

# Sumário

Introdução .....	5
Mecanismos envolvidos.....	5
Tipos .....	7
Marcadores moleculares.....	10
Referências .....	14

# Avaliação Molecular da Macho Esterilidade Citoplasmática em Milho

---

*Sílvia Neto Jardim Belicuas*

*Lauro José Moreira Guimarães*

## Introdução

A reprodução sexual em milho é um processo que envolve a expressão de genes específicos em células dos tecidos reprodutivos masculino e feminino da planta. Assim, alterações em qualquer fase desse processo podem levar à falta de fertilidade. A macho esterilidade ocorre quando não há a produção de gametas masculinos viáveis, apesar de os órgãos florais femininos e de as estruturas vegetativas não apresentarem qualquer anomalia (SCHNABLE; WISE, 1998).

## Mecanismos envolvidos

A macho esterilidade é uma característica que pode ser empregada como valiosa ferramenta para a produção comercial de sementes e já foi identificada em muitas espécies vegetais, sendo um componente estratégico para a produção comercial de híbridos em muitas culturas, como sorgo (XU et al., 1995), arroz (LI; YUAN, 2000), soja (PEREZ et al., 2009) e girassol (YUE et al., 2009). Pode ser empregada para evitar que ocorra a autofecundação na linha onde está sendo produzida a semente (linha de fêmeas). Em geral, um genótipo restaurador homocigoto é empregado como o parental masculino do híbrido. Além disso, a garantia da pureza genética das linhagens parentais de híbridos e deles próprios é

um requisito fundamental para a expressão de todo o potencial dos híbridos. Portanto, a utilização da esterilidade masculina na produção de sementes híbridas apresenta importância econômica, além de assegurar a pureza das sementes genéticas.

Em milho, existem dois tipos distintos de macho esterilidade: a nuclear e a citoplasmática. A macho esterilidade nuclear ocorre quando existem mutações recessivas em genes nucleares que interrompem a gametogênese masculina. Foi descrita pela primeira vez em 1921 por Eyster, que identificou mais de 40 locos associados à característica. Estudos citológicos posteriores demonstraram que essas mutações afetam praticamente todos os estágios do desenvolvimento das anteras, variando da pré-meiose até o pólen (CHAUBAL et al., 2003).

A macho esterilidade citoplasmática é uma característica que envolve genes mitocondriais, herdados maternalmente, e restauradores da fertilidade de natureza nuclear, constituindo um sistema binário. Os genes indutores da macho esterilidade citoplasmática são gerados pelo rearranjo do genoma mitocondrial, que resulta em produtos gênicos aberrantes e/ou em níveis alterados de produtos gênicos normais. Alterações mitocondriais associadas com a macho esterilidade incluem a produção de novas proteínas a partir de ORFs (Open Reading Frames) quiméricas, alterações na taxa de expressão de genes normais e síntese de proteínas mitocondriais alteradas devido à edição de RNA.

A fertilidade pode ser restaurada por genes nucleares denominados rf ou por interações com o ambiente. Fatores climáticos, como temperatura do ar, evapotranspiração e vapor d'água durante os dez dias anteriores e durante a antese, estão correlacionados positiva ou negativamente com a reversão parcial da macho esterilidade, indicando uma interação entre fatores ambientais e genéticos (WEIDER et al., 2009).

Os genes restauradores rf são capazes de suprimir o efeito dos genes de macho esterilidade mitocondriais, atuando nos controles do número de cópias e da transmissão de moléculas subgenômicas (JANSKA et al.,

1998), no processamento pós-transcricional ou na modificação de proteínas relacionadas à macho esterilidade citoplasmática (SARRIA et al., 1998) e, ainda, na compensação metabólica da disfunção mitocondrial (LIU et al., 2001).

## Tipos

Em milho, a característica foi primeiramente descrita por Rhoades em 1933. Nesta espécie, existem três sistemas distintos de macho esterilidade citoplasmática: Texas ou T (ROGERS; EDWARDSON, 1952); USDA ou S (JONES et al., 1957); e Charrua ou C (BECKETT, 1971). Estas três categorias são definidas pela capacidade de restauração dos genes nucleares na primeira geração (F1) (SCHNABLE; WISE, 1998), sendo que os restauradores *rf* são específicos para cada tipo de citoplasma, não promovendo restauração de fertilidade em outros tipos citoplasmáticos.

O citoplasma T foi identificado em 1952 por Rogers e Edwardson em uma variedade de polinização aberta mexicana denominada Golden June na Estação Experimental de Agricultura do Texas (Texas Agricultural Experimental Station). Esse tipo de macho esterilidade é caracterizada por uma falha na formação da antera e pelo aborto dos grãos de pólen, além de possuir grande proporção de células binucleadas (ROY; SARKAR, 1991).

O citoplasma T foi amplamente empregado para a produção de híbridos até o final da década de 60, principalmente nos EUA, por serem os restauradores desse tipo de citoplasma facilmente encontrados e pela ausência de pólen nesse subtipo. Dois genes nucleares dominantes, *rf1* e *rf2* (DUVICK, 1965), localizados nos cromossomos 3 e 9 respectivamente, em conjunto são essenciais para a restauração completa da fertilidade de genótipos contendo o citoplasma T. Além deles, os genes *rf8* e *rf\** são capazes de restaurar a fertilidade parcialmente nesse tipo de citoplasma

(WISE et al., 1999). Os genes *rf1*, *rf8* e *rf\** se caracterizam pela redução dos níveis de expressão do gene *urf13* (WISE et al., 1996). Em contraste, *rf2* é um gene regulatório do gene *rf1*, de expressão constitutiva (CUI et al., 1996), que tem sido amplamente estudado. Codifica uma aldeído desidrogenase (LIU et al., 2001), que, em plantas citoplasma T, tem a função de restauração da fertilidade e, em plantas de citoplasma normal, está envolvida no desenvolvimento das anteras (SOFI et al., 2007).

A macho esterilidade T foi praticamente extinta da produção de híbridos comerciais em consequência de uma epidemia causada pelo patógeno *Bipolaris maydis* raça T, causador da mancha de *Bipolaris maydis*. Entre 1969 e 1970, a incidência dessa doença foi extremamente forte nos cultivares que apresentavam citoplasma T e afetou drasticamente a produção de milho em função da susceptibilidade deste tipo de genótipo à toxina produzida pelo fungo (LEVINGS, 1993). A partir de então, passou-se a empregar o citoplasma normal ou o do tipo C ou S. Entretanto, os citoplasmas C e S não são estáveis, podendo ocorrer a reversão espontânea da fertilidade.

A toxina de *B. maydis* condiciona susceptibilidade específica para o citoplasma T. Ela inibe a respiração mitocondrial, desativa a fosforilação oxidativa, reduz o transporte de cálcio na mitocôndria, aumenta a permeabilidade da membrana ao H<sup>+</sup> e inibe o sistema de transporte dependente de malato. A virulência específica para o citoplasma T se deve ao gene mitocondrial *urf13*, responsável pelo fenótipo macho estéril em plantas citoplasma T e que está ausente nos citoplasmas C e S (SOFI et al., 2007).

O citoplasma S foi descrito pela primeira vez por Jenkins do USDA (GRACEN et al., 1979) na linhagem Teopod de milho. Os genótipos com citoplasma macho estéril S são caracterizados pela presença de pequenos plasmídeos de baixo peso molecular denominados S1 (6379 pares de bases) e S2 (5453 pares de bases) (PAILLARD et al., 1985) e pela capacidade de reversão espontânea da fertilidade. No milho com

citoplasma S, a macho esterilidade é associada com a expressão da quimera orf355-orf77 localizada no genoma mitocondrial (ZABALA et al., 1997). A restauração da fertilidade de plantas originadas de sementes colhidas em plantas com macho esterilidade tipo S ocorre por meio do gene nuclear dominante rf3, localizado no cromossomo 2. A ação do rf3 resulta na redução do tamanho dos transcritos do citoplasma S associados com a orf355-orf 77 (atp 9), bem como dos transcritos dos genes atp 6 e cob. Quase 60 locos restauradores da fertilidade de citoplasma S já foram descritos além do rf3, sete deles mapeados no cromossomo 2 e os outros nos cromossomos 1, 3, 6 e 8 (GABAY-LAUGHNAM et al., 2004). Grande parte desses locos não são úteis comercialmente, pois possuem características como a letalidade ou efeitos deletérios em homozigose, sendo denominados restauradores de fertilidade letais (WEN et al., 2003).

O citoplasma C foi descrito pela primeira vez por Beckett em 1971 na variedade brasileira Charrua. A mitocôndria desse tipo de citoplasma apresenta um peptídeo de 17.5 kD no lugar de um peptídeo de membrana no citoplasma normal (NEWTON, 1989). Além disso, já foram detectadas mutações nos genes atp 6, atp 9 e cosII, resultantes do rearranjo entre o genoma mitocondrial e o do cloroplasto.

A esterilidade masculina condicionada pelo citoplasma C em milho mostra-se mais estável que aquela observada pelo citoplasma S (WEIDER et al., 2009) e não está associada a doença alguma. Dessa forma, atualmente o citoplasma C tem sido o mais utilizado para geração de linhagens macho estéreis em programas de melhoramento de milho.

Existem relatos de que apenas um gene nuclear seria responsável pelo restabelecimento da fertilidade em milho de citoplasma C. Entretanto, Tang et al. (2002) e Weider et al. (2009), entre outros autores, apresentam evidências de que pelo menos dois ou três genes nucleares rf seriam importantes na restauração de fertilidade nesse tipo citoplasmático, sendo que o fenótipo macho estéril só ocorre se os locos estiverem em homozigose recessiva concomitantemente. Khey-Pour et al. (1981) e

Newton (1983) descrevem o rf4 como o gene dominante capaz de restaurar completamente a fertilidade nesse tipo de citoplasma, localizado no cromossomo 8. Segundo Kheyr-Pour et al. (1981) e Gabay-Laughnan et al. (2004), além dele, o rf5 e o Rf6 estão envolvidos na restauração da fertilidade nesse tipo de citoplasma.

## Marcadores moleculares

Para a produção de sementes no sistema que emprega a macho esterilidade citoplasmática para a produção de híbridos, uma das misturas comumente encontradas é a de linhagens mantenedoras com linhagens macho estéreis. Como ambas são isogênicas do ponto de vista nuclear, não é possível distinguir entre elas até a época do florescimento. A pureza dos lotes de sementes normalmente é avaliada por meio de grow out em uma amostra representativa do lote a ser comercializado (VERMA, 1996). O grow out envolve o crescimento das plantas até as mesmas atingirem a maturidade e a avaliação das características fenotípicas que distinguem o híbrido. O grow out é caro e o resultado está sujeito à interação genótipo-ambiente.

Marcadores moleculares podem ser empregados para acessar mais rápida e precisamente a pureza genética de híbridos e das linhas parentais, inclusive em um sistema que emprega a macho esterilidade citoplasmática. Mutações específicas no DNA mitocondrial associadas com cada tipo de macho esterilidade citoplasmática são empregadas para diferenciar entre os citoplasmas C, T ou S com bastante rapidez por meio de reações em cadeia da polimerase ou PCR (LIU et al., 2002). A utilização de marcadores moleculares para esses genes citoplasmáticos permite, também, diferenciar plantas com citoplasma normal. O gene quimérico urf13 é detectado no DNA mitocondrial do citoplasma T (DEWEY et al., 1986); uma ORF de origem desconhecida na região quimérica atp6/atp9 é empregada no citoplasma C (DEWEY et al., 1991); uma região repetitiva

no DNA mitocondrial contendo duas ORFs quiméricas (ORF355 e ORF77) é empregada no citoplasma S (ZABALA et al., 1997).

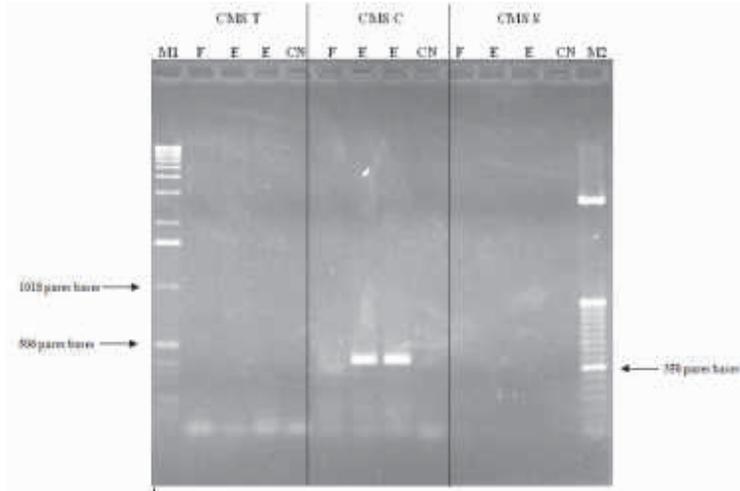
Analisando linhagens elite do programa de melhoramento da Embrapa Milho e Sorgo, foi identificada a macho esterilidade tipo C. Na Figura 1, podem ser visualizados detalhes do florescimento de uma linhagem elite nas versões fértil e macho estéril plantadas na mesma época. Foi realizado um teste por meio da amplificação com os marcadores CMS T, CMS S e CMS C, conforme descrito por Liu et al. (2002). Foi obtido um fragmento de 398 pares de bases amplificado com o marcador CMS C indicando macho esterilidade citoplasmática do tipo C no material analisado (Figura 2).

A variação na sequência mitocondrial também pode ser empregada para o fingerprinting do citoplasma macho estéril, sendo possível estimar a diversidade dos acessos do germoplasma e identificar novas fontes de citoplasma indutores da macho esterilidade (XU et al., 1995).

A recombinação no genoma mitocondrial das plantas é uma grande força evolucionária responsável pela criação de variação genética. Diferenças na estrutura e na expressão do genoma mitocondrial podem fornecer critérios moleculares para a diferenciação dos mesmos por meio de marcadores moleculares. Essa ferramenta possibilita resposta rápida e simples na identificação de citoplasmas macho estéreis disponíveis para o melhorista e para o controle de qualidade na indústria de sementes.



**Figura 1:** Detalhes de plantas férteis e macho estéreis. A: Plantas macho estéreis em fase de florescimento (pendões fechados, sem pólen). B: Detalhe do pendão de planta macho estéril (pendão fechado, sem pólen). C: Detalhe do pendão de planta fértil (pendão liberando pólen)



**Figura 2:** Teste para verificação do tipo de macho esterilidade citoplasmática em linhagem elite do programa de melhoramento da Embrapa Milho e Sorgo por meio da amplificação com os marcadores CMS T, CMS S e CMS C, conforme descrito por Liu et al. (2002). Fragmento de 398 pares de bases amplificado com o marcador CMS C nas amostras estéreis indicando macho esterilidade citoplasmática do tipo C. M1: marcador de peso molecular 1Kb DNA Ladder (Invitrogen, Cat. No. 15615-016). F: amostra de linhagem fértil. E: amostra de linhagem estéril. CN: controle negativo, reação de amplificação sem DNA. M2. Marcador de peso molecular 50 pb DNA Ladder (Invitrogen, Cat. No.: 10416-014)

## Referências

- BECKETT, J. B. Classification of male-sterile cytoplasm in maize (*Zea mays* L.). **Crop Science**, Madison, v. 11, p. 724-727, 1971.
- CHAUBAL, R.; ANDERSON, J. R.; TRIMNELL, M. R.; FOX, T. W.; ALBERTSEN, M. C.; BEDINGER, P. The transformation of anthers in the *msca1* mutant of maize. **Planta**, New York, v. 216, p. 778-788, 2003.
- CUI, X.; WISE, R. P.; SCHNABLE, P. S. The *rf2* nuclear restorer gene of male-sterile T-cytoplasm in maize. **Science**, Washington, v. 272, p. 1334-1336, 1996.
- DEWEY, R. E.; TIMOTHY, D. H.; LEVINGS III, C. S. Chimeric mitochondrial genes expressed in the C male sterile cytoplasm of maize. **Current Genetics**, New York, v. 20, p. 475-482, 1991.
- DEWEY R. E.; LEVINGS III, C. S.; TIMOTHY, D. H. Novel recombinations in the maize mitochondrial genome produce a unique transcriptional unit in the Texas male-sterile cytoplasm. **Cell**, Cambridge, v. 44, p. 439-449, 1986.
- DUVICK, D. N. Cytoplasmic pollen sterility in corn. **Advances in Genetics**, New York, v. 13, p. 1-56, 1965.
- EYSTER, L. A. Heritable characters of maize. VII. Male sterile. **Journal of Heredity**, Washington, v. 12, p.138-141, 1921.
- GABAY-LAUGHNAN, S.; CHASE, C. D.; ORTEGA, V. M.; ZHAO, L. M. Molecular-genetic characterization of CMS-S restorer-of fertility alleles identified in Mexican maize and teosinte. **Genetics**, Maryland, v. 166, p. 959-970, 2004.
- GRACEN, V. E.; KHEJR-POUR, A.; EARLE, E. D.; GREGORY, P. Cytoplasmic inheritance of male-sterility and pest resistance. **Proceedings of Annual Corn and Sorghum Research Conference**, v. 34, p. 76-91, 1979.
- JANSKA, H.; SARRIA, R.; WOLOSZYNSKA, M.; ARRIETA-MONTIEL, M.; MACKENZIE, S. A. Stoichiometric shifts in the common bean mitochondrial genome leading to male sterility and spontaneous reversion to fertility. **Plant**

**Cell**, Rockville, v. 10, p. 1163-1180, 1998.

JONES, D. F.; STINSON, H. T. J.; KHOO, U. **Pollen restoring genes**. New Haven: Connecticut Agricultural Experiment Station, 1957. (Bulletin, 610).

KHEYR-POUR, A.; GRACEN, V. E.; EVERETT, H. L. Genetics of fertility restoration in the C-group of cytoplasmic male sterility in maize. **Genetics**, Maryland, v. 98, p. 379-388, 1981.

LEVINGS, C. Thoughts on cytoplasmic male sterility in cms-T maize. **Plant Cell**, Rockville, v. 5, p. 1285-1290, 1993.

LI, J. M.; YUAN, L. P. Hybrid rice, genetics, breeding, and seed production. **Plant Breeding Reviews**, New York, v. 17, p. 150-158, 2000.

LIU, F.; CUI, X.; HORNER, H. T.; WEINER, H.; SCHNABLE, P. S. Mitochondrial aldehyde dehydrogenase activity is required for male fertility in maize. **Plant Cell**, Rockville, v. 13, p. 1063-1078, 2001.

LIU, Z.; PETER, S. O.; LONG, M.; 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.

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

NEWTON, K. Plant mitochondrial genomes: organisation, expression and variation. **Annual Review of Plant Physiology and Molecular Biology**, Palo Alto, v. 39, p. 505-532, 1983.

PAILLARD, M.; SEDEROFF, R. R.; LEVINGS, III, C. S. Nucleotide sequence of the S-1 mitochondrial DNA from the S cytoplasm of maize. **EMBO Journal**, Oxford, v. 4, p. 1125-1128, 1985.

PEREZ, P. T.; CIANZIO, S. R.; ORTIZ-PEREZ, E.; PALMER, R. G. Agronomic performance of soybean hybrids from single, three-way, four-way, and five-way crosses, and backcrosspopulations. **Journal of Crop Improvement**, v. 23, p. 95-118, 2009.

RHOADES, M. The cytoplasmic inheritance of male sterility in *Zea mays*. **Journal of Genetics**, London, v. 27, p. 71-93, 1933.

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

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

SARRIA, R.; LYZNIK, A.; VALLEJOS, E. C.; MACKENZIE, S. A. A cytoplasmic male sterility-associated mitochondrial peptide in common bean is post-translationally regulated. **Plant Cell**, Rockville, v. 10, p. 1217-1228, 1998.

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

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

TANG, J. H.; LIU, Z. H.; CHEN, W. C.; HU, Y. M.; JI, H. Q.; JI, L. Y.; XIE, H. L.; HUANG, X. L. Mapping major restore genes for C-type cytoplasmic male sterility in maize with SSR marker. **Agricultural Science in China**, v. 1, n. 3j, p. 269-273, 2002.

VERMA, M. M. Procedures for Grow-Out-Test (GOT). **Seed Technology Newsletter**, v. 26, p. 1-4, 1996.

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

WEN, L.; RUESCH, K.; ORTEGA, V.; KAMPS, T.; GABAY-LAUGHNAN, S.; CHASE, C. A nuclear restorer-of-fertility mutation disrupts accumulation of mitochondrial ATP synthase subunit in developing pollen of S male-sterile maize. **Genetics**, Maryland, v. 165, p. 771-779, 2003.

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

WISE, R. P.; GOBELMAN-WERNER, K.; PEI, D.; DILL, C. L.; SCHNABLE, P. S. Mitochondrial transcript processing and restoration of male fertility in T-cytoplasm maize. **Journal of Heredity**, Washington, v. 90, p. 380-385, 1999.

XU, G. W.; CUI, Y. X.; SCHERTZ, K. F.; HART, G. E. Isolation of mitochondrial DNA sequences that distinguish male-sterility-inducing cytoplasms in *Sorghum bicolor* (L.) Moench. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 90, p. 1180-1187, 1995.

YUE, B.; VICK, B. A.; CAI, X.; HU, J. Genetic mapping for the Rf1 (fertility restoration) gene in sunflower (*Helianthus annuus* L.) by SSR and TRAP markers. **Plant Breeding**, 2009. Disponível em: <<http://www3.interscience.wiley.com/cgi-bin/fulltext/122438455/PDFSTART>>. Acesso em: 20 jun. 2009.

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

