

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

Ganho com seleção e diversidade genética: medidas para
monitorar o melhoramento populacional de arroz

Ana Cláudia de Carvalho Badan

Orientador: Dr. Elcio Perpétuo Guimarães

Co-orientadora: Dra. Catalina Ramis-S.

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da
Universidade Estadual de Campinas para a
obtenção do título de Doutor em Genética e
Biologia Molecular na área de Genética
Vegetal e Melhoramento

Campinas-SP- Brasil

2003

BANCA EXAMINADORA

Data da defesa: 24 de Outubro de 2003.

Dr. Elcio Perpétuo Guimarães

Dr. Louis Bernard Klacsko

Dra. Anete Pereira de Souza

Dr. Aluizio Borém

Dra. Sandra Milach

Dedicatória

Aos amigos,
que de longe ou de perto,
sempre estiveram presentes...

Agradecimento

Meu muito obrigada...

Ao querido amigo e orientador Elcio Perpétuo Guimarães, que me serve como guia por sua maneira de ser, de estimular, de liderar grupos por onde quer que passe, com seu jeito simples de plantar idéias e de dar asas aos seus colaboradores, sempre lhes apoiando.

À querida amiga e co-orientadora Catalina Ramis, que além de ensinar a tenacidade e criatividade durante o trabalho, mostrou como acolher pessoas e unir laboratórios.

Aos amigos Rosana e Cláudio Brondani, e Dr. Prabhu que me ensinaram o “bê-á-bá” molecular e fitopatológico.

Aos Dr. Fernando Ajmad e Eng. Agr. Carlos Gamboa da Fundación DANAC e também Dr. Pedro Arraes e Dra. Beatriz S. Pinheiro da Embrapa Arroz e Feijão, pelo apoio ao meu trabalho junto às suas instituições.

Aos respeitados professores Dra. Anete Pereira de Souza, Dr. Cláudio Lopes Souza Júnior, Dr. Isaías Olivio Geraldi e Dr. Louis Bernard Klacsko que, além de terem contribuído diretamente na minha formação, me deram a honra de terem aceitado participar da pré-banca e/ou banca dessa tese.

Aos Doutores Aluizio Borém e Sandra Milach que se fizeram próximos através de sua literatura, e que aceitaram opinar diretamente sobre esse trabalho, na banca dessa tese.

Aos Doutores Francisco Zimmerman (Embrapa Arroz e Feijão); Rosana Figueroa (UCV); Marc Chatel (CIRAD/CIAT), Antônio Dias (UCV) e Jaimes Taillebois (CIRAD); que participaram com importantes ensinamentos durante a realização dessa tese.

Ao Dr. Usberti, por ter me acompanhado nos primeiros passos dentro do melhoramento genético.

Às “meninas” das bibliotecas que deram apoio tanto nas buscas dos trabalhos quanto na formatação final da tese, em especial a Luciana (IB/Unicamp), Célia e Regina (BC/Unicamp), Ana (CNPAF).

Aos amigos de “todo dia” da Embrapa: Pedro Maurício, Sr. Hilton, Jânio, Luis, Rodrigo, Dionídio, Priscila, Tereza, Tatiana, Mara, Maria Imaculada, Zezinho, Elsa, Romilda, Claudeci, D. Faustina e Aurelie;

aos amigos de “todo dia” na Venezuela: Ariadna; Joad, Maria Ines, Fabiana, Érika, Kátiusca, Maureen, Petra, Blanca, Arancha e Daniel;

aos amigos de “todo dia” na Unicamp: Milena, Alexandre, Luciana Pinto, Andréia, Sibov, Luciana Benchimol e Silvana (*in memoriam*);

e aos vários amigos de “de vez em quando” de todos esses lugares: também igualmente importantes,

por terem feito os dias (e às vezes noites) passarem de maneira mais agradável, tanto pelas boas e diferentes ajudas como pelas risadas compartilhadas.

E, finalmente aos amigos “de todo momento”, que não foram associados a nenhuma instituição em particular: Sandrinha, Yolima, Nivaldo, Natália, Edson, Fá, Júlio, Papai, Mamãe e Evandro agradeço pelo grande apoio que transcende aos pontos, genes, variâncias, sinônimos, separação de sementes férteis e estéreis, e bibliografias.

E também às instituições, e principalmente às pessoas que nelas trabalham, que possibilitaram que esse trabalho fosse desenvolvido: Coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior (CAPES), Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Embrapa Arroz e Feijão, Fundación para Investigación Agrícola DANAC (DANAC), Universidad Central de Venezuela (UCV), Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT).

Resumo

A crescente utilização do método de seleção recorrente para conduzir o melhoramento de populações de ampla base genética em arroz tem requerido, cada vez mais, uma apreciação da eficiência de suas etapas. Nesse estudo, a população de arroz de terras altas CNA-7 - da Embrapa Arroz e Feijão, no Brasil - e a população PFD-1 desenvolvida para condições irrigadas - da Fundación para Investigación Agrícola DANAC, na Venezuela - foram monitoradas ao longo de seus ciclos de seleção recorrente. O progresso genético foi avaliado na população CNA-7 e a variabilidade genética foi estimada em ambas. No capítulo 1, se apresentam os resultados do progresso genético. Eles indicam que os procedimentos de avaliação e seleção aplicados foram eficientes para incrementar a resistência a brusone na folha (BI) em 13,1% no ciclo 1 e em 6,1% no ciclo 2; no entanto, não o foram para brusone no pescoço da panícula (NBI) na população CNA-7. Nos capítulos 2 e 3, as análises dos dados de microssatélites mostraram que para ambas as populações os valores de diversidade de Nei não se alteraram em termos estatísticos ao longo dos ciclos estudados. Isso significa que não são necessárias novas introduções de genitores nas populações. Na CNA-7, esse valor foi de 0,66 para o ciclo 0 e de 0,63 para o ciclo 2, enquanto que na PFD-1 a estimativa foi de 0,60 para o ciclo 0 e de 0,57 para o ciclo 1. O número de alelos/locos encontrados nos diferentes ciclos (5,3; 5,0 e 5,2; 4,5) indicaram uma grande variabilidade genética nas duas populações. Adicionalmente, os marcadores moleculares ajudaram a detectar um número de homozigotos maior do que o esperado assumindo-se a ocorrência de panmixia. Conclui-se que o monitoramento das populações por meio das estimativas de ganho genético e da diversidade genética é uma ferramenta importante para a seleção recorrente em arroz.

Palavras-chave: arroz; seleção recorrente; melhoramento genético populacional; ganho com seleção; brusone; diversidade genética; marcadores moleculares.

Abstract

The growing utilization of the recurrent selection method to conduct breeding populations of broad genetic-base in rice has increasingly demanded an appreciation on the efficiency of its phases. In this study, the upland CNA-7 rice population - from Embrapa Arroz e Feijão, in Brazil - and the lowland PFD-1 population – from Fundación para Investigación Agrícola DANAC, in Venezuela - were monitored along its recurrent selection cycles. Genetic gain was evaluated in the CNA-7 population, and genetic variability was estimated in both. In chapter 1, the results of the genetic gain are shown. They indicate that the evaluation and selection proceedings applied were efficient to increase the blast resistance (BI) by 13.1% in the cycle 1, and by 6.1% in cycle 2; however, they were not efficient to increase neck blast resistance (NBI) in the CNA-7 population. In chapters 2 and 3, the analyses of microsatellite data showed that to both populations the values of Nei's diversity did not change in statistical terms throughout the cycles studied. This means that introducing genitors in the populations is not required. In CNA-7, the value was 0.66 to cycle 0 and 0.63 to cycle 2, while at PFD-1 this value was 0.60 to cycle 0 and 0.57 to cycle 1. The values of alleles/loci found in different cycles (5.3; 5.0 and 5.2; 4.5) indicated great genetic variability within both populations. Moreover, the molecular markers helped to detect bigger number of homozigotes than it was expected by panmixy. The conclusion is that monitoring the populations evaluating genetic gain and genetic diversity is a very important tool to recurrent selection in rice.

Key-words: rice, recurrent selection, population breeding, genetic gain, blast, genetic diversity, molecular markers.

Listas de ilustrações e tabelas

CAPÍTULO 1

- Cuadro 1.** Progenitores y participación relativa (%) de las fuentes de resistencia a Piricularia introducidas en las poblaciones CNA-IRAT 5/2/1 y CNA-IRAT 9B/2/2 para formar las poblaciones de arroz CNA-7A y CNA-7B, respectivamente ---- (*livro Mejoramiento Poblacional p.326*) 31
- Cuadro 2.** Resumen del flujo de materiales de la población de arroz de tierras altas CNA-7 en la Estación Experimental Capivara (EEC), Santo Antônio de Goiás, y en el Campo Avanzado de Desarrollo e Investigación del Tocantins (CADIT) utilizando el método de mejoramiento poblacional con evaluación de familias $S_{0:2}$ para resistência a Piricularia ---- (*livro Mejoramiento Poblacional p. 328*) 33
- Cuadro 3.** Datos de Piricularia en la hoja (BI) para el promedio, el porcentaje de plantas resistentes (% R) y el porcentaje de plantas intermedias (% I) de los tratamientos ciclo 0 (C0), 1 (C1) y 2 (C2) de la población CNA-7, en los experimentos conducidos en las localidades EEC y EEP, en dos fechas de siembra (EEC 1 y 2, y EEP 1 y 2) ---- (*livro Mejoramiento Poblacional p.334*) 39
- Cuadro 4.** Cuadrados medios del análisis de varianza combinado y coeficientes de variación (CV) para el promedio, el porcentaje de plantas resistentes (% R) y el porcentaje de plantas intermedias (% I) de la característica Piricularia en la hoja (BI) en la población CNA-7 ---- (*livro Mejoramiento Poblacional p. 335*) 40
- Cuadro 5.** Valores de ganancia genética absoluta y porcentual de la resistencia a Piricularia en la hoja (BI) para el promedio, el porcentaje de plantas resistentes (% R) y el porcentaje de plantas intermedia (% I) en la población CNA-7, a lo largo de los tratamientos ciclo 0 (C0), 1 (C1) y 2 (C2) a través de datos obtenidos en los experimentos distribuidos en las localidades EEC y EEP, en dos fechas de siembra (EEC 1 y 2), (EEP 1 y 2) ---- (*livro Mejoramiento Poblacional p.337*) 42

Cuadro 6. Cuadrados medios del análisis de varianza por localidad y coeficientes de variación (CV) para el promedio, el porcentaje de plantas resistentes (% R) y el porcentaje de plantas intermedias (% I) de la característica Piricularia en la hoja (BI) en la población CNA-7 a través de datos obtenidos en los experimentos conducidos en la EEC y EEP en dos fechas de siembra (EEC 1 y 2), (EEP 1 y 2) ---- (*livro Mejoramiento Poblacional p.339*) 44

Cuadro 7. Cuadrados medios del análisis de varianza individual y coeficientes de variación (CV) para el promedio, el porcentaje de plantas resistentes (% R) y el porcentaje de plantas intermedias (% I) de la característica Piricularia en la hoja (BI) en la población CNA-7 a través de datos obtenidos en los experimentos conducidos en la EEC en dos fechas de siembra (EEC 1 y 2) ---- (*livro Mejoramiento Poblacional p.340*) 45

Cuadro 8. Cuadrados medios del análisis de varianza individual y coeficientes de variación (CV) para el promedio, el porcentaje de plantas resistentes (% R) y el porcentaje de plantas intermedias (% I) de la característica Piricularia en la hoja (BI) en la población CNA-7 a través de datos obtenidos en los experimentos distribuidos en la EEP en dos fechas de siembra (EEP 1 y 2) ---- (*livro Mejoramiento Poblacional p.341*) 46

Figura 1. Gráficas con regresión lineal de la resistencia a Piricularia en la hoja (BI) en la población CNA-7 a lo largo de los ciclos 0, 1, 2 del Programa de Mejoramiento donde el valor “b” de las formulas representa la heredabilidad realizada para el promedio (A), la % I (B) y % R (C) ---- (*livro Mejoramiento Poblacional p.342*) 47

Cuadro 9. Datos de Piricularia en el cuello de la panícula (NBI) para el promedio, el porcentaje de plantas resistentes (% R) y el porcentaje de plantas intermedias (% I) de los tratamientos Ciclo 0 (C0), 1 (C1) y 2 (C2) de la población CNA-7, en los experimentos distribuidos en las localidades EEC y EEP, en dos fechas de siembra (EEC 1 y 2, y EEP 1 y 2) ---- (*livro Mejoramiento Poblacional p.344*) 49

Cuadro 10. Cuadrados medios del análisis de varianza por localidad y coeficientes de variación (CV) para el promedio, el porcentaje de plantas resistentes (% R) y el porcentaje de plantas intermedias (% I) de la característica Piricularia en el cuello de la panícula (NBI) en la población CNA-7 a través de datos obtenidos en los experimentos conducidos en la EEC y EEP en dos fechas de siembra (EEC 1 y 2), (EEP 1 y 2) ---- (*livro Mejoramiento Poblacional p.345*) 50

Cuadro 11. Cuadrados medios del análisis de varianza individual y coeficientes de variación (CV) para el promedio, el porcentaje de plantas resistentes (% R) y el porcentaje de plantas intermedias (% I) de la característica Piricularia en el cuello de la panícula (NBI) en la población CNA-7 a través de datos obtenidos en los experimentos distribuidos en la EEC en dos fechas de siembra (EEC 1 y 2) ---- (*livro Mejoramiento Poblacional p.346*) 51

Cuadro 12. Cuadrados medios del análisis de varianza individual y coeficientes de variación (CV) para el promedio, el porcentaje de plantas resistentes (% R) y el porcentaje de plantas intermedias (% I) de la característica Piricularia en el cuello de la panícula (NBI) en la población CNA-7 a través de datos obtenidos en los experimentos distribuidos en la EEP en dos fechas de siembra (EEP 1 y 2) ---- (*livro Mejoramiento Poblacional p.348*) 53

CAPÍTULO 2

Cuadro 1. Distintos patrones (P_i) electroforéticos observados para las isoenzimas isocitrato deshidrogenasa (IDH), fosfoglucoisomerasa (PGI), β -esterasa (β -est I y β -est II) y fosfatasa ácida (ACP) en la población de arroz PFD-1, ciclo 0, y cuatro cultivares comerciales de arroz Araure 4, Cimarrón, Fonaiap 1 y Palmar ---- (*livro Mejoramiento Poblacional p.83*) 66

Cuadro 2. Índices de Shannon-Weaver (H), Uniformidad (E) y complemento del índice de Simpson (D), en cinco sistemas isoenzimáticos de la población de arroz PFD-1 ciclo 0 ---- (*livro Mejoramiento Poblacional p.84*) 67

Figura 1. Dendrograma construido con base en estimaciones de similitud genética por el coeficiente de Jaccard y cálculo de agrupamiento por el método UPGMA, de 136 plantas del ciclo 0 de Selección recurrente de la población PFD-1 y 4 variedades venezolanas de arroz (Araure 4, Palmar, Cimarrón y Fonaiap 1) ---- (*livro Mejoramiento Poblacional p.85*) 68

Cuadro 3. Patrones isoenzimáticos encontrados en 136 individuos del ciclo 0 de la población PFD-1 del programa de selección recurrente en arroz ---- (*livro Mejoramiento Poblacional p.87*) 70

-
- Cuadro 4.** Número de alelos en cada SSR analizado para los ciclos 0 y 1 de la población PFD-1, y comparación con los resultados obtenidos por Temnykh et al. (2000) ---- (**livro Mejoramiento Poblacional p.88**) 71
- Cuadro 5.** Frecuencias alélicas (p_i) de cada alelo y prueba exacta de diferenciación génica y genotípica para cada locus microsatélite (SSR) entre los ciclos 0 y 1 de la población PFD-1 -- -- (**livro Mejoramiento Poblacional p.85**) 74
- Cuadro 6.** Heterocigosis esperada (H_e) y observada (H_o), coeficiente de endocria (f) y cumplimiento de equilibrio de Hardy-Weinberg (H-W) de diez marcadores microsatélites (SSRs) en los ciclos 0 y 1 de la población PFD-1 ---- (**livro Mejoramiento Poblacional p.94**) 77
- Cuadro 7.** Prueba de detección de desequilibrio de ligamiento para diez SSR, de los ciclo 0 (fondo gris oscuro) y ciclo 1 (fondo gris claro) de la población PFD-1 ---- (**livro Mejoramiento Poblacional p.96**) 79

CAPÍTULO 3

Tabela 1. Freqüência alélica nos ciclos 0 e 2 da população de arroz CNA-7, para cada primer avaliado. Intervalo de confiança calculado com base na distribuição binomial dos dados. N. representa o número de bandas encontradas. O número do cromossomo onde se encontram os primers (Cromos.) 99

Tabela 2. Valores de Heterozigosidade esperada (H_e), Heterozigosidade observada (H_o), Coeficiente de endogamia de Fisher (f), para cada um dos primers estudados nos ciclos 0 e 2 da população de arroz CNA-7, e cromossomos onde os primers estão localizados (Crom.), segundo literatura (www.gramene.org e Brondani et al., 2001) 100

Sumário geral

Dedicatória _____	iv
Agradecimento _____	v
Resumo _____	vii
Abstract _____	viii
Listas de ilustrações e tabelas _____	ix
Sumário geral _____	xiii
Introdução geral _____	1
Revisão geral de literatura _____	3
Arroz (<i>Oryza sativa</i> L.) _____	3
O melhoramento genético do arroz _____	4
Ferramentas para avaliação da eficiência do programa de melhoramento _____	7
Estimativa de ganho com seleção (Gs) _____	8
Avaliação de diversidade genética utilizando marcadores moleculares _____	9
Objetivos do trabalho _____	13
Apresentação do trabalho _____	14
Referências _____	16
Capítulo 1 _____ (<i>livro Mejoramiento Poblacional p.319-354</i>) _____	23
Capítulo 2 _____ (<i>livro Mejoramiento Poblacional p.77-98</i>) _____	60
Capítulo 3 _____ (<i>artigo a ser enviado a TAG</i>) _____	83
Considerações finais _____	101
Conclusão _____	104

Introdução geral

O arroz é importante na alimentação humana. Trata-se do terceiro grão mais consumido no mundo, perdendo apenas para o milho e o trigo. Na América Latina, seu consumo é de aproximadamente 30 kg *per capita* / ano de grãos em casca (*paddy*). Desde os anos 60, a produção mundial vem apresentando uma tendência de aumento e, segundo as projeções de crescimento populacional, deverá ser incrementada em 800 mil ton/ano para atender a demanda potencial.

Esse aumento na produção foi devido, basicamente, a dois fatores, expansão da área cultivada e aumento na produtividade. Influenciaram no segundo fator a melhoria no manejo da cultura e a produção de melhores cultivares. O melhoramento genético, nos últimos anos, contribuiu para o lançamento de muitos cultivares com características como resistência a doenças, precocidade, tipo de planta, qualidade de grãos e, obviamente, elevado potencial produtivo.

Com ênfase na produção de cultivares cada vez melhores e com as características exigidas pelo mercado, os melhoristas da América Latina concentraram-se na utilização de um pequeno grupo de genitores em seus programas de melhoramento genético. Isso representou um estreitamento na base genética das cultivares plantadas. Esse aspecto pode ter como conseqüência uma maior vulnerabilidade da cultura ao ataque massivo de novas pragas e patógenos, e a dificuldade na obtenção de genótipos superiores aos já existentes.

Com a intenção de buscar uma solução para esse problema, os pesquisadores passaram a utilizar o melhoramento populacional do arroz como uma alternativa adicional aos métodos disponíveis para a melhoria das espécies autógamias. A metodologia parte da síntese de populações de ampla base genética, através da realização de cruzamentos entre vários genitores de origem e constituição genética diversas. No caso do arroz, estes cruzamentos foram facilitados pela

utilização de um gene de androesterilidade, que, introduzido na população, permite o cruzamento aleatório entre os indivíduos, sem a necessidade da emasculação artificial. Ao se conduzir essas populações através de ciclos de seleção recorrente é possível acumular genes favoráveis ao longo das gerações, e permitir que eles se combinem. Dentro dessas novas combinações genéticas que deve ser possível selecionar genótipos superiores.

O melhoramento populacional em arroz teve início em 1984, na Embrapa Arroz e Feijão, Goiânia, Goiás, Brasil, em um convênio com o "Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement" (CIRAD, antigo IRAT), Montpellier, França. Em 1989, essa estratégia passou a ser utilizada pelo Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colômbia, em convênio com o CIRAD. Em 1996, essa metodologia chegou ao programa de melhoramento genético da "Fundación para la Investigación Agrícola Danac (FD)", San Felipe, Yaracuy, Venezuela. Atualmente, a Embrapa Arroz e Feijão e a "FD" são as duas organizações dentro da América Latina que maiores esforços têm dedicado ao uso dessa metodologia.

Monitorar o progresso genético realizado com os ciclos de seleção recorrente, bem como a alteração que esse processo causa na variabilidade genética presente na população é fundamental para que os melhoristas tomem decisões que permitam incrementar a eficiência de seus programas. Algumas maneiras que os melhoristas têm para avaliar se os procedimentos que vêm adotando estão sendo eficientes são: 1) verificar alterações na média da população; 2) avaliar os efeitos nas frequências alélicas; e 3) estimar as alterações na variabilidade genética da população.

Este trabalho teve dois objetivos principais: 1) avaliar o progresso genético para resistência à doença brusone, tanto na folha como no pescoço da panícula, resultante de dois ciclos de seleção recorrente na população CNA-7 e 2) avaliar os efeitos dos ciclos de seleção recorrente na diversidade genética de populações de arroz melhoradas no Brasil (CNA-7) e na Venezuela (PFD-1).

Revisão geral de literatura

Arroz (*Oryza sativa* L.)

O arroz é um cultivo de grande importância por ser uma entre as 15 espécies responsáveis por 90% da alimentação mundial (PATERNIANI, 2000). Na América Latina, seu consumo anual *per capita* girava em torno de 10 kg de arroz em casca nos anos 1920 e subiu para aproximadamente 30 kg nos anos 1990 (CIAT, 2002). É um produto, geralmente relacionado à alimentação da população de baixa renda que, na América Latina, corresponde a 40% da população total (CIAT, 2002).

O arroz apresenta um sistema de reprodução naturalmente autógamo (CASTRO et al., 1999), ou seja, que se autofecunda antes da antese, fenômeno conhecido como cleistogamia. Como consequência, a variabilidade genética se manifesta entre progênies endogâmicas mas não dentro destas.

As espécies cultivadas dentro do gênero *Oryza* são: *O. glaberrima* e *O. sativa* (CASTRO et al., 1999). O cultivo da primeira predomina no continente Africano e a segunda está distribuída em praticamente todos os países do mundo. Histórias de domesticação desta última espécie levaram à sua diferenciação nas subespécies *indica* e *japonica* (CHEN et al., 1994). Em geral, os grãos longos e finos e o cultivo em condições irrigadas eram características dos tipos *indica*, enquanto os tipos *japonica* apresentavam seus grãos do tipo cateto, que são mais curtos e têm menor conteúdo de amilose, produzindo um grão pegajoso (TERRES et al., 1999). No Brasil, os tipos *japonica* eram plantados com o sistema de cultivo de terras altas (sequeiro) e os tipos *indica* sob irrigação, diferenças essas, já não perceptíveis nas variedades atuais.

Dentro da América Latina, os principais sistemas de cultivo do arroz são os de várzeas, com 55% da área, e de terras altas, com 45%

(<http://www.ciat.cgiar.org/riceweb/background.htm>), no Brasil, entretanto, essas cifras se invertem em relação à área de plantio, isto é 60% em cultivos de terras altas e 40% em cultivo de várzeas; mas, se mantém em relação à produtividade em 40% de terras altas e 60% de várzeas (Embrapa Arroz e Feijão, 2002). No sistema de várzea brasileiro, a produtividade média é de 5,5 ton/ha (AGRIANUAL, 2003). Na Venezuela a situação é bem diferente: o sistema de terras altas praticamente não existe e a produtividade média é de 4,6 ton/ha.

Dos anos 60 até 1995, a produtividade média do arroz irrigado em toda América Latina subiu de 3,3 para 4,6 ton/ha (CIAT, 2002), isso graças, principalmente, à utilização de variedades geneticamente melhoradas.

O melhoramento genético do arroz

O melhoramento genético de qualquer cultura caracteriza-se por sua dinâmica, visto que tem que acompanhar e vislumbrar as demandas dos diferentes elos da cadeia produtiva (CASTRO et al., 1999). Cada programa é conduzido objetivando atingir alvos específicos, como a resistência a enfermidades, a melhoria da qualidade de grãos ou mesmo a adaptação a ambientes específicos (CASTRO et al., 1999).

Sob uma perspectiva histórica, os programas de melhoramento poderiam ser genericamente descritos considerando-se o arroz de várzea ou irrigado separadamente do arroz de terras altas (PEDROSO et al., 1990; VENCOVSKY; RAMALHO, 2000). Para o arroz de várzeas, considera-se que nos anos 60 tenham sido cultivadas principalmente as variedades tradicionais, com porte alto e nos anos 70, que tenha ocorrido uma substituição dessas variedades por aquelas de porte

mais baixo (semi-anã), com elevado potencial produtivo. Padrão este, mantido até hoje.

Para o arroz de terras altas, considera-se ter havido uma predominância do cultivo dos materiais tradicionais desde o início até meados dos anos 70. No entanto, essa situação alterou-se a partir do momento que o arroz passou a ter o papel de abrir novas fronteiras agrícolas. Para essa nova função, as plantas com características de rusticidade e adaptação a solos ácidos foram as preferidas. No início dos anos 90, as atenções voltaram-se ao potencial produtivo e ao tipo de planta. Do mesmo modo, a melhoria da qualidade de grão passou a ter grande destaque. A necessidade de ampliação da base genética das variedades cultivadas, tanto nas variedades de várzea como nas de terras altas, também passou a ser uma preocupação para os pesquisadores na década de 90.

Este tipo de inquietação fez com que a Embrapa Arroz e Feijão em um convênio com o "Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement", (CIRAD, antigo IRAT), iniciasse um programa de desenvolvimento e melhoramento de populações de arroz de ampla base genética em 1984 (CHATEL; GUIMARÃES, 1997). Isso foi facilitado com a utilização de um gene recessivo de androesterilidade, obtido por Singh e Ikehashi (1981) através da indução de mutação na variedade IR36. A presença desse gene permite que o cruzamento entre as plantas seja feito sem a emasculação, economizando o grande e cansativo trabalho de castrar as flores.

Em 1989, o Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) reconheceu a importância dessa estratégia para a América Latina e começou a trabalhar o tema em colaboração com a Embrapa Arroz e Feijão (GUIMARÃES, 2000). A partir daí, várias populações de ampla base genética foram desenvolvidas e disponibilizadas aos pesquisadores dos programas de melhoramento da região (GUIMARÃES, 2000). De 1995 em diante, após terem sido realizados vários cursos, reuniões e conferências internacionais pelo CIAT/CIRAD e pela Embrapa Arroz e Feijão,

diversos países da região passaram a conhecer e, em seguida, a utilizar estas populações dentro de seus programas de melhoramento (GUIMARÃES, 2000). A estratégia de condução dessas populações variou de instituição para instituição, conforme as possibilidades institucionais, interesses e necessidades de cada país. O programa de melhoramento genético de El Salvador, por exemplo, utilizou-se diretamente das populações introduzidas (SERVELLÓN, 2000). O programa da Venezuela optou por selecionar as populações com maior adaptabilidade local e cruzar as populações escolhidas com as variedades com características de interesse (GRATEROL, 2000). As estratégias utilizadas na Argentina, no Chile, em Cuba, na Bolívia, na Colômbia, e no Brasil são descritas em Guimarães (2000) por diversos autores. O melhoramento populacional em todos esses casos esteve baseado no método de seleção recorrente.

O método, que envolve as fases de geração de progênies, avaliação/seleção e recombinação, é recomendado para caracteres quantitativos e de baixa herdabilidade, uma vez que possibilita o acúmulo gradual de genes, através dos ciclos de seleção (GERALDI, 1997). Em alguns casos, entretanto, ele também é recomendado para o melhoramento de características cujo controle genético é principalmente monogênico, como para a resistência a brusone. A justificativa para isso é que se cada gene oferece resistência a uma ou a poucas raças específicas do patógeno, então, a resistência às diversas raças deveria envolver o acúmulo de vários genes, o que a torna uma característica quantitativa (GUIMARÃES; CORREA-VICTORIA, 1997).

Os principais efeitos da seleção com relação aos caracteres quantitativos são a alteração na frequência alélica, a alteração na média da população na direção da característica selecionada e a mudança na variabilidade da população (VEGA, 1988).

Em geral, o monitoramento dessas alterações possibilita um aumento na eficiência do programa de melhoramento, uma vez que possibilita a detecção de

possíveis problemas e a interpretação e/ou a elucidação de suas causas e efeitos. Nesse sentido, as ferramentas desenvolvidas ao longo dos anos são as mais variadas, abrangendo diferentes áreas (genética quantitativa, molecular, de populações, citogenética e estatística). Cabe ao melhorista avaliar o método mais adequado e mais informativo e o melhor momento para acompanhar as diferentes etapas do programa.

Ferramentas para avaliação da eficiência do programa de melhoramento

Os programas de melhoramento genético podem ter sua eficiência otimizada através do estabelecimento de mecanismos rotineiros de avaliação sobre os procedimentos utilizados. São eles que permitem o planejamento de ações corretivas para os períodos que seguem o da avaliação (MORAIS et al., 2000).

Alguns aspectos passíveis de serem monitorados nas populações de ampla base genética que possibilitam a tomada de decisões mais acertadas são listados a seguir. O primeiro é com relação à eficiência da seleção. Às vezes, dois caracteres de interesse estão inversamente ligados; ou ainda, podem ter sua expressão mascarada devido a efeitos de epistasia, dominância ou por influência do ambiente e a avaliação acaba sendo prejudicada. Por isso, nem sempre a seleção de caracteres é alcançada na direção desejada (MORAIS et al., 2000).

Um segundo aspecto a ser considerado, é com relação a diversidade genética existente e/ou mantida na população. De uma maneira ideal, poder-se-ia afirmar que se a seleção não for tão intensa será possível manter essa população dentro do programa de melhoramento por um tempo maior (FEHR, 1987). Seguindo

o teorema de Fisher, isso seria o mesmo que dizer que nenhum ganho com seleção poderia ser conseguido em uma população que tivesse acabado com sua variância genética aditiva (FALCONER; MACKAY, 1996). Essa variabilidade permite uma melhor mescla dos genes e possibilita o aparecimento de novos arranjos gênicos.

Um outro modo de realizar o monitoramento é avaliando os mecanismos que proporcionam a recombinação entre os alelos. É importante saber se os cruzamentos estão ou não produzindo os resultados esperados. A liberação da variabilidade potencial pode ser provocada através da recombinação e da quebra de blocos gênicos (PATERNIANI; MIRANDA FILHO, 1987).

Algumas das ferramentas para estimar a eficiência na condução das populações encontram-se dentro das áreas de genética quantitativa ou da molecular. Uma breve descrição do que representam algumas dessas estimativas está apresentada a seguir.

Estimativa de ganho com seleção (G_s)

As estimativas de ganho com seleção podem servir para prever médias de gerações futuras ou para avaliar o ganho obtido com seleção. Nesta última abordagem, a estimativa do parâmetro é uma das ferramentas com a qual um programa de melhoramento pode contar para avaliar sua eficiência, em especial no que diz respeito ao tipo e/ou a intensidade de seleção que foram adotadas. Trata-se de um parâmetro que compara as médias de populações antes e depois delas terem sido submetidas a um processo seletivo.

A seleção é considerada como um processo de “reprodução diferencial de genótipos, mediante a qual só se permite a descendência àqueles indivíduos que apresentam características desejáveis” (VEGA, 1988). Os caracteres vegetais de

maior interesse para o homem são quase sempre mais difíceis de serem selecionados por serem controlados por vários genes, isto é, são caracteres quantitativos. A eficiência na seleção desses caracteres, portanto, está relacionada a sua herdabilidade e à eficácia da estratégia adotada (FALCONER, 1968). Normalmente, as descrições dos efeitos da seleção são feitas em termos das propriedades observáveis dos caracteres métricos, tais como médias, variâncias e covariâncias, e apenas mais recentemente em termos moleculares.

Há dois procedimentos para se avaliar o ganho com seleção no melhoramento populacional (MORAIS et al., 2000). O primeiro, comparando os resultados médios dos experimentos de avaliação em cada ciclo de melhoramento, mas que, para garantir a correção dos efeitos de ambiente (anos ou locais), precisam conservar testemunhas comuns (RANGEL; ZIMMERMANN, 1998). O segundo, comparando o comportamento de amostras das populações melhoradas, relativas a cada ciclo em um ensaio delineado com essa finalidade (CEBALLOS et al., 1991; GATICA, 1993; SALTER et al., 1994; BAUSKE et al., 1994; LAURENTIN, 1996; DIAZ-LAGO et al., 2002).

Alguns outros detalhes sobre essas técnicas estão explicados no capítulo encontrado a seguir (Cap. 1), bem como os resultados e implicações desses resultados na tomada de decisões de um programa de melhoramento.

Avaliação de diversidade genética utilizando marcadores moleculares

A importância da variabilidade genética dentro de uma população é que sem ela a seleção não é eficiente, segundo discutia Johanssen em 1906 (ALLARD, 1971). Sob o ponto de vista agrônomo, a importância dessa variabilidade está relacionada à tentativa de se diminuir a vulnerabilidade da cultura ao ataque de pragas e doenças e a outras adversidades (BORRERO et al., 1997). Ampliar a base genética de uma cultura cultivada seria, portanto, uma solução para tentar

minimizar essa vulnerabilidade. A estreita base genética do arroz cultivado na América Latina ou no Brasil já foi descrita por CUEVAS-PÉREZ et al. (1992); GUIMARÃES (1993); RANGEL et al. (1996); MONTALVÁN et al. (1998).

O monitoramento da diversidade genética ao longo dos ciclos de uma população representa, em termos práticos, a avaliação da potencialidade dessa população ser submetida a subseqüentes ciclos de seleção. Uma população que não apresente diversidade dificilmente terá condições de apresentar novos genótipos. Detectada essa situação, e sendo de interesse, cabe ao melhorista introduzir novos genótipos para que a população tenha sua base genética ampliada.

Para estimar a variabilidade genética de uma população, poder-se-ia utilizar o parâmetro variância (BETRAN; HALLAUER, 1996), desde que se tomasse a cautela de se separar a variância ambiental da variância genética; entretanto, o desenvolvimento da ferramenta “marcadores moleculares” abriu uma nova alternativa para esse tipo de análise, com a vantagem de se eliminar a influência do ambiente (FEDERIZZI, 1998).

Os marcadores moleculares são seqüências de DNA que diferenciam dois ou mais indivíduos e são herdadas geneticamente (MILACH, 1998). Dentre os vários tipos de marcadores existentes, os microssatélites apresentam a vantagem de serem codominantes, bastante informativos e de fácil utilização para o arroz (McCOUCH et al., 1997; OLUFOWOTE et al., 1997; NAGARAJU et al., 2002). Também chamados de seqüências simples repetidas (SSRs), os microssatélites consistem de curtas regiões do DNA com não mais do que 6 nucleotídeos de comprimento, repetidas em *tandem* ao longo do genoma (LITT; LUTY, 1989; FERREIRA; GRATAPAGLIA, 1998; HANCOCK, 2000). Estas regiões são amplificadas através de reação de polimerase em cadeia (PCR), utilizando um par de primers específicos (de 20 a 30 bases), complementares a seqüências únicas que flanqueiam o microssatélite. Cada segmento amplificado de tamanho diferente representa um alelo diferente do mesmo loco (FERREIRA; GRATAPAGLIA, 1998).

Para a separação desses alelos, são utilizados géis de poliacrilamida ou agarose metafor que possibilitam a separação dos alelos de diferentes tamanhos quando submetidos à eletroforese. E para a visualização desses alelos, são utilizados brometo de etídeo, nitrato de prata, radioisótopos ou a bioluminescência.

Utilizar essa metodologia na análise da diversidade é uma possibilidade para os programas de melhoramento genético. Essas estimativas trazem o conceito de freqüência alélica (PINTO, 2001). A diversidade depende diretamente do número de alelos e da maneira que as freqüências desses alelos estão distribuídas. Quanto mais homogêneas forem as freqüências, maior é a diversidade da população. Os conceitos de riqueza alélica e de uniformidade abordam esses dois aspectos (DIAZ-P, 2001). Outra maneira de se entender a diversidade é compreendendo como esses alelos se organizam dentro da população. A estimativa da quantidade de heterozigotos e homozigotos encontrados na população oferece um indicativo de como os indivíduos se relacionam. Os coeficientes de endogamia (f) abordam esse aspecto. Com eles, também é possível inferir sobre a recombinação desses indivíduos. Dentro de cada um desses aspectos, vários parâmetros são encontrados, e cada um deles apresenta sua particularidade, conforme didaticamente explicado por Pinto (2001).

A variabilidade genética de uma população pode ser estimada por meio de vários parâmetros: do número médio ou total de alelos/loco (NI et al., 2002; NAGARAJU et al., 2002; CHRISTIANSEN et al., 2002; MANIFESTO et al., 2001); da diversidade genética, também chamada por Nei (1978) de heterozigosidade esperada (LABATE et al., 1997; HAGDORN et al., 2003); do conteúdo de informação de polimorfismo (PIC) (KIM; WARD, 1997; MANIFESTO et al., 2001) ou ainda do índice de fixação de Wright (f), que representa o índice de endogamia em uma população, ou seja, o inverso da diversidade.

A possibilidade de utilizar um ou outro parâmetro muitas vezes está relacionada ao tipo de marcador molecular utilizado. Marcadores codominantes

permitem a visualização da contribuição dos dois parentais na formação do indivíduo, enquanto que os marcadores dominantes possibilitam a visualização da contribuição de apenas um dos pais. Por essas características, os primeiros marcadores moleculares comentados são muito mais informativos.

No caso das populações submetidas a vários ciclos de seleção, a comparação pode ser feita entre os diferentes ciclos (FRESCAROLI; LANDI, 1998; GUZMANN; LAMKEY, 2000). Entretanto, saber se a diversidade final é ou não suficiente para que a população seja mantida no programa tal como ela se encontra, exige o confronto desses valores com outros dados da literatura, para que um padrão possa ser estabelecido. Essas estimativas podem ser realizadas em linhagens utilizadas em programas de melhoramento (GETHI et al., 2002; NI et al., 2002) ou em materiais armazenados em bancos de germoplasma (MANIFESTO et al., 2001). Alguns exemplos reportados na literatura estão resumidos nos capítulos 2 e 3 dessa publicação.

O parâmetro tamanho efetivo populacional também é uma estimativa que ajuda a compreender a variabilidade de uma população. Este é um parâmetro cuja estimativa com base em marcadores moleculares ainda está pouco difundida. A comprovação de sua aplicabilidade foi constatada por Pinto (2001), que obteve dados similares aos encontrados quantitativamente por Rezende (1997).

Os pesquisadores que adotarem essa ferramenta devem considerar vários aspectos relacionados à técnica utilizada. Por exemplo, o número de marcadores sugerido depende do tipo do marcador, das regiões amostradas do genoma, do tamanho do genoma, e também do tipo de gel utilizado para separar os fragmentos genômicos e podem acabar influenciando na interpretação dos resultados (FERREIRA, 2003).

Objetivos do trabalho

Tendo em vista que os programas de melhoramento genético de populações de arroz conduzidas pelo método de seleção recorrente buscam monitorar as ações e ganhos genéticos ocorridos, os objetivos foram:

- avaliar o progresso para resistência à doença brusone resultante de dois ciclos de seleção recorrente na população CNA-7;
- avaliar os efeitos dos ciclos de seleção recorrente na variabilidade genética em populações de arroz melhoradas no Brasil (CNA-7) e na Venezuela (PFD-1).

Apresentação do trabalho

No presente trabalho, cujo objetivo foi monitorar o melhoramento populacional de arroz com relação a diferentes aspectos, foram utilizadas as populações de arroz CNA-7 e PFD-1 conduzidas pelo método de seleção recorrente (SR). Esses materiais fazem parte dos programas de melhoramento da Embrapa Arroz e Feijão, Goiânia, Brasil, e da “Fundación para Desarrollo Agrícola DANAC”, San Felipe, Venezuela, respectivamente.

Os resultados desse trabalho foram organizados em três capítulos:

Capítulo 1: Trata da avaliação do ganho genético da resistência a brusone na folha (BI) e do colmo do pescoço (NBI) na população de arroz de terras altas CNA-7 ao longo dos ciclos 0 e 2 de seleção recorrente, com base em experimentos de campo. Esse trabalho gerou o capítulo 16 do livro “Mejoramiento poblacional: una alternativa para explorar los recursos genéticos del arroz en América Latina”, publicado em Outubro/2003 na versão em espanhol, e no prelo para lançamento no primeiro semestre/2004 terá sua versão em inglês.

Capítulo 2: Esse capítulo avalia a diversidade genética da população PFD-1 através de marcadores moleculares. Trata-se de um trabalho realizado em colaboração com a equipe da “Universidad Central de Venezuela” (UCV). Os dados dos marcadores microssatélites, que foram obtidos pela autora dessa tese, foram unidos aos dados de marcadores isoenzimáticos, obtidos pela equipe da UCV sob a coordenação da Professora Catalina Ramis, e geraram como publicação o capítulo 5 do livro “Mejoramiento poblacional: una alternativa para explorar los recursos

genéticos del arroz en América Latina”, publicado em Outubro/2003 na versão em espanhol e, no prelo para lançamento no primeiro semestre/2004 na versão em inglês.

Capítulo 3: Consiste na avaliação da diversidade genética da população de arroz de terras altas, a CNA-7, através de marcadores microssatélites. O trabalho foi conduzido em sua maioria, no Laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Arroz e Feijão em colaboração com os Dr. Cláudio Brondani e Dra. Rosana P. V. Brondani. Trata-se da versão inicial de um artigo que será submetido à revista TAG.

Referências

AGRIANUAL **Arroz**. 2003. p. 219-228.

ALLARD, R. W. **Princípios de melhoramento genético de plantas**. São Paulo: Edgard Blucher, 1971. 381p.

BAUSKE, E. M.; KOLB, F. L.; HEWINGS, A. D.; CISAR, G. Modified recurrent selection for barley yellow dwarf virus tolerance in winter wheat. **Crop Sci.**, v. 34, n. 2, p. 371-375, 1994.

BETRAN, F. J.; HALLAUER, A. R. Characterization of interpopulation genetic variability in three hybrid maize populations. **Heredity**, v. 87, n. 4, p. 319-322, 1996.

BORRERO, J.; OSPINA, Y.; GUIMARÃES, E.P. E CHATEL, M. **Ampliación de la base genética de los acervos de arroz, mediante la introducción de variabilidad**. In: GUIMARÃES, E. P. (Ed.). **Selección recurrente en arroz**. Cali: Centro Internacional de Agricultura Tropical. 1997. p. 55-66.

CASTRO, E. M.; BRESEGHELLO, F.; RANGEL, P. H.; MORAES, O. P. **Melhoramento do arroz**. In: BORÉM, A. (Ed.). **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa: UFV. 1999. p. 95-130.

CEBALLOS, H.; DEUTSCH, J. A.; GUTIÉRREZ, H. Recurrent selection for resistance to *Exserohilum turcicum* in eight subtropical maize populations. **Crop Sci.**, v. 31, p. 964-971, 1991.

CHATEL, M. E.; GUIMARÃES, E. P. **Selección Recurrente en arroz en África y Madagascar: estado actual y progreso**. In: GUIMARÃES, E. P. (Ed.). **Selección recurrente en arroz**. Cali, Colômbia: Centro Internacional de Agricultura Tropical. 1997. p. 151-187.

CHRISTIANSEN, M. J.; ANDERSEN, S. B.; ORTIZ, R. Diversity changes in an intensively bred wheat germplasm during the 20th century. **Molecular Breeding**, v.9, p. 1-11, 2002.

CHEN, W. B.; SATO, Y. I.; NAKAMURA, I.; NAKAI, H. *Indica-japonica* differentiation in Chinese rice landraces. **Euphytica**, v. 74, p. 195-201, 1994.

CIAT. **Annual review**. 2002. 80 p.

CIAT. **Rice improvement for Latin America and the Caribbean**. Disponível em: <<http://www.ciat.cgiar.org/impact/summeries.htm>> Acesso em: 28 out. 2002b.

CUEVAS-PEREZ, F.; GUIMARÃES, E. P.; BERRIO, L. E.; GONZÁLES, D. I. Genetic base of irrigated rice in Latin America and the Caribbean, 1971-1989. **Crop Sci.**, v. 32, p. 1054-1059, 1992.

DIAZ-LAGO, J. E.; STUTHMAN, D. D.; ABADIE, T. E. Recurrent selection for partial resistance to crown rust in oat. **Crop Sci.**, v. 42, p. 1475-1482, 2002.

DIAZ-P., A. J. **Marcadores moleculares**: estadística básica. Maracay: Universidad Central de Venezuela. Facultad de Agronomía. Instituto y departamento de Genética. 2001. 84 p.

EMBRAPA ARROZ E FEIJÃO. **Sistemas de cultivo**. Disponível em: <<http://www.cnpaf.embrapa.br/>> Acesso em: 22 out. 2002.

FALCONER, D. S. **Introduction to quantitative genetics**. Glasgow: MacLohose and Company, 1968. 365 p.

FALCONER, D. S.; MACKAY, T. **Introduction to quantitative genetics**. Essex: Longman, 1996. 464 p.

FEDERIZZI, L. C. **Estrutura de um programa de melhoramento de plantas e possíveis aplicações de marcadores moleculares**: visão do melhorista. In:

MILLACH, S.C.K. (Ed.). **Marcadores moleculares em plantas**. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1998. 141p.

FEHR, W. **Recurrent selection**. In: _____ **Principles of cultivar development**. London: Collier Macmillan Publishers 1987. p.172-198.

FERREIRA, M. E. **Melhoramento genético do arroz: impacto da genômica**. In: BORÉM, A.; GIÚDICE, M.; SEDYAMA, T. (Ed.). **Melhoramento genômico**. Viçosa: UFV, 2003. p. 73-127.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética**. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, Documento 20, 1998. 220 p.

FRESCAROLI, E.; LANDI, P. Allelic frequency change of P1 gene in a maize population after recurrent selection for grain yield. **Crop Sci.**, v. 38, p.1391-1394, 1998.

GATICA, H. **Evaluación de cuatro ciclos de selección recurrente en una población de maíz resistente a “punta loca”**. 58 f. Tesis (Maestría) - Universidad Central de Venezuela, Maracay, 1993.

GERALDI, I. O. **Selección recurrente en el mejoramiento de plantas**. In: GUIMARÃES, E. P. (Ed.). **Selección recurrente en arroz**. Cali: Centro Internacional de Agricultura Tropical, 1997. p. 3-11.

GETHI, J. G.; LABATE, J. A.; LAMKEY, K. R.; SMITH, M. E.; KRESOVICH, S. SSR variation in important U.S. maize inbred lines. **Crop Sci.**, v. 42, p. 951-957, 2002.

GRATEROL M., E. J. **Caracterización de poblaciones e introducción de variabilidad genética para iniciar un programa de mejoramiento poblacional del arroz en Venezuela**. In: GUIMARÃES, E.P. (Ed.). **Avances en el mejoramiento poblacional en arroz**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2000. p. 87-103.

GUIMARÃES, E. P. **Avances en el mejoramiento poblacional en arroz.** Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2000. 311 p.

GUIMARÃES, E. P. **Genealogy of Brazilian upland rice varieties.** Int. Rice Res. Notes, v. 18, n. 1, p. 6, 1993.

GUIMARÃES, E. P.; CORREA-VICTORIA, F. **Utilización de la selección recurrente para desarrollar resistencia a *Pyricularia grisea* Sacc. en arroz.** In: GUIMARÃES, E. P. (Ed.). **Selección recurrente.** Cali: Centro Internacional de Agricultura Tropical, 1997. p. 165-176.

GUIMARÃES, E. P. **Selección recurrente.** Cali: Centro Internacional de Agricultura Tropical, 1997. 239p.

GUZMAN, P. S.; LAMKEY, K. R. Effective population size and genetic variability in the BS11 maize population. **Crop Sci.**, v. 40, p. 338-346, 2000.

HAGDORN, S.; LAMKEY, K. R. FRISCH, M.; GUIMARÃES, E. O.; MELCHINGER, A. E. Molecular genetic diversity among progenitors and derived elite lines of BSSS and BSCB1 maize populations. **Crop Sci.**, v. 43, p. 474-482, 2003.

HANCOCK, J. M. **Microsatellites and other simple sequences: genomic context and mutational mechanisms.** In: GOLDSTEIN, D. B.; SCHLÖTTERER, C. (Ed.). **Microsatellites.** Oxford: University Press, 2000. p. 1-9.

KIM, H. S.; WARD, R. W. Genetic diversity in Eastern US soft winter wheat (*Triticum aestivum* L. em. Thell.) based on RFLPs and coefficients of parentage. **Theor. Appl. Gen.**, v. 94, p. 472-479, 1997.

LABATE, J. A.; LAMKEY, K. R.; LEE, M.; WOODMAN, W. L. Molecular genetic diversity after reciprocal recurrent selection in BSSS and BSCB1 maize populations. **Crop Sci.**, v. 37, p. 416-423, 1997.

LAURENTIN, H. E. **Evaluación del efecto de dos ciclos de selección recurrente sobre el rendimiento en una población de ajonjolí (*Sesamum indicum* L.).** 81 f. Tese (maestria) Universidad Central de Venezuela, Maracay, 1996.

- LITT, M.; LUTY, J. A. A hypervariable microsatellite revealed by *in vitro* amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. **Am. J. Hum. Genet.** 44, 397-401. 1989.
- MANIFESTO, M. M.; SCHLATTER, A. R.; HOPP, H. E.; SUÁREZ, E. Y.; DUBCOVSKY, J. Quantitative evaluation of genetic diversity in wheat germplasm using molecular markers. **Crop Sci.**, v. 41, p. 682-690, 2001.
- McCOUCH, S.R.; CHEN, X.; PANAUD, O.; TEMNYKH, S.; XU, Y.; CHO, Y.G.; HUANG, N.; ISHII, T.; BLAIR, M. Microsatellite marker development, mapping and applications in rice genetics and breeding. **Plant Molecular Biology.** v. 35, p. 89-99, 1997.
- MILLACH, S.C.K. **Marcadores de DNA:** aplicação no melhoramento de plantas. Ano 1, Número 5 - Março/Abril 1998 <http://www.biotechnologia.com.br/bio05/5_h.html> Acesso em: 22 out. 2002.
- MONTALVÁN, R.; DESTRO, D.; SILVA, E. F.; MANTAÑO, J. C. Genetic base of Brazilian upland rice cultivars. **J. Genet. Breed.**, v. 52, p. 203-209, 1998.
- MORAIS, O. P.; ZIMMERMANN, F. J. P.; RANGEL, P. H. **Evaluación de ganancias observadas en selección recurrente.** In: GUIMARÃES, E.P. (Ed.). **Avances en el mejoramiento poblacional en arroz.** Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2000. 311 p.
- NAGARAJU, J.; KATHIRVEL, M.; KUMAR, R.R.; SIDDIQ, E.A.; HASNAIN, S.E Genetic analysis of traditional and evolved Basmati and non-Basmati rice varieties by using fluorescence-based ISSR-PCR and SSR markers. **PNAS**, v. 99, n. 9,. 2002. p. 5836-5841.
- NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from small number of individuals. **Genetics**, 89:583-590, 1978.
- NI, J.; COLOWIT, P. M.; MACKILL, D. J. Evaluation of genetic diversity in rice subspecies using microsatellite markers. **Crop Sci.**, v. 42, p. 601-607, 2002.

OLUFOWOTE, J. O.; XU, Y.; CHEN, X.; PARK, W. D.; BEACHELL, H. M.; DILDAY, R. H.; GOTO, M.; McCOUCH, S. R. Comparative evaluation of within-cultivar variation of rice (*Oryza sativa* L.) using microsatellite and RFLP markers. **Genome**, v. 40, p.370-378, 1997.

PATERNIANI, E. **Breve história da agricultura até a era da biotecnologia**. In: _____ **Agricultura Brasileira e Pesquisa Agropecuária**. Brasília: Embrapa, 2000. p. 11-30.

PATERNIANI, E.; MIRANDA FILHO, J. B. **Melhoramento de populações**. In: PATERNIANI, E.; VIEGAS, G. P. (Ed.). **Melhoramento e produção do milho**. Campinas: Fundação Cargill, 1987. cap. VI, p. 217-74.

PEDROSO, A.; CARMONA, P. S.; FREITAS, D. G.; SCHERER, C. H.; VALÉRIO, M. G.; LOPES, M. S.; ABUD, J. K.; MARIOT, C.; ROCHA, S. B.; SOUZA, J. A. B.; NICKEL, L.; DOMIKS, J. M.; RIBEIRO, A. W.; SOUZA, M. G. C.; VELHO, S. C. **Lavoura Arrozeira**, v. 43, n. 390, p. 11-20, 1990.

PINTO, L. R. **Análise da estrutura genética das populações de milho (*Zea mays* L.) BR-105 e BR-106 e respectivos sintéticos IG-3 e IG-4 por meio de microssatélites**. 112 f. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura 'Luiz de Queiroz', Piracicaba, 2001.

RANGEL, P. H. N.; GUIMARÃES, E. P.; NEVES, P. C. Base genética das cultivares de arroz (*Oryza sativa* L.) irrigado do Brasil. **Pesq. Agropec. Bras.**, v. 31, n. 5, p. 349-357, 1996.

RANGEL, P. H. N.; ZIMMERMANN, F. J. P. **Ganhos de produtividade de grãos no melhoramento populacional de arroz de várzea**. In: REUNIAO NACIONAL DE PESQUISA DE ARROZ, 6., 1998. Goiânia, GO. **Perspectivas para a cultura do arroz nos ecossistemas de várzeas e terras altas**. Resumos expandidos... Goiânia: Embrapa CNPAF. 1998. p. 174-175.

REZENDE, G. D. S. P. **Heterose, depressão por endogamia e variabilidade genética associadas à seleção e oscilação genética nas populações de milho BR-105 e BR-106**. 112 f. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura 'Luiz de Queiroz', Piracicaba, 1997.

SALTER, R.; MILLER-GARVIN, J. E.; VIANA, D. R. Breeding for resistance to alfafa root rot caused by *Fusarium* species. **Crop Sci.**, v. 34, n. 5, p. 1213-1217, 1994.

SERVELLÓN, R. **Mejoramiento poblacional del arroz en El Salvador**. In: GUIMARÃES, E.P. (Ed.). **Avances en el mejoramiento poblacional en arroz**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2000. p. 269-285.

SINGH, R. J.; IKEHASHI, H. I. Monogenic male-sterility in rice: Induction, identification and inheritance. **Crop Sci.**, v. 21, p. 286-289, 1981.

TERRES, A. L.; GALLI, J.; FAGUNDES, P. R. R.; MACHADO, M. O.; MAGALHÃES J. R., A. M.; MARTINS, J. F.; NUNES, C. D. M.; FRANCO, D. F.; AZAMBUJA, I. H. V. **Arroz irrigado no Rio Grande do Sul**: generalidades e cultivares. Circular técnica n. 14, Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 1999. 57 p.

VEGA, U. **Introducción a la teoría de genética cuantitativa**. Maracay: Universidad Central de Venezuela, 1988. 398 p.

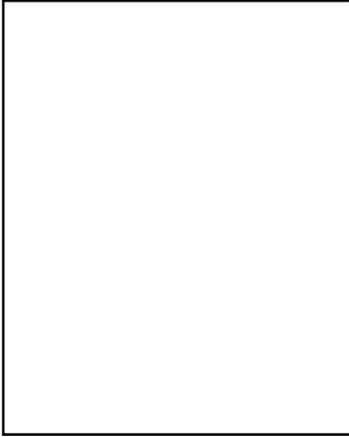
VENCOVSKY, R.; RAMALHO, M. A. P. **Contribuição do melhoramento genético de plantas no Brasil**. In: PATERNIANI, E. (Ed.). **Agricultura brasileira e pesquisa agropecuária**. Brasília: Embrapa comunicação para transferência de tecnologia, 2000. p. 57-89.

Capítulo 1

Ganancia genética para resistencia a Piricularia en una población de arroz

BADAN, A.C.C.; GUIMARÃES, E.P. y RAMIS, C. (2003). **Ganancia genética para resistencia a Piricularia en una población de arroz.** In: GUIMARÃES, E.P. (Ed.). **Mejoramiento poblacional: una alternativa para explorar los recursos genéticos del arroz en América Latina.** Cali: Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cap. 16. p.319 a 354.

CAPÍTULO 16



Ganancia Genética para Resistencia a Piricularia en una Población de Arroz

**Ana Claudia de Carvalho
Badan**

**Ana Claudia de Carvalho Badan¹
Elcio Perpétuo Guimarães²
Catalina Ramis³**

1. Estudiante de doctorado en el “Departamento de Genética e Biología Molecular” de la “Universidade Estadual de Campinas” (UNICAMP), Campinas, São Paulo, Brasil.
Correo electrónico: anaclaudia@mpc.com.br

2. Investigador de “Embrapa Arroz e Feijão”, actualmente en la “Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación” (FAO), Senior Officer Cereal/Crops Breeding, Viale delle Termi di Caracalla, 00100 Roma, Italia.
Correo electrónico: elcio.guimaraes@fao.org

3. Profesora de mejoramiento de plantas en el “Instituto de Agronomía” de la “Universidad Central de Venezuela”, Maracay, Venezuela.
Correo electrónico: dasilram@telcel.net.ve

Contenido

Resumen

Abstract

Introducción

Creación y manejo de la población

Estrategia de evaluación y diseño experimental

- Estrategia de evaluación y selección
- Diseño experimental para la evaluación de la ganancia genética
- Análisis estadístico de la ganancia genética

Estudio de la ganancia genética

- Piricularia en la hoja (BI)
- Piricularia en el cuello de la panícula (NBI)
- Selección simultánea de las características BI y NBI

Conclusiones y recomendaciones

Agradecimientos

Referencias

RESUMEN

El hongo *Pyricularia grisea* Sacc. es responsable por una de las más importantes enfermedades del cultivo del arroz. Una manera de controlar las pérdidas que provoca es el uso de cultivares resistentes. La "Embrapa Arroz e Feijão", en Goiânia, Brasil, creó en 1995 la población CNA-7 de amplia base genética y con varias fuentes de resistencia a la enfermedad. Desde entonces, empezó a seleccionar y recombinar, de manera cíclica, plantas con resistencia completa a *Pyricularia* en la hoja (BI) y en el cuello de la panícula (NBI). El objetivo de este trabajo es presentar la evaluación del progreso observado con el uso del mejoramiento poblacional. Para los experimentos se seleccionaron las familias $S_{0.2}$ resistentes para ambas características. Los resultados del porcentaje R parecieron ser los más eficientes en ese tipo de análisis. Se demostró que hubo incremento de la resistencia a BI en la población CNA-7 entre 13,1 y 6,1% para los ciclos 1 y 2 en términos de porcentaje R, lo cual indica que la estrategia de selección adoptada fue eficiente para mejorar esta característica. Para NBI ninguna diferencia estadística se detectó entre los tratamientos, lo que significa que no hubo ganancia genética para esta característica. La significancia estadística observada para época de siembra indica la importancia de considerar este parámetro en las evaluaciones. Los altos grados de resistencia observados desde el ciclo inicial demuestran que la selección de los progenitores para la formación de la población fue muy adecuada. El alto grado de resistencia presente en la población CNA-7 con los ciclos de selección recurrente permite que se inicie la selección para otras características de interés, o para retirar de ella nuevas fuentes de germoplasma para cruces.

GENETIC GAIN FOR BLAST RESISTANCE IN A RICE POPULATION

ABSTRACT

Pyricularia grisea Sacc. causes blast, the most important fungal disease of cultivated rice. One way to control the disease is to use resistant cultivars. In 1995, Embrapa Arroz e Feijão (Goiânia, Brazil) created CNA-7, a population with a broad genetic base and carrying several sources of resistance to blast. Through several cycles of selection and recombination, plants resistant to both leaf (BI) and neck blast (NBI) were developed. This chapter evaluates progress, expressed in terms of genetic gain, made through population improvement. $S_{0.2}$ families resistant to both blast types were selected for experiments. R percentage results seem to be the most efficient for this type of analysis. Resistance to BI in population CNA-7 increased 13,1% and 6,1% for cycles 1 and 2, respectively, indicating that the strategy adopted was efficient for improving BI resistance. In contrast, no statistical differences were found among treatments for resistance to NBI, indicating that no genetic gain was obtained. The statistical significance observed for planting date indicates the importance of considering this parameter when evaluating. The high degree of resistance observed since the initial cycle suggests that the selection of parents to create the original population was highly adequate. The high level of resistance present in population CNA-7 in the recurrent selection cycles means selection for other traits could begin, or that new sources of germplasm for crossing could be extracted.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad Piricularia, causada por el hongo *Piricularia grisea* Sacc., estado anamorfo de *Magnaporthe grisea* (Herbert) Barr, es responsable por pérdidas en la productividad del arroz que pueden variar del 17 al 52% (Prabhu *et al.*, 1999). Es una enfermedad que afecta los cultivos del arroz de casi todos los países de América Latina, siendo más severa bajo las condiciones de cultivo de secano. La creación de variedades resistentes ha sido una de las estrategias más utilizadas por los investigadores para controlar este problema. No obstante lo anterior, con frecuencia la gran variabilidad del patógeno logra romper la resistencia de las variedades lanzadas en un corto período de tiempo (Correa-Victoria *et al.*, 1997), que según Notteghen (1981) en general, varía de 2 a 3 años.

Como una alternativa adicional a las estrategias que se emplean en el mejoramiento de especies autóгамas, el mejoramiento de poblaciones empezó a utilizarse en arroz al final de la década de los ochenta. Los primeros estudios que enfocan el mejoramiento de poblaciones para resistencia a Piricularia los realizó Guimarães *et al.* (1995) y Filippi y Prabhu (1997). En estos trabajos se describen los resultados y las experiencias del uso de la

metodología para desarrollar poblaciones con resistencia completa y parcial a la enfermedad. Con objetivos similares Courtois *et al.* (1997) indicaron cuál es la estrategia que empleará el "International Rice Research Institute" (IRRI), Filipinas, para crear y mejorar poblaciones de arroz de secano con resistencia a la enfermedad.

En Colombia, Guimarães y Correa-Victoria (1997) mejoraron la resistencia a Piricularia en las hojas y en el cuello de la panícula de la población GC-91 a través de selección recurrente, basándose en la evaluación de familias $S_{0,2}$, probando que la metodología funciona para características controladas por una serie de genes mayores y menores.

La "Embrapa Arroz e Feijão", en Brasil, ha venido utilizando esta metodología para mejorar el nivel de resistencia de poblaciones para Piricularia desde hace algunos años. Este trabajo está basado en la población CNA-7, desarrollada a partir de los trabajos de Filippi y Prabhu (1997) y cuya composición presentan Châtel y Guimarães (1998).

La selección recurrente se caracteriza por ser un método cíclico donde las ganancias para la o las características bajo selección ocurren de manera gradual y continua. Aunque este supuesto se basa en que la metodología de evaluación y

selección es suficientemente precisa para permitir que las etapas del proceso se cumplan de manera eficiente, no siempre es correcto pues pueden presentarse situaciones en las cuales la metodología de evaluación o las decisiones para la selección no lleven a los resultados esperados. Por esta razón se recomienda a los fitomejoradores que utilizan esta metodología que a determinado número de ciclos de recurrencia evalúen las ganancias obtenidas para la o las características bajo selección.

Una posible forma de evaluar la eficiencia de la selección a través de los ciclos de selección recurrente es aprovechar las mismas etapas de conducción de las poblaciones, y organizarlas de manera que sea viable comparar ciclos diferentes en años distintos. Esto se vuelve admisible con la utilización de testigos comunes a lo largo de los años, de manera que las medias sean ajustadas con relación a los años de siembra. Este tipo de estudio seguiría el mismo principio utilizado en la comparación entre las diversas variedades lanzadas por programas nacionales de mejoramiento a lo largo de varios años (Vencovsky *et al.*, 1986; Breseghello *et al.*, 1999; Santos *et al.*, 1999; Soares *et al.*, 1999).

Otra manera para evaluar las ganancias obtenidas a lo largo del programa es comparar los

diversos ciclos bajo un mismo experimento como lo efectuaron Ceballos *et al.* (1991), Gatica (1993), Salter *et al.* (1994), Bauske *et al.* (1994), Laurentin (1996), y Diaz-Lago *et al.* (2002). De esta manera se garantiza que el efecto de la interacción entre años se elimine y se logre una mejor comparación entre tratamientos.

Bajo esta segunda metodología los experimentos, por lo general, utilizan diseños estadísticos de bloques al azar, con varias repeticiones y en varias localidades. Casi siempre se evalúan las características para las cuales se efectuaron las selecciones aunque, en algunos casos, se evalúan también otras. Ello finalmente puede indicar la influencia de la selección de un carácter sobre otro, o sea, la respuesta correlacionada (ver Geraldí Capítulo 3 en esta publicación). Un ejemplo de esto es lo que ocurrió con una población de avena donde se practicó la selección para resistencia al hongo *Puccinia* y se alteró la característica floración (Diaz-Lago *et al.*, 2002).

Algunos trabajos utilizaron la selección recurrente para aumentar la productividad de granos, y lo efectuaron a través del aumento de la resistencia a enfermedades sometiendo las poblaciones a condiciones de alta presión del inóculo durante la fase de selección. Para intentar comprobar si la estrategia

utilizada había sido eficiente Gatica (1993) comparó los diferentes ciclos de recurrencia de una población de maíz. Lo interesante es que en este caso, hubo incremento de la productividad de granos a lo largo de los ciclos en apenas una localidad de las 2 evaluadas, precisamente en la localidad donde se habían efectuado las selecciones. Ello es un fuerte indicio de una gran interacción genotipo x ambiente. En ajonjolí Laurentin (1996) comprobó un aumento en la productividad de granos de la población entre los ciclos 0, 1 y 2, también bajo indicios de incremento de la resistencia a la mosca blanca (*Bemisia sp.*). Esto fue más perceptible después de verificarse que no se presentó ningún incremento en las características correlacionadas con el rendimiento, como peso de granos o número de granos por vaina.

En avena las evaluaciones de ganancia genética indican que hubo eficiencia en las selecciones para resistencia al hongo *Puccinia coronata* utilizando el método de selección recurrente (Diaz-Lago *et al.*, 2002). Sin embargo, la falta de homogeneidad de la varianza entre los experimentos situados en diversas localidades exigió una serie de análisis estadísticos minuciosos lo cual demuestra que la evaluación de los grados de la enfermedad en el campo no

es sencilla. Estos análisis involucraron las transformaciones sugeridas por Box-Cox (1964) citado por Diaz-Lago *et al.* (2002) y Azzalini-Cox, descritos por Baker (1988) citado Diaz-Lago *et al.* (2002) y utilizaciones de programas Proc Mixed del SAS, todos procedimientos estadísticos no muy usuales en la actualidad en el área agrícola.

Para los análisis de datos de enfermedades Amézquita *et al.* (1996) utilizaron otra alternativa para demostrar el progreso de la resistencia a la Piricularia en una población de arroz: los datos categóricos empleando 2 modelos. En el primero consideraron la reacción a Piricularia como una variable binaria (Resistentes ≤ 3 y Susceptibles ≥ 4); y en el segundo la variable categórica con 3 niveles (Resistentes ≤ 3 ; Intermedias = 4 ó 5; y Susceptibles ≥ 6). En ambos casos, las diferencias detectadas entre tratamientos fueron estadísticamente significativas, o sea, el proceso de selección utilizado fue eficiente para incrementar la resistencia en la población.

Ceballos (s.f.) en su libro sobre mejoramiento de plantas, cita varios ejemplos donde la selección recurrente ha sido eficiente para el incremento de la resistencia. El análisis de varios de estos trabajos llama la atención ya que las evaluaciones de resistencia se realizaron tanto

con base en promedios de grados de incidencia o con base en el porcentaje de plantas infectadas. Parece no haber una regla general en cuanto a qué tipos de datos se deben utilizar o a cuáles son los tipos de análisis más eficientes para demostrar el progreso genético para los trabajos que buscan incremento de la resistencia.

Otro factor que merece destacarse es que en los trabajos citados, la estrategia para la evaluación del programa se basa en la comparación de compuestos de los ciclos, es decir, se comparan los ciclos 0 con el 1 y el 2 y así sucesivamente. Sin embargo, Laurentin (1996) utilizó también la evaluación entre los padres de cada uno de los ciclos, y entre los compuestos de los ciclos con testigos. Lo que llama la atención de esta estrategia es que los resultados presentados en la comparación de los padres de los ciclos tuvieron la respuesta positiva de ganancia, pero con un nivel de probabilidad por debajo de lo esperado ($p = 0,06$). En cambio, la comparación de los ciclos con los testigos (sembrados en el mismo año) presentó resultados conformes con el análisis de los compuestos.

En este trabajo se presenta la evaluación del proceso de mejoramiento poblacional a través de la selección recurrente empleado para incrementar el

nivel de resistencia de la población de arroz de tierras altas CNA-7, para las características Piricularia en la hoja (BI) y en el cuello de la panícula (NBI). Se trata de una estrategia innovadora para la selección recurrente en arroz, que involucra los conceptos de seleccionar para las 2 características de manera alternada bajo un ambiente de alta presión del inóculo. Para medir si la estrategia utilizada ha sido eficiente se presentan los resultados del estudio en el cual se evaluó las ganancias genéticas obtenidas a lo largo de 2 ciclos de recurrencia.

CREACIÓN Y MANEJO DE LA POBLACIÓN

Partiendo del principio que el mejoramiento poblacional a través del método de selección recurrente posibilita la acumulación de genes favorables y que, al mismo tiempo, permite una sistemática mezcla de las características de los progenitores, se planteó crear una población de amplia base genética con veinte progenitores resistentes a Piricularia.

La creación y el manejo de la población de arroz de tierras altas (o secano) CNA-7 se llevó a cabo en la Estación Experimental de la "Embrapa Arroz e Feijão" (Estación Experimental Capivara – EEC), ubicada en Santo Antônio de Goiás, Goiás, Brasil.

Las poblaciones con el gen de androesterilidad CNA-IRAT 5/2/1 (también denominada CNA-7A) y la CNA-IRAT 9B/2/2 (denominada CNA-7B), que estaban siendo conducidas por Filippi y Prabhu (1997), fueron las bases para crear la población utilizada en este trabajo: la CNA-7. Esa población es originaria de la

mezcla en iguales proporciones de semillas de la CNA-7A y de la CNA-7B. En 1994 se introdujo en ellas 20 fuentes de resistencia a Piricularia y la variedad americana Lemont, como fuente de calidad de grano. La proporción con la cual cada componente contribuyó a la nueva población se presenta en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Progenitores y participación relativa (%) de las fuentes de resistencia a Piricularia introducidas en las poblaciones CNA-IRAT 5/2/1 y CNA-IRAT 9B/2/2 para formar las poblaciones de arroz CNA-7A y CNA-7B, respectivamente.

Progenitor	Origen	Población CNA ³	
		7A	7B
Raminad	Fuente tradicional	1,68	2,50
Carreon	Fuente tradicional	1,68	2,50
Dular	Fuente tradicional	1,68	2,50
Tres Marias	Fuente tradicional	1,68	2,50
Huan-Sen-Goo	Fuente tradicional	1,68	2,50
Colombia 1	Fuente tradicional	1,68	2,50
IRI 342	Fuente tradicional	1,68	2,50
IRI 344	Fuente tradicional	1,68	2,50
IRI 355	Fuente tradicional	1,68	2,50
Araguaia	IAC 47/TOx2578/7-4-2-3-B2	1,68	2,50
Lemont ¹	Lebonnet/PI331581/CI9881	5,05	-
No. 48 Formoso 92	Ram Tulase/3*IAC 25	1,68	2,50
No. 55 Formoso 92	T-23/3*IRAT112	1,68	2,50
No. 09 Formoso 92	Pusur/3*IAC 25	1,68	2,50
No. 36 Formoso 92	CTG 1516/3*IRAT 112	1,68	2,50
No. 34 Formoso 92	Tetep/3*IRAT 112	1,68	2,50
No. 54 Formoso 92	C46-15/3*IAC 25	1,68	2,50
No. 40 91/92 ²	Cuiabana/CNAx 784-5	1,68	2,50
No. 108 91/92 ²	A8-204-1/TOM 1-3	1,68	2,50
No. 70 91/92 ²	CNA 5180/Basmati 370	1,68	2,50
No. 60 91/92 ²	CNA 5180/Toride	1,68	2,50
CNA-IRAT 9B/2/2	CNA-IRAT 5	-	50,0
CNA-IRAT 5/2/1	CNA-IRAT 5	61,35	-

1. Adicionado como fuente de calidad de granos.

2. Material policitoplasmático.

3. Participación relativa de cada progenitor dada en %.

La metodología de selección recurrente utilizada para mejorar la población CNA-7 se resume en el Cuadro 2 y la estrategia de evaluación empleada para realizar las selecciones durante los ciclos se describe más adelante. Cabe resaltar que en el invierno de 1998 se creó la primera población mejorada, es decir, se completó el primer ciclo de selección recurrente. En el año 2000 se logró el segundo ciclo de recurrencia.

El estudio que se presenta y discute en este capítulo se realizó en el año agrícola 2000/01 utilizando como material la población original (ciclo 0) y las 2 poblaciones mejoradas (ciclos 1 y 2).

ESTRATEGIA DE EVALUACIÓN Y DISEÑO EXPERIMENTAL

Estrategia de evaluación y selección

El ambiente donde se evalúan y se seleccionan los materiales es de gran importancia para el éxito de la estrategia de mejoramiento. La EEC, que posee suelos clasificados como 'latosuelos rojo-amarillo distrófico', es un ambiente que puede considerarse similar al restante de la región central de Brasil en lo que se refiere a la presión y a las razas del patógeno de la *Pyricularia*. Como se pretende desarrollar los nuevos materiales para esta zona, se está trabajando en el

ambiente meta y por esa razón, los resultados obtenidos podrán transferirse de inmediato a otras localidades del área.

La evaluación de los materiales se realizó utilizando las escalas propuestas por el IRRI (1988), pero antes de discutir este aspecto es válido mencionar algunos conceptos básicos sobre la enfermedad, su ciclo y su epidemiología. En las regiones tropicales el hongo *Pyricularia grisea* puede encontrarse en el aire durante todo el año (Frohlich y Rodewald, 1970). Algunas condiciones específicas de humedad, luminosidad y oscilación de la temperatura favorecen el desarrollo de la enfermedad (Yap, 2000).

El conidio, depositado en la superficie de la planta, desarrolla un tubo germinativo que termina en un apresorio y que le permite la penetración en el hospedero a través de la cutícula (Leung y Shi, 1994). El hongo puede infectar las hojas o el cuello de la panícula de las plantas. En general, cuando se va al campo se verifica que una planta que tiene hojas afectadas, no siempre tiene sus panículas o cuellos atacados y viceversa. Bonmann *et al.* (1989) describieron que las razas del hongo que atacan las hojas son las mismas que atacan el cuello de la panícula, aunque el mecanismo de resistencia de la planta a las 2 enfermedades (hoja y cuello de la panícula) podría ser distinto.

Cuadro 2. Resumen del flujo de materiales de la población de arroz de tierras altas CNA-7 en la Estación Experimental Capivara (EEC), Santo Antônio de Goiás, y en el Campo Avanzado de Desarrollo e Investigación del Tocantins (CADIT) utilizando el método de mejoramiento poblacional con evaluación de familias $S_{0.2}$ para resistencia a Piricularia.

Año	Local	Actividades	Manejo	Etapa
1994/95	EEC	Creación de la CNA-7 (mezcla de semillas de CNA-7A y 7B).		Evaluación y selección (154 plantas S_0)
1995/96	EEC	Siembra de 154 plantas S_0	Cosecha de plantas androestéres	Recombinación
1996/97	EEC	Siembra de la S_0 (ciclo 0) en dos épocas distintas ESTRATEGIA DE SELECCIÓN Siembra en noviembre para evaluar Piricularia en el cuello de de la panícula (NBI), y en enero para evaluar Piricularia en la hoja (BI)		Evaluación y selección (48 plantas resistentes 51 plantas resistentes a BI)
1997	CADIT	Siembra de 94 familias $S_{0.1}$	Avance de generación	
1997/98	EEC	Siembra de 94 familias $S_{0.2}$ en dos épocas distintas ESTRATEGIA DE SELECCIÓN Siembra en noviembre para evaluar NBI y en enero para evaluar BI		Evaluación y selección (54 familias)
1998	CADIT	Siembra de la mezcla de semillas de 54 familias $S_{0.1}$ (semillas remanentes almacenadas en cámara fría) de las seleccionadas en $S_{0.2}$. Transplante de 2215 plantas de las cuales 314 eran androestéres (14.2%).	Cosecha de plantas androestéres	Recombinación
1998/99	EEC	Siembra de 3000 plantas S_0 (ciclo 1) en dos épocas distintas ESTRATEGIA DE SELECCIÓN Siembra en noviembre para evaluar NBI, y en enero para evaluar BI.		Evaluación y selección
1999	CADIT	Siembra de 118 familias $S_{0.1}$	Avance de generación	Cosecha de semillas de 5 plantas fértiles/familia
1999/2000	EEC	Siembra de 114 familias $S_{0.2}$ ESTRATEGIA DE SELECCIÓN Siembra en diciembre para evaluar NBI, y en enero para evaluar BI		Evaluación y selección (27 familias)
2000	CADIT	Siembra de la mezcla de semillas de 27 familias $S_{0.1}$ (semillas remanentes almacenadas en cámara fría) de las seleccionadas en $S_{0.2}$. Producción del ciclo 2. Siembra de 500 plantas S_0 de los 3 ciclos para recombinación	Cosecha de plantas androestéres	Recombinación
2000/2001	EEC EEP ¹	Siembra de los 3 ciclos en el diseño experimental de Bloques al Azar en dos localidades (1000 plantas/época)	Para estudio de ganancia genética	

1. Estación Experimental Palmital.

La experiencia del trabajo de campo en la EEC indica que en febrero la presión para BI es más fuerte y que en marzo predomina la presión para NBI. Considerando esto e intentando asociar el estadio fenológico de la planta con la alta incidencia de la enfermedad, se elaboró un esquema en el cual se hizo coincidir el período de mayor incidencia de la enfermedad con las etapas de desarrollo de las plantas donde el tejido de la hoja y del cuello de la panícula estuvieran más susceptibles (Prabhu *et al.*, 1999). Para que esto ocurriera se sembraron los materiales en diciembre para evaluar NBI en marzo, y en enero para evaluar BI en febrero. Las semillas S_0 y $S_{0.2}$ de los diferentes ciclos de selección recurrente de la población CNA-7 se dividieron y sembraron en estas 2 etapas. La selección de las familias ocurrió con base en ambos datos (BI y NBI) y la intensidad de selección utilizada varió entre años, pero estuvo alrededor del 20%.

Las familias $S_{0.2}$ se sembraron en la EEC en 2 surcos de 1 metro lineal, con una densidad de 80 semillas/metro para la evaluación de NBI y de 100 semillas/metro para la de BI. La distancia entre surcos fue de 0,35 m. De forma perpendicular a los surcos se sembraron esparcidores con una mezcla de semillas de las

variedades susceptibles Rio Paranaiba, Caiapó y IAC 47. Cada cuatro surcos se sembró uno con el testigo Caiapó y el siguiente con el testigo Rio Paranaiba, lo cual permitió un análisis de medias ajustadas para auxiliar en la selección.

Para la evaluación de BI se utilizó la escala de 0 a 9 donde se considera que de 0 a 3 son plantas resistentes, de 4 y 5 intermedias y de 6 a 9 susceptibles (IRRI, 1988). Para la evaluación de NBI se utilizó la escala 0, 1, 3, 5, 7 y 9, en la cual 0 y 3 son resistentes, 5 intermedias, 7 y 9 susceptibles (IRRI, 1988). La selección se realizó escogiendo las familias que mejor se comportaban para las 2 características.

Diseño experimental para la evaluación de la ganancia genética

La ganancia genética observada (G_s), también llamada progreso genético, es un parámetro utilizado en los programas de mejoramiento que sirve para evaluar la eficiencia del método de selección aplicado y que, en general, se utiliza para evaluar la ganancia que se espera obtener. Morais *et al.* (2000), sin embargo, describen que también es importante evaluar las ganancias que ya se obtuvieron, o sea, las observadas dentro de un programa de mejoramiento, de manera que se posibilite un análisis crítico de la eficiencia de los procedimientos realizados.

La mayoría de los trabajos que presentan una evaluación de ganancia genética realizada consideran el carácter rendimiento, pero también es posible y justificable utilizarlo para otras características (Morais y Rangel, 1997). En este trabajo se evaluó la ganancia observada para las características resistencia a BI y NBI en la población CNA-7.

Para ello en diciembre del 2000 se estableció un ensayo constituido por 3 tratamientos ciclo 0 (C0), 1 (C1) y 2 (C2) distribuidos en bloques al azar con cuatro repeticiones en 2 localidades: la EEC y la Estación Experimental Palmital (EEP), Brazabrantes. La EEC fue el mismo sitio donde la población CNA-7 había sido conducida en las etapas de selección y la EEP es una finca donde se siembra arroz irrigado en su mayor parte.

En cada parcela se incluyeron 500 plantas espaciadas 0,1 x 0,50m y distribuidas en 25 líneas de 2 m. Paralelas a estas líneas y entre los bloques, se localizaron 3 líneas espaciadas 0,7m entre sí, con mezcla de las cultivares susceptibles Primavera, IAC 47 y Rio Paranaíba que servían como esparcidores del inóculo. En enero del 2001 se realizó una repetición de este experimento.

En los experimentos sembrados en diciembre se evaluó NBI en marzo y en los sembrados en enero, BI en

febrero. Las evaluaciones de BI y NBI se efectuaron con base en las escalas de IRRI (1988) utilizando 200 plantas al azar dentro de la parcela, según lo recomiendan Badan *et al.* (1998).

La preparación de las semillas de los tratamientos evaluados involucró su multiplicación y recombinación en la EEC y en el CADIT, en el semestre anterior al del montaje de los experimentos (Cuadro 2). Para ello se utilizó la técnica de sembrar en bandejas en 3 épocas distintas, de manera que se garantizara la eficiente recombinación entre los materiales.

Análisis estadístico de la ganancia genética

Las medidas de ganancias genéticas se realizaron con base en el valor medio del grado de incidencia de las enfermedades y después con base en la frecuencia de plantas resistentes e intermediarias, así como lo hicieron Filippi y Prabhu (1997) y Guimarães y Correa-Victoria (1997), respectivamente. Para calcular el promedio de las parcelas se utilizaron los datos de las 200 plantas evaluadas.

Se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) por experimento considerando el modelo I (fijo), para lo cual se utilizó el procedimiento de la ANOVA del programa SAS (SAS, 2000). Se efectuó la prueba de Hartley (1950) para determinar si

las varianzas de los errores en las distintas localidades eran homogéneas, y para los casos donde las respuestas eran afirmativas se realizó un análisis combinado. Cuando se presentó diferencia significativa entre los tratamientos, se calculó la respuesta con selección.

La estimación de la respuesta a la selección se calculó con base en la fórmula adaptada de García (1995):

$$Gs = R(Cn) - R(C0)$$

En ésta:

Gs es la ganancia con selección total.

R(Cn) es la respuesta de la población mejorada.

R(C0) es la respuesta de la población original, sin mejorar.

La respuesta a la selección (Gs%) en términos porcentuales, como porcentaje del ciclo 0, se calculó con base en la fórmula:

$$Gs\% = [R(Cn) - R(C0)]/R(C0) \times 100$$

Para estimar el avance genético se estimó la heredabilidad realizada con base en el cálculo de regresión de los datos del promedio de los ciclos. Esto fue posible considerando los valores de los ciclos C1 y C2 como porcentuales del ciclo C0 (Falconer, 1968; Gatica, 1993).

ESTUDIO DE LA GANANCIA GENÉTICA

Los resultados se presentaron conforme a la característica evaluada, primero los datos de Piricularia en la hoja (BI) y en seguida los de

Piricularia en el cuello de la panícula (NBI).

Los primeros cuadros incluidos para cada una de las características (Cuadro 3 ó 9 para BI y NBI, respectivamente) tienen los valores reales obtenidos en los experimentos (o mejor, la media de 200 plantas/ experimento). Las letras representan los resultados de las pruebas estadísticas de Duncan que permiten la diferenciación entre ellos. Las pruebas entre tratamientos, localidades o épocas/localidades (experimento) se representan horizontal o verticalmente, con letras mayúsculas o minúsculas, conforme se describen en las leyendas de cada cuadro.

En los cuadros que siguen dentro de las divisiones para BI y NBI (Cuadros 4, 6 a 8 y 10 a 12, respectivamente) se representan los análisis de varianza. Para la característica BI, los datos responden a las premisas de homogeneidad de varianza y por lo tanto, se presentan inicialmente a partir de los análisis combinados para luego presentar los análisis más sencillos (por localidad o por experimento).

Para la característica NBI, los análisis de varianza se presentan por localidad y por experimento. Las transformaciones de los datos para realizar cada análisis se realizaron como se describen en las respectivas leyendas.

Los resultados se presentan en términos del promedio de los grados de enfermedad (PROMEDIO) y también en porcentaje de plantas resistentes (plantas con grados de enfermedad entre 0 y 3 - % R) y de plantas intermediarias (con grados entre 4 y 5 - % I). De esta manera también fue posible efectuar una comparación entre la informabilidad de ellos.

Se omitieron los análisis de porcentaje de plantas susceptibles (% S), o sea con grados mayores a 5, por tratarse de valores muy poco frecuentes. Sin embargo, al mismo tiempo, los valores que resultan de la suma de % R y % I, de manera indirecta sirven para tener una idea de la disminución en la cantidad de plantas susceptibles a lo largo de las generaciones. La manera indirecta debe entenderse como el 100% disminuido de los valores de % R + % I.

En el Cuadros 5 se presentan los valores de ganancia genética obtenidos para BI. Se consideran ganancias estadísticamente significativas cuando los tratamientos diferían entre sí por la prueba de Duncan. Los valores positivos indican los aumentos en la resistencia, apuntado a través de una disminución numérica (0=resistente y 9=susceptible), o sea, incrementar la resistencia significa disminuir en número el valor del promedio o de % I.

Los resultados de la ganancia genética para la característica NBI se presentan a lo largo del texto, pues se observó poco incremento en la resistencias.

Para la característica BI también se presenta una gráfica (Figura 1) que representa la regresión lineal de los datos de ganancia en los ciclos. Con base en eso, también se calculó la heredabilidad realizada. Este fue un dato calculado apenas para BI con los datos utilizados para el análisis combinado, es decir, con todos los datos obtenidos.

Piricularia en la hoja (BI)

El primer cuadro presenta los valores originales obtenidos del análisis de 200 plantas/ parcela de la característica BI (Cuadro 3). Un primer análisis permite verificar que toda la población CNA-7 tiene ya un alto grado de resistencia a Piricularia en la hoja, desde el inicio del programa de mejoramiento (con la población Ciclo 0). Esto indica que la selección de los progenitores utilizados como fuente de resistencia ha sido eficiente. Ello se observa a través de los datos 2,13; 1,76 y 1,56 en la línea de media general de la característica promedio de los grados, para los ciclos 0, 1 y 2, respectivamente (Cuadro 3). Considerando que la escala de evaluación de resistencia varía de 0, como totalmente resistente, hasta 9 como susceptible, esos

son valores que pueden considerarse como bajos. Así mismo, a través de los datos observados en la línea del promedio general de % R (Cuadro 3) se confirma esa idea: 0,67, 0,78 y 0,82 para los ciclos 0, 1 y 2. La hipótesis de que la presión de selección fue muy baja durante la realización de los experimentos se descarta pues se observa un elevado número de plantas susceptibles en las líneas esparcidoras del inóculo (dato no demostrado).

Es interesante notar que el análisis de otro tipo de datos (promedio o %) puede llevar a conclusiones distintas en algunos casos como, por ejemplo, la comparación entre localidades realizada con base en los valores promedios de cada localidad. Cuando esa comparación toma como base los valores promedios de los grados, no se consigue detectar diferencia significativa entre la EEC y la EEP. Al mismo tiempo, cuando ese análisis toma en cuenta el porcentual de plantas resistentes o intermediarias, se consigue percibir, estadísticamente que la en la EEC se encuentran la mayoría de plantas resistentes (78% contra 73% en la EEP). Para verificar estas diferencias en el Cuadro 3, basta comparar verticalmente las letras mayúsculas al frente de los valores numéricos.

Las posibles explicaciones para esa diferencia entre los 2

tipos de análisis serían que el cálculo del promedio lleva a que valores extremos se coloquen en una clase intermedia al considerar sus frecuencias. En la EEP se observan plantas con grados mayores (o sea, plantas en extremo enfermas, de grado 7 o 9), pero con baja frecuencia. En la EEC se encuentra un mayor número de plantas resistentes. A través del cálculo de medias esas diferencias pasan a ser imperceptibles. Desde un punto de vista didáctico, ello podría explicarse anotando que en la EEC se tendrían cuatro plantas con grados 3, 3, 3 y 5, lo que daría 75% de plantas resistentes y en la EEP otras plantas con grados 0, 0, 7 y 7, o sea, con 50% de resistentes. Si se verifica el promedio de ambas localidades, ambas tienen media 3,5 pero, en términos porcentuales, son distintas. Con base en las evidencias demostradas, podría sugerirse que, en este caso, el análisis de los datos de valores porcentuales de la resistencia fueron mucho más informativos que los datos del promedio. Esta es una afirmación que no parece ser unánime dentro de la literatura pues es usual utilizar el promedio para describir la resistencia (Fillipi y Prabhu, 1997).

Discutidos los 2 puntos anteriores (la gran resistencia que indica la buena selección de los padres y los tipos de datos

Cuadro 3. Datos de Piricularia en la hoja (BI) para el promedio, el porcentaje de plantas resistentes (% R) y el porcentaje de plantas intermedias (% I) de los tratamientos ciclo 0 (C0), 1 (C1) y 2 (C2) de la población CNA-7, en los experimentos conducidos en las localidades EEC y EEP, en dos fechas de siembra (EEC 1 y 2, y EEP 1 y 2).

Experimento ³	Promedio ¹				% Resistentes ²				% Intermedias ²			
	C0 ⁴	C1 ⁴	C2 ⁴	Media ^{5,6}	C0 ⁴	C1 ⁴	C2 ⁴	Media ^{5,6}	C0 ⁵	C1 ⁵	C2 ⁵	Media ^{5,6}
				1,72				0,80				0,19
EEC 1	2,12 a	1,49 b	1,59 b	A	0,73 b	0,85 a	0,82 a	A	0,26 a	0,15b	0,18 b	A
				1,94				0,77				0,23
EEC 2	2,37 a	1,79 b	1,67 b	B	0,62 b	0,82 a	0,86 a	A	0,37 a	0,17b	0,14 b	A
Media EEC	2,24 a	1,64b	1,63b	1,8A	0,68 b	0,84 a	0,84 a	0,78 A	0,31 a	0,16b	0,16 b	0,21 A
				2,04				0,69				0,29
EEP 1	2,17 a	2,20 a	1,76 b	A	0,65 b	0,68ab	0,76 a	A	0,34 a	0,31a	0,23 a	A
				1,54				0,76				0,23
EEP 2	1,88 a	1,56ab	1,21 b	B	0,69 b	0,75 b	0,83 a	B	0,29 a	0,24a	0,16 b	B
Media EEP	2,02 a	1,88a	1,48b	1,8A	0,67 b	0,71 b	0,79 a	0,73 B	0,31 a	0,27a	0,19 b	0,26 B
Media General	2,13 a	1,76 b	1,56 c		0,67 a	0,78 b	0,82 c		0,31 a	0,21b	0,18 c	

1. Transformación por raíz ($x+0,5$) para realizar la ANDEVA y la prueba de Duncan.
2. Transformación por arcoseno de la raíz ($x+0,05$) para realizar ANDEVA y la prueba de Duncan.
3. EEC 1 y 2, y EEP 1 y 2, son los dos experimentos en las dos localidades de evaluación.
4. Comparación entre tratamientos (horizontal).
5. Comparación entre medias de localidades (vertical, letras mayúsculas al lado de los valores).
6. Comparación entre épocas/localidad (vertical, letras mayúsculas abajo de los valores).

que presentan mayor información), se presentan los resultados de ganancia genética de la resistencia a BI en la población a lo largo de los ciclos de selección recurrente.

En términos generales, el incremento de la resistencia a lo largo de los ciclos es algo que se notó con facilidad para la característica BI. Los resultados de los análisis de varianza combinado indican que hay diferencia altamente significativa entre tratamientos tanto para el análisis del promedio como para el % R y de % I (Cuadro 4). Los valores que miden cuáles fueron estas ganancias en la resistencia se presentan en el Cuadro 5.

Considerando los cálculos en términos del promedio de los grados, se observa que desde el ciclo 0 al ciclo 1, se presentó una ganancia de la resistencia en 17,37% con relación al ciclo 0; y del ciclo 1 al ciclo 2, una de 9,39% con relación al ciclo 0. Tales valores se pueden observar en la línea de Media General del Cuadro 5. Estos porcentuales se cambian para 16,42% y 5,97% si se consideran los valores de % R (Cuadro 5, línea de Media General de la característica % R). Como se puede observar, las ganancias en los ciclos iniciales son mayores que en los subsecuentes.

Cuadro 4. Cuadrados medios del análisis de varianza combinado y coeficientes de variación (CV) para el promedio, el porcentaje de plantas resistentes (% R) y el porcentaje de plantas intermedias (% I) de la característica Piricularia en la hoja (BI) en la población CNA-7.

		Estación Experimental Capivara - 1ª y 2ª épocas					
Fuente de Variación	Gl	Promedio ¹		% Resistentes ²		% Intermedias ²	
		CM	F	CM	F	CM	F
Rep	3	0,0066	1,45ns	0,018	4,31*	0,0095	3,17*
Trat	2	0,1460	32,00**	0,145	34,69**	0,0954	31,71**
Local	1	0,0032	0,70ns	0,075	17,83**	0,3899	12,96**
Época	1	0,0295	6,47*	0,0033	0,79ns	0,0035	1,19ns
LocalxEpoca	1	0,1641	35,99**	0,0348	8,28**	0,02947	9,79**
LocalxTrat	2	0,0253	5,55**	0,0254	6,05**	0,01797	5,97**
EpocaxTrat	2	0,0061	1,35ns	0,0104	2,48ns	0,0083	2,78ns
Error	35	0,0045		0,0042		0,0030	
CV		4,45		5,76		9,82	

1. ANDEVA con datos transformados por raíz de (x+0,5).

2. ANDEVA con datos transformados por arcoseno de la raíz de (x+0,05).

3. EEC 1 y 2, y EEP 1 y 2, son los dos experimentos en las dos localidades de evaluación.

Otro aspecto que llama la atención es que las ganancias de la resistencia no siguieron el mismo patrón en las distintas localidades, lo cual puede observarse a través de la significativa interacción entre localidad y tratamiento en la ANDEVA combinada (Cuadro 4). Esto sería lo mismo que decir que en la EEC hubo ganancia del ciclo 0 para el ciclo 1 de 26,79%, pero no del ciclo 1 para el siguiente. En la EEP ocurrió exactamente al revés, la ganancia fue de 19,80% apenas del ciclo 1 para el 2 (Cuadro 5).

Podrían considerarse 2 hipótesis para explicar este evento:

- 1) A lo largo de los ciclos se estarían acumulando no sólo los genes principales correlacionados con la resistencia a las razas específicas presentes en la EEC (localidad donde se realizaron las selecciones), sino también genes secundarios que podrían conferir resistencia en un más amplio espectro de razas del hongo.
- 2) A lo largo de los ciclos se acumularían sólo genes principales a través de la selección de plantas únicamente con grado entre 0-3.

Con la primera hipótesis, el incremento en el C2 presente en la EEP se explicaría por mejores combinaciones de genes

favorables con el paso de los ciclos, puesto que habría mayor posibilidad de que existieran interacciones epistáticas entre genes principales y secundarios acumulados. Esto permitiría que la población respondiera de manera favorable no sólo a la presión de hongos 'conocidos' (que serían los hongos de la EEC donde se efectuó la selección), sino también a 'desconocidos' (que serían las supuestas nuevas razas existentes en la EEP para la cual la población no había sido seleccionada).

Con la segunda hipótesis, la explicación para que la ganancia en el C2 fuera mayor en la EEP que en la EEC, sería que en esta última la resistencia ya habría alcanzado un nivel tan alto en el C1 que sería mucho más difícil que se presentara ganancia en los ciclos siguientes. Esto es que para detectar la ganancia realizada serían necesarias otras alternativas de evaluación experimental más precisas. Dado que en la EEP la ganancia no había sido tan grande en el C1, sería mucho más fácil que existiera un incremento.

Con esa diferencia entre localidades, la observación de los valores de ganancia total obtenidos en las 2 localidades a lo largo de los 2 ciclos (Cuadro 5) muestra con claridad la eficiencia de la estrategia de selección utilizada dentro del programa de selección recurrente para incrementar la resistencia a BI en

Cuadro 5. Valores de ganancia genética absoluta y porcentaje de la resistencia a Piricularia en la hoja (BI) para el promedio, el porcentaje de plantas resistentes (% R) y el porcentaje de plantas intermedias (% I) en la población CNA-7, a lo largo de los tratamientos ciclo 0 (C0), 1 (C1) y 2 (C2) a través de datos obtenidos en los experimentos distribuidos en las localidades EEC y EEP, en dos fechas de siembra (EEC 1 y 2, y EEP 1 y 2).

Exp. ¹	Promedio ²						%Resistente ²						%Intermediaria ²					
	(C0:C1) ³		(C1:C2) ⁴		Total ⁵		(C0:C1) ³		(C1:C2) ⁴		Total ⁵		(C0:C1) ³		(C1:C2) ⁴		Total ⁵	
	Gs	%(C0)	Gs	%(C0)	Gs	%(C0)	Gs	%(C0)	Gs	%(C0)	Gs	%(C0)	Gs	%(C0)	Gs	%(C0)	Gs	%(C0)
EEC 1	0,63	29,72*	-0,11	-5,19ns	0,52	24,53*	0,12	16,44*	0,03	-4,11ns	0,09	12,33*	-0,11	-42,31*	0,03	11,54ns	-0,18	-69,23*
EEC 2	0,58	24,47*	0,12	5,06ns	0,70	29,54*	0,20	32,26*	-0,04	6,45ns	0,24	38,71*	-0,20	-54,05*	-0,03	-8,11ns	-0,14	-37,84*
Media EEC	0,60	26,79*	0,01	0,45ns	0,61	27,23*	0,16	23,53*	0,00	0,00ns	0,16	23,53*	-0,15	-48,39*	0,00	0,00ns	-0,16	-51,61*
EEP 1	-0,03	-1,38ns	0,44	20,28*	0,41	18,89*	0,03	4,62ns	0,08	12,31ns	0,11	16,92*	-0,03	-8,82ns	-0,08	-23,53ns	-0,23	-67,65ns
EEP 2	0,32	17,02ns	0,35	18,62ns	0,67	35,64*	0,06	8,70ns	0,08	11,59*	0,14	20,29*	-0,05	-17,24ns	-0,08	-27,59*	-0,16	-55,17*
Media EEP	0,14	6,93ns	0,40	19,80*	0,54	26,73*	0,05	7,46ns	0,07	10,45*	0,12	17,91*	-0,04	-12,90ns	-0,07	-22,58*	-0,20	-64,52*
Media general	0,37*	17,37*	0,20	9,39*	0,57	26,76*	0,11	16,42*	0,04	5,97*	0,15	22,39*	-0,10	-32,26*	-0,03	-9,68*	-0,18	-58,06*

1. Experimentos en las dos localidades de evaluación EEC 1 y 2, y EEP 1 y 2.
2. Ganancias genéticas calculadas con base en datos originales. Las estadísticamente significativas a 95% de probabilidad por la prueba de Duncan se indican con * y no significativas con ns.
3. Ganancia genética del ciclo 0 para el ciclo 1 en términos reales (x) y en términos de % con relación a C0.
4. Ganancia genética del ciclo 1 para el ciclo 2 en términos reales (x) y en términos de % con relación a C0.
5. Ganancia genética total (del ciclo 0 para el ciclo 2) en términos reales (x) y en términos de % con relación a C0.

la población CNA-7. En la EEC la ganancia genética total (GsTotal) fue de 27,23% y en la EEP de 26,73% para el promedio de los grados; y de 23,53% y 17,91% para % R. Estos son incrementos que pueden considerarse altos al compararlos con el trabajo de Ceballos (1991), pero de nivel intermedio si se comparan con el trabajo de Diaz-Lago *et al.* (2002), que presentaron ganancias que variaron entre 41 y 64%.

Las interacciones altamente significativas entre localidad y época del análisis combinado (Cuadro 4) llevaron al análisis de los datos por localidad (Cuadro 6). Tanto en la EEC como en la EEP (Cuadro 6) fue posible verificar la diferencia significativa entre épocas de siembra lo cual lleva a afirmar que el conocimiento de la dinámica poblacional de las enfermedades es un factor que debe tenerse en cuenta. Los trabajos de Prabhu *et al.* (2001) proponen la elección de la época de siembra para variedades comerciales, lo cual sería una aplicación de este tipo de conocimiento. Estos argumentos fortalecen la idea de que la estrategia de selección adoptada en la conducción de la población CNA-7 fue adecuada pues fue posible hacer coincidir la época de selección con la alta presión de la enfermedad. Si con una diferencia de 10 días de siembra de una época a otra ya se verificó interacción significativa

en las respuestas, seguramente esa es una cuestión en la cual se debe profundizar más. Desde 1970, cuando se intentaba elaborar un mecanismo sencillo de captura de los hongos en el aire, ya se demostraba la intención de identificar y conocer la dinámica poblacional de los hongos (Yamaguchi, 1970).

Las diferencias entre tratamientos (ya presentadas) también pueden comprobarse en los Cuadros 7 y 8 en los cuales se presentan los análisis de varianza para cada experimento. Su análisis revela que los CVs obtenidos presentaron valores que variaron desde 3,10 hasta 11,62%. Se observa que los CVs más altos fueron para los datos de % I y que no hubo diferencia significativa entre repeticiones. La comparación entre los errores fue lo que permitió el análisis combinado de los datos (incluidos en el Cuadro 4).

Los cálculos de la heredabilidad realizada para la característica BI se presentan en las Figuras 1A, 1B y 1C con base en las regresiones lineales de los datos. Los valores de heredabilidad de 0,35; 0,29 y 0,50 se obtuvieron respectivamente para el promedio, la % I y % R.

Se comprueba que los datos obtenidos en la población CNA-7 fueron más grandes que los de Filippi y Prabhu (1997) en cuyo trabajo las heredabilidades oscilaron entre 0,16 y 0,26. Una posible explicación de ello es que

Cuadro 6. Cuadrados medios del análisis de varianza por localidad y coeficientes de variación (CV) para el promedio, el porcentaje de plantas resistentes (% R) y el porcentaje de plantas intermedias (% I) de la característica Piricularia en la hoja (BI) en la población CNA-7 a través de datos obtenidos en los experimentos conducidos en la EEC y EEP en dos fechas de siembra (EEC 1 y 2), (EEP 1 y 2).

Fuente de Variación	Gl	Estación Experimental Capivara - 1ª y 2ª épocas						Estación Experimental Palmital - 1ª y 2ª épocas					
		Promedio ¹		% Resistente ²		% Intermedia ²		Promedio ¹		% Resistente ²		% Intermedia ²	
		CM	F	CM	F	CM	F	CM	F	CM	F	CM	F
Rep	3	0,0032	0,91ns	0,0135	2,95ns	0,0057	1,84ns	0,0047	0,77ns	0,0090	2,00ns	0,0066	1,86ns
Trat	2	0,0958	26,76**	0,1193	26,00**	0,0781	24,94*	0,0713	11,48**	0,0519	11,51**	0,0353	9,95**
Época	1	0,0293	8,18**	0,0083	1,81ns	0,0062	1,99ns	0,1667	26,82**	0,0298	6,61*	0,0268	7,56*
Error	17	0,00358		0,0046		0,0031		0,0062		0,0045		0,0035	
CV		3,92		5,81		10,56		5,22		6,19		10,14	

1. ANDEVA con datos transformados por raíz de (x+0,5).

2. ANDEVA con datos transformados por arcosen de la raíz de (x+0,05).

Cuadro 7. Cuadrados medios del análisis de varianza individual y coeficientes de variación (CV) para el promedio, el porcentaje de plantas resistentes (% R) y el porcentaje de plantas intermedias (% I) de la característica Piricularia en la hoja (BI) en la población CNA-7 a través de datos obtenidos en los experimentos conducidos en la EEC en dos fechas de siembra (EEC 1 y 2).

Fuente de Variación	Gl	Estación Experimental Capivara - 1ª y 2ª épocas						Estación Experimental Palmital - 1ª y 2ª épocas					
		Promedio ¹		% Resistente ²		% Intermedia ²		Promedio ¹		% Resistente ²		% Intermedia ²	
		CM	F	CM	F	CM	F	CM	F	CM	F	CM	F
Rep	3	0,0048	1,06ns	0,0090	3,37ns	0,0048	3,08ns	0,0032	1,37ns	0,0071	1,90ns	0,0032	1,40ns
Trat	2	0,0485	10,65**	0,0302	10,74**	0,0180	11,48**	0,0546	23,3**	0,1030	27,60*	0,0717	31,32**
Error	6	0,0046		0,0028		0,0016		0,0023		0,0037		0,0022	
CV		4,52		4,48		7,71		3,10		5,35		8,76	
Media		1,49		1,18		0,51		1,56		1,14		0,55	

1. ANDEVA con datos transformados por raíz de $(x+0,5)$.

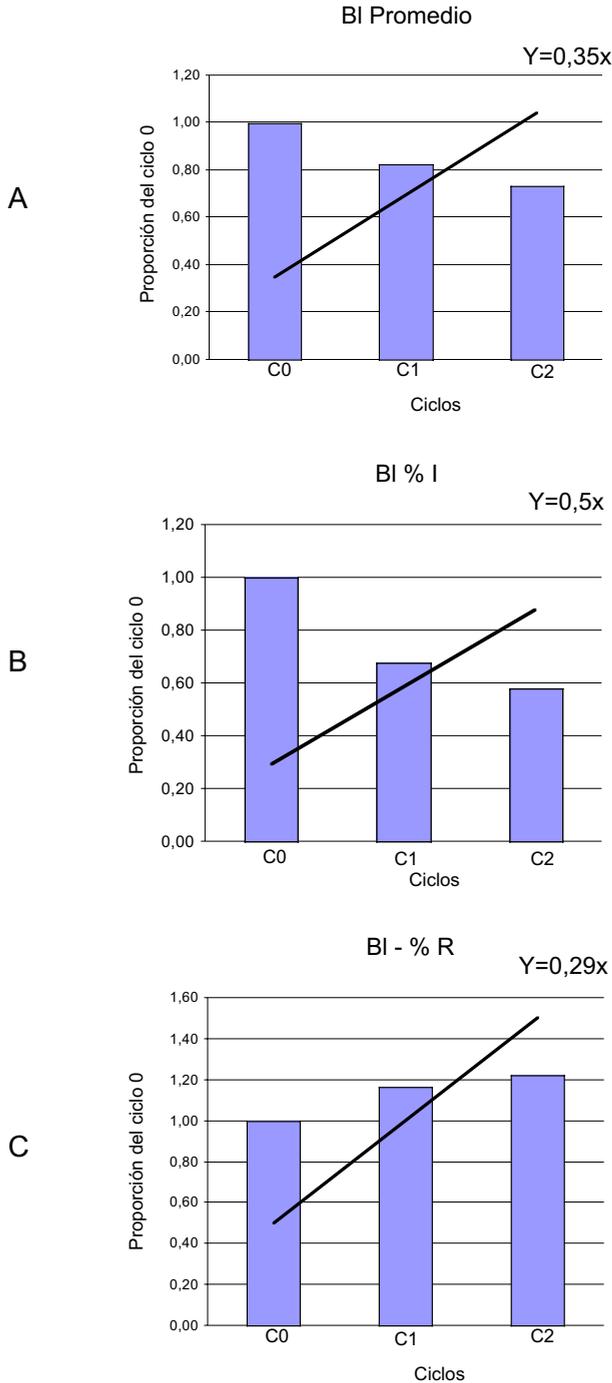
2. ANDEVA con datos transformados por arcosen de la raíz de $(x+0,05)$.

Cuadro 8. Cuadrados medios del análisis de varianza individual y coeficientes de variación (CV) para el promedio, el porcentaje de plantas resistentes (% R) y el porcentaje de plantas intermedias (% I) de la característica Piricularia en la hoja (BI) en la población CNA-7 a través de datos obtenidos en los experimentos distribuidos en la EEP en dos fechas de siembra (EEP 1 y 2).

Fuente de Variación	Gl	Estación Experimental Capivara - 1ª y 2ª épocas						Estación Experimental Palmital - 1ª y 2ª épocas					
		Promedio ¹		% Resistente ²		% Intermedia ²		Promedio ¹		% Resistente ²		% Intermedia ²	
		CM	F	CM	F	CM	F	CM	F	CM	F	CM	F
Rep	3	0,0072	2,93ns	0,0117	1,89ns	0,0099	1,92ns	0,0031	0,33ns	0,0042	1,44ns	0,0016	0,77ns
Trat	2	0,0240	9,78*	0,0219	3,53ns	0,0145	2,80ns	0,0552	5,82ns	0,0307	10,67**	0,0213	9,90*
Error	6	0,0024		0,0062		0,0052		0,0095		0,0028		0,0020	
CV		3,12		7,50		11,62		6,85		4,79		8,37	
Media		1,59		1,05		0,62		1,43		1,12			0,55

1. ANDEVA con datos transformados por raíz de (x+0,5).
2. ANDEVA con datos transformados por arcosen de la raíz de (x+0,05).
3. EEC 1 y 2, y EEP 1 y 2 son los dos experimentos en las dos localidades de evaluación.

Figura 1. Gráficas con regresión lineal de la resistencia a Piricularia en la hoja (BI) en la población CNA-7 a lo largo de los ciclos 0, 1 y 2 del Programa de Mejoramiento, donde el valor 'b' de las fórmulas representa la heredabilidad realizada para el promedio (A), la % I (B) y % R (C).



en la CNA-7 la estrategia de selección de plantas con grados entre 0-3, podría rescatar de manera mayoritaria genes principales si lo comparamos con la estrategia de la otra población, que era seleccionar plantas con resistencia parcial, o sea, con grados ≥ 4 en la escala IRR1 (1988).

Piricularia en el cuello de la panícula (NBI)

El primer cuadro (Cuadro 9) de los análisis de la característica Piricularia en el cuello de la panícula presenta los datos de 200 plantas/experimento para el promedio de los grados, el % R y el % I. Las letras representan los resultados de las pruebas de Duncan a 95% de probabilidad: las iguales representan igualdad entre tratamientos en términos estadísticos. Se dan casos donde estas letras no se presentan debido a la falta de los criterios de homocedasticidad de varianzas que posibilitarían los análisis.

Aunque existe una tendencia a creer que se presentó ganancia de la resistencia a NBI en la localidad EEP, con base en la observación de los datos del promedio en el Cuadro 9 (1,62; 1,51; 1,16), los análisis de varianzas individuales demuestran que esto no pudo comprobarse estadísticamente.

A diferencia del análisis de la característica BI (ya presentada), en el cual fue posible mostrar un

análisis combinado de los datos, los análisis de NBI tuvieron que efectuarse por localidad y por experimento, de forma separada.

Tanto para los experimentos realizados en la EEC como en la EEP, se destaca la importancia de la época de siembra en la evaluación de la característica NBI, cuando se detecta diferencia significativa en la fuente de variación 'época' del análisis de varianzas (Cuadro 10). Los datos para el promedio del Cuadro 9, por ejemplo, señalan que en la media EEC en la primera época (EEC-1) fue de 0,62, mientras que en la segunda (EEC-2) fue de 0,33. Estos datos se corroboran con lo que describe Ou (1985) cuando afirma que para la característica NBI, en particular, la época de siembra parece tener gran influencia.

En el Cuadro 9 se debe también considerar que si se suman los datos de % R y % I para cada uno de los ciclos, es posible percibir indirectamente que desde el ciclo 0 la población CNA-7 ya presentó un bajo grado de susceptibilidad, lo cual indica que también para NBI fue buena la selección de los progenitores utilizados. Este cálculo se obtuvo sumando el valor medio de % R con el valor medio de % I en la EEC (0,94+0,03) que es igual a 0,97. Por lo tanto, los 0,03 que restan para llegar a los 100% representan la cantidad de plantas susceptibles encontradas en el ciclo 0 de la EEC.

Cuadro 9. Datos de Piricularia en el cuello de la panícula (NBI) para el promedio, el porcentaje de plantas resistentes (% R) y el porcentaje de plantas intermedias (% I) de los tratamientos Ciclo 0 (C0), 1 (C1) y 2 (C2) de la población CNA-7, en los experimentos distribuidos en las localidades EEC y EEP, en dos fechas de siembra (EEC 1 y 2, y EEP 1 y 2).

Experimento ³	Promedio ¹				% Resistente ²				% Intermedia ²			
	C0 ⁴	C1 ⁴	C2 ⁴	Media ^{5,6}	C0 ⁴	C1 ⁴	C2 ⁴	Media ^{5,6}	C0 ⁵	C1 ⁵	C2 ⁵	Media ^{5,6}
EEC 1	0,43 b	0,96 a	0,48 b	0,62 A	0,92 a	0,88 a	0,93 a	0,91 A	0,04 a	0,06a	0,03 a	0,05 A
EEC 2	0,35 a	0,39 a	0,26 a	0,33 B	0,96 a	0,95 a	0,97 a	0,96 A	0,01 a	0,03a	0,02 a	0,03 B
Media EEC	0,39 b	0,68 a	0,37 b	0,48	0,94 a	0,92 a	0,95 a	0,94	0,03 a	0,04a	0,03 a	0,04
EEP 1	1,43 a	1,28 a	0,99 a	1,23 A	0,84 a	0,85 a	0,89 a	0,86 A	0,09 a	0,11a	0,04 b	0,08 A
EEP 2	1,81 a	1,74 a	1,34 a	1,63 B	0,78 a	0,80 a	0,85 a	0,81 B	0,11 a	0,13a	0,10 a	0,12 B
Media EEP	1,62 a	1,51ab	1,16 b	1,43	0,81 b	0,83ab	0,87 a	0,84	0,10ab	0,12a	0,08 b	0,10
Media General	1,04	1,07	0,85		0,87	0,87	0,91		0,07	0,09	0,05	

1. ANDEVA con datos transformados por raíz de $(x+0,5)$.
2. ANDEVA con datos transformados por arcosen de la raíz de $(x+0,05)$.
3. EEC 1 y 2, y EEP 1 y 2 son los dos experimentos en las dos localidades de evaluación.
4. Comparación entre tratamientos (horizontal).
5. Comparación entre épocas/localidad (vertical, letras mayúsculas al lado de los valores).
6. No fue posible realizar la comparación entre datos de media de localidad en la EEP, ni de media general porque no se cumplieron los criterios de homocedasticidad de varianza.

Cuadro 10. Cuadrados medios del análisis de varianza por localidad y coeficientes de variación (CV) para el promedio, el porcentaje de plantas resistentes (% R) y el porcentaje de plantas intermedias (% I) de la característica Piricularia en el cuello de la panícula (NBI) en la población CNA-7 a través de datos obtenidos en los experimentos conducidos en la EEC y EEP en dos fechas de siembra (EEC 1 y 2), (EEP 1 y 2).

Fuente de Variación	Gl	Estación Experimental Capivara - 1ª y 2ª épocas						Estación Experimental Palmital - 1ª y 2ª épocas					
		Promedio ¹		% Resistente ²		% Intermedia ²		Promedio ¹		% Resistente ²		% Intermedia ²	
		CM	F	CM	F	CM	F	CM	F	CM	F	CM	F
Rep	3	0,0100	1,21ns	0,0049	0,54ns	0,0009	0,62ns	0,0098	0,47ns	0,0018	0,29ns	0,0003	0,12ns
Trat	2	0,0547	6,60**	0,0067	0,74ns	0,0022	1,51ns	0,0590	2,82ns	0,0208	3,19ns	0,0086	3,16ns
Época	1	0,1197	14,45**	0,0021	2,24ns	0,0108	7,42*	0,1221	5,84*	0,0429	6,58*	0,0174	6,33*
Error	17	0,0082		0,0096		0,0014		0,0209		0,0065		0,0027	
CV		9,28		6,90		13,29		10,47		6,52			13,26

1. ANDEVA con datos transformados por raíz de (x+0,5).

2. ANDEVA con datos transformados por arcosen de la raíz de (x+0,05).

Cuadro 11. Cuadrados medios del análisis de varianza individual y coeficientes de variación (CV) para el promedio, el porcentaje de plantas resistentes (% R) y el porcentaje de plantas intermedias (% I) de la característica Piricularia en el cuello de la panícula (NBI) en la población CNA-7 a través de datos obtenidos en los experimentos distribuidos en la EEC en dos fechas de siembra (EEC 1 y 2).

Fuente de Variación	GI	Estación Experimental Capivara - 1ª y 2ª épocas						Estación Experimental Palmital - 1ª y 2ª épocas					
		Promedio ¹		% Resistente ²		% Intermedia ²		Promedio ¹		% Resistente ²		% Intermedia ²	
		CM	F	CM	F	CM	F	CM	F	CM	F	CM	F
Rep	3	0,0178	2,59ns	0,0044	0,43ns	0,0021	0,81ns	0,0025	0,88ns	0,00008	0,32ns	0,0007	1,88ns
Trat	2	0,0730	10,75*	0,0098	0,97ns	0,0019	0,74ns	0,0064	2,23ns	0,0003	1,20ns	0,0009	2,47ns
Error	6	0,0068		0,010		0,0026		0,0029		0,002		0,003	
CV		7,88		7,33		16,56		5,93		1,63		7,15	
Media		1,05		1,37		0,31		0,91		0,96		0,26	

1. ANDEVA con datos transformados por raíz de $(x+0,5)$.
2. ANDEVA con datos transformados por arcosen de la raíz de $(x+0,05)$.
3. Datos originales.

Para la característica NBI, diferente de BI, no fue posible demostrar si los valores promedios o los porcentuales eran más adecuados para utilizarse en este tipo de análisis.

Con relación a los análisis de varianza por experimento (Cuadros 11 y 12), se observaron pocos casos en los cuales se presentara diferencia significativa entre los tratamientos. La comparación entre las letras en la horizontal de la media de EEC del Cuadro 9 lo muestra con claridad. Con los promedios, que oscilaron entre 0,39; 0,68; y 0,37 a lo largo de los ciclos, fue posible calcular las ganancias genéticas y verificar que apenas en la EEC, la resistencia a NBI de la población disminuyó en el primero ciclo (GsC0:C1= -74%) y después volvió a aumentar en el segundo ciclo (GsC1:C2= +79%) para el promedio. La imposibilidad de calcular ganancias para las otras características indica que no fue posible detectar con confiabilidad estadística, ganancia de la resistencia a NBI en la población CNA-7 utilizando la estrategia de selección ya descrita.

Los datos indican, por lo tanto, que la estrategia de selección adoptada no fue eficiente para incrementar la característica NBI dentro de la población CNA-7. La

explicación de ello podría encontrarse en los siguientes factores:

Problemas en la evaluación.

Un factor sería que como el análisis de la característica NBI se basa en el porcentaje de granos estériles, sería factible que se presentara una confusión en el momento de la evaluación por un mimetismo del síntoma de la enfermedad con los granos androestériles existentes en la población (Guimarães *et al.*, 1995). La otra posibilidad sería que como la escala de evaluación de Piricularia en el cuello de la panícula describe el grado 0 como 'planta sin incidencia'; el grado 1 como 'menos de 5% de panículas infectadas', el grado 3 como '5-10% de panículas infectadas', es posible imaginar la dificultad de ser exacto durante la evaluación.

Una dificultad adicional en la evaluación de la característica NBI se presenta en las casas de malla. Por ejemplo, Prabhu (comunicación personal) comenta que aún se busca una metodología adecuada para que la inoculación sea eficiente, y en algunas publicaciones se dan sugerencias para que sistemas alternativos para evaluación de Piricularia en el cuello de la panícula y en la hoja se investigen y desarrollen (Filippi y Prabhu, 1997).

Influencia del ambiente. Otro factor que pudo imposibilitar la detección de ganancia genética

Cuadro 12. Cuadrados medios del análisis de varianza individual y coeficientes de variación (CV) para el promedio, el porcentaje de plantas resistentes (% R) y el porcentaje de plantas intermedias (% I) de la característica Piricularia en el cuello de la panícula (NBI) en la población CNA-7 a través de datos obtenidos en los experimentos distribuidos en la EEP en dos fechas de siembra (EEP 1 y 2).

Fuente de Variación	Gl	Estación Experimental Capivara - 1ª y 2ª épocas						Estación Experimental Palmital - 1ª y 2ª épocas					
		Promedio ¹		% Resistente ²		% Intermedia ²		Promedio ¹		% Resistente ²		% Intermedia ²	
		CM	F	CM	F	CM	F	CM	F	CM	F	CM	F
Rep	3	0,0215	1,30ns	0,0047	0,94ns	0,0016	1,98ns	0,0083	0,26ns	0,0034	0,33ns	0,00100	0,22ns
Trat	2	0,0270	1,67ns	0,0109	2,17ns	0,0104	12,81**	0,0317	0,98ns	0,0099	0,96ns	0,00138	0,29ns
Error	6	0,0160		0,005		0,0008		0,0324		0,0102		0,0047	
CV		9,85		5,55		7,74		12,39		8,48		16,32	
Media		1,31		1,27		0,36		1,45		1,19		0,42	

1. ANDEVA con datos transformados por raíz de $(x+0,5)$.

2. ANDEVA con datos transformados por arcosen de la raíz de $(x+0,05)$.

para la característica NBI, sería la gran influencia del ambiente durante la evaluación de los datos. Con relación al ambiente se sabe que en la EEC es usual la siembra de materiales de tierras altas, mientras que en la EEP se utiliza el arroz de riego, y podría suponerse que las razas de hongos que se desenvuelven en uno y otro sitio difieren entre sí. La diferencia entre las localidades EEC y EEP no pudieron ser estadísticamente comprobadas en este experimento pues los análisis no cumplieron con la premisa de homogeneidad de las varianzas. Con relación a la época de siembra se sabe que la característica NBI se ve más afectada que BI (Ou, 1985; Veillet y Filippi, 1993). Todas esas influencias ambientales podrían ser ocasionadas por las diferentes frecuencias o distribuciones de las razas del patógeno en la localidad y época.

Comparando los datos de la CNA-7 del experimento de 2001/02 con los datos obtenidos en 1997/98 para las familias $S_{0,2}$, se nota que en aquella época el promedio del ciclo 0 era de 5,02 (Badan *et al.*, 2000) mientras que el de ahora es mucho más bajo, lo que refuerza más la presunción de la influencia del ambiente.

Varios trabajos corroboran esta idea. Alvarez (1995), por ejemplo, justifica la falta de ganancia genética de la resistencia en la población con la

cual trabajaba por un supuesto cambio en la población del patógeno en la localidad donde se realizaban las evaluaciones de un año a otro; y Gatica (1993) en su población de maíz explica la alteración en la población del patógeno de un ambiente a otro.

Una conjetura más podría surgir en relación a la distribución de la enfermedad de manera desigual en el campo, lo que incrementaría el error experimental y dificultaría la demarcación entre los tratamientos.

Estrategia de selección. La selección truncada para plantas con grado debajo de 3, la misma estrategia utilizada en la población GC-91, ya había funcionado. En 1995 Guimarães *et al.* (1995) lograron incrementar la resistencia a Piricularia en términos de % R, desde 21,11 (C0) a 36,78 % (C1), por lo que era de esperarse que seguiría funcionando. De todos modos, una consulta a la bibliografía de la genética de BI y NBI podría arrojar alguna otra idea de cómo estaría funcionando esto o si puede estar presentándose algún tipo de influencia de una selección sobre la otra.

Selección simultánea de las características BI y NBI

La selección simultánea de varias características es una tarea bastante complicada. Por esa razón cuando se creó la población CNA-7 la idea era

primero garantizar la obtención de la resistencia, y solamente después seleccionar para otras características de interés pues la varianza de la población se mantendría a un nivel adecuado, o la población creada podría servir como base para nuevos cruzamientos.

A pesar de que la característica resistencia a *Piricularia* se plantea como única, las formas desiguales del ataque de la enfermedad se consideran como distintas fases: la resistencia a la hoja y la resistencia al cuello de la panícula (Veillet y Filippi, 1993), incluso en los varios programas de mejoramiento que siempre las seleccionan por separado.

En la literatura, hasta hoy, las correlaciones genéticas entre ellas no son muy claras. Bonmann *et al.* (1989) encontraron correlaciones positivas entre BI y NBI. En la misma población CNA-7, con la cual se trabaja en la actualidad, se encontró una asociación positiva entre las características BI y NBI (Badan *et al.*, 2001), lo que significó que la mayoría de las líneas $S_{0:1}$ evaluadas en el año 2000 resultarían resistentes tanto para BI como para NBI. Sin embargo, llama la atención el hecho de que utilizando la misma estrategia de selección se observó ganancia para la característica BI y no para NBI.

¿Sería posible pensar que las interacciones intra o

interalélicas podrían estar influyendo en estos resultados o se atribuiría apenas al efecto ambiental o de mala evaluación, como se describió anteriormente?

Veillet y Filippi (1993) al analizar la población CNA-IRAT 5, describieron que la heterosis positiva encontrada llevó a la conclusión de que los híbridos serían siempre más resistentes a *Piricularia* que las líneas puras, independientemente del método de selección utilizado. También explican que los efectos de dominancia no podrían explicar la heterosis para BI. Para NBI fue imposible explicar con claridad su efecto sólo con base en los componentes de resistencia en la hoja. Así que sería posible creer que la característica NBI tendría mayor influencia de la interacción de genes de dominancia, lo que proporcionaría mayor heterosis, mientras que para la característica BI, el efecto aditivo de los genes ya estaría siendo eficiente para que la selección recurrente fuera eficiente. Estas son discusiones que se deben aclarar en trabajos futuros.

Otro factor importante sería que el tipo de familia donde se están realizando las evaluaciones tal vez podría estar influyendo en el tipo de reacción observada. Cuando se evalúan familias $S_{0:1}$, estas presentan un número de homocigotos mucho mayor que las S_0 . ¿No podrían ser los heterocigotos los responsables por la resistencia a NBI?

Una suposición más es la de las interacciones interalélicas. La estrategia de selección utilizada posiblemente estaría eliminando alelos importantes pues ya se sabe que la selección para genes principales resulta en la eliminación de genes secundarios (Van der Plank, 1978). ¿Tendrían los genes secundarios una gran importancia para la característica NBI?

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

A través de los estudios realizados se verificó que la población CNA-7 presentó buenos incrementos en el grado de resistencia a BI a lo largo de dos ciclos de selección, al emplearse la estrategia de selección de plantas con grados de 0-3 bajo fuerte presión del inóculo en el campo. Sin embargo, lo mismo no ocurrió para la característica NBI. Se propone que se perfeccione la metodología de evaluación y del análisis de los datos de NBI. Una sugerencia sería el análisis de varianza cartográfico para intentar al máximo disminuir el efecto ambiental (Duarte, 2000), o buscar otras alternativas como las propuestas por Diaz-Lago *et al.* (2002).

Los bajos grados de incidencia de la enfermedad, tanto para BI como para NBI, indican que la elección de los progenitores ha sido bastante eficiente en el sentido de

incrementar la resistencia de la población. Con el grado existente, ya sería posible utilizar la población CNA-7 para la selección de otras características, así como fuente de nuevos progenitores para otros cruzamientos.

La diferencia de comportamiento de la población en distintas localidades, para la característica BI, indica que la durabilidad de la resistencia tal vez sea otro factor que deba ser asistido en la población.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a los Drs. Anne S. Prabhu y Rosana Figueroa por sus valiosos auxilios durante la conducción y los análisis del trabajo.

REFERENCIAS

- Amézquita, M. C.; Guimarães, E. P.; Correa-Victoria, F.; y Lema, G. 1996. Análise de dados categóricos. 2. Uso de um modelo logístico para avaliação de progresso genético para resistência à brusone. En: Pinheiro, B. S. y Guimarães, E. P. (eds.). Arroz na América Latina: Perspectivas para o incremento da produção e do potencial produtivo. Embrapa-CNPAP, Goiânia, Brasil. p. 66.
- Alvarez, R. 1995. Evaluación de dos ciclos de selección recurrente em una población de maíz resistente al buzano cogollero (*Sodoptera rugiperda*). Tesis, MSc. Universidad Central de Venezuela, Maracay, Venezuela. 74 p.

- Badan, A. C. C.; Geraldi, I. O.; Guimarães, E. P.; y Ospina-Rey, Y. 1998. Estimativa do tamanho efetivo de amostra ideal para caracterizar uma população de arroz para as características peso de panículas e peso de 100 grãos. *Genetics and Molecular Biology* 21:246.
- Badan, A. C. C.; Guimarães, E. P.; y Prabhu, A. S. 2000. Recurrent selection to develop blast resistant lines in rice. En: *Durable Resistance Symposium*. Ede Wageningen, Holanda. p. 143.
- Badan, A. C. C.; Guimarães, E. P.; Prabhu, A. S.; y Zimmermann, F. J. P. 2001. Associação entre brusone na folha e na panícula em arroz de terras altas. En: *Congresso de melhoramento genético de plantas, Goiânia, GO, Brasil*. Disponible: <http://www.sbmp.org.br/cbmp2001/area1/01Resumo50.htm> (Jan. 21, 2003).
- Baker, R. J. 1988. Tests for crossover genotype-environmental interactions. *Canadian J. of Plant Sci.* 68: 405-410.
- Bauske, E. M.; Kolb, F. L.; Hewings, A. D.; y Cisar, G. 1994. Modified recurrent selection for barley yellow dwarf virus tolerance in winter wheat. *Crop Sci.* 34(2):371-375.
- Bonmann, J. M.; Estrada, B. A.; y Bandong, J. M. 1989. Leaf and neckblast resistance in tropical lowland rice cultivars. *Plant Disease* 73(5):388-390.
- Box, G. E. P. y Cox, D. R. 1964. An analysis of transformations. *Journal of Royal Statistical Society* 26: 211-252.
- Breseghele, F.; Rangel, P. H.; y Morais, O. P. 1999. Ganho de produtividade pelo melhoramento genético do arroz irrigado no nordeste do Brasil. *Pesq. Agropec. Bras.* 34(3):399-407.
- Ceballos, H. (s.f.). *Genética cuantitativa y fitomejoramiento*. Universidad Nacional de Colombia, Palmira, Colombia. p. VII-21.
- Ceballos, H.; Deutsch, J. A.; y Gutiérrez, H. 1991. Recurrent selection for resistance to *Exserohilum turcicum* in eight subtropical maize populations. *Crop Sci.* 31:964-971.
- Châtel, M. y Guimarães, E. P. 1998. Catalogue registration to manage rice gene pool and population improvement. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia. 55 p.
- Correa-Victoria, F.; Guimarães, E. P.; y Martínez, C. P. 1997. Caracterización de la estructura genética y la virulencia de *Pyricularia grisea* Sacc. para desarrollar variedades resistentes al añublo del arroz. En: Guimarães, E. P. (ed.). *Selección recurrente en arroz*. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia. p. 203-215.
- Courtois, B.; Nelson, R.; y Roumen, E. 1997. Creación de un acervo genético para mejorar la resistencia parcial a la *Pyricularia* en el arroz de secano mediante selección recurrente. En: Guimarães, E. P. (ed.). *Selección recurrente en arroz*. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia. p. 189-202.

- Díaz-Lago, J. E.; Stuthman, D. D.; y Abadie, T. E. 2002. Recurrent selection for partial resistance to crown rust in oat. *Crop Sci.* 42:1475-1482.
- Duarte, J. B. 2000. Sobre o emprego e a análise estatística do delineamento em blocos aumentados no melhoramento genético vegetal. Tesis, PhD. Escola Superior Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, Brasil. 293 p.
- Falconer, D. S. 1968. Introduction to quantitative genetics. MacLohose and Company, Glasgow. 365 p.
- Filippi, M. C. y Prabhu, A. S. 1997. Selección recurrente para resistencia parcial a *Pyricularia grisea* Sacc. en arroz en Brasil. En: Guimarães, E. P. (ed.). Selección recurrente en arroz. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia. p. 177-187.
- Frohlich, G. y Rodewald, W. 1970. Enfermedades de las plantas tropicales. Disipación y Lucha, México. p. 151-153.
- García, P. J. 1995. Efectos de la selección recurrente de familia de hermanos completos sobre poblaciones de maíz (*Zea mays* L.). Tesis, M.Sc. Universidad Central de Venezuela, Maracay, Venezuela. 89 p.
- Gatica, H. 1993. Evaluación de cuatro ciclos de selección recurrente en una población de maíz resistente a "punta loca". Tesis, MSc. Universidad Central de Venezuela, Maracay, Venezuela. 58 p.
- Guimarães, E. P.; Correa-Victoria, F. J.; y Tulandé, E. 1995. CG-91. A broad-based rice synthetic population for blast (*Pyricularia grisea* Sacc.) resistance. *Revista Brasileira de Genética* 18(4):533-561.
- Guimarães, E. P. y Correa-Victoria, F. J. 1997. Utilización de la selección recurrente para desarrollar resistencia a *Pyricularia grisea* Sacc. en arroz. En: Guimarães, E. P. (ed.). Selección recurrente en arroz. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia. p. 165-175.
- Hartley, H. O. 1950. The maximum F-ratio as a short-cut test for heterogeneity of variance. *Biometrika* 37:308-312.
- IRRI. 1988. Standard Evaluation system for rice. 3rd. ed. Los Baños, Filipinas. 54 p.
- Laurentin, H. E. 1996. Evaluación del efecto de dos ciclos de selección recurrente sobre el rendimiento en una población de ajonjolí (*Sesamum indicum* L.). Tesis, MSc. Universidad Central de Venezuela, Maracay, Venezuela. 81 p.
- Leung, H. y Shi, Z. 1994. Genetic Regulation of sporulation in the rice blast fungus. En: Zeigler, R. S.; Leong, S. A.; y Teng, P. S. Rice blast disease. International Rice Research Institute (IRRI), Los Baños, Philippines. p. 35-50.
- Morais, O. P. y Rangel, P. H. N. 1997. Melhoramento de arroz no Brasil. En: Abreu, A. F. B.; Gonçalves, F. M. A.; Marques Jr., O. G.; y Ribeiro, P. H. E. (eds.). Simpósio sobre atualização em genética e melhoramento de plantas. Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras, Brasil. p. 148-166.

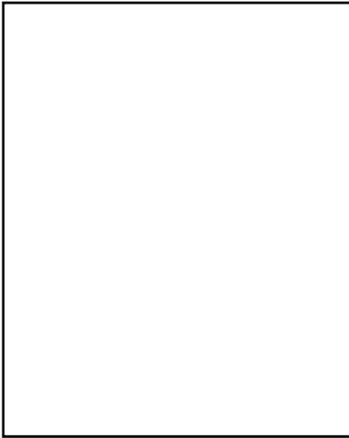
- Morais, O. P.; Zimmermann, F. J. P.; y Rangel, P. H. N. 2000. Evaluación de ganancias observadas en selección recurrente. En: Guimarães, E. P. (ed.). Avances en el mejoramiento poblacional en arroz. Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antonio de Goiás, Goiás, Brasil. p. 21-35.
- Notteghen, J. L. 1981. Cooperative experiment on horizontal resistance to rice blast. En: International Rice Research Institute (IRRI). Blast and upland rice: report and recommendations from the meeting for international collaboration in upland rice improvement. Los Baños, Filipinas. p. 43-51.
- Ou, S. H. 1985. Rice disease. 2nd. ed. CAB International Wallingford Oxon Press, UK. 380p.
- Prabhu, A. S.; Filippi, M. C.; y Ribeiro, A. S. 1999. Doenças e seu controle. En: Vieira, N. R. A.; Santos, A. B.; Sant'ana, E. P. (eds.). A cultura do arroz no Brasil. Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás. p. 262-307.
- Prabhu, A. S.; Guimarães, C. M.; y Berni, R. F. 2001. Influência da época de plantio no controle da brusone em folhas de arroz de terras altas. Embrapa Arroz e Feijão. Pesquisa em Foco, n. 56. Disponible: <http://www.cnpaf.embrapa.br/negocios/emfoco/pqfoc56.htm> (Dic. 29, 2002).
- SAS. 2000. User's guide, version 8. SAS Institute, Cary, NC.
- Salter, R.; Miller-Garvin, J. E.; y Viana, D. R. 1994. Breeding for resistance to alfalfa root rot caused by *Fusarium* species. Crop Sci. 34(5):1213-1217.
- Santos, P. G.; Soares, P. C.; Soares, A. A.; Morais, O. P.; y Cornélio, V. M. O. 1999. Avaliação do progresso genético obtido em 22 anos no melhoramento do arroz irrigado em Minas Gerais. Pesq. Agropec. Bras. 34(10):1889-1896.
- Soares, A. A.; Santos P. G.; Morais, O. P.; Soares, P. C.; Reis, M. S.; y Souza, M. D. 1999. Progreso genético obtido pelo melhoramento do arroz de sequeiro em 21 anos de pesquisa em Minas Gerais. Pesq. Agropec. Bras. 34(3):415-424.
- Van der Plank. 1978. Genetic and molecular basis of plant pathogenesis. Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag. 167 p.
- Veillet, S. y Filippi, M. C. 1993. Combined genetic analysis of partial blast resistance in upland rice population and recurrent selection for line and hybrid values. En: Veillet, S. Organization of the genetic variability and recurrent selection in rice (*Oryza sativa* L.). Tesis, PhD. L'Institut National Agronomique, Paris, Francia. 125 p.
- Vencovsky, R.; Morais, A. R.; Garcia, J. C.; y Teixeira, N. M. 1986. Progreso genético em vinte anos de melhoramento do milho no Brasil. Congresso nacional de milho e sorgo. 16. Belo Horizonte. Anais... Sete Lagoas. EMBRAPA-CNPMS. p. 300-306.
- Yamaguchi, T. 1970. Forecasting techniques of rice blast. Jap. Agric. Res. Q. 5:26-30.
- Yap, I. 2000. Disponible: <http://www.ascus.plbr.cornell.edu/blastdb/about/html/> (Abril 8, 2001).

Capítulo 2

Marcadores moleculares como herramientas para el mejoramiento poblacional en arroz

RAMIS, C.; GUIMARÃES, E.P.; BADAN, A.C.C.; DIAZ, A.; GAMBOA, C.E. (2003). **Marcadores moleculares como herramientas para el mejoramiento poblacional en arroz**. In: GUIMARÃES, E.P. (Ed.). **Mejoramiento poblacional: una alternativa para explorar los recursos genéticos del arroz en América Latina**. Cali: Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cap. 5. p.77 a 98.

CAPÍTULO 5



Marcadores Moleculares como Herramientas para el Mejoramiento Poblacional en Arroz

Catalina Ramis

Catalina Ramis¹

Ana Claudia de Carvalho Badan²

Antonio Díaz³

Carlos Eduardo Gamboa⁴

1. Profesor Facultad de Agronomía. Universidad Central de Venezuela.
Correo electrónico: dasilram@telcel.net.ve

2. Estudiante de doctorado en el Departamento de Genética y Biología Molecular de la
"Universidade Estadual de Campinas" (UNICAMP), Campinas, São Paulo, Brasil.
Correo electrónico: anaclaudia@mpc.com.br

3. Profesor Facultad de Agronomía. Universidad Central de Venezuela.
Correo electrónico: adiape@cantv.net

4. Investigador de la Fundación para la Investigación Agrícola Danac. Apdo. Postal 182.
San Felipe, estado Yaracuy, Venezuela.
Correo electrónico: cegamboav@hotmail.com; cgamboa@danac.org.ve

Contenido

Resumen

Abstract

Introducción

¿Era amplia la base genética de la población PFD-1?

¿Se mantuvo la variabilidad genética entre los ciclos 0 y 1?

- Variación en la riqueza alélica
- Variación en la uniformidad alélica de los ciclos

¿El uso de la androesterilidad aseguró la libre recombinación de los alelos, dentro y entre genes?

- Combinación al azar de alelos de un locus dado
- Recombinación entre genes

Consideraciones finales

Referencias

RESUMEN

El éxito de un programa de mejoramiento poblacional en arroz requiere del cumplimiento de algunas condiciones como amplia variabilidad genética inicial; mantenimiento de esa variabilidad en los diferentes ciclos del programa de selección recurrente y apareamiento al azar en la etapa de recombinación. Este estudio se realizó con el propósito de estudiar el cumplimiento de esas condiciones con el uso de marcadores moleculares (isoenzimas - IDH, PGI, ACP, β -est, y diez microsatélites) y plantas de la población PFD-1 ciclos 0 y 1. Los resultados obtenidos con isoenzimas comprobaron la amplia variabilidad genética de la población PFD-1 ciclo 0 que, en una gran proporción resultó diferente a la hallada en cuatro cultivares de arroz de Venezuela. El análisis de las frecuencias alélicas de diez loci microsatélites en los ciclos 0 y 1 permitió corroborar el mantenimiento de la diversidad genética entre ambos ciclos. Al estudiar el cumplimiento de la condición de equilibrio de Hardy-Weinberg para cada loci y ciclo, se encontró una proporción de heterocigotos significativamente menor con respecto a lo esperado en ambos ciclos y en consecuencia un valor de endocría mayor que 0. El análisis de desequilibrio de ligamiento indicó la recombinación al azar entre genes. Los valores de endocría encontrados parecen indicar la ocurrencia de cierto grado de autogamia que debe estudiarse con más detalle para tomar las correcciones pertinentes.

MOLECULAR MARKERS AS TOOLS FOR POPULATION IMPROVEMENT IN RICE

ABSTRACT

To run a successful population improvement programme for rice, certain conditions must be fulfilled, such as an initially broad genetic variability, the maintenance of this variability through various cycles of the recurrent selection programme and random mating in the recombination stage. To evaluate the fulfilment of these conditions, a study was carried out with molecular markers (isoenzymes IDH, PGI, ACP and β -est, and 10 microsatellites) and plants from the PFD-1 population, cycles 0 and 1. The results obtained with the isoenzymes proved broad genetic variability for PFD-1 cycle 0, with a large proportion of the variability differing from that found in four Venezuelan rice cultivars used as checks. The analysis of allelic frequencies, using the microsatellites, in cycles 0 and 1 showed maintenance of genetic diversity through the two cycles. On evaluating the fulfilment of the Hardy-Weinberg equilibrium for each locus and cycle, we found, for both cycles, a significantly minor proportion of heterozygotes than was expected and consequently an inbreeding value of more than 0. Analysing the linkage disequilibrium showed random recombination among genes. The inbreeding values found apparently indicated the occurrence of a certain degree of autogamy, which must be studied in more detail to correct accordingly.

INTRODUCCIÓN

La selección recurrente es un procedimiento cíclico y gradual cuyo objetivo es aumentar la frecuencia de alelos favorables dentro de una población, manteniendo una alta variabilidad de manera que permita al fitomejorador extraer plantas promisorias en los diferentes ciclos del programa. El éxito de este tipo de programa depende de varios factores:

- Una variabilidad inicial que permita el avance deseado.
- Evaluación de los caracteres de interés que permita discernir el efecto genotípico para así identificar los superiores.
- Ocurrencia de cruzamientos al azar orientados hacia la libre combinación de alelos dentro de genes (equilibrio de Hardy-Weinberg) y entre genes (equilibrio de ligamiento).

De esta manera se espera:

- Aumentar la frecuencia de genotipos con los caracteres deseables hacia los cuales se ha dirigido la selección, en el caso de que la selección sea eficiente.
- Mantener una alta variabilidad para el resto de los caracteres, permitiendo el uso de estas poblaciones como base para la obtención de nuevos genotipos. Por esto se requiere que la población básica sea de amplia base genética.

- Brindar la oportunidad de que aparezcan nuevas combinaciones que enriquezcan la posibilidad de selección en el tiempo, lo cual se logra en la etapa de recombinación cuando debe asegurarse una condición de panmixia.

Este tipo de programa de mejoramiento se diseñó en un principio para el maíz, donde la polinización cruzada está asegurada por el mecanismo de floración. Como para plantas autóгамas, como arroz y soya, la polinización cruzada debía realizarse a mano, la ejecución de este tipo de programa se dificultaba.

En el caso del arroz la incorporación en las poblaciones básicas de un gen de androesterilidad ha facilitado la aplicación de los esquemas de selección recurrente en los programas de mejoramiento poblacional. De esta manera, es posible asegurar la polinización cruzada al cosechar en la etapa de recombinación únicamente las plantas androestériles que habrían recibido el polen de plantas fértiles vecinas para formar las semillas.

Sin embargo, ante lo novedoso de estos esquemas aplicados a un cultivo autóгамo como el arroz, surgen inquietudes en quienes lo desarrollan en cuanto al buen desenvolvimiento del mismo y, en consecuencia, en cuanto al éxito futuro como fuente

potencial para la obtención de cultivares mejorados.

Con el propósito de brindar respuestas a los fitomejoradores en cuanto al cumplimiento de los factores de éxito de los programas conducidos en América Latina, en el Centro de Investigaciones en Biotecnología Agrícola (CIBA)-Instituto de Genética de la Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela, en Maracay, se está realizando una serie de estudios con herramientas biotecnológicas como son los marcadores moleculares tipo isoenzimas y microsátélites utilizando como población modelo la PFD-1. El objetivo de este estudio es responder a las siguientes inquietudes:

1. ¿Era amplia la base genética de la población PFD-1?
2. ¿Se mantuvo la variabilidad genética entre los ciclos 0 y 1?
3. ¿El uso de la androesterilidad aseguró la libre recombinación de los alelos, dentro y entre genes?

¿ERA AMPLIA LA BASE GENÉTICA DE LA POBLACIÓN PFD-1?

Para este estudio se utilizaron 300 plantas del ciclo 0 de la población PFD-1 que se sembraron en bandejas en condiciones de umbráculo. A los 8 días después de la siembra se tomó una muestra de tejido foliar de cada planta para la determinación de patrones

electroforéticos de las isoenzimas β -esterasa (β -est) y fosfatasa ácida (ACP) en geles de poliacrilamida al 10% (Velásquez, 2001). A los 18 días después de la siembra se tomó tejido foliar de cada planta para la determinación de patrones electroforéticos en geles de almidón al 12% de las enzimas fosfoglucoisomerasa (PGI) e isocitrato deshidrogenasa (IDH), siguiendo la metodología de Rodríguez (2001) y Ortiz *et al.* (2002).

En el Cuadro 1 se presentan los distintos patrones observados para cada sistema isoenzimático. Para las enzimas IDH, PGI y ACP se observó una zona de actividad y en el caso de β -est, se observaron dos, que se identificaron como β -est I y β -est II.

Dada la imposibilidad de asignar un genotipo a cada planta para cada isoenzima —por el desconocimiento del control genético de las mismas— el estudio de diversidad se realizó sobre la base de los patrones electroforéticos de cada isoenzima. Para ello se identificaron los diferentes patrones de bandas de cada sistema isoenzimático y por conteo directo se obtuvieron sus frecuencias. Con ellas se estimaron los índices de diversidad de Shannon y Weaver (H), el de uniformidad (E) y el complemento del índice de Simpson (D) (Sneath y Sokal, 1973). El índice de Shannon y

Weaver (H) es una medida del grado de incertidumbre para encontrar un patrón electroforético dado para un individuo cualquiera dentro de la población, y está afectado tanto por el número de patrones como por la frecuencia relativa de los mismos. Su cálculo se realiza según la fórmula $H = - \sum p_i \ln (p_i)$, donde "p_i" representa la frecuencia del i-ésimo patrón electroforético. Los valores mayores de H se esperan en poblaciones con más patrones, es decir con mayor riqueza y con frecuencias semejantes de cada patrón, o con mayor uniformidad de sus frecuencias.

Por otra parte, el índice (E) es una medida de uniformidad de la frecuencia de los distintos patrones y representa la proporción de diversidad observada (H) con respecto al máximo valor teórico. Se calcula con base al índice de Shannon y Weaver (H) como $E = H/\ln S$, donde S corresponde al número de patrones por sistema isoenzimático. De esta manera E tenderá al valor máximo de 1 cuando las frecuencias de los patrones observados sean más similares. El complemento del índice de Simpson (D) estima la probabilidad de encontrar dos patrones distintos en la población y se calcula por la fórmula: $D = 1 - \sum p_i^2$, donde "p_i" es la frecuencia del i-ésimo patrón electroforético. El índice D será mayor cuando las frecuencias de

los patrones sean similares; por el contrario, a medida que un patrón electroforético predomine, el índice D irá disminuyendo (Sneath y Sokal, 1973).

En el Cuadro 2 se presentan los valores obtenidos de H, E y D para cada sistema isoenzimático y su valor promedio. Los valores más altos del índice H, permitieron observar que los sistemas isoenzimáticos más diversos fueron β-est II y PGI. Los resultados en cuanto al índice de uniformidad E indicaron que esta población presenta cerca de 91% (0,905) de la variabilidad teórica máxima para el número de patrones observados, que ocurriría si todos los patrones presentaran frecuencias similares. Esto, a su vez, indica que ninguno de estos patrones predomina en la población, lo cual es importante pues disminuye el peligro de derivación genética y permite mantener la variabilidad en el programa de mejoramiento. Con base en el valor promedio de D en una comparación al azar entre dos plantas, hay una probabilidad de 65,9% de encontrar patrones distintos. De esta manera, considerando estos índices podemos responder nuestra primera pregunta afirmando que la población PFD-1 ciclo 0 presenta una alta diversidad genética, evidenciada por la cantidad de genotipos distintos presentes y con frecuencias similares sin el predominio de alguno de ellos.

Cuadro 1. Diferentes patrones (P_i) electroforéticos observados para las isoenzimas isocitrato deshidrogenasa (IDH), fosfoglucoisomerasa (PGI), β -esterasa (β -est I y β -est II) y fosfatasa ácida (ACP) en la población de arroz PFD-1, ciclo 0, y cuatro cultivares comerciales de arroz Araure 4, Cimarrón, Foniaiap 1 y Palmar.

Isoenzima	PFD-1			Cultivares comerciales			
	P_1	P_2	P_3	Araure 4	Cimarrón	Foniaiap 1	Palmar
IDH							

Por otra parte, con el propósito de inferir si la variabilidad presente en la población PFD-1 era diferente a la de los cultivares tradicionales del país, se determinaron los patrones electroforéticos de las mismas enzimas de los cultivares comerciales Araure 4, Cimarrón, Fonaiaip 1 y Palmar comparándolos con 136 individuos del ciclo 0 de la población PFD-1. Con estos datos se elaboró una matriz de distancias genéticas utilizando el complemento del Índice de Apareamiento Simple (1 - SM), donde SM es el número de patrones coincidentes entre el total. A partir de la matriz se construyó un dendrograma (Figura 1) por el método de agrupamiento UPGMA (Sneath y Sokal, 1973). En éste se observó la presencia de ocho grandes grupos, en dos de los cuales se encontraron las variedades comerciales: en el grupo II las variedades Araure 4 y

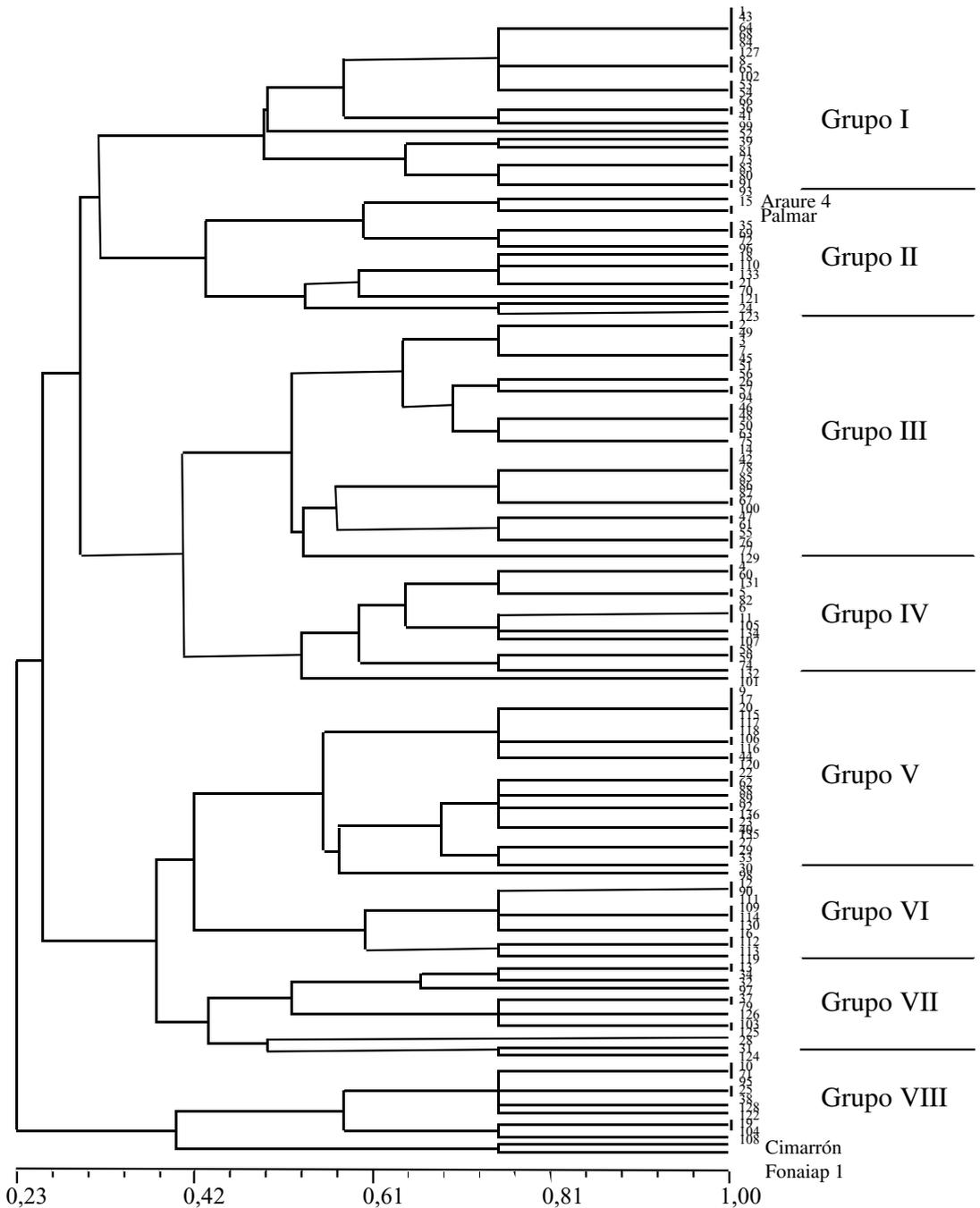
Palmar y en el grupo VIII, Cimarrón y Fonaiaip 1. Este último grupo se caracterizó por ser muy diferente a la gran mayoría de la muestra. El hecho de que se detectaron seis grupos diferentes a las variedades comerciales sugiere que existe una nueva variabilidad en esta población básica. La variabilidad de la población PFD-1 también incluye la existente en las variedades comerciales pues algunas plantas de la PFD-1 se clasificaron dentro de los grupos II y VIII, donde se encuentran las cuatro variedades comerciales utilizadas en los análisis.

Otro aspecto importante es la presencia no sólo de variabilidad diferente, sino también de nuevas combinaciones entre los distintos sistemas isoenzimáticos. Para evaluar este punto se compararon entre sí las plantas de la población PFD-1 en cuanto a la combinación de los patrones electroforéticos de los cinco

Cuadro 2. Índices de Shannon-Weaver (H), Uniformidad (E) y complemento del índice de Simpson (D) en cinco sistemas isoenzimáticos de la población de arroz PFD-1 ciclo 0.

Enzima	(H)	(E)	(D)
ACP	0,469	0,985	0,656
IDH	0,465	0,976	0,649
PGI	0,538	0,894	0,678
β -est II	0,624	0,739	0,694
β -est I	0,445	0,933	0,617
Promedio	0,508	0,905	0,659

Figura 1. Dendrograma construido con base en estimaciones de similitud genética por el coeficiente de Jaccard y cálculo de agrupamiento por el método UPGMA, de 136 plantas del ciclo 0 de Selección recurrente de la población PFD-1 y 4 variedades venezolanas de arroz (Araure 4, Palmar, Cimarrón y Fonaiaip 1).



sistemas isoenzimáticos, como se muestra en el Cuadro 3. Por observación directa se obtuvieron 102 combinaciones distintas; de éstas, 75 correspondieron a plantas que presentaron combinaciones únicas, lo que corrobora la amplia variabilidad genética de la población PFD-1 ciclo 0.

Cuando en esta comparación se incluyeron las combinaciones de patrones de las variedades comerciales, en la población se encontraron combinaciones distintas a las de éstas. Esto pudiera ser consecuencia de la presencia de alelos nuevos y de la recombinación producto de la etapa de cruzamientos en la formación de la población básica.

Con base en los resultados obtenidos se pudo concluir que la población PFD-1 ciclo 0 muestra una amplia variabilidad genética que podrá ser aprovechada en los programas de mejoramiento. Más aún, esta variabilidad incluye en parte la de las variedades comerciales y en mayor proporción una distinta a ella.

¿SE MANTUVO LA VARIABILIDAD GENÉTICA ENTRE LOS CICLOS 0 Y 1?

La segunda inquietud y requerimiento para el éxito en el tiempo de un programa de selección recurrente es el mantenimiento de la variabilidad

con el pasar de los ciclos de recurrencia. Para estudiar este aspecto se debía determinar:

- La variación en la riqueza alélica. Esto incluiría el número de alelos diferentes para varios loci, para dos o más ciclos de una población del programa de selección recurrente y detectar la posible desaparición de alelos.
- La variación en la uniformidad alélica de los ciclos considerando para ello la frecuencia relativa de cada alelo para dos o más ciclos de una población del programa de selección recurrente.

Con tales objetivos se decidió establecer el estudio utilizando como herramienta biotecnológica marcadores microsatélites (SSRs) conocidos en arroz (www.gramene.org) con la idea de tener la información de un SSR por par de cromosomas. De un total de 27 SSRs probados se seleccionaron diez SSRs de buena resolución. Esos SSRs son: RM102, RM268, RM143, RM185, RM111, RM296, RM228, RM224, RM235 y RM17 localizados en los cromosomas 1, 2, 3, 4, 6, 9, 10, 11 y los dos últimos en el 12, respectivamente.

Como material vegetal se utilizaron los ciclos 0 y 1 de la población PFD-1, considerando una muestra de 96 plantas por

Cuadro 3. Patrones isoenzimáticos encontrados en 136 individuos del ciclo 0 de la población PFD-1 del programa de selección recurrente en arroz.

Individuo	Patron (1)						
1	11222	38	21141*	75	23323*	112	32311
2	11222	39	21231	76	23333*	113	32331*
3	11223*	40	21231	77	23341*	114	33121
4	11242*	41	21242*	78	23422*	115	33121
5	12131*	42	21253*	79	23442*	116	33122*
6	12141*	43	21273*	80	31121	117	33162*
7	12211*	44	21323*	81	31121	118	33221
8	12212	45	21422	82	31122	119	33221
9	12212	46	21422	83	31122	120	33122*
10	12221*	47	22122	84	31122	121	33162*
11	12222	48	22122	85	31131*	122	33221
12	12222	49	22122	86	31133*	123	33221
13	12232*	50	22131*	87	31142*	124	33222*
14	12322*	51	22132*	88	31171*	125	33223
15	12342*	52	22133*	89	31222*	126	33223
16	12421*	53	22141*	90	31232*	127	33231
17	12422*	54	22161*	91	31242*	128	33231
18	12432*	55	22163*	92	31462*	129	33232
19	13121*	56	22212*	93	32122	130	33232
20	13212*	57	22221*	94	32122	131	33242*
21	13221	58	22222*	95	32122	132	33263*
22	13221	59	22223*	96	32123	133	33321*
23	13231*	60	22233*	97	32123	134	33422*
24	13232	61	22252*	98	32132*	135	33431*
25	13232	62	22322*	99	32133	136	33442*
26	13242*	63	22433*	100	32133	Araure 4	21373
27	13321*	64	23132*	101	32152	Cimarrón	23144
28	13322	65	23132*	102	32152	Foaniap 1	21144
29	13322	66	23221*	103	32223*	Palmar	21373
30	13323	67	23222	104	32232		
31	13323	68	23222	105	32232		
32	13331*	69	23222	106	32233*		
33	13442*	70	23232	107	32241*		
34	21121*	71	23232	108	32243*		
35	21123*	72	23321*	109	32262		
36	21131*	73	23322	110	32262		
37	21132*	74	23322	111	32311		

1. El primer número corresponde a ACP, el segundo a IDH, el tercero a PGI, el cuarto a β -est II y el quinto a β -est I. El asterisco indica combinaciones únicas.

ciclo. Para ello se sembraron las semillas en bandejas con tierra y las plántulas se conservaron en condiciones de umbráculo y en saturación permanente.

A partir de los 21 días de la siembra se tomó tejido foliar de cada planta para la purificación del ADN genómico siguiendo el protocolo de CTAB (por inglés “Cationic hexadecyl trimethyl ammonium bromide”) descrito por Ferreira y Gratapaglia (1998). Después de verificar la calidad del ADN se procedió a amplificar específicamente cada SSR siguiendo el protocolo de PCR específico para cada microsatélite (Brondani *et al.*, 2001). Luego se separaron los SSRs electroforéticamente en geles de poliacrilamida al 6%, y las bandas se revelaron siguiendo la metodología de nitrato de plata (Panaud *et al.*, 1996).

Variación en la riqueza alélica

Para medir la riqueza alélica o la diversidad cualitativa presente en cada ciclo se contabilizó el número de alelos diferentes para cada SSR en los ciclos 0 y 1 de la población PFD-1 (Cuadro 4). En promedio se obtuvieron 5,2 alelos/locus en el ciclo 0 y 4,5 en el ciclo 1. En el mismo Cuadro se incluyó el número de alelos obtenido en un muestra de 14 variedades de arroz representativas del germoplasma del arroz cultivado para los SSRs utilizados en el presente trabajo (Temnykh *et al.*, 2000). La variabilidad similar o hasta mayor en la población PFD-1 concuerda con los resultados obtenidos con isoenzimas que indica que la población bajo estudio presenta una amplia variabilidad genética

Cuadro 4. Número de alelos en cada SSR analizado para los ciclos 0 y 1 de la población PFD-1, y comparación con los resultados obtenidos por Temnykh *et al.* (2000).

Cromosoma # (SSR)-locus	C0	C1	Temnykh <i>et al.</i> (2000)
1 (RM102) – A	3	2	3
2 (RM263) – B	8	5	5
3 (RM143) – C	5	3	3
4 (RM185) – D	3	3	2
6 (RM111) – E	5	4	3
9 (RM296) – F	4	4	2
10 (RM228) - G	7	8	7
11 (RM224) - H	8	7	9
12 (RM235) – I	6	6	6
12 (RM17) – J	3	3	4
Total	52	45	44
Alelos/locus	5,2	4,5	4,4

disponible para continuar el programa de mejoramiento. Por otra parte, estos resultados también son comparables a los encontrados en dos poblaciones de selección recurrente en maíz, donde se encontró un promedio de 3,9 y 3,7 alelos/locus utilizando 30 marcadores moleculares (Pinto, 2001).

De otro lado, en cuanto a la desaparición de alelos entre ciclos se observó una disminución de alelos entre los ciclos 0 y 1 de un 13,5%. La importancia de este valor dependerá de las frecuencias en el ciclo 0 de los alelos perdidos; si tal frecuencia era muy baja era muy probable que se perdieran independientemente del método de selección aplicado.

Variación en la uniformidad alélica de los ciclos

Otra manera de determinar si la variabilidad se mantuvo ciclo a ciclo sería a través de la frecuencia relativa y de las pruebas exactas de diferenciación génica y genotípica (Raymond y Rousset, 1995) para cada locus SSR en los ciclos 0 y 1 de la población PFD-1. Los resultados, resumidos en el Cuadro 5, muestran diferencias entre los dos ciclos en ocho de los diez loci para diferenciación génica, y en cinco para diferenciación genotípica. La prueba global evidenció diferencias altamente significativas para ambas pruebas.

El análisis detallado de las frecuencias alélicas permitió observar que en algunos casos, cuando la frecuencia alélica era muy baja en el ciclo 0, no se presentó el alelo en el ciclo 1, específicamente los alelos A3, B6, B7, B8, C4, C5, E5 y H8. Por el contrario, en el caso del alelo G8 no se observó en el ciclo 0, indicando que el tamaño de la muestra no fue lo suficientemente grande para detectar su presencia en el ciclo 0. Esto corrobora lo que se menciona en el punto anterior: cuando algún alelo tiene una baja frecuencia en la población inicial, la probabilidad de que desaparezca en la siguiente generación es muy alta.

Por otra parte, es de esperarse que el proceso de selección favorezca la presencia de algunos alelos en detrimento de otros. De esta manera algunas frecuencias alélicas disminuyen de un ciclo a otro, mientras otras del mismo locus aumentan. Tal es el caso de los alelos B1 y B4; E1 y E3; G6 y G8. Sin embargo, lo importante para este tipo de programa de mejoramiento es que la variabilidad genética se mantenga en un nivel lo suficientemente alto para permitir el avance con la selección. Esta condición se está cumpliendo. Los índices de diversidad de Nei (Nei, 1978) calculados fueron de 0,6045 ($IC_{(95\%)} = 0,4771$ a $0,7319$) para el ciclo 0 y de $0,5727$

(I.C._(95%) = 0,4049 a 0,7435) para el ciclo 1, valores estadísticamente iguales, tal como lo indican los intervalos de confianza respectivos.

De esta manera, estos resultados permitieron evidenciar una amplia variabilidad genética mantenida entre los ciclos 0 y 1 de la población PFD-1. Eso responde positivamente nuestra segunda pregunta: se mantuvo la variabilidad genética después de un ciclo de selección recurrente.

¿EL USO DE LA ANDROESTERILIDAD ASEGURÓ LA LIBRE RECOMBINACIÓN DE LOS ALELOS, DENTRO Y ENTRE GENES?

La etapa de recombinación en un programa de selección recurrente exige el cumplimiento de la condición de panmixia. A través de ella se garantiza la libre combinación de alelos de un locus dado, y la recombinación entre genes para establecer los requisitos de una población en equilibrio (Falconer, 1989).

Combinación al azar de alelos de un locus dado

En la condición de panmixia, y según la ley de Hardy-Weinberg para un locus con dos alelos, A y a, podrían hallarse los tres posibles genotipos AA, Aa y aa. Si las frecuencias de estos alelos son respectivamente p y q, las frecuencias de los posibles genotipos en la población estarían dadas por el desarrollo del binomio $(p + q)^2$ como sigue:

$p^2 (AA) + 2pq (Aa) + q^2 (aa) = 1$ (Falconer, 1989). De esta manera, la proporción de heterocigotas "H" será $2pq$, o también, 1 menos la proporción de homocigotas, es decir: $H = 1 - (p^2 + q^2)$. En el caso de alelos múltiples, sin embargo, como es el caso de microsatélites, la proporción de heterocigotas será: $H = 1 - \sum p_i^2$ donde "p_i" representa la frecuencia relativa de cada alelo.

En el caso de los programas de selección recurrente en arroz, se espera que la cosecha de sólo las plantas androestériles en la etapa de recombinación logre inducir la condición de panmixia. Si por alguna razón eso no fuera el caso, como el arroz es una planta autógama, se observaría el aumento de los genotipos homocigotos a expensas de los heterocigotos. Para evaluar el cumplimiento de esta premisa se utilizó el coeficiente de endocria "f" de Wright (Hartl, 1987), que evalúa la disminución de la frecuencia relativa de heterocigotas con respecto a la que se esperaría en panmixia. Con la fórmula $f = (H_e - H_o)/H_e$, donde la proporción de heterocigotas esperados (H_e) se calcula con base en las frecuencias alélicas, la proporción de heterocigotas observados (H_o), se determina por conteo directo de los heterocigotas en la población.

Si la proporción de H_o fuese igual a los H_e el coeficiente "f" tomaría el valor esperado en panmixia de 0, con lo que se

Cuadro 5. Frecuencias alélicas (p_i) de cada alelo y prueba exacta de diferenciación génica y genotípica para cada locus microsatélite (SSR) entre los ciclos 0 y 1 de la población PFD-1.

SSR	Cromosoma	Alelo	Ciclo 0	Ciclo 1	Prueba de diferenciación ¹	
			f ₁	f ₁	génica	genotípica
RM102	(1)	A1	0,0978	0,0647	*	ns
		A2	0,8750	0,9352		
		A3	0,0271	0,0000		
RM263	(2)	B1	0,0256	0,1333	**	**
		B2	0,0512	0,1000		
		B3	0,859	0,3000		
		B4	0,3974	0,0557		
		B5	0,2948	0,3111		
		B6	0,0128	0,0000		
		B7	0,0192	0,0000		
		B8	0,0128	0,0000		
RM143	(3)	C1	0,0577	0,0446	**	**
		C2	0,7692	0,9375		
		C3	0,0961	0,0179		
		C4	0,0705	0,0000		
		C5	0,0064	0,0000		
RM185	(4)	D1	0,1547	0,1444	*	ns
		D2	0,7559	0,8277		
		D3	0,0893	0,0277		
RM111	(6)	E1	0,3188	0,1020	**	**
		E2	0,2898	0,3877		
		E3	0,1232	0,3367		
		E4	0,2464	0,1735		
		E5	0,0217	0,0000		
RM296	(9)	F1	0,1053	0,1000	ns	ns
		F2	0,1644	0,2765		
		F3	0,2171	0,1588		
		F4	0,5131	0,4647		

(Continúa en la página siguiente)

(Viene de la página anterior)

Cuadro 5. Frecuencias alélicas (p_i) de cada alelo y prueba exacta de diferenciación génica y genotípica para cada locus microsatélite (SSR) entre los ciclos 0 y 1 de la población PFD-1.

SSR	Cromosoma	Alelo	Ciclo 0	Ciclo 1	Prueba de diferenciación ¹	
			f1	f1	génica	genotípica
RM228	(10)	G1	0,1279	0,1410		
		G2	0,0639	0,1026		
		G3	0,0232	0,0641		
		G4	0,0930	0,0641		
		G5	0,1919	0,1025		
		G6	0,4884	0,1666		
		G7	0,0120	0,0513		
		G8	0,0000	0,3077		
					**	**
RM224	(11)	H1	0,0291	0,0500		
		H2	0,0523	0,0200		
		H3	0,1977	0,2333		
		H4	0,1860	0,1666		
		H5	0,2035	0,1666		
		H6	0,0581	0,1166		
		H7	0,2267	0,0666		
		H8	0,0465	0,0000		
					**	*
RM235	(12)	I1	0,0937	0,1948		
		I2	0,2500	0,3312		
		I3	0,2187	0,1169		
		I4	0,1094	0,1558		
		I5	0,1094	0,1104		
		I6	0,2187	0,0909		
					*	ns
RM17	(12)	J1	0,3563	0,3224		
		J2	0,0977	0,1118		
		J3	0,5460	0,5658		
					ns	ns
Prueba Global					**	**
Índice de Diversidad de Nei			0,6045	0,5742		
Intervalo de Confianza (IC95%)			0,4771	0,4099		
			a	a		
			0,7319	0,7435		

1. ns: valor no significativo; * significativo al 5% y ** significativo al 1%.

concluye que la población está en equilibrio. El valor de “f” puede tomar valores entre -1 y $+1$. Si ocurriera un exceso de heterocigotos, el valor de “f” sería menor que 0, y si hubiera un déficit de heterocigotos, el valor de “f” sería mayor que 0. En estos dos últimos casos se podría asegurar ausencia de cruzamientos al azar.

De lo expuesto anteriormente se desprende que para determinar el coeficiente de endocria se requiere de una metodología que permita determinar las frecuencias alélicas para un gen dado e identificar los genotipos heterocigotas y homocigotas. Los marcadores SSRs ofrecen esa posibilidad.

Con la finalidad de estudiar si el esquema seguido en la etapa de recombinación permite los cruzamientos al azar entre las plantas de la población PFD-1, con los resultados obtenidos en el punto anterior se estimó la frecuencia alélica de cada alelo para cada SSR de los ciclos 0 y 1 y la frecuencia de heterocigotas observado para cada locus.

En los resultados (Cuadro 6) se observa que únicamente en el RM17 para el ciclo 1, el valor de H_o es estadísticamente igual al del H_e ; mientras que, el valor de “f” es menor y próximo al valor esperado de 0.

Para el resto de los loci SSRs se observó menos heterocigotas que las esperados.

En el ciclo 0 el promedio de la proporción de heterocigotas observados fue de 0,3621, valor diferente al promedio de la proporción de heterocigotas esperados (0,6056).

En el ciclo 1 el valor de H_o fue un poco mayor (0,3873) al del ciclo 0 pero todavía menor al valor H_e (0,5727). Las razones por las cuales ambos valores de H_o se alejan de H_e persisten en ambos ciclos.

Los valores de “f” de ambos ciclos son estadísticamente similares, como lo indica el intervalo de confianza generado por “bootstrapping” (Lewis y Zaykin, 2001).

Con el objetivo de determinar si estas diferencias eran importantes a nivel estadístico se realizó una prueba exacta “U” para deficiencia de heterocigotos (Raymond y Rousset, 1995), a través del programa Genepop. Se consideró como hipótesis nula el cumplimiento de equilibrio de Hardy-Weinberg y como hipótesis alternativa la deficiencia de heterocigotos.

Los resultados obtenidos (Cuadro 6) corroboraron la ocurrencia de déficit de heterocigotos para cada locus y en ambos ciclos.

El déficit de heterocigotos observados puede ser consecuencia de uno o varios factores que estén ocurriendo de manera simultánea, específicamente:

Cuadro 6. Heterocigosis esperada (H_e) y observada (H_o), coeficiente de endocria (f) y cumplimiento de equilibrio de Hardy-Weinberg (HW) de diez marcadores microsatélites (SSRs) en los ciclos 0 y 1 de la población PFD-1.

SSR	Ciclo 0					Ciclo 1				
	n	H_o	H_e	f	HW ¹	n	H_o	H_e	f	HW ¹
RM 102	92	0,0869	0,2252	0,6153	**	85	0,0352	0,1217	0,7113	**
RM 263	78	0,3333	0,7212	0,5394	**	90	0,3444	0,7655	0,5514	**
RM 143	78	0,2564	0,3932	0,3494	**	56	0,0714	0,1198	0,4062	*
RM 185	84	0,2976	0,3990	0,2552	**	90	0,2000	0,2948	0,3227	*
RM 111	69	0,5072	0,7534	0,3192	**	49	0,4082	0,7029	0,4219	**
RM 296	76	0,3552	0,6557	0,4598	**	85	0,4588	0,6764	0,3229	**
RM 228	86	0,5232	0,6989	0,2525	**	39	0,6154	0,8365	0,2669	**
RM 224	86	0,2674	0,8292	0,6787	**	30	0,7333	0,8435	0,1325	*
RM 235	32	0,5000	0,8219	0,3955	**	77	0,5065	0,7992	0,3677	**
RM 17	87	0,4942	0,5687	0,1315	*	76	0,5000	0,5672	0,1191	ns
Media	76.8	0,3621	0,6056	0,4038	**	67	0,3873	0,5727	0,3623	**
					(a) ²					(a) ²
IC _{95%}				0,3030					0,2300	
				a					a	
				0,5122					0,4310	

1. ns: valor no significativo; * significativo al 5% y ** significativo al 1%.

2. (a) prueba global.

- Existencia de cruces preferenciales.
- Pocas siembras de recombinación como en el caso de la población PFD-1. En este caso sería necesario medir si se requieren de mayor número de ciclos de recombinación.
- Cierta grado de endogamia que a su vez pudiera ser causado por:
 - a. Errores en la identificación de las plantas androestériles en el campo. Tal identificación se realiza al observar la excreción y coloración de la panícula al inicio de la floración.
 - b. Presencia de granos de polen viables en la planta androestéril. Singh y Ikehashi (1981) al identificar y caracterizar el gen de androesterilidad en la línea IR36 mencionan la ocurrencia de un 4% de polen fértil, y no se conocen otros estudios donde se establezca el posible efecto del ambiente sobre la expresión del gen de androesterilidad. Sin embargo, el valor reseñado es bajo y no explicaría por si solo el déficit de heterocigotas observados.
 - c. Un problema de polinización que se reflejaría

en panículas con pocas semillas y que podría mejorarse fácilmente utilizando técnicas de campo para mejorar la polinización como por ejemplo, sacudir las plantas fértiles sobre las estériles al momento de la floración.

Recombinación entre genes

Otra consecuencia de la panmixia es la recombinación al azar entre genes. Esto es que al momento de la formación de las gametas, los alelos de un gen podrán aparecer en distintas combinaciones con los alelos de otro gen, en proporciones dadas por el producto de las frecuencias alélicas de los loci. En tal caso se considera que los genes están en equilibrio de ligamiento.

Tales recombinaciones aleatorias ocurrirán de manera más rápida en caso de ausencia de ligamiento entre genes o de condiciones físicas o fisiológicas que favorezcan unas gametas en detrimento de otras. En ambos casos unas gametas estarán en mayor proporción que las esperadas según las frecuencias alélicas dadas para cada loci, y se considera que los genes están en desequilibrio de ligamiento. A diferencia del equilibrio de Hardy-Weinberg, cuya condición se alcanza con una generación de panmixia, la condición de equilibrio de ligamiento requerirá numerosas generaciones dependiendo del tipo e intensidad

de los factores que causaron el desequilibrio de ligamiento original en la población (Hartl, 1987).

En teoría la condición de desequilibrio de ligamiento para dos loci dados (A y B) con dos alelos cada uno (Aa; Bb) se cuantifica a través del índice "D" que se calcula considerando la diferencia entre la frecuencia de las gametas paternas (AB; ab) y recombinantes (Ab; aB) como sigue:

$$D = P_{11}P_{22} - P_{12}P_{21}$$

En ésta:

D es el desequilibrio de ligamiento.

P₁₁ es la frecuencia de la gameta producto de fAfb.

P₂₂ es la frecuencia de la gameta producto de fabb.

P₁₂ es la frecuencia de la gameta producto de fAfb.

P₂₁ es la frecuencia de la gameta producto de fabB.

El valor "D" tenderá a 0 a medida que las frecuencias gaméticas paternas y recombinantes sean similares.

El desequilibrio de ligamiento implicaría mayor proporción de algunas combinaciones gaméticas que, en consecuencia, modificaría las clases y frecuencias genotípicas observadas en una población. Por otra parte, aunque se formaran todas las gametas esperadas, la imposibilidad de ocurrencia de cruzamientos al azar, por cruces preferenciales, posiblemente debido a

incompatibilidad o a la falta de oportunidad por necesidad de hacer un mayor número de siembras de recombinación, podrían afectar el equilibrio de ligamiento. Por esto ciertos genotipos estarían en una mayor frecuencia en la población.

Con la idea de detectar si ocurre o no desequilibrio de ligamiento en la población PFD-1 ciclo 0 y 1, se utilizaron las frecuencias genotípicas obtenidas en cada SSR para detectar la presencia de “D” para cada combinación de dos loci, a través de las pruebas exactas de Fisher (Raymond y Rousset, 1995). El programa utilizado (Genepop) parte del hecho de que si las frecuencias genotípicas de un locus son independientes de las de otro locus, entonces ambos loci se encuentran en equilibrio de ligamiento. En tal sentido el programa genera tablas de contingencia y evalúa si

hay independencia o no. Eso lo hace para todas las posibles combinaciones y mediante una prueba exacta de Fisher, arroja la probabilidad de que dos loci sean independientes (hipótesis nula) o no (hipótesis alternativa).

La significación estadística de la prueba de detección se presenta en el Cuadro 7. En éste se puede observar que de manera general y con muy pocas excepciones, para todas las combinaciones de loci y para cada ciclo no se detectó desequilibrio de ligamiento. Esto indica que los alelos de los diferentes loci aparecen en las diferentes combinaciones gaméticas acordes con las frecuencias alélicas particulares. Es importante destacar el caso de los SSR RM235 y RM17 ubicados en el cromosoma 12 que no mostraron desequilibrio de ligamiento, en ninguno de los dos ciclos.

Cuadro 7. Prueba de detección de desequilibrio de ligamiento para diez SSR, de los ciclo 0 (fondo gris oscuro) y ciclo 1 (fondo gris claro) de la población PFD-1.

Cromosoma	1	2	3	4	6	9	10	11	12	12
Crom. SRR	RM102 ¹	RM268	RM143	RM185	RM111	RM296	RM228	RM224	RM235	RM17
1	RM102	ns	ns							
2	RM268	ns	ns	ns	**	ns	ns	ns	ns	ns
3	RM143	ns	ns							
4	RM185	ns	ns	ns	ns	ns	*	ns	ns	ns
6	RM111	ns	*	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
9	RM296	ns	ns	ns	ns	ns	ns	*	**	ns
10	RM228	ns	ns							
11	RM224	ns	ns							
12	RM235	ns	**	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
12	RM17	ns	ns	*	ns	ns	ns	ns	ns	ns

1. ns: valor no significativo; * significativo al 5% y ** significativo al 1%.

Estos resultados indican que todos los alelos de un locus dado tienen igual oportunidad de combinarse con los alelos de otro locus. Considerando que la mayoría de los SSRs utilizados se encontraban en cromosomas diferentes y que, por lo tanto, no hay un efecto de ligamiento físico, se descarta la idea de que en la siembra de recombinación algunos apareamientos no se están realizando debido a factores de incompatibilidad, o la falta de oportunidad por un bajo número de generaciones de recombinación.

CONSIDERACIONES FINALES

La selección recurrente aplicada a cultivos autógamos, como es el caso del arroz, supone un reto para los fitomejoradores que lo aplican. El cumplimiento de ciertas condiciones definirá el éxito futuro del mejoramiento poblacional. Por tal razón, y en vista de que los programas de selección recurrente aportan sus beneficios en el mediano y largo plazo, el fitomejorador debe vigilar el cumplimiento de condiciones como alta variabilidad inicial, su mantenimiento en el tiempo y la condición de panmixia en la siembra de recombinación. Para verificar tales condiciones los marcadores moleculares representan una herramienta útil y apropiada.

Este trabajo permitió verificar la alta variabilidad genética de la población PFD-1 ciclo 0 y el mantenimiento de la misma después de un ciclo de selección. Por otra parte, se evidenció la presencia de inconvenientes en la etapa de recombinación por la aparente ocurrencia de algún grado de autogamia. Debido a tales resultados se requiere estudiar las posibles razones para que los fitomejoradores encargados del programa de mejoramiento poblacional a través de la selección recurrente para la población PFD-1, puedan tomar las medidas necesarias para corregir tal situación.

REFERENCIAS

- Brondani, C.; Brondani, R. P. V.; Rangel, P. H. N.; y Ferreira, M. E. 2001. Development and mapping of *Oryza glumaepatula* – derived microsatellite markers in the interspecific cross *Oryza glumaepatula* x *O. sativa*. *Hereditas* 134:59-71.
- Falconer, D. S. 1989. Introduction to quantitative genetics. 3rd Ed. Longman Scientific & Technical, New York, USA. 438 p.
- Ferreira, M. E. y Grattapaglia, D. 1998. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3^a Ed. EMBRAPA, Brasília, Brasil. 220 p.
- Hartl, D. 1987. A primer of population genetics. Sinauer Associates Publishers, Massachusetts, USA. 305 p.

- <http://www.gramene.org/> (Feb,10; 2001).
- Lewis, P. y Zaykin, D. 2001. Genetic data analysis: Computer program for the analysis of allelic data. Version 1.0 (1d16c). University of Connecticut. University of North Caroline. USA. Free program distributed by the authors over the internet from <http://lewis.eeb.uconn.edu/lewishome/software.html>
- Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from small number of individuals. *Genetics* 89:583-590.
- Ortiz, A.; Ramis, C.; Parra, P.; Díaz, A.; y López, L. 2002. Patrones isoenzimáticos de variedades de arroz y arroces rojos en Venezuela. *Rev. Fac. Agr. (Maracay)* 28:117-130.
- Panaud, O.; Chen, X.; y McCouch, S. R. 1996. Development of microsatellite markers and characterization of simple sequence length polymorphism (SSLP) in rice (*Oryza sativa* L.). *Mol. Gen. Genet.* 252:597-607.
- Pinto, L. R. 2001. Genetic structure of maize (*Zea mays* L.) populations BR-105 and BR-106 and their synthetics IG-3 and IG-4 by microsatellite markers. Tesis Ph.D. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, Brasil. 142 p.
- Raymond M. y Rousset, F. 1995. Genepop (version 1.2): population genetics software for exact test and ecumenicism. *J. Hered.* 86:243-249.
- Rodriguez, N. 2001. Evaluación de la erosión cualitativa de la semilla de arroz (*Oryza sativa* L.) en el sistema de producción de semillas certificadas en Portuguesa. Tesis Ms.C. Postgrado de Agronomía. Universidad Central de Venezuela. Facultad de Agronomía, Maracay, Venezuela. 65 p.
- Singh, R. J. e Ikehashi, H. 1981. Monogenic male-sterility in rice: induction, identification and inheritance. *Crop Sci.* 21:286-288.
- Sneath, P. y Sokal, R. 1973. Numerical taxonomy. Freeman and Company. San Francisco, California, USA. 573 p.
- Temnykh, S.; Park, W.; Ayres, N.; Cartinhour, S.; Hauck, N.; Lipovich, L.; Gu Gho, Y.; Ishi, T.; y McCouch, S. 2000. Mapping and genome organization of microsatellite sequences in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor. Appl. Genet.* 100:697-712.
- Velásquez, R. 2001. Control genético de tres sistemas isoenzimáticos en arroz (*Oryza sativa* L.). Trabajo de ascenso a Asistente. Facultad de Agronomía. Universidad Central de Venezuela, Maracay, Venezuela. 85 p.

Capítulo 3

Monitoramento da diversidade genética na população CNA-7 de arroz por meio de marcadores SSR

Versão inicial de artigo que será submetido à revista Theoretical and Applied Genetics

Monitoramento da diversidade genética na população CNA-7 de arroz por meio de marcadores SSR

Ana Claudia C. Badan; Elcio P. Guimarães*; Catalina Ramis; Cláudio Brondani;
Rosana Brondani

Departamento de Genética e Biologia Molecular - Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, São Paulo, Brasil. E-mail: anaclaudia@mpc.com.br

Embrapa Arroz e Feijão, atualmente na "Food and Agriculture Organization of the United Nations" (FAO), Roma, Itália. E-mail: elcio.guimaraes@fao.org

Instituto de Agronomia - Universidad Central de Venezuela, Maracay, Venezuela. E-mail: dasilram@telcel.net.ve

Embrapa Arroz e Feijão – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), Santo Antônio de Goiás, Goiás, Brasil. E-mail: brondani@cnpaf.embrapa.br e rosanavb@cnpaf.embrapa.br

Resumo

O melhoramento genético do arroz, utilizando populações de ampla base genética, tem sido empregado por vários programas da América Latina. O monitoramento dessas populações ao longo dos ciclos de seleção, possibilita a tomada de decisões sobre o modo de conduzi-las.

Neste trabalho, objetivou-se monitorar a variabilidade genética existente nos ciclos 0 e 2 de uma da população de arroz e verificar o efeito de ciclos de seleção sobre os alelos do marcador revelado pelo primer RM224. Através da análise de 10 marcadores moleculares microssatélites, avaliados em 96 indivíduos dos ciclos 0 e 2 da população CNA-7, foi possível medir a diversidade genética em termos de número de alelos/locos e de heterozigosidade observada.

Os valores 5,3 e 5,0 alelos/locos encontrados nos ciclos 0 e 2, respectivamente, indicam que a população apresenta um nível adequado de variabilidade para ser submetida a subseqüentes ciclos de seleção. Os valores 0,66 e 0,63, da heterozigosidade esperada, calculada pelo índice de diversidade de Nei, mostraram que não houve diferença significativa entre os ciclos de seleção.

A análise do locus amplificado pelo RM224, mostrou ter havido aumento na freqüência de 2 dos 8 alelos descritos.

Conclui-se que a população não variou de um ciclo para outro em termos de diversidade e por isso poderá ser mantida no programa de melhoramento sem a necessidade de serem adicionados novos genitores.

Introdução

A utilização do método de seleção recorrente em populações de arroz de ampla base genética tem sido freqüente em vários programas de melhoramento genético da América Latina (Guimarães, 1997; 2000). Isso é possível graças ao gene da macho-esterilidade que permite que a etapa de cruzamentos seja feita em campo, eliminando a trabalhosa emasculação manual de plantas (Singh e Ikehashi, 1981). Mesmo sendo descrito de maneira simplificada, nas etapas de avaliação, seleção e recombinação, o método de seleção recorrente pode apresentar muitas variações durante a sua condução (Fehr, 1987).

O monitoramento das populações ao longo dos ciclos é uma ferramenta útil, que permite avaliar a eficiência no modo de conduzi-las (Badan et al., 2003; Courtois et al., 2003; Ramis et al., 2003).

Em uma população, a diversidade genética é a base para a obtenção de novos genótipos. A medida que ela for se exaurindo ao longo dos ciclos, menores serão as possibilidades de fazer progressos com subseqüentes ciclos de seleção. Uma das maneiras de medir essa diversidade é através de marcadores moleculares (Labate et al., 1997; Pinto, 2001; Filoux et al., 2001 apud Courtois et al., 2003; Ramis et al., 2003; Zhou et al., 2003).

Os marcadores moleculares microsatélites, por serem codominantes, permitem uma análise de diversidade com base no número médio de alelos/locos (riqueza alélica) ou na distribuição desses alelos na população (uniformidade alélica), ou ainda, como uma medida da heterozigosidade observada na população (Nei, 1987).

A interpretação dos dados obtidos através dos marcadores microssatélites possibilita, ainda, agregar outras informações aos estudos de diversidade. Pode-se apurar, por exemplo, a contribuição preferencial de algum genitor na formação das populações. Ferreira et al. (2000) mostraram isso através da comparação das freqüências alélicas dos indivíduos da população de arroz CNA-5 com as freqüências alélicas de seus genitores e verificaram que o genitor IR-36 teria contribuído mais do que os outros genitores para a formação da população. Isso

levou-os a admitir uma hipótese de efeito de arraste de ligamento do gene da macho-esterilidade, existente no cultivar IR-36.

Outra possibilidade do uso dos marcadores microssatélites é a medida da eficiência do processo de cruzamento entre plantas. Butcher et al. (2003) compararam as proporções de homozigotos e heterozigotos de populações de eucalipto com proporções estimadas segundo o sistema reprodutivo descrito e encontraram um desvio que indicou a ocorrência de problemas nos cruzamentos.

A associação dos marcadores moleculares aos fenótipos de interesse, e consequente utilização nos processos seletivos também têm sido uma de suas grandes aplicações (Temnykh et al., 2000). No caso dos genes de resistência à brusone, Correa-Victoria et al. (2002), por exemplo, afirmaram que a resistência durável só seria conseguida em genótipos que apresentassem os genes Pi-1, Pi-2 e Pi-33. Estes genes, por sua vez, foram associados aos marcadores microssatélites RM224 localizado no cromossomo 11, RM527 no cromossomo 6 e RM331, RM404, RM483 ou RM72 localizados no cromossomo 8. Trabalhos como esse, indicam uma possibilidade de se associar marcas de DNA com a seleção. Outros autores também descreveram marcas moleculares associados a genes de resistência (McCouch et al., 1994; Bryan et al., 2000; Araújo, 2001; Sallaud et al., 2003).

No presente trabalho, o monitoramento da população CNA-7 por meio de marcadores microssatélites em seus ciclos de seleção 0 e 2 recorrente objetivou:

- 1) avaliar a diversidade genética nos dois ciclos;
- 2) avaliar o efeito da seleção no marcador RM224.

Materiais e métodos

Materiais vegetais

Foi utilizada a população de arroz CNA-7 nos ciclos 0 e 2 de seleção recorrente. Trata-se de material pertencente ao programa de melhoramento genético da Embrapa Arroz e Feijão, em Goiânia, Brasil. Utilizou-se 96 indivíduos de cada um dos ciclos. A seleção praticada para formar o ciclo 2, está descrita em Badan et al. (2003).

Para a análise molecular, foram utilizados os ciclos 0 e 2 da população CNA-7, do programa de melhoramento populacional de arroz de terras altas da Embrapa Arroz e Feijão, Brasil. Foram coletadas quatro ou cinco folhas de 96 indivíduos tomados ao acaso de cada ciclo da população que estava em experimento de avaliação do ganho genético da resistência à brusone (Badan et al., 2003).

Genotipagem

O DNA genômico de 96 plantas dos ciclos 0 e 2 foi extraído. Utilizou-se o protocolo de Doyle e Doyle (1987). O DNA foi quantificado e diluído até uma concentração de 3ng/μl. De 20 primers testados, apenas os dez que apresentaram maior polimorfismo foram analisados. Foram eles: OG19, OG17, RM22, OG61, RM11, OS30, OG81, RM224 e RM235, cuja localização nos cromossomos está apresentada na Tabela 1.

As reações de amplificação foram feitas em um volume final de 15μl, contendo 5μl de DNA 3,55μl de água destilada, 1,5μl de buffer 10x, 1,3μl de dNTPs com uma concentração de 2,5mM; 1,3μl de DMSO (50%); 2,15μl de cada primer com uma concentração de 0,9μM/μl e 0,2μl de enzima Taq DNA polimerase (Gibco BRL®) com uma concentração de 5 unidades/μl. As reações de amplificação foram conduzidas em um termociclador PTC-100 (MJ Research) de placa de 96. O programa de amplificação consistiu de denaturação a 94° C por 5 minutos, seguido por 29 ciclos de 94° C por 1 minuto (denaturação); 56 ou 60° C

por 1 minuto (anelamento) e 72° C por 1 minuto (polimerização) seguido de uma extensão final de 7 minutos a 72° C. Os produtos amplificados foram separados por eletroforese em géis de poliacrilamida (4%), corridos por 1h10ma 90V em cuba de eletroforese vertical (*Sequencing* DNA-BIORAD®). Os géis foram coloridos em prata para visualização dos fragmentos de DNA.

Análise de dados

As freqüências alélicas foram calculadas com base na contagem direta dos dados, considerando-se:

$$\hat{x}_i = x_{ii} + \frac{1}{2} \sum_{i \neq j} x_{ij}$$

Onde:

\hat{x}_i = freqüência do alelo i na população

\hat{x}_{ii} = freqüência genotípica dos homocigotos para o alelo i

\hat{x}_{ij} = freqüência genotípica para os heterocigotos sendo o alelo i diferente de j

O número médio de alelos por loco foi obtido com base no número total de locos. O intervalo de confiança das freqüências alélicas foi estimado com base na distribuição binomial.

Para diferenciar a freqüência alélica de um ciclo de outro comparou-se o valor médio de um determinado alelo em um ciclo com o intervalo de confiança deste mesmo alelo no outro ciclo. Quando esses valores se sobrepuseram, isso significou que não havia diferença significativa entre os ciclos para esses alelos.

A riqueza alélica foi estimada através do número médio de alelos por locos. A uniformidade alélica foi mostrada graficamente, através da distribuição da

$$H_o. = \sum_i \sum_{i \neq j} n_{lij}$$

freqüência de cada alelo por locos. Heterozigosidade observada (H_o) e heterozigosidade esperada (H_e) foram estimadas pelo software *Genetic Data Analysis* (GDA) (Lewis e Zayakin, 2001). Heterozigosidade observada (H_o), foi estimada como:

onde,

locos (l), alelos (i e j), tamanho de amostra (n) e o número de heterozigotos observados (n_{ij}) onde i diferente de j (Weir, 1990).

Heterozigosidade esperada foi estimada para um loco l como:

$$\hat{H}_e = \frac{2n(1 - \sum \hat{x}_i^2)}{2n - 1}$$

onde,

x_i^2 é a freqüência do i -ésimo alelo (Nei, 1987).

O índice de endogamia de Wright (f) (Hartl, 1987), foi calculado com base na fórmula:

$$f = \frac{H_e - H_o}{H_e}$$

onde,

H_e é a heterozigosidade esperada;

H_o é a heterozigosidade observada.

Resultados

Os dados de freqüências alélicas dos ciclos 0 e 2 estão apresentados na Tabela 1. Os 10 locos estudados apresentaram um total de 53 alelos para o ciclo 0

e 50 para o ciclo 2. O marcador revelado pelo primer OS30 apresentou o menor número de alelos (dois) e o OG61 apresentou o maior número. Em média, os ciclo 0 e 2 apresentaram 5,3 e 5,0 alelos/locos, respectivamente.

Os símbolos de significância estatística apresentados na Tabela 1, mostraram que 30 alelos variaram suas freqüências desde o ciclo 0 até o ciclo 2.

Na Tabela 1 observa-se que os alelos que diminuíram significativamente sua freqüência do ciclo 0 para o ciclo 2 foram os alelos A1, A2, B4, C1, C4, D7, E3, E5, E7, F1, G2, G4, I1, I3 e J5. Por outro lado, os alelos A3, B2, C3, D2, D5, E2, E6, F2, G1, G3, G4, I4, I5, J2 e J3 tiveram suas freqüências aumentadas de maneira significativa. Alguns alelos foram encontrados em apenas um dos ciclos da população (C5, D7, D8, D9 e E7) mas, nem sempre, essas diferenças foram estatisticamente validadas. Isso pode ter ocorrido em decorrência da amostragem. O tamanho de amostra utilizado pode não ter sido grande suficiente para detectar os alelos de baixa freqüência.

A variação na uniformidade alélica de um ciclo para outro pode ser observada para cada locus revelado pelos primers. O locus amplificado pelo OS30, localizado no cromossomo 8, foi o único que apresentou uma queda acentuada na uniformidade de um ciclo ao outro.

Os valores de heterozigosidade esperada (H_e), heterozigosidade observada (H_o) e coeficiente de endogamia (f) calculados para cada marcador são apresentados na Tabela 2. Os valores de heterozigosidade observada (H_o), que representam a diversidade da população variaram entre 0,07 (OS30) e 0,73 (RM11) no ciclo 0, e entre 0,00 (OS30) e 0,70 (OG61) no ciclo 2. As médias de diversidade ficaram entre 0,50 e 0,48 para os dois ciclos estudados.

O coeficiente de endogamia (f), variou entre 0,06 (RM228) a 0,78 (OS30) no ciclo 0 e entre 0,08 (OG61) a 1,00 (OS30) no ciclo 2.

Discussão

A diversidade genética das populações nos dois ciclos de seleção recorrente foi estimada por meio de marcadores microssatélites. Ao comparar-se

os valores obtidos nesse estudo com os reportados na literatura verificou-se que a diversidade em termos de número de alelos/locos de encontrada nessa população (5,3 e 5,0) foi similar a de outras populações de arroz estudadas e conduzidas através do melhoramento populacional. A população PFD-1, do programa de melhoramento da Venezuela, por exemplo, apresentou 5,3 alelos/locos no ciclo 0 e 4,6 alelos/locos no ciclo 1 quando avaliada uma amostra de 92 indivíduos através de dez marcadores microssatélites (Ramis et al., 2003). Já a população CNA-5, do programa de melhoramento da Embrapa Arroz e Feijão, no Brasil, apresentou 5,14 alelos/locos no ciclo 0 e 4,5 alelos/locos no ciclo 3 quando avaliada uma amostra com 60 indivíduos com sete marcadores microssatélites (Ferreira et al., 2000). A população restauradora da fertilidade, utilizada na França, apresentou 4,3 alelos/locos quando avaliados 150 indivíduos, com 22 marcadores microssatélites (Filoux, 2001, citado por Courtois et al., 2003).

Para que os valores encontrados nesse estudo, e também nas outras populações mantidas nos programas de melhoramento genético pudessem ser comparados com a diversidade genética observada em outros materiais de arroz, outros dados de literatura foram consultados. Foi encontrada uma média de 6,8 alelos/locos ao se estudar 38 materiais do banco de germoplasma do “International Rice Research Instituto” (IRRI), sendo 10 cultivares *indica*, 8 *japonica* e 20 *japonica temperada*, utilizando-se 111 pares de marcadores microssatélites (Ni et al., 2002). Foi também encontrada uma média de 3,68 alelos/locos em 24 variedades do grupo *basmati* utilizando-se 19 marcadores moleculares (Nagaraju et al., 2002).

Essas comparações indicam que a população CNA-7 possui grande variabilidade, comparável a das outras populações utilizadas em programas de seleção recorrente. Isso provavelmente se deva a inclusão de inúmeros genótipos divergentes para a formação da população base (Badan et al., 2003).

Para se realizar comparações entre populações, entretanto, os primers e o tamanho das populações deveriam ser sempre iguais. A comparação de primers comuns entre as populações CNA-7 e PFD-1 (Ramis et al., 2003) demonstra haver diferença entre as populações. Para o marcador revelado pelo primer

RM228 (localizado no cromossomo 10) foram encontrados seis alelos na população CNA-7 e oito alelos na população PFD-1, e para o marcador revelado pelo primer RM235 (localizado no cromossomo 12) foram encontrados cinco alelos na CNA-7 e 6 alelos na PFD-1. Ou seja, para esses dois marcadores avaliados, a variabilidade genética existente na população PFD-1 foi maior.

Comparando o nível de diversidade genética entre os ciclos de seleção da população CNA-7, verificou-se que, em termos de número de alelos/locos não houve nenhuma perda estatisticamente comprovada entre os ciclos 0 e 2. Isso representa que a diferença entre 5,3 e 5,0 alelos/locos não foi significativa.

Em termos de diversidade genética medida com base na heterozigidade observada nenhuma diferença significativa entre os ciclos 0 e 2 foi detectada. Os valores de $H_{o(C0)} = 0,50$ e de $H_{o(C1)} = 0,48$ respectivamente comprovam esse fato (Tabela 2).

Isso mostra que mesmo tendo ocorrido uma seleção para as características resistência à brusone na população, essa seleção não chegou a alterar a magnitude da diversidade genética. Em outras palavras, isso seria o mesmo que considerar que a probabilidade de alelos distintos se parearem ao acaso no ciclo 0 foi a mesma que no ciclo 2, pelo menos para a maioria dos alelos. Com base nesses resultados, pode-se dizer que a população estudada manteve sua variabilidade genética ao longo dos dois ciclos de seleção e pode ser mantida no programa de melhoramento como se apresenta.

Um outro aspecto estudado foi a associação entre a alteração na frequência dos marcadores moleculares com a seleção praticada na população para aumentar a resistência à brusone. Observou-se para isso a região cromossômica ligada ao marcador molecular RM224, supostamente ligado ao gene Pi-1 (Correa-Victoria et al., 2002).

Neste sentido, pode-se observar que os alelos I4 e I5 foram os que tiveram sua frequência incrementada do ciclo 0 para o ciclo 2, enquanto que para todos os outros alelos as frequências diminuíram ou não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre ciclos.

Esses aumentos por si só, não significam uma associação direta entre esses alelos com o gene de resistência Pi-1, entretanto, essa informação poderá servir de base para trabalhos futuros.

Outro aspecto observado foi que para todos os primers analisados, tanto no ciclo 0 como no ciclo 2, houve mais indivíduos homozigotos que heterozigotos. Fenômeno semelhante ao ocorrido na população PFD-1 (Ramis et al., 2003) e também para o marcador ligado ao primer RM261 (cromossomo 4) na população CNA-IRAT 4 (Courtois et al., 2003).

Esse desvio nas proporções de homozigotos e heterozigotos esperados pode indicar um problema nos cruzamentos. Na prática, algumas explicações para isso seriam a ocorrência de erros na identificação das plantas estéreis no campo; a existência de autofecundação nas plantas férteis; ou ainda a existência de problemas de polinização provocando a ocorrência de plantas com poucas sementes (Ramis et al., 2003).

Outras hipóteses para tentar explicar o fato seriam: a possibilidade de terem sido usados parentais similares entre si, pelo menos com relação aos locos estudados; e/ou ter havido uma influência do ambiente sobre a macho-esterilidade.

Na literatura, são descritos outros exemplos que também apresentaram esse desvio na proporção de homozigotos e as explicações para isso foram de possível falta de acurácia na distinção de heterozigotos devido à qualidade do gel utilizado (metaphor e não poliacrilamida) (Pinto, 2001) ou de cruzamento entre indivíduos geneticamente aparentados Zhou et al. (2003).

Conclusão

A população CNA-7 apresentou, nos ciclos 0 e 2, uma diversidade similar a de outras populações de arroz, em termos de número de alelos/locos.

Não houve diferença de diversidade entre os ciclos 0 e 2 nem em termos de número de alelos/locos, nem de heterozigosidade observada.

Houve alteração na frequência de vários alelos de um ciclo ao outro, inclusive no loco do marcador revelado pelo primer RM224, supostamente ligado ao gene Pi-1 de resistência à brusone, dois alelos tiveram sua frequência incrementada.

Bibliografia

ARAÚJO, LG (2001) Marcadores RAPDs ligados ao gene de resistência à brusone do somaclone da cultivar de arroz Araguaia. 139f. Tese (doutorado) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia.

BADAN, ACC; GUIMARÃES, EP; RAMIS, C (2003) Ganancia genética para resistencia a *Piricularia* en una población de arroz. Cap. 16 p.319-354. In: GUIMARÃES, EP (Ed.). Mejoramiento poblacional: una alternativa para explorar los recursos genéticos del arroz en América Latina. Cali: Centro Internacional de Agricultura Tropical 374p.

BRYAN, G; WU, KS; FARRAL, L; JIA, Y; HERSHEY, HP; McADAMS, SA; FAULK, KN; DONALDSON, GK; TARCHINI, R; VALENT, B (2000) A Single amino acid difference distinguishes resistant and susceptible Alleles of the Rice Blast Resistance Gene *Pi-ta* Plant cell 12: 2033-2046.

BUTCHER, PA; GLAUBITZ, JC; MORAN, GF (2003) Applications for microsatellite markers in the domestication and conservation of forest tree. <www.fao.org/forestry/FOR/FORM/FOGENRES/genresbu/web27-en/micr-e.stm>. Acesso em 27/6/03.

CORREA-VICTORIA, F.; THARREAU, D; MARTINEZ, C; VALES, M; ESCOBAR, F; PRADO, G; ARICAPA, G (2002) Gene combinations for durable rice blast resistance in Colombia. <[http:// www.ciat.cgiar.org/](http://www.ciat.cgiar.org/)> Acesso em 12/12/02.

COURTOIS, B; FILOUX, D; AHMADI, N; NOYER, JL; BILLOT, C; GUIMARÃES, EP El uso de marcadores moleculares para el manejo de poblaciones de arroz mejoradas mediante la selección recurrente (2003) Cap. 4. p.53 a 76. In: GUIMARÃES, E.P. (Ed.). Mejoramiento poblacional: una alternativa para explorar los recursos genéticos del arroz en América Latina. Cali: Centro Internacional de Agricultura Tropical. 374p.

DOYLE, JJ; DOYLE JL (1987) Isolation of DNA from fresh plant tissue Focus 12: 13-15

FEHR, WR (1987) Recurrent selection. p.172-198 In: FEHR, WR (Ed.). Principles of cultivar development. Collier, MacMillan.

FERREIRA, ME; PENTEADO, MIO; BRONDANI, C; BELÓ, A; FERREIRA, MA; RANGEL, PHN (2000) Caracterización y uso de marcadores RAPD y microsatélites (SSR) en el monitoreo del programa de mejoramiento poblacional en arroz. p.37-62 In: GUIMARÃES, EP (Ed.). Avances en el mejoramiento poblacional en arroz. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão.

FILOUX, D (2001) Analyse de la diversité génétique d'une population restauratrice de fertilité utilisée pour la création de variétés hybrides de riz. DEA Thesis, University of Montpellier, 17p.

GUIMARÃES, EP (1997) Selección recurrente en arroz Cali: Centro Internacional de Agricultura Tropical, 240p.

GUIMARÃES, EP (2000) Avances en el mejoramiento poblacional en arroz Santo Antônio de Goiás: EMBRAPA Arroz e Feijão, 311p.

HARTL, D (1987) A primer of population genetics. Massachusetts: Sinauer Associates Publishers, 305p.

LABATE, JA; LAMKEY, KR; LEE, M; WOODMAN, WL (1997) Molecular genetic diversity after reciprocal recurrent selection in BSSS and BSCB1 maize populations. *Crop Sci.* 37: 416-423.

LEWIS, P; ZAYRIN, D (2001) Genetic data analysis: Computer program for the analysis of allelic data. Version 1.0 (1d16c). University of Connecticut. University of North Caroline. USA. Free program distributed by the authors over the internet from <http://lewis.eeb.uconn.edu/lewishome/software.html>.

McCOUCH, SR et al. (1994) Mapping of blast resistance in rice In ZEIGLER, RS; LEONG, SA; TENG, PS (Ed.). Rice blast disease. Wallingford: CAB International, 1994. p.167-186.

NAGARAJU, M; KATHIRVELI, R; RAMESH K; SIDDIG, E; HASNAIN SE (2002) Genetic analysis of traditional and evolved Basmati and non-Basmati rice varieties by using fluorescence-based ISSR-PCR and SSR markers *PNAS* 99: 5836 - 5841

NEI, M (1987) Molecular evolutionary genetics. New York: Columbia Press. 512p

NI, J; COLOWIT, PM; MACKILL, DJ (2002) Evaluation of genetic diversity in rice subspecies using microsatellite markers *Crop Sci.* 42, 601-607.

PINTO, LR (2001) Análise da estrutura genética das populações de milho (*Zea mays* L.) BR-105 e BR-106 e respectivos sintéticos IG-3 e IG-4 por meio de microssatélites. 112 f. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura 'Luiz de Queiroz', Piracicaba.

RAMIS, C; BADAN, ACC; DIAZ, A; GAMBOA, CE (2003). Marcadores moleculares como herramientas para el mejoramiento poblacional en arroz. Cap. 5. p.77 a 98. In: GUIMARÃES, E.P. (Ed.). Mejoramiento poblacional: una alternativa para explorar los recursos genéticos del arroz en América Latina. Cali: Centro Internacional de Agricultura Tropical. 374p.

SALLAUD, C; LORIEUX, M; ROUMEN, E; THARREAU, D; BERRUVER, R; SVESTASRANI, P; GARSMEUR, O; GHESQUIERE, A; NOTTEGHEM, JL (2003) Identification of five new blast resistance genes in the highly blast-resistant rice variety IR64 using a QTL mapping strategy. *Theor. Appl. Genet.* 106:(5)794-803.

SINGH, RJ; IKEHASHI, HI (1981) Monogenic male-sterility in rice: induction, identification and inheritance. *Crop Sci.* 21:286-289.

TEMNYKH, S.; PARK, WD; AYRES, N; CARTINHO, S; HAUCK, N; LIPOVICH, L; CHO, YG; ISHI, T; McCOUCH, SR (2000) Mapping and genome organization of microsatellite sequences in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor. Appl. Genet.* 100: 697-712.

WEIR, BS (1996) *Genetic data analysis* Sunderland: Sinauer Associates, 445p.

ZHOU, HF; XIE, ZW; GE, S (2003) Microsatellite analysis of genetic diversity and population genetic structure of a wild rice (*Oryza rufipogon* Griff.) in China *Theor Appl. Gen* 107: (2)332-339.

Tabela 1 Freqüência alélica nos ciclos 0 e 2 da população de arroz CNA-7, para cada marcador amplificado pelos primers avaliados. Intervalo de confiança calculado com base na distribuição binomial dos dados. N representa o número de bandas encontradas. O número do cromossomo onde se encontram os primers (Cromos.)

Cromos	Primer	Alelos	Ciclo 0			Ciclo 2			Significância
			N	Freq.C ₀	IC	N	Freq. C2	IC	
2	OG19	A1	102	0,7083	(0,6342-0,7810)	70	0,5833	(0,4982-0,6726)	*
		A2	22	0,1528	(0,1040-0,2221)	8	0,0667	(0,0349-0,1271)	*
		A3	20	0,1389	(0,0926-0,2063)	42	0,3500	(0,2729-0,4424)	*
2	OG17	B1	4	0,0227	(0,0093-0,0572)	1	0,0061	(0,0015-0,0335)	ns
		B2	31	0,1761	(0,1278-0,2406)	45	0,2744	(0,2132-0,3494)	*
		B3	27	0,1534	(0,1084-0,2153)	31	0,1890	(0,1375-0,2574)	ns
		B4	114	0,6477	(0,5781-0,7181)	87	0,5305	(0,4572-0,6087)	*
3	RM22	C1	87	0,4728	(0,4042-0,5476)	67	0,3681	(0,3032-0,4426)	*
		C2	36	0,1957	(0,1457-0,2604)	29	0,1593	(0,1141-0,2208)	ns
		C3	31	0,1685	(0,1221-0,2305)	73	0,4011	(0,3345-0,4762)	*
		C4	30	0,1630	(0,1174-0,2245)	12	0,0659	(0,0386-0,1123)	*
		C5	0	0,0000	(0,0001-0,0198)	1	0,0055	(0,0013-0,0302)	*
5	OG 61	D1	61	0,3675	(0,2998-0,4457)	68	0,3953	(0,3273-0,4726)	ns
		D2	15	0,0904	(0,0561-0,1447)	30	0,1744	(0,1259-0,2395)	*
		D3	24	0,1446	(0,0999-0,2074)	30	0,1744	(0,1259-0,2395)	ns
		D4	12	0,0723	(0,0424-0,1229)	16	0,0930	(0,0586-0,1467)	*
		D5	8	0,0482	(0,0251-0,0927)	25	0,1453	(0,1012-0,2070)	*
		D6	4	0,0241	(0,0099-0,0605)	3	0,0174	(0,0064-0,0510)	ns
		D7	16	0,0964	(0,0608-0,1518)	0	0,0000	(0,0001-0,2120)	*
		D8	24	0,1446	(0,0999-0,2074)	0	0,0000	(0,0001-0,2120)	ns
		D9	2	0,0120	(0,0037-0,0428)	0	0,0000	(0,0001-0,2120)	ns
7	RM11	E1	36	0,2195	(0,1641-0,2907)	40	0,2597	(0,1983-0,3365)	ns
		E2	30	0,1829	(0,1322-0,2507)	40	0,2597	(0,1983-0,3365)	*
		E3	16	0,0976	(0,0616-0,1536)	6	0,0390	(0,0185-0,0829)	*
		E4	33	0,2012	(0,1481-0,2708)	24	0,1558	(0,1079-0,2230)	ns
		E5	18	0,1098	(0,0712-0,1679)	3	0,0195	(0,0071-0,0559)	*
		E6	26	0,1585	(0,1114-0,2236)	41	0,2662	(0,2042-0,3434)	*
		E7	5	0,0305	(0,0135-0,0697)	0	0,0000	(0,0002-0,0237)	*
8	OS30	F1	17	0,1977	(0,1290-0,2975)	2	0,0152	(0,0047-0,0537)	*
		F2	69	0,8023	(0,7155-0,8804)	130	0,9848	(0,9585-0,9982)	*
9	OG81	G1	5	0,0333	(0,0148-0,0761)	7	0,0407	(0,0227-0,0914)	*
		G2	61	0,4067	(0,3336-0,4898)	54	0,3140	(0,2816-0,4316)	ns
		G3	28	0,1867	(0,1335-0,2584)	41	0,2384	(0,2042-0,3434)	*
		G4	34	0,2267	(0,1682-0,3021)	49	0,2849	(0,2515-0,3980)	*
		G5	22	0,1467	(0,998-0,2136)	21	0,1221	(0,0917-0,2009)	ns
10	RM228	H1	20	0,1220	(0,0810-0,1820)	9	0,0625	(0,0316-0,1080)	ns
		H2	56	0,3415	(0,2750-0,4195)	72	0,5000	(0,3931-0,5495)	ns
		H3	14	0,0854	(0,0521-0,1391)	3	0,0208	(0,0071-0,0559)	ns
		H4	44	0,2683	(0,2077-0,3430)	34	0,2361	(0,1637-0,2946)	ns
		H5	18	0,1098	(0,0712-0,1679)	15	0,1042	(0,0606-0,1556)	ns
		H6	12	0,0732	(0,4929-0,1243)	11	0,0764	(0,0409-0,1242)	ns
11	RM224	I1	12	0,0769	(0,0451-0,1306)	5	0,0329	(0,0146-0,0751)	*

	I2	42	0,2692	(0,2072-0,3460)	35	0,2303	(0,1717-0,3054)	ns	
	I3	37	0,2372	(0,1785-0,3118)	22	0,1447	(0,0984-0,2109)	*	
	I4	43	0,2756	(0,2130-0,3528)	69	0,4739	(0,3795-0,5366)	*	
	I5	4	0,0256	(0,0105-0,0643)	10	0,0658	(0,0367-0,1177)	*	
	I6	5	0,0321	(0,0142-0,0732)	6	0,0395	(0,0187-0,0835)	ns	
	I7	12	0,0769	(0,0451-0,1305)	3	0,0197	(0,0072-0,5660)	ns	
	I8	1	0,0064	(0,0016-0,0352)	2	0,0131	(0,0041-0,0467)	ns	
12	RM235	J1	60	0,3371	(0,2733-0,4116)	55	0,3274	(0,2917-0,4436)	ns
		J2	3	0,0169	(0,0062-0,0485)	11	0,0655	(0,0415-0,1258)	*
		J3	5	0,0281	(0,0125-0,0643)	34	0,2024	(0,1659-0,2983)	*
		J4	78	0,4382	(0,3695-0,5144)	55	0,3274	(0,2917-0,4436)	ns
		J5	32	0,1798	(0,1312-0,2442)	13	0,0774	(0,0513-0,1418)	*

Tabela 2. Valores de Heterozigosidade esperada (H_e), Heterozigosidade observada (H_o), Coeficiente de endogamia de Fisher (f), para cada um dos primers estudados nos ciclos 0 e 2 da população de arroz CNA-7, e cromossomos onde os primers estão localizados (Crom.), segundo literatura (www.gramene.org e Brondani et al., 2001).

Crom.	Primer	Ciclo 0			Ciclo 2		
		H_e	H_o	f	H_e	H_o	f
2	OG 19	0,46	0,36	0,21	0,54	0,40	0,26
2	OG17	0,53	0,23	0,57	0,61	0,43	0,30
3	RM22	0,69	0,53	0,23	0,68	0,49	0,27
5	OG 61	0,80	0,48	0,40	0,76	0,70	0,08
7	RM11	0,84	0,73	0,12	0,77	0,55	0,30
8	OS30	0,32	0,07	0,78	0,03	0,00	1,00
9	OG81	0,73	0,61	0,16	0,75	0,58	0,23
10	RM228	0,78	0,73	0,06	0,68	0,56	0,18
11	RM224	0,79	0,64	0,19	0,72	0,61	0,16
12	RM235	0,66	0,60	0,10	0,74	0,45	0,39
	Média	0,66	0,50	0,28	0,63	0,48	0,32

Considerações finais

Durante a condução do melhoramento populacional o monitoramento das populações ao longo dos ciclos é de grande importância uma vez que permite quantificar e tipificar as alterações ocorridas no processo. Esse conhecimento possibilita o ajuste da metodologia, caso necessário, e ajuda a embasar decisões adotadas dentro do programa. Além disso, informações geradas podem servir de base para outros programas de melhoramento que utilizam metodologia similar.

Na população CNA-7 foi monitorado o ganho com seleção realizado ao longo dos ciclos 0, 1 e 2 para a resistência à brusone (Capítulo 1).

O objetivo dessa análise foi o de avaliar o progresso gerado pela seleção durante a condução da população. Descrevendo-a resumidamente, essa metodologia de seleção consistia na utilização de réplicas das famílias $S_{0:2}$, avaliadas em experimentos distintos para brusone na folha (BI) e para brusone no pescoço da panícula (NBI). Esses experimentos distintos procuravam fazer coincidir a época de maior infestação da doença no campo com a época de maturação da planta onde ela era mais suscetível a tal doença. No final, a seleção era feita para as famílias que apresentavam resistência total - nota menor que 3, na escala padrão do IRRI (IRRI, 1988) tanto a BI como a NBI. A teoria na qual essa estratégia de seleção estava embasada era que se a seleção fosse realizada dessa maneira, mesmo se os genes de resistência para uma ou outra característica (BI ou NBI) fossem distintos, essa metodologia estaria favorecendo a seleção de todos eles.

O ganho com seleção, significativos para a resistência a brusone na folha (BI) e não significativos para brusone no pescoço da panícula (NBI), indicaram que a estratégia de seleção adotada deve ser repensada para uma característica. Ou seja, os próximos trabalhos devem elaborar novas estratégias de seleção, pelo menos para conseguir incrementar a resistência à brusone no pescoço da panícula. Em

sendo essa a estratégia escolhida, algum procedimento estatístico ou de experimentação deve ser aperfeiçoado de maneira que diferenças menores possam ser detectadas. Na discussão do Capítulo 1, foram citados alguns autores que propõem alternativas para a análise dos dados.

Em termos metodológicos, a contribuição dos experimentos relatados no Capítulo 1 foi para auxiliar na compreensão que a análise de dados de resistência em termos de % de plantas resistentes foi mais eficiente do que as análises em termos de média.

Outro monitoramento realizado foi com relação à diversidade genética existente nas populações de arroz PFD-1 e CNA-7 (Capítulos 2 e 3). Em resumo, pode-se dizer que essas duas populações eram, uma do programa de melhoramento genético de arroz de terras altas da Embrapa Arroz e Feijão, no Brasil, a CNA-7, e a outra do programa de melhoramento de arroz irrigado da Fundación para Investigación Agrícola DANAC, na Venezuela. As duas populações estudadas diferiam entre si nos seguintes aspectos: 1) A CNA-7 era uma população de terras altas enquanto que a PFD-1 era de arroz irrigado; 2) a CNA-7 foi formada pela união de duas populações e mais o cruzamento com 20 genitores que apresentavam resistência à brusone enquanto que a PFD-1 foi formada pelo cruzamento de 5 genitores com diversas características de interesse a uma população com adaptabilidade local; 3) a população CNA-7 foi selecionada para resistência à brusone ao longo de 2 ciclos de seleção enquanto que a população PFD-1 foi selecionada até o 1 ciclo de recorrência para diversas características simultaneamente.

Para a análise de diversidade dessas populações, contou-se com a estrutura e o apoio dos coordenadores do Laboratório de Genética Molecular da Embrapa Arroz e Feijão, em Goiânia, e do Laboratório de Genética do CIBA, na “Universidad Central de Venezuela”, em Maracay. A metodologia utilizada para ambos os estudos foi similar. O que variou de um estudo para outro, foi a relação dos *primers* utilizados.

Apenas em alguns casos eles coincidiram. Em ambos os casos, foram 10 primers utilizados. Os resultados, foram apresentados em capítulos distintos. Pode-se afirmar, entretanto, que tanto para a população CNA-7 como para a população PFD-1 a análise de diversidade em termos de número de heterozigosidade esperada (diversidade de Nei) demonstrou que o efeito de ciclos não foi suficiente para alterar os valores encontrados, ou seja, a diversidade se manteve ao longo dos ciclos.

Em termos de números de alelos/locos, as duas populações mostraram-se com um nível de variabilidade significativo para serem mantidas nos programas de melhoramento tal como se apresentaram, sem haver necessidade de serem cruzados a outros genitores. Nem mesmo a perda de alguns alelos, de um ciclo a outro, mostra-se significativamente importante para que alguma ação diferente fosse adotada.

Quanto ao nível de endogamia (f) encontrou-se na população PFD-1 um valor de 0,40 para o ciclo 0 e de 0,36 para o ciclo 1; enquanto que na população CNA-7 esses valores foram de 0,28 e 0,32 para os ciclos 0 e 2. Esses valores revelam que a quantidade de homozigotos em ambas as populações foram mais altas do que as proporções esperadas, caso os cruzamentos estivessem sendo realizados de maneira totalmente ao acaso.

Conclusão

- Houve progresso genético para resistência à brusone na folha (BI) ao longo dos ciclos 1 e 2 da população de arroz de terras altas da Embrapa Arroz e Feijão, a CNA-7.
- Não foi possível detectar ganho genético para a característica brusone no pescoço da panícula (NBI), ao longo de todos os ciclos de seleção da população CNA-7 da Embrapa Arroz e Feijão, embora em alguns casos tenha sido percebido um incremento da resistência comparado-se diretamente os ciclos 0 e 2
- A variabilidade genética na população de arroz de terras altas CNA-7, da Embrapa Arroz e Feijão, foi mantida ao longo dos ciclos 0 e 2 de seleção, quando avaliada em termos da diversidade de Nei, com marcadores microssatélites.
- A variabilidade genética na população de arroz irrigado da Fundación DANAC foi mantida ao longo dos ciclos 0 e 1 de seleção recorrente em termos de diversidade de Nei, quando avaliada por meio de marcadores microssatélites.
- O número de alelos/locos nas populações CNA-7 e PFD-1 indicam que elas apresentam uma grande variabilidade genética, quando comparadas aos dados relatados na literatura.
- Para ambas as populações estudadas foram encontrados mais indivíduos homocigotos do que se esperaria sob a hipótese de panmixia.
- Os resultados permitiram alcançar os objetivos traçados, e estimularam a outras reflexões sobre as metodologias adotadas.