

LETICIA DA SILVEIRA PINHEIRO

**DETERMINAÇÃO DA VARIABILIDADE GENÉTICA NAS POPULAÇÕES DE
SELEÇÃO RECORRENTE DE ARROZ CNA-IRAT 4 E CNA 12 UTILIZANDO
MARCADORES MICROSSATÉLITES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, da Universidade Federal de Goiás, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Agronomia, área de concentração: Genética e Melhoramento de Plantas.

Orientador:
Dr. Claudio Brondani

Goiânia, GO – Brasil
2008

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(GPT/BC/UFG)

Pinheiro, Letícia da Silveira.

P654d Determinação da variabilidade genética nas populações de seleção recorrente de arroz CNA-IRAT 4 e CNA 12 utilizando marcadores microssatélites [manuscrito] / Letícia da Silveira Pinheiro. – 2008.

82 f. : il., figs. , tabs.

Orientador: Prof. Dr. Claudio Brondani.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás. Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos, 2008.

Bibliografia: f.67-75.

Inclui lista de tabelas e figuras.

Anexos

1.Arroz – Variabilidade genética 2. Arroz CNA-IRAT 4 3. Arroz – seleção recorrente 4. Arroz CNA 12 I. Brondani, Claudio II. Universidade Federal de Goiás, Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos. III. Título.

CDU: 575:633. 18

Dedico aos meus pais, Paulo e Beatriz e aos meus irmãos pelo apoio incondicional.
Aos meus queridos orientadores Claudio e Rosana pelos ensinamentos muito além dos acadêmicos.
E aos meus amados amigos que sempre se fizeram presentes em todos os momentos...

AGRADECIMENTOS

À todas as pessoas que me ajudaram a levantar quando eu mais precisei, que não me deixaram desistir apesar de todas as dificuldades enfrentadas por mim nesse ano;

Agradeço à minha família, ao meu pai Paulo, pelo exemplo de pessoa, caráter e amor deixados para mim, nunca será esquecido. À minha querida mãe Beatriz, que sempre me fez voltar a realidade e colocar os pés no chão quando o que eu mais queria era voar longe. Obrigada a vocês dois por tudo;

À minha bolsa de pesquisa concedida pelo CNPq;

Aos meus queridos orientadores Claudio e Rosana Brondani pelo exemplo de profissionalismo e dedicação à pesquisa;

Às minhas duas colegas de mestrado, Daniella e Claudia pelos estudos e pelas risadas;

Aos meus colegas de laboratório que tornaram o local de trabalho algo prazeroso, especialmente aos amigos Ricardo, Robertha, Mara, Priscila, Leciane, Gisele, Arthur e Tereza

Ao funcionário Zezinho que facilitou demais o meu trabalho dentro da Embrapa com suas invenções milaborantes;

Agradeço em especial à amiga Tereza Cristina e Priscila que sempre estiveram dispostas a me ajudar e passar seu conhecimento.

À todos os professores e funcionários da UFG em especial ao meu querido amigo Wellinton sempre disposto a me esclarecer todas as dúvidas burocráticas;

Ao Dr. Paulo Hideo pela grande ajuda na parte prática do meu projeto, compartilhando sua vasta experiência em campo;

Enfim, a todos os amigos que tanto de forma direta quanto indireta contribuíram muito para a realização deste.

Muito Obrigada!

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	8
LISTA DE FIGURAS.....	10
LISTA DE ANEXOS.....	11
RESUMO.....	12
ABSTRACT.....	13
1 INTRODUÇÃO.....	14
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
2.1 O ARROZ (<i>Oryza sativa</i> L.).....	17
2.2 IMPORTÂNCIA ECONÔMICA.....	18
2.3 IMPORTÂNCIA NUTRICIONAL.....	20
2.4 SISTEMAS DE CULTIVO.....	21
2.5 O MELHORAMENTO GENÉTICO DO ARROZ NO BRASIL.....	22
2.5.1 Seleção recorrente em plantas autógamas.....	24
2.5.1.1 Obtenção das progênes ou famílias.....	25
2.5.1.2 Avaliação experimental e seleção das progênes superiores.....	27
2.5.1.3 Recombinação das progênes selecionadas.....	28
2.5.2 Vantagens do uso da seleção recorrente em programas de melhoramento genético.....	28
2.5.3 Programas de seleção recorrente de arroz no Brasil.....	29
2.6 O GENOMA DO ARROZ.....	29
2.7 MARCADORES MOLECULARES.....	30
2.7.1 Marcadores SSR em seleção recorrente.....	33
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	35
3.1 DESENVOLVIMENTO DAS POPULAÇÕES DE SELEÇÃO RECORRENTE CNA-IRAT 4 E CNA12.....	35
3.2 MATERIAL VEGETAL.....	35
3.3 EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO.....	35
3.4 QUANTIFICAÇÃO DO DNA GENÔMICO.....	36
3.5 ANÁLISE MOLECULAR POR MARCADORES SSR.....	37
3.6 CONDIÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO DA PCR.....	37

3.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS.....	38
4	RESULTADOS.....	40
4.1	DETERMINAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA.....	40
4.1.1	Caracterização molecular da população.....	40
4.1.2	Presença de alelos não-esperados.....	43
4.1.3	Manutenção de alelos específicos ao longo dos ciclos de seleção recorrente.....	45
4.1.4	Estimativa do equilíbrio de Hardy-Weinberg.....	48
4.1.5	Distância genética entre os ciclos.....	50
4.2	ANÁLISE DA ESTRUTURA POPULACIONAL.....	54
4.2.1	Estatísticas F de Wright.....	54
4.2.2	Análise de variância molecular (AMOVA).....	55
4.2.3	Análise fatorial de correspondência (AFC).....	55
5	DISCUSSÃO.....	58
5.1	DETERMINAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA.....	59
5.2	ANÁLISE DA ESTRUTURA POPULACIONAL.....	61
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	65
7	CONCLUSÕES.....	66
8	REFERÊNCIAS.....	67
	ANEXOS.....	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Dados de produção de arroz em casca em onze maiores produtores mundiais no ano de 2006 (fonte: FAO, 2006).....	19
Tabela 2.	Marcadores SSR utilizados nas análises das duas populações CNA-IRAT 4 e CNA 12 de seleção recorrente e a localização destes no respectivo cromossomo.....	40
Tabela 3.	Número de alelos/loco e PIC para os marcadores utilizados na análise da população de seleção recorrente CNA-IRAT 4.....	41
Tabela 4.	Número de alelos/loco e PIC para os marcadores utilizados na análise da população de seleção recorrente CNA 12.....	42
Tabela 5.	Alelos não-esperados e sua respectiva frequência presentes na população CNA-IRAT 4.....	44
Tabela 6.	Frequência e número de alelos não-esperados na população CNA 12.....	45
Tabela 7.	Porcentagem da contribuição alélica dos genitores e dos alelos exclusivos dos mesmos ao longo dos ciclos de seleção recorrente das populações CNA-IRAT 4 e CNA 12.....	46
Tabela 8.	Coefficientes de endogamia médio (f), Taxa de cruzamentos aparente (Tap) e tamanho efetivo amostral (N_e) detectados para cada ciclo de seleção recorrente das populações CNA-IRAT 4 e CNA 12.....	47
Tabela 9.	Parâmetros populacionais obtidos para a população CNA-IRAT 4: A: número de alelos, A_e : número de alelos efetivos, H_o : heterozigosidade observada; H_e : heterozigosidade esperada; $H_{m\acute{a}x}$: heterozigosidade máxima.....	48
Tabela 10.	Parâmetros populacionais obtidos para a população CNA 12: A: número de alelos, A_e : número de alelos efetivos, H_o : heterozigosidade observada; H_e : heterozigosidade esperada; $H_{m\acute{a}x}$: heterozigosidade máxima.....	48
Tabela 11.	Heterozigosidade Observada (H_o), Heterozigosidade Esperada (H_e) e as probabilidades do p-valor dos marcadores em cada ciclo de seleção recorrente da população CNA-IRAT 4.....	49
Tabela 12.	Heterozigosidade Observada (H_o), Heterozigosidade Esperada (H_e) e as probabilidades do p-valor dos marcadores em cada ciclo de seleção recorrente da população CNA 12.....	50
Tabela 13.	Distâncias genéticas calculadas a partir do coeficiente de Rogers-W, comparado entre os genitores e os ciclos de seleção recorrente da população CNA-IRAT 4.....	53
Tabela 14.	Distâncias genéticas calculadas a partir do coeficiente de Rogers-W, comparado entre os genitores e os ciclos de seleção recorrente da população CNA 12.....	54

Tabela 15.	Comparação das estatísticas de Wright (Fis, Fst e Fit) entre os ciclos de seleção recorrente na população CNA-IRAT 4.....	54
Tabela 16.	Comparação das estatísticas de Wright (Fis, Fst e Fit) entre os ciclos de seleção recorrente na população CNA 12.....	54
Tabela 17.	AMOVA comparando diferenças entre e dentro dos ciclos de seleção recorrente da população CNA-IRAT 4.....	55
Tabela 18.	AMOVA comparando diferenças entre e dentro dos ciclos de seleção recorrente da população CNA 12.....	55

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Representação esquemática básica de um programa de seleção recorrente. Esquema extraído do livro *Selección Recurrente em Arroz*, cap.1 (Geraldí, 1997)..... 25
- Figura 2.** Dendrograma dos genitores obtido a partir da matriz de distância genética obtida pelo coeficiente de Rogers modificado por Wright (Rogers-W), pelo método de agrupamento UPGMA, com a distância média marcada na população CNA-IRAT 4..... 51
- Figura 3.** Dendrograma dos genitores obtido a partir da matriz de distância genética obtida pelo coeficiente de Rogers modificado por Wright (Rogers-W), pelo método de agrupamento UPGMA na população CNA 12..... 52
- Figura 4.** Dendrograma obtido a partir da matriz de distância genética obtida pelo coeficiente de Rogers modificado por Wright (Rogers-W), pelo método de agrupamento UPGMA, na população CNA-IRAT 4..... 52
- Figura 5.** Dendrograma obtido a partir da matriz de distância genética obtida pelo coeficiente de Rogers modificado por Wright (Rogers-W), pelo método de agrupamento UPGMA, na população CNA 12..... 53
- Figura 6.** Análise fatorial de correspondência e o padrão de distribuição espacial entre os genitores e os ciclos de seleção recorrente da população CNA-IRAT 4. Estão destacados em azul os indivíduos do grupo Ciclo 1, em branco os indivíduos do grupo Ciclo 2 e em cinza os indivíduos do grupo Ciclo 5. Os genitores estão destacados em amarelo correspondentes às letras. A:Colômbia 1; B: IR 36; C: Eloni; D: UPR 103; E: CNA 7; F: BG 90 2; G: Nanicão; H: CNA 3848; I: CNA 3815; J: CNA 3887..... 56
- Figura 7.** Análise fatorial de correspondência e o padrão de distribuição espacial entre os genitores e os ciclos de seleção recorrente da população CNA 12. Estão destacados em azul os indivíduos do grupo Ciclo 1, em branco os indivíduos do grupo Ciclo 2. Os genitores estão destacados em amarelo correspondentes às letras. A: IRGA 417; B: CNA 5287; C: Javaé; D: Diamante; E: CNA 8502; F: Marajó; G: CNA 9020; H: Oryzica 1; I: Taím; J: CNA 8621; L: Formoso; M: CNA 9029; N: Jequitibá; O: Chuí; P: Oryzica Llanos 4; Q: Huan Sen Goo..... 57

LISTA DE ANEXOS

Anexo A.	Desenvolvimento da população de seleção recorrente CNA-IRAT 4.....	77
Anexo B.	Desenvolvimento da população de seleção recorrente CNA 12.....	80

RESUMO

PINHEIRO, L. S. **Determinação da variabilidade genética nas populações de seleção recorrente de arroz CNA-IRAT 4 e CNA 12 utilizando marcadores microssatélites.** 2008. 82 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia: Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2007.¹

Seleção recorrente é um método de melhoramento populacional ainda pouco empregado em espécies autógamas, como o arroz. Contudo, a possibilidade de obter genótipos de ampla base genética e com bons atributos agronômicos, é um atrativo interessante para a implementação de populações de seleção recorrente, sobretudo pela necessidade de utilizar a grande variabilidade genética disponível para enfrentar o desafio de desenvolver cultivares elite mais produtivas e capazes de manter a estabilidade de produção. Foram utilizadas, neste estudo, duas populações de seleção recorrente de arroz irrigado, desenvolvidas pelo programa de melhoramento genético da Embrapa Arroz e Feijão. A população CNA-IRAT 4 portadora do gene da macho-esterilidade genética, permitindo assim que a sua recombinação seja feita à campo, e a população CNA 12 recombinada manualmente através do esquema de cruzamento em dialelo ciculante por não possuir este gene. O objetivo deste trabalho foi avaliar a variabilidade genética entre os ciclos de seleção das duas populações por meio de 14 marcadores SSR. Foram avaliados 180 indivíduos dos ciclos 1, 2 e 5 na CNA-IRAT 4, e ciclos 1 e 2 na CNA 12. O estudo da análise de variância molecular (AMOVA) não indicou nenhum tipo de estruturação entre os ciclos de seleção definindo que a maior parte da variação foi encontrada entre os indivíduos dentro dos ciclos do que entre os ciclos em ambas as populações. Foram identificados alelos não provenientes dos genitores nas duas populações, e em todos os ciclos, principalmente para a CNA-IRAT 4. Estes alelos foram provavelmente resultantes da fecundação indesejada a partir de genótipos que não faziam parte das populações. Os parâmetros Fis e Fit da estatística F de Wright indicaram que a recombinação manual está ampliando a variabilidade genética da população CNA 12, enquanto que a recombinação via gene da macho-esterilidade está reduzindo a variabilidade genética da CNA-IRAT 4, e o principal motivo é que os cruzamentos dirigidos estão promovendo uma maior combinação entre os alelos de todos os genitores, enquanto que a polinização via macho-esterilidade vêm privilegiando os alelos dos genótipos com maior porte e capacidade de produção de pólen e do macho-estéril. Para evitar a deriva genética na CNA-IRAT 4, genótipos de arroz geneticamente divergentes das progênes, com maior Capacidade Geral de Combinação e com bons atributos agronômicos, deverão ser introduzidos nesta população.

Palavras-chave: seleção recorrente, variabilidade genética, marcador microssatélite, *Oryza sativa*.

¹ Orientador: Dr. Claudio Brondani. Embrapa Arroz e Feijão.

ABSTRACT

PINHEIRO, L. S. **Determination of the genetic variability in rice populations of recurrent selection CNA-IRAT 4 and CNA 12 using microsatellites markers.** 2008. 82 f. Dissertation (Master in Agronomy: Genetic and Plant Breeding) – Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2007.¹

Recurrent Selection is a population inbreed method that is not traditionally used in autogamous species as rice. However, it is still an interesting methodology to the implementation of recurrent selection populations, due to the possibility of obtaining genotypes with wide genetic base and adequate agronomical traits. It is even more attractive when a great genetic variability is easily available, as it is for rice and could be largely used in the development of more productive elite cultivars and with a better production stability even under low input agricultural systems. Two recurrent selection irrigated rice populations, developed by Embrapa Arroz e Feijão, were synthesized using different recombination methods. The CNA-IRAT 4 population was developed in field conditions using male-sterility, while the CNA 12 population originated from manual crosses in a circulant partial diallel scheme. The aim of this work was the evaluation of the genetic variability among cycles of the two recurrent selection populations using fourteen SSR markers. Hundred and eighty genotypes of the cycles 1, 2 and 5 of CNA-IRAT 4 population and cycles 1 and 2 of CNA 12, were evaluated. The AMOVA did not indicate any genetic structure among the cycles of selection, meaning that the greater variation was attributed between individuals within cycles, in both studied populations. Unexpected alleles, which means alleles that not belong to the genetic pool of the genitors, were identified in both populations and in all cycles evaluated, mostly of these alleles were observed on CNA-IRAT 4 population. These alleles were probably a result of undesired crosses of genotypes which did not belong to both populations. Parameters F_{is} and F_{it} of Wright's statistics indicated that the genetic variability of the manually conducted population (CNA 12) were increased while the population using male-sterility recombination (CNA-IRAT 4) were reduced. The mean reason for this particular situation was due to the directionally crosses that promoted a greater combination between the alleles of all genitors, while male-sterility methodology pollination the alleles from plants with major height and more capable of producing more pollen were privileged. To avoid the genetic drift in CNA-IRAT 4, genotypes genetically divergent, with more General Capacity of Combination and with good agronomic attributes, should be introduced on this population.

Key words: recurrent selection, genetic variability, microsatellite marker and *Oryza sativa*

¹ Advisor: Dr. Claudio Brondani. Embrapa Arroz e Feijão.

1 INTRODUÇÃO

Cereais como o arroz, trigo, milho, cevada, soja e aveia provêm a maior parte das calorias consumidas pela população mundial (Jung et al., 2008). O arroz constitui o terceiro grão mais consumido no mundo, alimentando mais da metade da população mundial (Kush, 2005). O gênero *Oryza* é relativamente pequeno com apenas 23 espécies catalogadas, e dessas somente duas são cultivadas, o *Oryza sativa*, disseminada praticamente em todas as regiões do mundo, e *Oryza glaberrima*, exclusiva da África (Vaughan et al., 2003). O processo de domesticação e evolução, iniciado há 9.000 anos na Ásia, acabou levando ao desenvolvimento do arroz cultivado atualmente conhecido. No Brasil, o arroz foi introduzido por volta de 1.550 pelos portugueses, e até meados da década de 1.940, quando iniciaram os programas de melhoramento genético do arroz no Brasil, a introdução de genótipos do exterior provenientes do Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) e *Internacional Rice Research Institute* (IRRI) eram a principal fonte de variabilidade genética (Rangel et al., 1996; Fonseca et al., 2006).

Os programas de melhoramento genético de arroz foram baseados na utilização de um número reduzido de genitores em nível mundial (Rangel et al., 1996) que buscavam priorizar arquitetura moderna para a mecanização do sistema e atributos agronomicamente desejáveis (Fonseca et al., 2006). O uso de poucos genitores para a formação do pool gênico de programas de melhoramento do arroz conduziu a um estreitamento da sua base genética, tornando estes genótipos mais vulneráveis à pragas e estresses abióticos como a seca, e impedindo o surgimento de novas combinações gênicas, o que tem resultado na estagnação nos ganhos genéticos destes programas ao redor de 1% ao ano (Castro et al., 1999), Rangel et al. (1996) relataram o pequeno ganho genético apesar dos inúmeros cruzamentos realizados em trabalhos (Rangel et al., 1992; Soares, 1992). Em contrapartida, estima-se que existam cerca de 120.000 variedades de arroz no mundo (Khush, 1997). O grande desafio dos programas de melhoramento doravante é utilizar esta variabilidade de modo racional, possibilitando ampliar a base genética de genótipos elite de arroz, em um cenário que compreende a necessidade de aumentar a produção, devido ao crescimento

populacional, e redução das áreas agricultáveis, devido à degradação ambiental e crescimento urbano. Como a utilização direta de genótipos exóticos (variedades tradicionais e espécies silvestres) tem como desvantagem a quebra de blocos gênicos selecionados a várias gerações de melhoramento, tem-se proposto a implementação de programas de pré-melhoramento, que visam obter genótipos com base genética ampla, porém sem perder os atributos agronômicos que interessam aos programas de melhoramento. Dentre os métodos de melhoramento que podem ser empregados nos programas de pré-melhoramento, destacam-se os retrocruzamentos e a seleção recorrente.

Programas de seleção recorrente tem sido aplicados para contornar o problema do estreitamento da base genética experimentado por diversas culturas, através da formação de populações variáveis com genitores possuindo características superiores. A seleção recorrente se traduz por ser um processo repetitivo e cíclico de seleções e posterior recombinações das melhores famílias ou progênies. Essas repetições acabam propiciando, teoricamente, o aumento gradativo da frequência dos alelos favoráveis na população, sem que haja a redução da variabilidade genética. Deste modo, a maior frequência destes alelos na população resulta em maior probabilidade de sucesso na extração de linhagens superiores (Borém & Miranda, 2005). O método de melhoramento por seleção recorrente foi inicialmente proposto por Hull (1945), e foi inicialmente empregado em programas de melhoramento do milho, uma espécie alógama, principalmente pela facilidade de obtenção de cruzamentos dirigidos. A seleção recorrente em autógamias passou a ser amplamente empregada no melhoramento genético a partir do descobrimento do gene da macho-esterilidade, o qual facilitou a etapa de recombinação.

Uma das grandes questões surgidas durante a condução das populações de seleção recorrente diz respeito à falta de parâmetros para acompanhar a variabilidade genética ao longo dos ciclos. O acompanhamento do ganho genético para as características avaliadas ao longo dos ciclos tem sido o principal aferidor do melhoramento da população, e apesar de ser muito importante, não é capaz de indicar se os procedimentos adotados para a condução da população estão propiciando o surgimento de novas combinações, ou se a variabilidade genética está sendo exaurida pela intensidade de seleção, ou simplesmente, pela deriva resultante de cruzamentos preferenciais. A utilização de marcadores moleculares permite que o acompanhamento do número e frequência dos alelos, e conseqüentemente, da determinação de parâmetros populacionais, possam aumentar a eficiência dos programas de seleção recorrente. Dentre os marcadores moleculares, a classe

conhecida como SSRs (*Simple Sequence Repeats*) se destaca pelo seu alto conteúdo informativo, ser co-dominante, ter um grande número de locos disponíveis para estudos em arroz, e ser baseada na técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Adicionalmente, os marcadores moleculares ainda podem orientar o processo de escolha dos genitores e a avaliação dos efeitos do gene da macho-esterilidade (Courtois et al., 2003).

O programa de melhoramento populacional por seleção recorrente em arroz no Brasil iniciou em 1990, com o desenvolvimento da população de arroz irrigado CNA-IRAT 4, a qual visa melhorar a média populacional para a produção e qualidade do grão (Rangel & Neves, 2002). Esta população foi obtida a partir do uso do gene da macho-esterilidade, que promove recombinações a campo, cujo comportamento se aproxima de populações de polinização aberta. A CNA-IRAT 4 foi desenvolvida a partir do cruzamento de dez cultivares/linhagens de arroz irrigado da subespécie *Indica*, incluindo o mutante da variedade IR 36, portadora do gene que confere macho-esterilidade às plantas. Diversas populações já foram desenvolvidas através do uso deste gene devido à facilidade das recombinações à campo. Em 2002 foi iniciado o desenvolvimento da população de seleção recorrente CNA 12 (Rangel et al., 2003), através de intercruzamentos entre 16 genitores do sistema de cultivo irrigado, objetivando o melhoramento populacional e extração de linhagens com resistência estável à brusone. Essa população foi sintetizada sem o uso da macho-esterilidade, dependendo única e exclusivamente de recombinações manuais dirigidas.

Esta dissertação objetivou avaliar a variabilidade genética de diferentes ciclos das populações de seleção recorrente CNA-IRAT 4 e CNA 12 por marcadores moleculares SSR, e comparar a eficiência das metodologias de recombinação utilizadas por ambas as populações.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O ARROZ (*Oryza sativa* L.)

A espécie *Oryza sativa* é uma angiosperma monocotiledônea pertencente ao gênero *Oryza*, classificada na tribo Oryzeae, subfamília Oryzoideae e família Gramineae (Watanabe, 1997). Esta espécie possui caules ocos, flores reduzidas de cor verde e aquênios especializados ou cariopses como frutos (Pinheiro, 1999). O gênero *Oryza* possui apenas duas espécies de arroz cultivado, sendo elas *Oryza sativa* L. ($2n=24$; AA), distribuída no mundo inteiro, e *Oryza glaberrima* Steud. ($2n=24$; AA), disseminada no oeste africano, sendo ambas diplóides (Chang, 1976; Vaughan, 1994; Watanabe, 1997). Existem 21 espécies silvestres do gênero *Oryza*, das quais nove são conhecidamente tetraplóides, as demais são espécies diplóides, espalhadas nos continentes africano, asiático, americano e em território australiano (Watanabe, 1997).

O gênero *Oryza* surgiu provavelmente há cerca de 130 milhões de anos (Khush, 1997), disseminado no período da Gondwanaland, o super continente deu origem a Ásia, África, Américas, Austrália e Antártica (Watanabe, 1997). Atualmente as espécies desse gênero estão espalhadas por esses continentes com exceção da Antártica. O provável ancestral silvestre do arroz cultivado foi o *O. rufipogon*, do tipo perene. Ao tipo anual dessa espécie silvestre foi dado o nome de *O. nivara*, que foi domesticado na Ásia, até dar origem ao arroz cultivado atualmente conhecido. A espécie *O. glaberrima* provavelmente surgiu da espécie perene *O. longistaminata* que devido à domesticação do tipo anual, chamado *O. breviligulata*, deu origem ao *O. glaberrima*, na África. Acredita-se que o processo de evolução dessas duas espécies cultivadas de arroz ocorreram de forma paralela (Khush, 1997).

O processo de domesticação do arroz provavelmente teve início há cerca de 9000 anos (Khush, 1997; Watanabe, 1997). O centro de origem da espécie cultivada *O. sativa* inclui o Paquistão, China e Indonésia, enquanto para *O. glaberrima*, os primeiros

registros de sua domesticação datam de 1500 anos a.C. (Khush, 1997; Watanabe, 1997), cujo centro de origem ocorreu no oeste do continente africano. O arroz hoje vem sendo produzido em mais de 113 países (FAO, 2006).

Como resultado do processo de domesticação da espécie *O. sativa* às variações ambientais e à seleção entre diferentes áreas de cultivo por milhares de anos, a maior parte das cultivares podem ser classificadas em duas importantes subespécies de arroz *Oryza sativa* ssp. *Indica* e *Oryza sativa* ssp. *Japônica* (Chen et al., 1994; Pinheiro, 1999). Posteriormente, em 1950, as subespécie *Javânica* foi adicionada a esta classificação. Segundo o sistema de classificação morfológico de Oka (1958), corroborado através de testes por marcadores enzimáticos realizado por Glaszmann et al. (1984), *Japônica* e *Javânica* não são consideradas subespécies diferentes, mas sim componentes de um mesmo grupo varietal, sendo o grupo *Japônica* o componente de clima temperado e o *Javânica* o componente tropical (Matsuo et al., 1997; Pinheiro, 2006). A subespécie *Indica* é um grupo de arroz irrigado com ampla distribuição tropical e sub-tropical, disseminado por praticamente toda Ásia tropical e domina o sul da Índia enquanto a subespécie *Japônica* está distribuída em regiões de clima temperado e áreas elevadas do sul e sudeste asiático, Indonésia, bem como em regiões fora da Ásia, com na África, América do Norte, Europa e América do Sul (Jung et al., 2008). O grupo *Javânica* compreendem as variedades *bulu* e *gundil* cultivadas na Indonésia (Pinheiro, 1999; Pinheiro, 2006). As subespécies *Indica* e *Japônica* se diferenciam tanto em aspectos fisiológicos quanto morfológicos, sendo a diferença mais visivelmente marcante se deve ao tipo de grão. Os grãos da subespécie *Indica* são mais longos e finos e o seu sistema de cultivo no Brasil é predominantemente irrigado, enquanto *Japônica* apresenta os grãos mais curtos, de formato mais arredondado, cujo sistema de cultivo no Brasil é predominantemente de sequeiro (Khush, 1997; Pinheiro, 1999; 2006).

2.2 IMPORTÂNCIA ECONÔMICA

O arroz é um dos cereais mais consumidos no mundo (Khush, 1997; Tanksley & McCouch, 2001), o que acaba conferindo a esta cultura grande importância econômica. Mais de 90% de todo o arroz é produzido e consumido na Ásia, onde 60% de toda a população mundial vive. Em países como Bangladesh, Camboja, Laos e Mianmar, o arroz fornece mais de 70% das calorias diárias consumidas por pessoa. Na China e na Índia, esse

mesmo valor cai para 40% devido ao consumo de trigo ser mais intenso em algumas partes desse país. O arroz ocupa atualmente 11% de toda a terra cultivada, é o terceiro grão mais produzido no mundo (atrás somente do trigo e milho). Contudo, considerando apenas o consumo exclusivamente humano, o arroz é o grão mais produzido (Khush, 1997).

A produção de arroz em 2006 foi de quase 635 milhões de toneladas (Tabela 1). Apesar do arroz ser cultivado em todos o mundo, 90% da produção e do consumo mundial está concentrada no continente asiático (Ferreira et al., 2006), sendo a China o maior produtor mundial deste cereal, cuja produção atual ultrapassa 184 milhões de toneladas, seguido da Índia, com 136 milhões de toneladas anuais (IRRI, 2007). Indonésia, Bangladesh, Vietnam, Tailândia, Myanmar, Filipinas, Brasil, Japão e Estados Unidos completam a lista dos maiores produtores de arroz. O Brasil ocupa atualmente o 9º lugar nesta cadeia, com uma produção superior a 11,5 milhões de toneladas, superando em produção o Japão, um dos maiores consumidores deste grão (FAO, 2006).

Tabela 1. Dados de produção de arroz em casca em onze maiores produtores mundiais no ano de 2006.

País	Produção (milhões de toneladas)
China	184,07
Índia	136,51
Indonésia	54,40
Bangladesh	43,73
Vietnam	35,83
Tailândia	29,27
Mianmar	25,20
Filipinas	15,33
Brasil	11,51
Japão	10,70
Estados Unidos	8,79
Total	555,32

Fonte: FAO (2006).

Em muitos países está previsto para a próxima década uma diminuição desta produção, devido principalmente à escassez de água associados à intensa urbanização de alguns países o que não irá conseguir atender à demanda mundial necessária. A produção asiática cresceu somente 1% ao ano na década de 90, enquanto a produção da América do

Sul cresceu somente 3,2% ao ano (Ferreira et al., 2006). E um dos maiores e mais urgentes desafios atuais para o melhoramento genético se torna o aumento da produção mundial por meio da obtenção de ganhos de produtividade.

Apenas 5,2% de todo o arroz produzido no mundo é comercializado internacionalmente (Khush, 1997; Ferreira et al., 2006), sendo a Tailândia a maior exportadora de arroz e os principais mercados importadores compreendem África, Oriente Médio e Extremo Oriente. Em âmbito nacional, segundo Breseghello et al. (1999), a produção brasileira não é suficiente para suprir o consumo interno sendo necessária também a importação do produto, principalmente da Argentina e Uruguai. Desde o começo da década de 90, a produção de arroz no Brasil foi sempre menor que o seu consumo, mostrando um déficit médio de 1,3 milhões de toneladas (Ferreira et al., 2006), fazendo com que a demanda interna tenha que ser complementada em mais de 10%.

2.3 IMPORTÂNCIA NUTRICIONAL

Cereais como o milho, trigo e o arroz constituem a base alimentar da população mundial, contribuindo com cerca de metade da ingestão de carboidratos e proteínas. O grão de arroz contribui, respectivamente, com 20% e 15% do consumo mundial de energia e proteína. Em países mais pobres da Ásia, esses valores são mais altos, correspondendo a aproximadamente 65% do consumo de carboidratos e 60% da ingestão de proteínas.

O arroz constitui uma excelente fonte de carboidratos, proteínas, vitaminas, sais minerais e fibras. A maior parte do grão de arroz é formada por carboidratos complexos com elevadas concentrações de amido no grão (Bassinelo & Naves, 2006). Quanto maior sua concentração no grão, mais lenta é a liberação de glicose para o organismo, tornando sua absorção gradual, o que acaba oferecendo ao consumidor uma fonte disponível de energia por longos períodos de tempo (Vieira & Carvalho, 1999; Silva et al., 2004). A concentração de proteína no grão é próxima a 7%, e esse conteúdo protéico pode ser influenciado por condições ambientais, como temperatura, umidade, composição e fertilidade do solo e ainda pelo tipo de variedade (Bassinelo & Naves, 2006).

A proteína do grão de arroz é constituída por quatro frações protéicas (albumina, globulina, prolamina e glutelina), contendo os nove aminoácidos essenciais. Apesar da quantidade de aminoácidos ser maior no grão de arroz do que de outros cereais, como o milho e o trigo, ele ainda não supre as necessidades totais diárias. As vitaminas

mais estudadas presentes no arroz são a tiamina (B1), riboflavina (B2) e niacina (Vieira & Carvalho, 1999). Dentre os sais minerais presentes no arroz, destacam-se o ferro e o zinco, além de fósforo e potássio (Vieira & Carvalho, 1999; Bassinelo & Naves, 2006). Assim, o arroz tem relevante papel na nutrição e saúde humana, pois se trata de um cereal capaz de prevenir a desnutrição que ajuda a fortalecer o organismo, evitando doenças debilitantes como a anemia. Além de todos esses benefícios à saúde humana, o arroz ainda contém quantidades desprezíveis de gordura, é livre de colesterol e contém apenas ácidos graxos insaturados que são considerados saudáveis para a dieta humana. É um cereal que não contém glúten e possui pouco sódio em sua composição, tornando-se assim um alimento importante para dietas restritivas (Vieira & Carvalho, 1999).

2.4 SISTEMAS DE CULTIVO

O arroz é uma espécie hidrófila e o processo de evolução e domesticação levaram a sua adaptação às mais variadas condições ambientais. É uma espécie que apresenta dois grandes ecossistemas de cultura, o sistema de várzeas, que compreende o arroz irrigado através de inundações controladas, e o de terras altas, que engloba as variedades sem irrigação e com irrigação suplementar. Na Ásia, o sistema de cultivo mais utilizado é o irrigado, já o arroz de terras altas é bastante cultivado no Brasil e em poucas partes da África (Guimarães et al., 2006). No Brasil, o sistema de cultivo de várzeas é responsável por 69% da produção nacional, sendo a maior parte produzido em clima subtropical. O Rio Grande do Sul aparece com 75,9% da produção nacional de arroz irrigado, seguido pelos Estados de Santa Catarina (12,7%), Tocantins (3,9%) e Mato Grosso do Sul (2,5%). Os demais estados somam apenas 5% do arroz irrigado produzido. O arroz de terras altas é predominante produzido nos estados de Mato Grosso, Pará, Minas Gerais, Goiás, Bahia, São Paulo e Mato Grosso do Sul (Embrapa, 2007).

No Brasil, a área plantada do arroz irrigado corresponde à 45%, e é responsável por mais de 75% da produção total, enquanto o de sequeiro ocupa 54% da área plantada e é responsável por apenas 25% da produção nacional. De 1997 até 2006 foi constatado um pequeno, mas crescente aumento da produção (2,5 milhões de toneladas de arroz irrigado), sem que houvesse um aumento significativo do tamanho da área destinado às plantações, que permaneceram ocupando 1,3 milhões de hectares. O maior rendimento médio destas lavouras ocorreu de forma mais acentuada entre os anos de 2003 a 2006, passando de 5300

kg.ha⁻¹ para 6700 kg.ha⁻¹, predominantemente devido a melhoria no manejo da cultura (Embrapa, 2007).

2.5 O MELHORAMENTO GENÉTICO DO ARROZ NO BRASIL

O arroz foi introduzido no Brasil na época da colonização portuguesa e propagado por todo país com o processo de interiorização. Desde essa época o melhoramento já era usado, mas de uma forma mais intuitiva e menos técnica, em que as sementes eram selecionadas pelos agricultores, privilegiando certos conjuntos de indivíduos que apresentavam características que melhor satisfaziam às suas necessidades (Morais et al., 2006). Esse processo de domesticação e evolução levou ao desenvolvimento das variedades tradicionais, compostas por misturas eventuais de sementes e detentoras de uma importante fonte de variabilidade para a espécie.

Na década de 1960, a revolução verde possibilitou que muitos países atingissem o equilíbrio entre o crescimento populacional e a produção de alimentos, sobretudo pela alteração do tipo de planta e mudança no manejo de culturas como arroz, trigo, milho e soja. Variedades tradicionais de porte alto passaram a ser substituídas por cultivares de porte mais baixo (ou semi-anãs), mais produtivas e responsivas ao uso de adubação. (Young et al., 1996).

Na década de 1980, o potencial produtivo de cultivares oriundas de programas de melhoramento do arroz aumentou cerca de 30%, o que correspondeu a uma taxa de 2,65% de ganho genético ao ano nos programas de melhoramento (Morais et al., 2006). Contudo, observou-se que a partir da década de 1990 o ganho genético dos programas de melhoramento foi reduzido a uma taxa anual de 1,6% ao ano (autores). Segundo Rangel et al. (2003), dois fatores contribuíram para a redução do ganho genético do arroz irrigado o primeiro deles foi em função dos programas de melhoramento priorizarem esforços para o desenvolvimento de cultivares com maior qualidade do grão e resistência à doenças, o segundo deu-se em função do uso de um número limitado e repetido de genitores para a formação de um pool gênico constituído por populações com baixa variabilidade e estreita base genética. Rangel et al. (1996) observaram que apenas dez ancestrais contribuíam com mais da metade (cerca de 68%) do conjunto gênico das cultivares comerciais de arroz irrigado no Brasil. Como resultado, observou-se uma estagnação nos patamares de produtividade e no aumento da suscetibilidade à pragas nas cultivares modernas de arroz.

De acordo com Tanksley & McCouch (1997), estes problemas são comuns a cultivares comerciais oriundas de programas de melhoramento genético de todas as culturas de interesse econômico no mundo todo, incluindo o arroz.

Estima-se que a partir do ano de 2025, sejam necessárias uma média anual de produção de arroz de mais de 800 milhões de toneladas para conseguir acompanhar a demanda mundial (Pignali et al., 1997). Para enfrentar este desafio, uma segunda Revolução Verde certamente deverá ser realizada. Em adição ao aumento da produtividade, o desenvolvimento das novas cultivares deverá priorizar também a alta qualidade nutricional do grão, juntamente com tratos culturais que visem a preservação ambiental e o uso racional dos recursos naturais (Conway & Toenniessen, 1999).

A ampliação da base genética dos genótipos elite de programas de melhoramento genético do arroz é imprescindível para a sustentabilidade desta cultura. Para tornar isso possível é preciso incorporar e administrar convenientemente a variabilidade oriunda de genótipos ampliando a base genética. O direcionamento dos cruzamentos para obtenção de novas combinações alélicas, portanto, é fundamental para que haja sucesso na obtenção de genótipos de arroz melhorados e de ampla base genética. Um dos métodos de melhoramento populacional que visa atingir este objetivo é o de Seleção Recorrente, o qual foi proposto inicialmente por Hull (1945), e tem por princípio a maximização dos intercruzamentos entre genótipos, e por consequência, a maximização da recombinação. A seleção recorrente é um método de melhoramento populacional baseado em ciclos contínuos de seleção e intercruzamentos das melhores famílias, geração após geração, objetivando o aumento da média populacional e o desenvolvimento de linhagens melhoradas com uma ampla base genética. Esse é um método de melhoramento muito usado em espécies alógamas, como por exemplo o milho (Xia et al., 2004; Hinze et al., 2005), principalmente pela facilidade de obtenção dos intercruzamentos. Até o momento, a única cultivar de arroz lançada comercialmente foi a SCS BRS Tio Taka, extraída do segundo ciclo de seleção da população CNA-IRAT 4 (Rangel et al., 2007).

Em arroz, a seleção recorrente passou a ser mais amplamente utilizada com o descobrimento do gene da macho-esterilidade. Este gene foi identificado por Singh & Ikehashi (1981) e descoberto através de um mutante da variedade IR 36. Este é um gene recessivo (*ms*), que em homozigose (*ms/ms*) resulta na macho-esterilidade, definida como uma falha da planta em produzir anteras, pólen ou gametas masculinos funcionais. Deste

modo, plantas macho-estéreis são incapazes de produzir sementes através da autofecundação (Chattel & Guimarães, 1997).

2.5.1 Seleção recorrente em plantas autógamas

Por definição, seleção recorrente é qualquer sistema que aumente de forma gradativa a frequência de alelos desejados para características quantitativas por meio de ciclos repetidos de seleção, sem que haja redução significativa na variabilidade genética da população (Borém & Miranda, 2005). Segundo Fehr (1987) a seleção recorrente pode ser definida como a seleção sistemática de indivíduos desejáveis de uma população, seguida pela recombinação dos indivíduos selecionados para formar a nova população com o objetivo de aumentar as frequências dos alelos favoráveis, mantendo também a variabilidade genética. De acordo com Geraldi (1997) seleção recorrente é um processo sistemático de seleção de indivíduos dentro de uma população geneticamente heterogênea, seguido da recombinação dos indivíduos selecionados para formar uma nova população, a qual pode ser utilizada para iniciar um novo ciclo de seleção, podendo se estender por diversos anos.

A fim de observar o comportamento alélico de uma população de seleção recorrente em vários ciclos de seleção, Geraldi (1997) realizou uma simulação considerando uma população hipotética em processo de seleção recorrente por dez ciclos. Nesta simulação foi constatado sucesso e eficiência no incremento da frequência dos alelos favoráveis e, conseqüentemente, a diminuição da frequência dos alelos desfavoráveis. O progresso de seleção também foi medido de um ciclo para outro e observou-se que a partir do quinto ciclo, o progresso de seleção foi baixo, não compensando o trabalho nem o tempo adicional necessário para completar os ciclos subseqüentes. O mesmo autor concluiu que não seria vantajoso utilizar mais de três ciclos de seleção recorrente antes de se iniciar o processo de endogamia para a obtenção de linhagens nessas populações.

A utilização da seleção recorrente em arroz, de uma espécie preferencialmente autógama, se tornou mais fácil depois do surgimento da macho-esterilidade genética (Singh & Ikehashi, 1981), facilitando a recombinação gênica e tornando a seleção recorrente uma opção perfeitamente viável nos programas de melhoramento genético (Rangel & Neves, 1996). A grande vantagem do uso da macho-esterilidade é a redução do trabalho e recursos financeiros empregados para a realização dos cruzamentos manuais.

Como qualquer método de condução de populações, a seleção recorrente compreende três importantes fases que são conduzidas, repetitivamente, até que a frequência de alelos desejáveis na população atinja níveis satisfatórios (Borém & Miranda, 2005). As fases são: 1) obtenção de progênes; 2) avaliação e seleção destas e 3) recombinação dos genótipos superiores para formação da próxima geração (Figura 1).

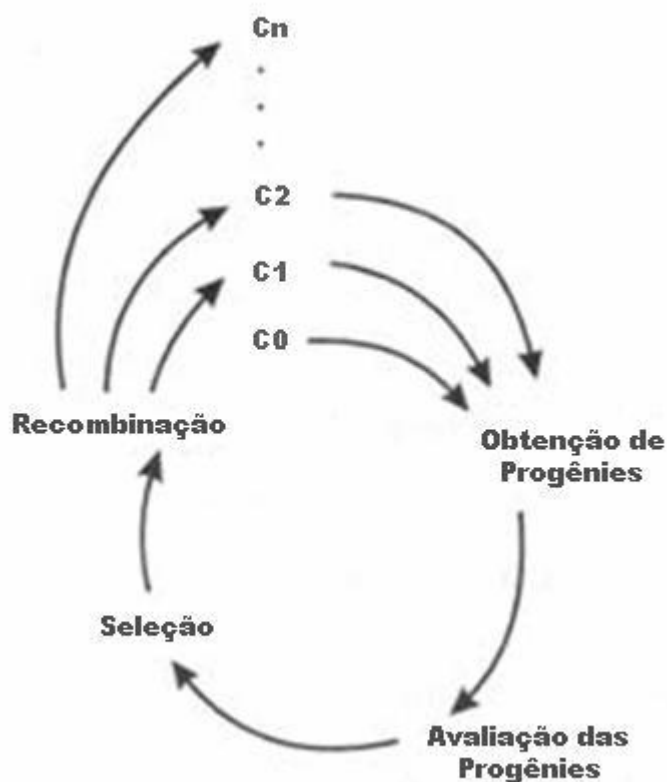


Figura 1. Representação esquemática básica de um programa de seleção recorrente (Gerald, 1997).

2.5.1.1 Obtenção das progênes ou famílias

O sucesso de um programa de seleção recorrente depende basicamente das propriedades da população base e da forma como se aplica a seleção a cada ciclo (Chaves, 1997). Todas as características de uma boa população base dependem única e exclusivamente da seleção das linhagens genitoras. Os genitores devem apresentar um bom comportamento para a característica que está sendo selecionada e serem geneticamente divergentes para maximizar a variabilidade genética. Deve-se usar um número suficiente

de genitores, sem que isso comprometa a média dos caracteres populacionais de interesse, e também realizar um número suficiente de recombinações para que a população entre em equilíbrio de ligação. Uma vez escolhidos os melhores e mais divergentes genitores que formarão a população base, tem-se a garantia de uma recombinação eficiente das mesmas.

Todo processo de seleção recorrente é orientado no sentido de se aumentar a frequência dos alelos favoráveis na população através da seleção do caráter desejado. Segundo Chaves (1997), considerando uma população base, cuja média para rendimento de grãos inicial está representado por X_0 , e gs_1 corresponde ao ganho de seleção referente ao primeiro ciclo, tem-se:

$$X_1 = X_0 + gs_1$$

Na próxima geração:

$$X_2 = X_1 + gs_2$$

$$X_2 = X_0 + gs_1 + gs_2$$

Portanto, em n gerações:

$$X_n = X_0 + gs_1 + gs_2 + \dots + gs_n$$

$$X_n = X_0 + \sum_{i=1}^n gs_i$$

Percebe-se que a média da população inicial, ou base, é um fator fundamental na determinação do resultado final, ou seja, partindo-se de uma população base que apresente uma média populacional adequada, existe uma grande possibilidade de sucesso do programa de seleção recorrente (Chaves, 1997). Esta população base também define as possibilidades de ganho de seleção, pois todos os alelos que serão combinados para formar as gerações subseqüentes estão contidos dentro desta população inicial. Idealmente, deve-se, portanto, aliar uma média adequada associada a um alto índice de variabilidade genética entre os genitores.

A seleção recorrente é um processo que se demanda muito tempo devido às diversas etapas que compõem um ciclo de recombinação. Se a população possui bons parâmetros iniciais, com a formação de uma boa população base, que se apresente geneticamente divergente e possua médias adequadas para a característica sob seleção, o programa de seleção recorrente pode ser mantido por longos períodos de tempo e pode se obter, com grande êxito e sucesso, a produção de linhagens melhoradas com de ampla base genética (Chaves, 1997).

2.5.1.2 Avaliação experimental e seleção das progênes superiores

Esta etapa compreende experimentos com repetições, objetivando selecionar os genótipos superiores resultantes da etapa de recombinação. A seleção é realizada visualmente, por seleção massal ou seleção das progênes. A seleção massal é baseada na escolha individual de genótipos superiores com base no fenótipo da característica de seleção. Esse método funciona muito bem para características que possuam uma alta herdabilidade, pois fica relativamente fácil a distinção visual planta a planta, e é bastante aplicada nos ciclos iniciais. Já, a seleção de progênes ou famílias, é mais utilizada na seleção de características de baixa herdabilidade, que sofrem grande influência ambiental. Nesse método, o valor genético da planta é avaliado de acordo com as características de sua progênie, e são selecionadas famílias e não plantas individuais (Nass et al., 2001).

A avaliação das progênes constitui uma das fases mais críticas do programa, pois impõe limites ao tamanho que as populações de seleção recorrente devem ter. A escolha do número de indivíduos que passam para o próximo ciclo representa uma amostragem da população, estando sujeita a oscilações das frequências gênicas e genotípicas (deriva genética) que podem tanto fixar alelos favoráveis quanto eliminá-los. O tamanho efetivo (N_e), na verdade, não corresponde ao tamanho físico e nem ao número de indivíduos reprodutivamente ativos a serem selecionadas para o desenvolvimento do próximo ciclo (Hallauer & Filho, 1981; Fehr, 1987), e sim uma estimativa relativa que depende do nível de endogamia dos genitores que se inter cruzam e do número de gametas com que cada sexo contribui para a próxima geração (Morais, 1997). À medida que os ciclos de seleção avançam, há um maior efeito da endogamia sobre estas populações, pois aumenta-se a frequência dos locos ocupados por alelos idênticos. Isso acaba se opondo aos objetivos de um programa de seleção recorrente, em que o aumento deve ser feito na frequência dos locos ocupados por alelos favoráveis, mas independentes quanto à origem, assegurando a manutenção da variabilidade dessas populações nos programas de seleção recorrente. A adoção de N_e pequenos possuem uma melhor resposta à seleção devido à maior pressão de seleção aplicada, mas acabam diminuindo progressivamente as frequências dos alelos favoráveis chegando rapidamente, em poucos ciclos, a uma situação em que os ganhos de seleção já não compensam os esforços realizados. Deste modo, o N_e deve ser suficientemente grande, não somente para garantir o progresso na direção que se

deseja, mas também para assegurar a presença dos alelos favoráveis para todas as características de interesse (Morais, 1997).

Geraldi & Souza (2000) sugerem que o número de famílias avaliadas deve ser o maior possível a fim de minimizar a depressão por endogamia causada pela recombinação de um número pequeno de famílias. O tamanho físico da amostragem é uma medida que depende diretamente do tipo de material genético e do coeficiente de endogamia gerado por esta população (Morais, 1997; Geraldi & Souza, 2000). É possível serem feitas estimativas do tamanho efetivo para cada tipo de progênie e, de acordo com Geraldi & Souza (2000), em famílias S_1 o tamanho efetivo populacional ideal seria de duzentas famílias, o que corresponderia à um N_e de cem em progênies de irmãos germanos, e de cinquenta em famílias de meios-irmãos. Moraes (1997) sugere tamanhos efetivos mínimos de cinquenta famílias em programas de melhoramento populacional por seleção recorrente. De acordo com Castro et al. (2000), os programas de seleção recorrente de arroz de sequeiro no Brasil tem utilizado rotineiramente o tamanho efetivo mínimo de cinquenta na seleção das melhores progênies.

2.5.1.3 Recombinação das progênies selecionadas

Depois de avaliadas à campo para determinada característica, as sementes das famílias selecionadas, previamente armazenadas e identificadas como superiores para a característica, sofrem uma geração de intercruzamentos ao acaso se a população possuir o gene da macho-esterilidade, ou através do intercruzamento dirigido, caso a recombinação seja via polinização manual. As sementes resultantes dessas combinações fazem parte da população melhorada e tem-se a formação do primeiro ciclo de seleção recorrente (Geraldi, 1997).

2.5.2 Vantagens do uso da seleção recorrente em programas de melhoramento genético

A seleção recorrente tem sido mais utilizada em espécies alógamas, como o milho, justamente pela facilidade em ser obtida a fecundação cruzada. Em espécies autógamias, em consequência das dificuldades de obtenção das sementes recombinadas, a

adoção desse método depende da disponibilidade da macho-esterilidade ou de outros sistemas que facilitem os cruzamentos (Borém & Miranda, 2005).

A seleção recorrente tem sido utilizada em diversas espécies e para as mais variadas características agronômicas, com pequenas variações metodológicas, dependendo da cultura. No Brasil, a seleção recorrente tem sido empregada em milho (Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – ESALQ e Universidade Federal de Viçosa - UFV), soja (Embrapa Soja), feijão e arroz (Embrapa Arroz e Feijão e UFV).

2.5.3 Programas de seleção recorrente de arroz no Brasil

No Brasil, os programas de seleção recorrente começaram em 1990, com o desenvolvimento da população CNA-IRAT 4. Essa população foi obtida através do uso do gene da macho-esterilidade que permite a recombinação em campo sem a necessidade de cruzamentos manuais dirigidos. Esta população foi desenvolvida através da parceria entre o CIRAD (França) e a Embrapa Arroz e Feijão. A CNA-IRAT 4 foi iniciada pelo intercruzamento de dez cultivares/linhagens do sistema de cultivo irrigado.

Em 2002, a população CNA 12 foi obtida através de intercruzamentos entre 16 genitores objetivando, principalmente, a extração de linhagens com resistência estável à brusone (Rangel et al., 2003). Essa população foi sintetizada sem o uso da macho-esterilidade, dependendo única e exclusivamente de cruzamentos manuais dirigidos. Além destas, novas populações deste sistema de cultivo foram desenvolvidas, como a CNA 1 em 1991, a CNA 5 em 1993, a CNA 11 em 1996, e a CNA 12 em 2002 (Rangel & Neves, 1997; Rangel et al., 2003). Para o arroz do sistema de cultivo de terras altas foram sintetizadas seis populações: CG1, CG2, CG3, CNA6, CNA7 e CNA10. Estas populações são selecionadas quanto a produtividade e qualidade de grãos, resistência à brusone e ao acamamento, precocidade, vigor e resistência à pragas (Castro et al., 1999).

2.6 O GENOMA DO ARROZ

O genoma do arroz (*Oryza sativa*; genoma AA) é composto por 12 cromossomos ($2n=24$), possuindo 430 Mbp (milhões de pares de base), distribuídos em aproximadamente 1.500 cM (Kurata et al., 1994; Harushima et al., 1998). O arroz vem sendo extensivamente estudado por geneticistas moleculares e constitui uma das espécies

de plantas mais bem caracterizadas até hoje, sendo considerada uma planta modelo para as demais espécies de gramíneas, particularmente cereais (Jung et al., 2008).

O sequenciamento do genoma estrutural do arroz foi concluído em 2005, sendo o primeiro cereal a ter seu genoma completo sequenciado (IRGSP, 2005). O arroz possui um genoma pequeno quando comparado ao de outras culturas de importância alimentar. Seu tamanho é um sexto menor que o genoma do milho (3.000 Mpb) e quarenta vezes menor que o genoma do trigo (16.000 Mpb) (Feuillet & Keller, 2000; Jung et al., 2008). Dados recentes obtidos com o sequenciamento do genoma estrutural do arroz indicaram a presença de 55.278 genes, dos quais 33.882 foram caracterizados, validados e disponibilizados publicamente (IRGSP, 2005).

2.7 MARCADORES MOLECULARES

Segundo Borém & Miranda (2005), marcadores genéticos são quaisquer características, processos bioquímicos ou fragmentos de DNA que permitem a distinção de indivíduos geneticamente diferentes. Os primeiros marcadores desenvolvidos foram os marcadores morfológicos, baseados em características visuais ou fenotípicas da planta, utilizados até a década de 1960 (Ferreira & Grattapaglia, 1998). Devido ao pequeno número de marcadores morfológicos disponíveis, a utilização restrita a poucas espécies de plantas e a baixa detecção de marcas polimórficas, esta classe de marcadores não foi adotada por geneticistas, mas representou uma significativa contribuição para o desenvolvimento teórico de análise de ligação e para as primeiras versões de mapa de ligação. Um grande avanço na tecnologia de marcadores foi o surgimento e desenvolvimento de descritores bioquímicos e enzimáticos para a caracterização do germoplasma (Ferreira & Grattapaglia, 1998; Zimmer et al., 2005). Isso possibilitou uma ampliação do número de marcadores até então disponíveis, e a aplicabilidade quando da técnica pôde ser repassada potencialmente para quase todas as espécies de plantas. Foram marcadores utilizados de modo limitado, pois apesar de apresentarem um maior polimorfismo e aplicabilidade comparado aos marcadores morfológicos, ainda não representaram um avanço suficientemente grande a ponto de se tornar uma ferramenta usual dentre os métodos de melhoramento. Com o avanço e desenvolvimento de técnicas da biologia molecular, foi proposta a detecção de polimorfismo genético diretamente em

nível de DNA, ou seja, os fragmentos de DNA passaram a ser usados como marcadores genéticos para monitoramento da segregação cromossômica (Borém & Miranda, 2005).

Os primeiros marcadores moleculares utilizavam fragmentos de DNA formados a partir da digestão do DNA por enzimas de restrição, dando origem a classe de marcadores denominada RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*). Este marcador detecta o polimorfismo no comprimento dos fragmentos de DNA digeridos. Uma vantagem deste tipo de marcador é a possibilidade de se acessar diretamente o genótipo do indivíduo, evitando a expressão do fenótipo e a influência do ambiente. Esses marcadores permitiram uma maior amostragem do genoma, não ficando limitados apenas às regiões ativas na expressão gênica, além de apresentarem um maior nível de polimorfismo associado a cada loco avaliado. Tal fato tornou estes marcadores bastante interessantes para a construção de mapas genéticos e estudos de diversidade genética (Borba, 2007).

A tecnologia da reação de polimerase em cadeia, também conhecida como PCR (*Polymerase Chain Reaction*), desenvolvida por Kary Mullis em 1987 (Mullis & Faloona, 1987) causou uma verdadeira revolução na biologia devido à facilidade, rapidez e versatilidade de seu uso (Ferreira & Grattapaglia, 1998). A PCR é uma técnica poderosa, capaz de produzir grandes quantidades de DNA de segmentos específicos do genoma a partir de quantidades mínimas de DNA. Essa técnica envolve a síntese enzimática *in vitro* de milhões de cópias de um segmento específico de DNA na presença da enzima DNA polimerase, permitindo a análise diretamente em géis de eletroforese através de corantes específicos para DNA (brometo de etídio, nitrato de prata). Atualmente existe uma infinidade de marcadores moleculares baseados nesta técnica, altamente polimórficos, informativos e de fácil obtenção para qualquer espécie vegetal. Os marcadores atualmente mais utilizados baseados nesta técnica estão o RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) (Williams et al., 1990; Welsh & McClelland, 1990), microssatélites ou SSR (*Simple Sequence Repeats*) (Litt & Luty, 1989; Weber & May, 1989) e os AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) (Zabeau, 1993).

Marcadores do tipo RAPD utilizam um oligonucleotídeo (*primer*) sintético como iniciador do processo de amplificação, cujo polimorfismo ocorre com a presença ou ausência de bandas discretas de DNA (Borém & Miranda, 2005), sendo, portanto de expressão dominante. Marcadores dominantes são mais limitados, pois a detecção dos indivíduos heterozigotos se torna mais difícil. Borba (2007) recomenda uma otimização bastante cuidadosa das condições experimentais, para que desta forma, os resultados sejam

mais confiáveis e reproduzíveis. Contudo, marcadores RAPD são eficientes e adequados para amostrar polimorfismo de DNA amplamente distribuídos no genoma (Ferreira & Grattapaglia, 1998; Borém & Miranda, 2005), podem ser utilizados em estudos de caracterização e diversidade de populações. Comparada ao RFLP, o RAPD é uma técnica relativamente simples e rápida, aonde se requer poucas quantidade de DNA, menos mão-de-obra e não envolve o uso de sondas radioativas. Marcadores RAPD podem facilmente ser convertidos em marcadores SCAR (*Sequence Characterized Amplified Regions*) (Paran & Michelmore, 1993), de expressão co-dominante. Estes marcadores são altamente específicos e não apresentam os problemas de reprodutibilidade do RAPD. Os marcadores AFLP, assim como o RAPD, são de expressão dominante. É um marcador que combina a especificidade, resolução e poder de amostragem da digestão com enzimas de restrição, com a velocidade e praticidade de detecção do polimorfismo via PCR. É uma técnica que vem sendo muito utilizada para obtenção de *fingerprinting*, mapeamento genético principalmente de espécies de plantas cultivadas que são populações que apresentam baixa variabilidade genética o que acaba mostrando pouco polimorfismo. A maior limitação desse marcador é o baixo conteúdo de informação genética por loco e a necessidade do DNA extraído ser de boa qualidade (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Nos últimos anos os marcadores moleculares microssatélites ou SSR (*Simple Sequence Repeats*) têm sido extensivamente usados na análise genética de diversos organismos. Em plantas, estudos mostraram que sítios de microssatélites são largamente distribuídos com uma frequência de uma a cada cinquenta mil pares de bases (Ferreira & Grattapaglia, 1998). São marcadores atrativos por serem codominantes (é possível separar homozigotos e heterozigotos), são multialélicos, possuem o mais elevado conteúdo de informação de polimorfismo (PIC), requerem quantidades mínimas de DNA e de fácil utilização para o arroz (McCouch et al., 1997; Olufowote et al., 1997; Nagaraju et al., 2002), além de serem baseados na técnica de PCR (Ferreira & Grattapaglia, 1998; Zimmer et al., 2005). Os SSR são muito freqüentes e possuem ampla distribuição pelo genoma de todas as espécies existentes, o que permite uma cobertura quase completa de qualquer genoma eucarioto (Ferreira & Grattapaglia, 1998). Para o arroz, estão disponíveis mais de três mil marcadores SSR na base de dados Gramene (www.gramene.org), permitindo a escolha de marcadores com maior potencial informativo e, ao mesmo tempo, com ampla dispersão no genoma. Os marcadores SSR são amplamente usados em estudos de determinação da variabilidade genética e caracterização de germoplasma (McCouch et al.,

1997; Ni et al., 2002; Ravi et al., 2003), identificação de genótipos e obtenção de *fingerprintings* (Djè et al., 1999; Cho et al., 2000), estimação da distância genética entre populações e materiais melhorados (Ren et al., 2003; Garris et al., 2005; Karasawa et al., 2007), análises de estruturação populacional de variedades cultivadas e silvestres (Messeguer et al., 2004; Kuroda et al., 2005), mapeamento genético, mapeamento associativo e análises de QTL (Tanksley & Mc Couch, 1997; Ivandic et al., 2003; IRGSP, 2005), seleção assistida por marcadores (SAM) (Peleman & Voort, 2003) e identificação de seqüências de genes candidatos (Wheeler et al., 2005).

2.7.1 Marcadores SSR em seleção recorrente

Em seleção recorrente os marcadores moleculares microssatélites, quando utilizados, podem ser extremamente úteis na escolha de genitores, na decisão quanto ao número de intercruzamentos necessários para se ter um bom nível de recombinação e no monitoramento do gene da macho-esterilidade (Courtois et al., 2003). Para que se consiga ter uma alta variabilidade inicial nos programas de seleção recorrente e para avaliação da manutenção da variabilidade durante os ciclos de recombinação, o uso de marcadores moleculares se tornou uma ferramenta indispensável (Ramis, 2003).

Os marcadores SSR são considerados apropriados para identificação de variabilidade devido a sua capacidade de detectar um grande número de alelos repetidamente, acuradamente e eficientemente (McCouch et al., 1997). Contudo, até o momento, poucos trabalhos tem utilizado marcadores moleculares para o monitoramento da variabilidade genética durante os ciclos de seleção recorrente. Em estudos recentes, marcadores moleculares RAPD foram usados para a caracterização molecular de populações de seleção recorrente em aveia (De Koeyer et al., 1993), pimenta (Thabuis et al., 2004) e *Brassica napus* (Yuan et al., 2004). Marcadores SSR tem sido utilizados para monitoramento da variabilidade genética ao longo dos ciclos de seleção recorrente em culturas como arroz (Ramis, 2003; Badan, 2003, Brondani et al., 2005), trigo (Röder et al., 1998; Liu et al., 2007), cevada (Struss & Plieske, 1998) e soja (Djè et al., 2000).

Em milho vários trabalhos usando ambos marcadores RAPD e SSR foram realizados para determinação da variabilidade genética entre os ciclos e entre as populações de seleção recorrente (Pinto et al., 2003; Huang et al., 2004; Hinze et al., 2005; Falke et al., 2007). Esses autores indicaram que o uso dos marcadores moleculares,

principalmente os marcadores SSR, foi eficiente para determinação da variação da diversidade alélica provocada pela deriva gênica, cujo efeito é comum nas populações de seleção recorrente, bem como na definição da presença de estruturação genética destas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 DESENVOLVIMENTO DAS POPULAÇÕES DE SELEÇÃO RECORRENTE CNA-IRAT 4 E CNA 12

A relação dos genitores que formaram as populações utilizadas neste estudo, e as metodologias para a formação dos ciclos e condução das duas populações de seleção recorrente estão detalhados e descritos no Anexo A (Descrição da Obtenção da População de Seleção Recorrente CNA-IRAT 4) e Anexo B (Descrição da Obtenção da População de Seleção Recorrente CNA 12) do presente trabalho.

3.2 MATERIAL VEGETAL

Para a população CNA-IRAT 4 foram avaliados os dez genitores que originaram esta população (BG 90-2, CNA 7, CNA 3815, CNA 3848, CNA 3887, Colômbia 1, Eloni, Nanicão, UPR 103 e IR-36) e 180 indivíduos de cada um dos ciclos 1, 2 e 5. Estes indivíduos foram originados de sementes S_0 , resultantes do ciclo anterior de recombinação (sementes $S_{0:1}$ oriundas de plantas macho-estéreis) e seleção.

Para a população CNA 12 foram avaliados os dezesseis genitores que originaram esta população (BRS Formoso, Oryzica-1, Chuí, CNAi 9020, CNA 5287, CNA 8621, Oryzica Lhanos-4, IRGA 417, CNAi 9029, Javaé, Jequitiba, Taim, Diamante, CNA 8502, Marajá, Huan-Sen-Goo) e 180 indivíduos de cada um dos ciclos 1 e 2. Estes indivíduos foram originados de sementes de plantas F_2 resultantes da auto-fecundação de plantas híbridas obtidas via polinização manual, oriundas da etapa de recombinação, provenientes dos ciclos 1 e 2, obtida via polinização manual.

3.3 EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO

Amostras de tecido foliar dos genitores e dos indivíduos representantes de cada ciclo estudado foram coletadas e analisadas. As extrações de DNA foram realizadas segundo protocolo descrito por Doyle & Doyle (1987), modificado por Brondani et al. (2002), que utiliza o detergente catiônico CTAB (*cationic hexadecyl trimethyl ammonium bromide*) como tampão de extração.

O tecido foliar de cada indivíduo foi cortado (aproximadamente 100 mg) e imediatamente transferido para tubo de 2,5 mL, aos quais foram acrescentados o tampão de extração CTAB. A cada tubo, foi adicionado uma esfera de porcelana (*bead*) para iniciar o processo de maceração automática realizada pelo aparelho BIO101, modelo Fastprep FP120 (*Thermo Electron Corporation*), por 10 segundos em rotação 4. Em seguida, os tubos foram incubados em banho-maria, por cerca de uma hora a 65 °C, homogeneizados a cada 15 minutos. Após resfriamento dos tubos, foi adicionado 600 µL de clorofórmio/álcool isoamílico, na proporção de 24:1. Os tubos foram homogeneizados a fim de que todo material macerado entrasse em contato com a solução de clorofórmio/álcool isoamílico e imediatamente centrifugados por 15 minutos em centrífuga na rotação máxima de 13.000 rotações por minuto (rpm). Após a centrifugação, o sobrenadante foi transferido para tubos de 1,5 mL e adicionados 800 µL de etanol absoluto resfriado a 4 °C. Os tubos foram novamente homogeneizado e colocados em freezer -20 °C por duas horas. Após esse resfriamento, os tubos foram novamente centrifugados por 15 minutos a 13.000 rpm, resultando na formação de um precipitado (*pellet*). O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado por duas vezes com 800 µL de etanol 70%, seguido por lavagem com álcool absoluto. Cada lavagem foi acompanhada de centrifugação por 5 minutos a 13.000 rpm. O precipitado foi seco à temperatura ambiente por, aproximadamente, meia hora. Ao final do processo, o precipitado foi ressuspensão em 50 µL de tampão Tris-EDTA (10 mM Tris-HCl pH 8,0; 1 mM EDTA com pH 8,0) contendo enzima RNase (10 µg.mL⁻¹), e incubado em estufa 37 °C por uma hora para completa degradação do RNA. Em seguida o DNA foi armazenado à 4 °C para completa ressuspensão, seguidos pelos procedimentos de quantificação e armazenamento à -20 °C.

3.4 QUANTIFICAÇÃO DO DNA GENÔMICO

A concentração do DNA de cada genótipo foi estimada através da colocação de uma alíquota de 3 µL em gel de agarose 1,0% contendo brometo de etídio (0,2 µg.mL⁻¹) e submetida à eletroforese horizontal contendo solução salina TBE 1X (0,09 M Tris Borato e

2mM EDTA). A concentração de DNA de cada amostra foi comparada ao DNA-padrão do fago λ (lambda), nas concentrações de 25, 50, 100 e 200 ng. Os géis foram submetidos a eletroforese por 20 minutos a 80 Volts. Logo após a eletroforese, a imagem do gel foi registrada no sistema de fotodocumentação Eagle-Eye II (Stratagene) e realizada a determinação da concentração de DNA para cada amostra via comparação visual. Em seguida foram realizadas as diluições para a concentração final de DNA de $3\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$.

3.5 ANÁLISE MOLECULAR POR MARCADORES SSR

Para a análise genética das populações CNA-IRAT 4 e CNA 12 foram utilizados os marcadores microssatélites MRG4653, MRG4961, OG7, OG17, OG61, OG106, RM9, RM11, RM38, RM204, RM207, RM223, RM224, RM229, RM247, RM248, RM257 das séries RM (Panaud et al., 1996; Chen et al., 1997), OG (Brondani et al., 2001), e MRG (Brondani et al., 2005; Brunet et al., 2007), escolhidos com base no seu alto conteúdo informativo previamente testado nos genitores aliados a um bom padrão de resolução em géis de acrilamida.

3.6 CONDIÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO DA PCR

As reações de amplificação foram realizadas em placas de 96 poços, em volume final de 15 μL contendo 1,4 μL de Água Mili-Q autoclavada, 1,5 μL de Tampão 10X (concentração final de 10mM de Tris-HCl pH 8,3; 50 mM de KCl; e 1,5 mM de MgCl_2), 1,3 μL de dNTP (2,5 mM), 1,3 μL de DMSO (concentração final 50%), 0,2 μL de enzima Taq polimerase ($5\text{u}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) e 4,3 μL de primer (0,9 mM), e 1 μL de DNA genômico a 3 ng/mL. As reações de amplificação de PCR foram conduzidas em termociclador PT-100 Thermal Controller (MJ Research) com a seguinte programação: um pré-ciclo de 96°C por 2 min; seguido por 30 ciclos de 94°C por 1 min, 56°C por 1 min, 72°C por 1 min; e um último passo de 72°C por 7 min.

A eletroforese dos produtos amplificados foi realizada em géis de poli-acrilamida desnaturante 6% (contendo 7M de uréia), coradas com nitrato de prata, de acordo com protocolo descrito por Creste et al. (2001). Após a secagem completa dos géis, estes foram visualizados em aparelho transiluminador. O tamanho das bandas amplificadas foi determinado de acordo com a posição das bandas do marcador padrão Ladder 10Kb

(Stratagene), as quais são definidas pela massa molecular. Os dados referentes à genotipagem dos géis foram transferidos em planilha Excel e analisados.

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

A estimativa de alelos privados (ou exclusivos) e o teste de aderência ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW), foram realizados pelo programa GDA (Lewis & Zaikin, 2001), diferenças significativas estatisticamente, a uma probabilidade de p-valor de 0,05 entre a heterozigosidade observada (H_o) e esperada (H_e) foram consideradas como desvios do EHW entre os ciclos de seleção recorrente de cada loco nas populações. Este software calcula valores médios de H_e e H_o através dos estimadores de diversidade genética determinados por Nei (1972). A Heterozigosidade esperada calculada pelo GDA leva em consideração um estimador não viesado determinado pela multiplicação da heterozigosidade amostrada $H_e = (1 - \sum_u p_u^2)$ pelo fator $(2n / 2n - 1)$.

O cálculo do número médio de alelos efetivos (A_e), heterozigosidade máxima ($H_{máx}$) e a taxa de cruzamentos aparentes foram calculados respectivamente pelas fórmulas:

$$A_e = \frac{1}{1 - H_e} \quad H_{máx} = \frac{(n^\circ \text{ alelos}) - 1}{n^\circ \text{ alelos}} \quad T_{ap} = \frac{1 - f}{1 + f};$$

em que H_e corresponde aos índices de heterozigosidade esperada citada acima e f corresponde ao coeficiente de endogamia descrito por Cockerham (1969).

Os índices de diversidade genética observados, as estatísticas F de Wright (1951, 1965) e a determinação do PIC (*Polymorphism Information Content*, ou conteúdo de informação de polimorfismo) foram calculados pelo programa Powermarker (Liu, 2004).

As estatísticas F de Wright foram calculados de acordo com a fórmula

$$1 - \hat{F}_{IT} = (1 - \hat{F}_{IS}) \cdot (1 - \hat{F}_{ST})$$

em que:

- F_{IT} corresponde ao índice de fixação ou coeficiente de endogamia para o conjunto das populações (devido ao sistema reprodutivo e subdivisão);
- F_{IS} corresponde ao índice de fixação ou coeficiente de endogamia intrapopulacional (devido ao sistema reprodutivo);

- F_{ST} corresponde ao índice de fixação ou coeficiente de endogamia entre populações (devido à subdivisão).

Este programa ainda calcula valores de PIC segundo descritos por Botstein et al. (1980) através da fórmula:

$$PIC_1 = 1 - \sum_{u=1}^K Pu^2 - \sum_{u=1}^{k-1} \sum_{v=u+1}^k 2Pu^2 P_v^2$$

A Probabilidade de Identidade (PI), que é a probabilidade de dois indivíduos amostrados na população serem geneticamente idênticos devido ao acaso, foi estimada pela

fórmula: $\sum_{i=1}^n (p_i^2)^2 + \sum_{i=1}^n \sum_{j=i+1}^n (2p_i p_j)^2$; através do programa Identity (Horst & Kristina, 1999).

A distância genética entre os ciclos das populações foram calculadas usando o coeficiente de similaridade de Rogers modificado por Wright (1978) (Rogers-W) disponível no programa NTSys (Rohlf, 1989). O critério de agrupamento utilizado foi UPGMA (*Unweighted Pair Group Method Arithmetical Means*) e a consistência dos dendrogramas foi testada através de correlações cofenéticas.

A análise de variância de dados moleculares (AMOVA), descrita por Excoffier et al. (1992), foi realizada pelo programa Arlequin (Schneider et al., 2000). A utilização do procedimento estatístico AMOVA permitiu a decomposição da variância genética total em componentes de variação entre os ciclos das populações de seleção recorrente, bem como entre os indivíduos dentro dos ciclos. Todas as correlações foram realizadas com um total de 1000 permutações. A estruturação espacial dos genitores e indivíduos de cada ciclo de seleção recorrente foi obtida pela análise fatorial de correspondência (AFC), disponível no programa Genetix (Belkhir et al., 2001).

4 RESULTADOS

4.1 DETERMINAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA

4.1.1 Caracterização molecular da população

Cada população foi analisada por 14 marcadores microsatélites, dos quais onze foram comuns às duas populações de seleção recorrente (Tabela 2). Os três marcadores exclusivos da população CNA-IRAT 4 (RM223, RM229 e RM 247) não foram usados na análise da população CNA 12 pois resultou em um padrão monomórfico para os seus genitores, sendo então substituídos, assim outros três marcadores foram escolhidos para a caracterização desta população.

Tabela 2. Marcadores SSR utilizados nas análises das duas populações CNA-IRAT 4 e CNA 12 de seleção recorrente e a localização destes no respectivo cromossomo.

Marcador SSR	População	Cromossomo	Fonte
OG07	CNA-IRAT4 e CNA12	11	Brondani et al. (2001)
OG17	CNA-IRAT4 e CNA12	2	Brondani et al. (2001)
OG61	CNA-IRAT4 e CNA12	5	Brondani et al. (2001)
OG106	CNA-IRAT4 e CNA12	9	Brondani et al. (2001)
RM09	CNA-IRAT4 e CNA12	1	Panaud et al. (1996)
RM11	CNA-IRAT4 e CNA12	7	Panaud et al. (1996)
RM38	CNA-IRAT4 e CNA12	8	Panaud et al. (1996)
RM 207	CNA-IRAT4 e CNA12	2	Chen et al. (1997)
RM224	CNA-IRAT4 e CNA12	11	Chen et al. (1997)
RM257	CNA-IRAT4 e CNA12	9	Chen et al. (1997)
MRG4653	CNA-IRAT4 e CNA12	12	Brunes et al. (2007)
RM223	CNA-IRAT4	8	Chen et al. (1997)
RM229	CNA-IRAT4	11	Chen et al. (1997)
RM247	CNA-IRAT4	12	Chen et al. (1997)
RM204	CNA12	6	Chen et al. (1997)
RM248	CNA12	7	Chen et al. (1997)
MRG4961	CNA12	11	Brondani et al. (2005)

Na população CNA-IRAT 4 foram identificados um total de 105 alelos (média de 7,5 alelos/loco) para o conjunto dos 14 marcadores SSR. Foram detectados nos parentais 74 alelos (5 alelos/loco), enquanto os ciclos 1, 2 e 5 foram encontrados 71 (5,07 alelos/loco), 79 (5,64 alelos/loco) e 73 alelos (5,28 alelos/loco), respectivamente. Os valores do Conteúdo de Informação de Polimorfismo ou PIC (*Polymorphism Information Content*) para os genitores variaram de 0,91 (OG07) a 0,44 (RM223), com média de 0,70 (Tabela 3).

Tabela 3. Número de alelos/loco e PIC para os marcadores utilizados na análise da população de seleção recorrente CNA-IRAT 4.

SSR	Alelos/Loco				PIC			
	Genitores	Ciclo1	Ciclo2	Ciclo5	Genitores	Ciclo1	Ciclo2	Ciclo5
OG07	4	5	5	3	0,61	0,39	0,34	0,34
OG17	8	7	6	6	0,91	0,65	0,53	0,37
OG61	6	6	8	10	0,84	0,58	0,58	0,60
OG106	5	6	5	5	0,74	0,71	0,62	0,73
RM09	5	5	4	6	0,77	0,73	0,72	0,76
RM11	5	6	7	6	0,63	0,51	0,55	0,56
RM38	4	2	3	5	0,50	0,18	0,12	0,20
RM207	7	7	9	7	0,82	0,69	0,73	0,70
RM224	5	7	8	8	0,74	0,79	0,78	0,74
RM257	5	4	7	6	0,79	0,72	0,74	0,74
MRG4653	3	5	3	4	0,61	0,64	0,54	0,58
RM223	4	4	7	3	0,44	0,40	0,36	0,39
RM229	4	4	4	2	0,69	0,51	0,44	0,33
RM247	5	3	3	3	0,72	0,51	0,48	0,53
Média	5	5,07	5,64	5,29	0,70	0,57	0,54	0,54

Ainda considerando os indivíduos dentro de cada ciclo de seleção recorrente, o PIC variou de 0,79 (RM224) a 0,18 (RM38) no ciclo 1. Para o ciclo 2, o PIC variou de 0,78 (RM224) a 0,12 (RM38), e no ciclo 5 estes valores variaram de 0,76 (RM09) a 0,20 (RM38), com médias de 0,57; 0,54 e 0,54 para os ciclos 1, 2 e 5, respectivamente (Tabela 3).

Na população CNA 12 foram identificados um total de 95 alelos (média de 6,7 alelos/loco) para o conjunto dos 14 marcadores SSR. Foram detectados nos parentais 83 alelos (5,93 alelos/loco), enquanto os ciclos 1 e 2 apresentaram 76 (5,43 alelos/loco) e 87 (6,21 alelos/loco) respectivamente. Os valores de PIC variaram de 0,84 (RM224) a 0,47 (OG07) para os genitores. Considerando os ciclos, o PIC no ciclo 1 variou de 0,76 (RM224

e OG17) a 0,37 (OG07), enquanto o ciclo 2 esses valores variaram de 0,77 (OG17) a 0,35 (4653) (Tabela 4).

Tabela 4. Número de alelos/loco e PIC para os marcadores utilizados na análise da população de seleção recorrente CNA 12.

SSR	Alelos/Loco			PIC		
	Genitores	Ciclo1	Ciclo2	Genitores	Ciclo1	Ciclo2
OG07	4	3	5	0,47	0,37	0,36
OG17	7	7	8	0,83	0,76	0,77
OG61	8	9	10	0,74	0,68	0,59
OG106	4	3	4	0,56	0,41	0,51
RM09	7	6	6	0,77	0,67	0,61
RM11	7	7	7	0,64	0,56	0,62
RM38	5	4	6	0,70	0,38	0,46
RM207	5	4	6	0,70	0,62	0,68
RM224	7	6	6	0,84	0,76	0,70
RM257	5	3	6	0,65	0,42	0,56
RM247	6	6	6	0,56	0,43	0,35
RM204	6	6	5	0,75	0,63	0,57
RM248	6	6	7	0,69	0,53	0,47
MRG4961	6	6	5	0,69	0,62	0,43
Média	5,93	5,43	6,21	0,63	0,56	0,55

De maneira geral, em ambas populações, foi constatado um aumento do valor de alelos/loco concomitantemente à diminuição dos valores de PIC (Tabelas 3 e 4). Essa situação específica, aonde foram detectados um maior número de alelos nos ciclos de seleção recorrente comparados aos genitores é explicada pela existência de alelos que foram introduzidos às populações no decorrer dos ciclos de seleção, inexistentes nos genitores, e que neste estudo serão referidos como alelos não-esperados. Apesar do aumento do número total de alelos detectados por marcadores SSR, o PIC diminuiu com o avanço dos ciclos, e isto ocorreu porque o cálculo dos valores de PIC leva em conta o número de alelos e suas respectivas frequências. Alelos não-esperados ocorrem, ao menos nos ciclos imediatos à sua incorporação na população, em baixa frequência, diminuindo com isto os valores do PIC médio destes ciclos.

A Probabilidade de Identidade (PI) corresponde à probabilidade de serem encontrados dois genótipos idênticos por descendência ou por estado, ao acaso, em um determinado conjunto de genótipos sob estudo. Para a população CNA-IRAT 4, os genitores apresentaram um PI de $4,75 \times 10^{-10}$, enquanto os ciclos 1, 2 e 5 apresentaram PI de $1,63 \times 10^{-7}$, $3,06 \times 10^{-7}$ e $2,85 \times 10^{-7}$ respectivamente. O PI total da população CNA-

IRAT 4 foi de $1,89 \times 10^{-7}$. A população CNA 12 obteve um PI para os genitores de $3,97 \times 10^{-10}$, enquanto os ciclos 1 e 2 apresentaram $3,97 \times 10^{-8}$ e $5,11 \times 10^{-8}$ respectivamente. O PI global desta população foi de $2,03 \times 10^{-8}$. Os baixos valores de PI encontrados indicam que o conjunto de marcadores escolhidos para a caracterização das populações são altamente informativos, e produziram resultados bastante confiáveis.

4.1.2 Presença de alelos não-esperados

Foi observada em ambas populações a presença de alelos não identificados nos genitores. A população CNA-IRAT 4 amostrou um total de 31 alelos não-esperados (Tabela 5), sendo 12 encontrados no Ciclo1, 20 no Ciclo 2 e 15 no Ciclo 5.

Apenas os marcadores RM38 e RM247 não detectaram alelos não-esperados. Os locos que apresentaram maior número de alelos não-esperados (cinco no total) foram RM 207 e o loco RM 11, considerando os três ciclos analisados (Tabela 5). Apesar de estarem em baixa frequência no ciclo onde foi detectado, foi possível identificar alguns destes alelos em ciclos subsequentes. Por exemplo, os alelos não-esperados 126 e 160 detectados pelo marcador OG07 no ciclo 1 foram detectados no ciclo 2 da população CNA-IRAT 4, mas não foram detectados no ciclo 5, indicando que os mesmos estão em frequência muito baixa, não tendo sido detectados nos indivíduos avaliados, ou até mesmo tenham sido eliminados da população (Tabela 5).

Outros alelos aumentaram a sua frequência na população, permanecendo nos três ciclos estudados, como o alelo 128 detectado pelo marcador RM11. O alelo 146 (RM11) foi detectado nos ciclos 1 e 5, mas não no ciclo 2, provavelmente devido sua baixa frequência na população, ou por ter surgido novamente na população devido a novo evento de fecundação com material genético plantado em área adjacente à área utilizada para recombinação. Esses alelos não-esperados podem aparecer em qualquer ciclo de seleção, bem como desaparecer devido ao processo de seleção que pode eliminar alguns alelos que se apresentam em baixa frequência.

Nove alelos não-esperados do ciclo 1 avançaram até o ciclo 2 mas não permaneceram até o ciclo 5. Cinco alelos não-esperados se mantiveram durante os três ciclos de seleção detectados pelos marcadores OG61, RM11, RM207 e RM224. Foram detectados doze alelos não-esperados a partir do ciclo 2, mas apenas sete se mantiveram até o ciclo 5. No ciclo 5 foram identificados oito novos alelos não-esperados, podendo ter

sido incorporados nos ciclos 3, 4 ou 5, indicando que à medida em que vão sendo avançados os ciclos de populações de seleção recorrente recombinadas via gene da macho-esterilidade, vão sendo acumulados e fixados alelos não-esperados, o que acaba dando origem a indivíduos com composição alélica bastante diferenciada entre ciclos.

Tabela 5. Alelos não-esperados e sua frequência presentes na população CNA-IRAT 4.

Marcadores SSR	Alelos Não-Eesperados			
	Alelos	Ciclo1	Ciclo2	Ciclo5
Frequência				
OG07	126	0,0028	0,0083	—
	160	0,0028	0,0083	—
OG17	130	—	0,0028	—
	132	0,0028	—	—
OG61	108	—	0,0139	0,0316
	116	—	0,0028	0,0056
	118	—	—	0,0082
	136	0,0611	0,0167	0,0361
OG106	148	—	—	0,0278
	238	—	—	0,0167
	244	0,0028	0,0028	—
RM09	128	—	—	0,0389
	140	—	—	0,0167
RM11	98	—	0,0278	—
	124	—	0,0167	—
	128	0,0056	0,1417	1,1722
	146	0,0861	—	0,0083
RM207	98	—	0,0611	—
	116	—	0,0139	—
	134	—	—	0,0677
	136	0,4306	0,3583	0,4361
RM223	164	—	0,0028	—
RM224	130	—	0,0306	—
	148	0,0056	0,0056	0,0028
	150	—	—	0,0028
	156	0,0861	0,0417	0,05
RM229	114	—	0,0083	—
	124	0,0111	—	—
RM257	176	—	0,0028	—
	182	—	0,0056	—
MRG4653	98	0,0111	—	—

Os alelos não-esperados na população CNA 12 (Tabela 6), recombinada manualmente, foram menos frequentes que os presentes na população CNA-IRAT 4, que por sua vez foi recombinada utilizando o gene da macho-esterilidade. No total, 12 alelos não esperados foram detectados nos ciclos 1 e 2, com 3 e 10 alelos respectivamente

(Tabela 6). Dos três alelos não esperados detectados no primeiro ciclo de seleção, apenas o alelo 138 (OG 61) foi identificado no ciclo 2. Os alelos não esperados detectados nesta população recombinada manualmente podem ter sido resultantes de falha durante a polinização controlada, ou resultantes de fecundação cruzada no campo, durante as etapas de: a) obtenção de plantas F_2 (a partir das sementes recombinadas F_1); b) avaliação e seleção de famílias $F_{2,3}$; ou c) avaliação e seleção de famílias $F_{2,4}$, as quais serão utilizadas no novo ciclo de recombinação.

Tabela 6. Frequência e número de alelos não-esperados na população CNA 12.

Marcadores SSR	Alelos Não-Esperados		
	Alelos	Ciclo 1	Ciclo 2
		Frequência	
OG07	146	—	0,0056
OG17	114	—	0,0056
	160	—	0,0083
OG61	132	—	0,0194
	138	0,0184	0,0056
RM11	122	—	0,0028
	134	0,0031	—
RM38	280	—	0,0083
RM207	130	—	0,025
RM248	88	—	0,0083
RM257	170	—	0,0028
MRG4653	126	0,0031	—

4.1.3 Manutenção de alelos específicos ao longo dos ciclos de seleção recorrente

Observou-se que o número total de alelos dos genitores da população CNA-IRAT 4, em comparação com os alelos detectados nos indivíduos dos ciclos 1, 2 e 5, decresceu continuamente, sendo uma evidência de que o processo de recombinação e seleção dos indivíduos está conduzindo a um processo de perda de variabilidade alélica oriunda exclusivamente dos genitores. Contudo, a introdução aleatória de alelos não-esperados, caso estes adicionem valor adaptativo à população, podem ser fixados, e contribuir para o aumento de sua variabilidade alélica (Tabela 7). Por outro lado, observou-se na população CNA 12 que a proporção do número total de alelos dos genitores aumentou do ciclo 1 para o ciclo 2 (75,79% para 81,05%), resultado da recombinação planejada, que forçosamente mantém a participação alélica de todos os genitores na

progênie, e do processo de aleatório de escolha dos indivíduos para serem analisados por marcadores moleculares (Tabela 7).

Tabela 7. Porcentagem da contribuição alélica dos genitores e dos alelos exclusivos dos mesmos ao longo dos ciclos de seleção recorrente das populações CNA-IRAT 4 e CNA 12.

Alelos Genitores	CNA-IRAT 4			CNA 12	
	Ciclo 1	Ciclo 2	Ciclo 5	Ciclo 1	Ciclo 2
Alelos Totais	80,82%	76,71%	71,23%	75,79%	81,05%
Alelos Privados	67,50%	55,00%	55,00%	78,95%	86,84%

Considerando apenas os alelos exclusivos ou privados, ou seja, alelos que ocorreram em apenas um genitor, o percentual de alelos detectados na população CNA-IRAT 4 nos ciclos 1, 2 e 5, em relação ao número de alelos do conjunto de genitores, caiu de 67,5% no ciclo 1, estabilizando em 55% nos ciclos 2 e 5. Na população CNA 12, por outro lado, ocorreu um aumento do percentual de participação dos alelos privados dos genitores entre os ciclos 1 e 2, acompanhando a tendência observada no número total de alelos dos genitores. A presença destes alelos permite o monitoramento de fragmentos genômicos específicos do genitor em que fora detectado, e com isto estimar a contribuição de cada genitor ao longo dos ciclos da população. Na CNA-IRAT 4, os genitores com maior número de alelos privados foram o Colômbia 1, IR 36 e CNA 7, todos apresentando seis alelos privados, e com menor número foi o genitor BG 90-2, com apenas dois alelos privados. Na CNA 12, os genitores que apresentaram o maior número de alelos privados foram Huan-Sen-Goo e 5287 ambos com nove alelos privados, e com o menor número foi CNAi 9029, com apenas um alelo privado.

O tamanho efetivo populacional (N_e) refere-se ao número de indivíduos que efetivamente participam da reprodução e de sua contribuição relativa para a geração seguinte (Crossa & Vencovsky, 1994). Deste modo, quanto maior a sua magnitude, menor será o efeito da endogamia na população. As populações CNA-IRAT 4 e CNA 12 utilizadas neste projeto apresentaram um coeficiente de endogamia ou f médio variável no decorrer dos ciclos (Tabela 8).

Assim, considerando o nível de endogamia que cada ciclo se encontra e dada a fórmula de tamanho efetivo amostral $N_e = N/1+f$; para uma população aonde se amostrou 180 indivíduos em cada ciclo, o tamanho efetivo da população CNA-IRAT 4 para o ciclo 1

foi de aproximadamente 176 plantas, os ciclos 2 e 5 apresentaram um tamanho efetivo amostral de 138 e 140 plantas respectivamente (Tabela 8). Para a população CNA 12, o N_e no ciclo 1 foi de 112 indivíduos e para o ciclo 2 o tamanho amostral aumentou para 116 indivíduos. As estimativas da taxa de cruzamento aparente (t_{ap}), que também depende da estimativa da endogamia (f), foram maiores para a CNA-IRAT 4, apesar de ter sua magnitude estagnada entre os ciclos 3 e 5. Por outro lado, houve um aumento considerável na t_{ap} em apenas um ciclo de recombinação da CNA 12, o que indica que o aumento do número de recombinações planejadas entre famílias contribuirá com a diminuição da endogamia, e conseqüentemente, com o aumento da t_a .

Tabela 8. Coeficientes de endogamia médio (f), tamanho efetivo amostral (N_e) e Taxas de cruzamentos aparente (T_{ap}) detectados para cada ciclo de seleção recorrente das populações CNA-IRAT 4 e CNA 12.

População	Ciclos	f (médio)	$N_e=N/1+f$ (indivíduos)	T_{ap}
CNA-IRAT 4	Ciclo 1	0,24	176	0,61
	Ciclo 2	0,30	138	0,54
	Ciclo 5	0,29	140	0,55
CNA 12	Ciclo 1	0,61	112	0,24
	Ciclo 2	0,55	116	0,29

A população CNA-IRAT 4, identificou apenas cinco alelos de um total de 73 alelos parentais, detectados nos ciclos 2 e 5 que não foram devidamente amostrados no ciclo 1, portanto, foi constatado uma porcentagem de erro amostral de somente 6,8%. A população CNA 12 também apresentou somente cinco alelos dos 83 totais que reapareceram no ciclo 2 mas não foram amostrados no ciclo 1, assim a porcentagem do erro de amostragem nesta população ficou em torno de 6%.

O número médio de alelos efetivos (A_e) nos ciclos da população CNA-IRAT 4 foi menor que o número de alelos médio para os genitores e os ciclos de seleção recorrente (Tabela 9). O A_e dos genitores foi de 4,14, enquanto os ciclos 1, 2 e 5 apresentaram um A_e de 2,66; 2,5 e 2,56, respectivamente. Da mesma forma, na população CNA 12 as estimativas de A_e sempre foram inferiores ao número médio de alelos encontrados, com um A_e de 3,52 para os genitores, enquanto os ciclos 1 e 2 obtiveram um A_e de 2,71 e 2,55, respectivamente (Tabela 10). A diferença entre o número de alelos efetivamente detectados pelos marcadores e o A_e é devida à presença de alelos de baixa frequência.

Tabela 9. Parâmetros populacionais obtidos para a população CNA-IRAT 4: A: número de alelos, Ae: número de alelos efetivos, Ho: heterozigiosidade observada; He: heterozigiosidade esperada; Hmáx: heterozigiosidade máxima esperada.

Grupos	A	Ae	Ho	He	Hmáx	H/Hmáx
Genitores	5,00	4,14	0,07	0,70	0,80	0,88
Ciclo1	5,07	2,66	0,43	0,57	0,80	0,71
Ciclo2	5,64	2,50	0,38	0,54	0,82	0,65
Ciclo5	5,28	2,56	0,38	0,54	0,81	0,67

Tabela 10. Parâmetros populacionais obtidos para a população CNA 12: A: número de alelos, Ae: número de alelos efetivos, Ho: heterozigiosidade observada; He: heterozigiosidade esperada; Hmáx: heterozigiosidade máxima esperada.

Grupos	A	Ae	Ho	He	Hmáx	H/Hmáx
Genitores	5,93	3,52	0,06	0,68	0,83	0,82
Ciclo 1	5,43	2,71	0,23	0,59	0,82	0,72
Ciclo 2	6,21	2,55	0,26	0,57	0,84	0,68

A diversidade genética máxima (Hmáx) refere-se ao valor máximo teoricamente esperado da diversidade gênica (He), considerando o número de alelos observado na análise. Neste trabalho, os marcadores SSR puderam detectar, no ciclo 1 da CNA-IRAT 4, 71% da diversidade genética máxima, número que foi sendo reduzido a 67% ciclo 5 (Tabela 9). Na CNA 12, por sua vez, 72% da Hmáx foi detectada no ciclo 1, sendo reduzida a 68% no ciclo 2 (Tabela 10). Os maiores valores encontrados de Hmáx em relação ao He nas duas populações de seleção recorrente são resultantes de um grande número de alelos de baixa frequência.

4.1.4 Estimativa do equilíbrio de Hardy-Weinberg

A análise do Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) indica que quando as probabilidades de p-valor são menores que o nível de significância 0,05, as populações possuem índices de heterozigiosidade observada estatisticamente diferentes da heterozigiosidade esperada sob equilíbrio, indicando que a população ou o loco, está desviando-se do EHW.

Na análise da população CNA-IRAT 4 (Tabela 11) somente dois marcadores apresentaram equilíbrio no Ciclo 1 (RM 11 e RM 38) e no Ciclo 2 (4653 e RM247), e três marcadores mostraram-se em equilíbrio no Ciclo 5 (OG07, RM 38 e RM 229). Considerando a maior parte dos locos, pode-se constatar que a população CNA-IRAT 4 não se encontra em equilíbrio, situação que somente seria esperada se a população idealizada fosse suficientemente grande, se possuísse os cruzamentos completamente ao acaso, e se não houvesse seleção, mutação ou deriva genética, pressupostos necessários para o estabelecimento do EHW. No caso de populações de seleção recorrente o número de plantas utilizadas na etapa de recombinação não pode ser considerado suficientemente grande já que trata-se de amostras da população, além de ainda ocorrer a seleção genética presente em cada ciclo das etapas da seleção recorrente. Ainda, os cruzamentos não são totalmente aleatórios e devido à seleção sofrida em cada ciclo, ocorrem também efeitos de deriva genética.

Tabela 11. Heterozigosidade Observada (Ho), Heterozigosidade Esperada (He) e Probabilidades do p-valor dos marcadores em cada ciclo de seleção recorrente da população CNA-IRAT 4.

Locos	Ciclo1			Ciclo2			Ciclo5		
	Ho	He	p-valor	Ho	He	p-valor	Ho	He	p-valor
OG07	0,3333	0,3871	0,0414	0,3176	0,3369	0,0232	0,3073	0,3398	0,3521
OG17	0,4800	0,6485	0,0000	0,3728	0,5319	0,0000	0,2034	0,3664	0,0000
OG61	0,3408	0,5840	0,0000	0,3434	0,5824	0,0000	0,4253	0,5979	0,0000
OG106	0,5196	0,7142	0,0000	0,3657	0,6246	0,0000	0,4804	0,7276	0,0000
RM09	0,6509	0,7301	0,0000	0,4472	0,7159	0,0000	0,5455	0,7628	0,0000
RM11	0,4500	0,5092	0,0630	0,4036	0,5518	0,0000	0,4343	0,5614	0,0000
RM38	0,1989	0,1796	0,2239	0,0867	0,1155	0,0087	0,1977	0,2000	0,4519
RM207	0,3086	0,6875	0,0000	0,3818	0,7257	0,0000	0,2273	0,7024	0,0000
RM223	0,3068	0,4022	0,0000	0,2609	0,3573	0,0000	0,2528	0,3896	0,0000
RM224	0,6034	0,7874	0,0000	0,5602	0,7775	0,0000	0,5056	0,7434	0,0000
RM229	0,4713	0,5062	0,0000	0,4052	0,4378	0,0421	0,2768	0,3283	0,0611
RM247	0,3977	0,5058	0,0012	0,4268	0,4847	0,0913	0,3931	0,5337	0,0000
RM257	0,4775	0,7195	0,0000	0,3663	0,7432	0,0000	0,5207	0,7436	0,0000
MRG4653	0,5084	0,6353	0,0000	0,5535	0,5422	0,6329	0,6057	0,5771	0,0440

Com relação à população de seleção recorrente CNA 12, nenhum dos quatorze marcadores avaliados detectou a condição de Equilíbrio de Hardy-Weinberg (Tabela 12). Pôde-se constatar, graças a esses resultados observados, que a população CNA 12 como um todo não se encontra em equilíbrio. Assim como na população CNA-IRAT 4, esse fato ocorreu devido à ausência dos diversos pressupostos da existência do EHW (populações

infinitamente grandes; cruzamentos ao acaso; ausência de mutação, seleção ou deriva genética) em populações submetidas a seleção recorrente.

Tabela 12. Heterozigosidade Observada (Ho), Heterozigosidade Esperada (He) e probabilidades do p-valor dos marcadores em cada ciclo de seleção recorrente da população CNA 12.

Locos	Ciclo1			Ciclo2		
	Ho	He	p-valor	Ho	He	p-valor
OG7	0,1899	0,4344	0,0000	0,2067	0,4197	0,0000
OG17	0,2443	0,7756	0,0000	0,3543	0,7826	0,0000
OG61	0,3687	0,7047	0,0000	0,1955	0,6120	0,0000
OG106	0,1292	0,5011	0,0000	0,2674	0,5504	0,0000
RM9	0,3220	0,6994	0,0000	0,4034	0,6335	0,0000
RM11	0,2793	0,5896	0,0000	0,3184	0,6470	0,0000
RM38	0,1222	0,4076	0,0000	0,1695	0,4687	0,0000
RM204	0,2905	0,6731	0,0000	0,3483	0,5988	0,0000
RM207	0,1714	0,6147	0,0000	0,0899	0,6795	0,0000
RM224	0,4034	0,7845	0,0000	0,3390	0,7381	0,0000
RM248	0,1897	0,5440	0,0000	0,2529	0,4452	0,0000
RM257	0,0739	0,4815	0,0000	0,2542	0,5969	0,0000
MRG4653	0,1648	0,4322	0,0000	0,1564	0,3636	0,0000
MRG4961	0,2857	0,6349	0,0000	0,2833	0,4691	0,0000

4.1.5 Distância genética entre os ciclos

Com a finalidade de avaliar a variabilidade genética presente nos genitores das populações CNA-IRAT 4 e CNA 12, foram construídos dendrogramas baseados no coeficiente de distância Rogers-W. Os genitores da população CNA-IRAT 4 apresentaram uma distância genética média de Rogers-W de 0,86 e utilizando este valor como ponto de corte para a formação de grupos de similaridade, dois grupos distintos foram obtidos, mais o genitor não-agrupado Colômbia 1 (Figura 2). No primeiro grupo estão presentes os genótipos IR-36 e BG 90-2, no segundo grupo estão os genótipos CNA 7, CNA 3848, CNA 3887, Eloni, UPR 103.

O dendrograma para os dezesseis genitores da população CNA 12 (Figura 3) apresentou distância genética média Rogers-W de 0,81, formando três grupos, e dois genótipos não-agrupados Huan-Sen-Goo e CNA 5287. O primeiro grupo é formado pelos genitores BRS Formoso, Oryzica 1, BRS Chuí, Jequitibá, CNAi 9029, IRGA 417, BRS Taím, Diamante, CNA 8502 e CNA 8621; o segundo pelos genótipos CNAi 9020 e

Oryzica Llanos 4; e o terceiro pelos genótipos Javaé e Marajó. As distâncias genéticas médias encontradas para os genitores das duas populações são consideradas altas, o que indica que foi bem sucedida a escolha de genótipos tendo como um dos critérios a ampla variabilidade genética.

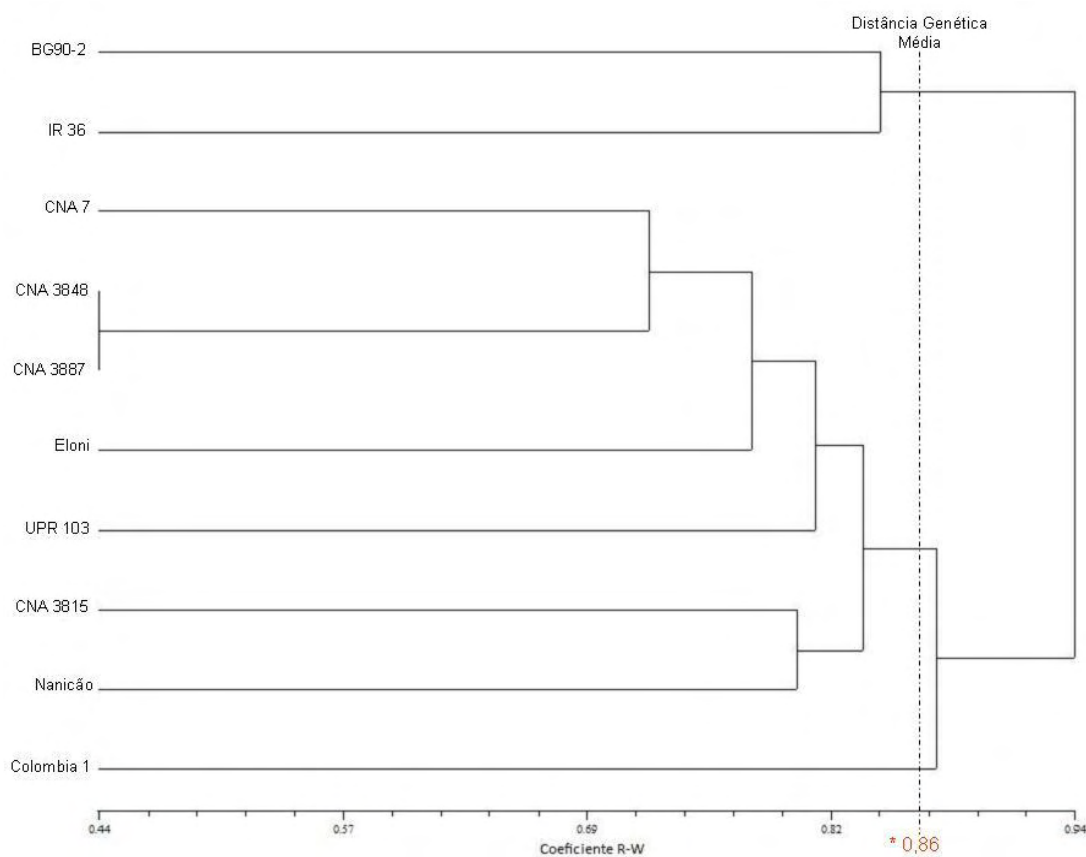


Figura 2. Dendrograma dos genitores obtido a partir da matriz de distância genética obtida pelo coeficiente de Rogers modificado por Wright (Rogers-W), pelo método de agrupamento UPGMA, com a distância média marcada na população CNA-IRAT 4. A linha pontilhada corta o dendrograma exatamente na distância genética média dos genitores nesta população (*0,86).

No dendrograma da população CNA-IRAT 4 (Figura 4), utilizando como limite a distância genética média de Rogers-W de 0,17, houve a formação de dois grupos principais, o primeiro composto pelos genitores desta população e o segundo formado pelos ciclos da mesma. A distância genética média entre genótipos, considerando o grupo de genitores e os indivíduos dentro de cada ciclo da população, aumentou a partir dos genitores para o ciclo 5 (Tabela 13), o mesmo sendo observado do ciclo 1 para o ciclo 5, resultante provavelmente das mudanças das frequências alélicas ocasionadas pela recombinação e seleção, além do surgimento de alelos não esperados oriundos de genótipos de áreas adjacentes à população sob recombinação.

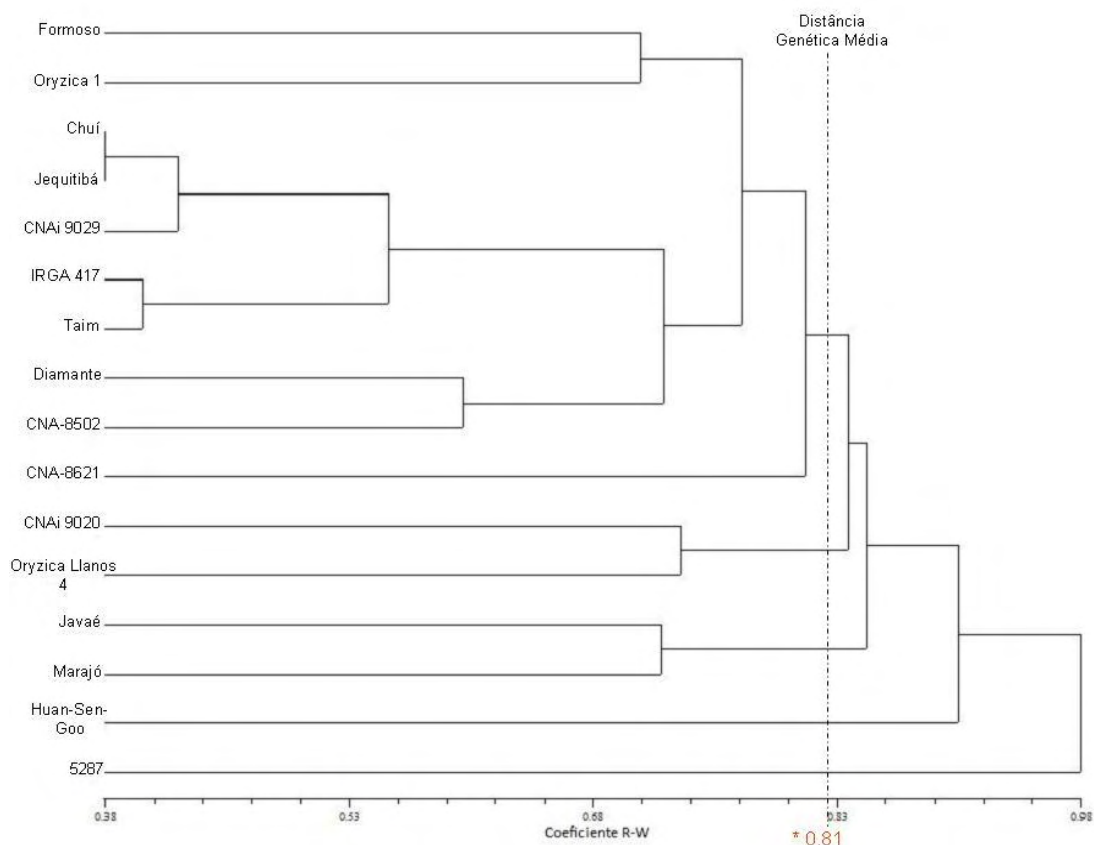


Figura 3. Dendrograma dos genitores obtido a partir da matriz de distância genética obtida pelo coeficiente de Rogers-W, pelo método UPGMA, com a distância média marcada na população CNA 12. A linha pontilhada corta o dendrograma exatamente na distância genética média dos genitores nesta população (*0,81).

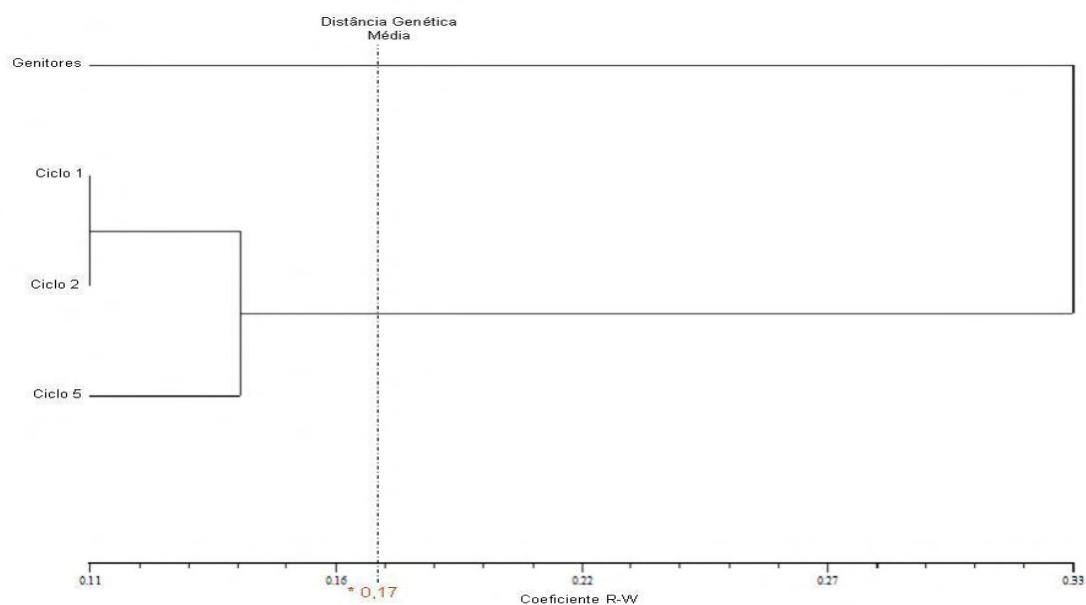


Figura 4. Dendrograma obtido a partir da matriz de distância genética obtida pelo coeficiente Rogers-W, pelo método UPGMA, com a distância média marcada na população CNA-IRAT 4 (*0,17).

Tabela 13. Distâncias genéticas calculadas a partir do coeficiente de Rogers-W, comparado entre os genitores e os ciclos de seleção recorrente da população CNA-IRAT 4.

Grupos	Genitores	Ciclo1	Ciclo2	Ciclo5
Genitores	----	0,1073	0,1109	0,1122
Ciclo1	----	----	0,0470	0,0660
Ciclo2	----	----	----	0,0538

No dendrograma da população CNA 12 (Figura 5), a partir do limite estabelecido da distância Rogers-W, média de 0,12, formaram-se dois grupos, um composto pelos genitores, e outro pelos ciclos 1 e 2. Considerando a distância genética Rogers-W do grupo de genitores e dos indivíduos dos ciclos 1 e 2, observou-se que ela aumentou no sentido dos genitores para o ciclo 2 (Tabela 14). Contudo, os valores da distância genética média dos genitores para os ciclos 1 e 2 corresponderam praticamente à metade dos valores encontrados para a população CNA-IRAT 4, provavelmente resultante da menor diferenciação de alelos presentes nos genitores e nos ciclos, ou seja, a maioria dos alelos ainda está sendo compartilhado entre os ciclos, pela utilização do cruzamentos dirigidos, o que garante a representatividade de boa parte dos alelos presentes nos genitores nestes ciclos, além da menor ocorrência de alelos não esperados na CNA 12. Por outro lado, a distância média entre os ciclos 1 e 2 das duas populações foram idênticas, o que indica que apesar de apenas uma amostra dos alelos dos genitores terem sido transferidos para o ciclo 1 na CNA-IRAT 4, estes alelos foram transferidos para o ciclo 2.

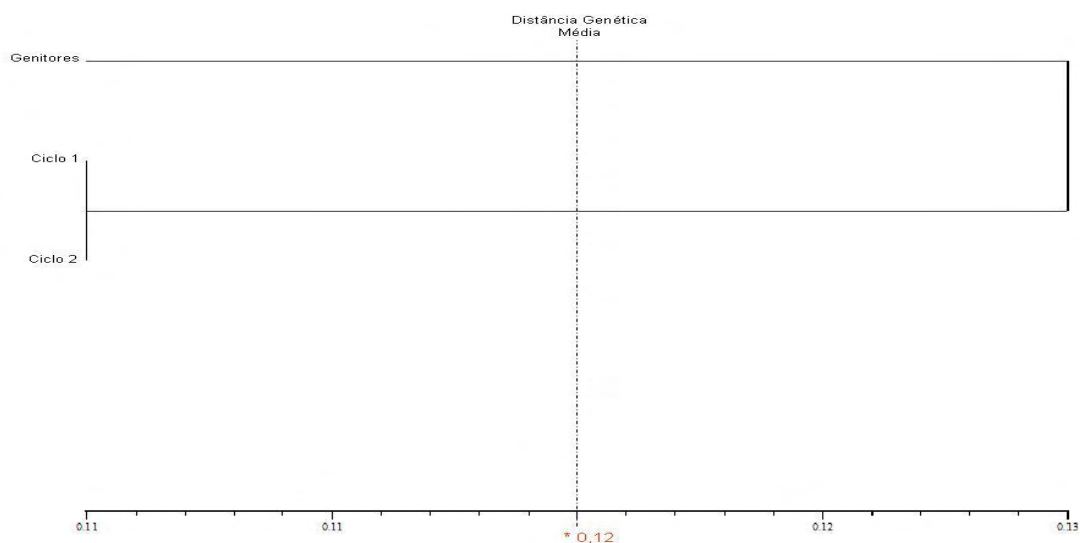


Figura 5. Dendrograma obtido a partir da matriz de distância genética obtida pelo coeficiente de Rogers modificado por Wright (Rogers-W), pelo método de agrupamento UPGMA, com a distância média marcada na população CNA 12 (*0,12).

Tabela 14. Distâncias genéticas calculadas a partir do coeficiente de Rogers-W, comparado entre os genitores e os ciclos de seleção recorrente da população CNA 12.

Grupos	Genitores	Ciclo1	Ciclo2
Genitores	-----	0,0513	0,0518
Ciclo 1	-----	-----	0,0483

4.2 ANÁLISE DA ESTRUTURA POPULACIONAL

4.2.1 Estatísticas F de Wright

Medidas Fis e Fst (Wright, 1965) indicam o déficit de heterozigotos na população ocasionados pelo sistema de cruzamento e pelo efeito da subdivisão ou fragmentação da população. Na população CNA-IRAT 4 observou-se uma maior diferenciação entre os ciclos, pois a variação do Fst foi maior entre o grupo de genitores e o ciclo 5 (Tabela 15), sugerindo uma tendência de diferenciação entre a descendência e os genitores. A população CNA 12 obteve um resultado contrário ao da população CNA-IRAT 4, ocorrendo uma diminuição dos valores de Fst entre os genitores e o último ciclo analisado (ciclo 2) (Tabela 16).

Tabela 15. Comparação das estatísticas de Wright (Fis, Fst e Fit) entre os ciclos de seleção recorrente na população CNA-IRAT 4.

Indivíduos	Genitores			Ciclo 1			Ciclo 2			Ciclo 5		
	Fis	Fst	Fit	Fis	Fst	Fit	Fis	Fst	Fit	Fis	Fst	Fit
Genitores	-----	-----	-----	0,29	0,37	0,12	0,34	0,43	0,14	0,33	0,43	0,15
Ciclo 1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	0,27	0,28	0,02	0,27	0,30	0,04
Ciclo 2	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	0,29	0,31	0,02

Tabela 16. Comparação das estatísticas de Wright (Fis, Fst e Fit) entre os ciclos de seleção recorrente na população CNA 12.

Indivíduos	Genitores			Ciclo 1			Ciclo 2		
	Fis	Fst	Fit	Fis	Fst	Fit	Fis	Fst	Fit
Genitores	-----	-----	-----	0,64	0,64	- 0,01	0,58	0,58	0,00
Ciclo 1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	0,58	0,59	0,02

4.2.2 Análise de variância molecular (AMOVA)

A AMOVA foi realizada para decompor a variância molecular total entre dois níveis de amostragem, entre ciclos e dentro de ciclos, para as duas populações de seleção recorrente. Para a população CNA-IRAT 4, a variância molecular não foi significativa entre os ciclos de seleção recorrente, resultando em um F_{st} de 0,0240, cujo valor não foi significativo (p -valor $< 0,0001$). Contudo, a variância molecular dentro dos ciclos de seleção recorrente representou mais de 97% da variância total (Tabela 17).

Tabela 17. AMOVA comparando diferenças entre e dentro dos ciclos de seleção recorrente da população CNA-IRAT 4.

Fonte de Variação	GL	SQ	Componentes de Variação	% Variação
Entre Ciclos	2	54,7560	0,06833	2,4 ns
Dentro Ciclos	1077	2992,0830	2,77816	97,6
Total	1079	3046,8390	2,84650	

ns: não significativo.

Para a população CNA 12, a variância molecular entre os ciclos de seleção recorrente também não foi significativa, e a variação existente entre os ciclos resultou em um F_{st} de 0,0173 (p -valor $< 0,0001$) (Tabela 18). Como na CNA-IRAT 4, a variância molecular dentro dos ciclos de seleção recorrente também foi alta, representando mais de 98%. Estes resultados indicam que a diversidade genética dividida entre ciclos é quase nula, assim como as diferenças dentro dos ciclos são resultantes da base genética ampla que está sendo recombinada a cada ciclo. Neste caso, para ambas as populações, nenhuma estruturação está ocorrendo entre os ciclos de seleção.

Tabela 18. AMOVA comparando diferenças entre e dentro dos ciclos de seleção recorrente da população CNA 12.

Fonte de Variação	GL	SQ	Componentes de Variação	% da Variação
Entre Ciclos	1	28,769	0,06900	1,72 ns
Dentro dos Ciclos	718	2822,364	3,93087	98,28
Total	719	2851,133	3,99986	

ns: não significativo.

4.2.3 Análise fatorial de correspondência (AFC)

A distribuição espacial dos genitores e indivíduos dos ciclos de seleção recorrente da CNA-IRAT 4 foi obtida pela análise fatorial de correspondência (AFC) (Figura 6). Observou-se que os genitores UPR 103, Colômbia-1, IR-36 e CNA-7 estão mais afastados espacialmente em relação aos indivíduos de dentro dos ciclos, significando que houve uma menor contribuição destes genitores desde o ciclo 1. Provavelmente estes genitores podem ter deixado poucos descendentes, ou as progênes derivadas destes genitores não apresentaram bons atributos e não foram selecionadas.

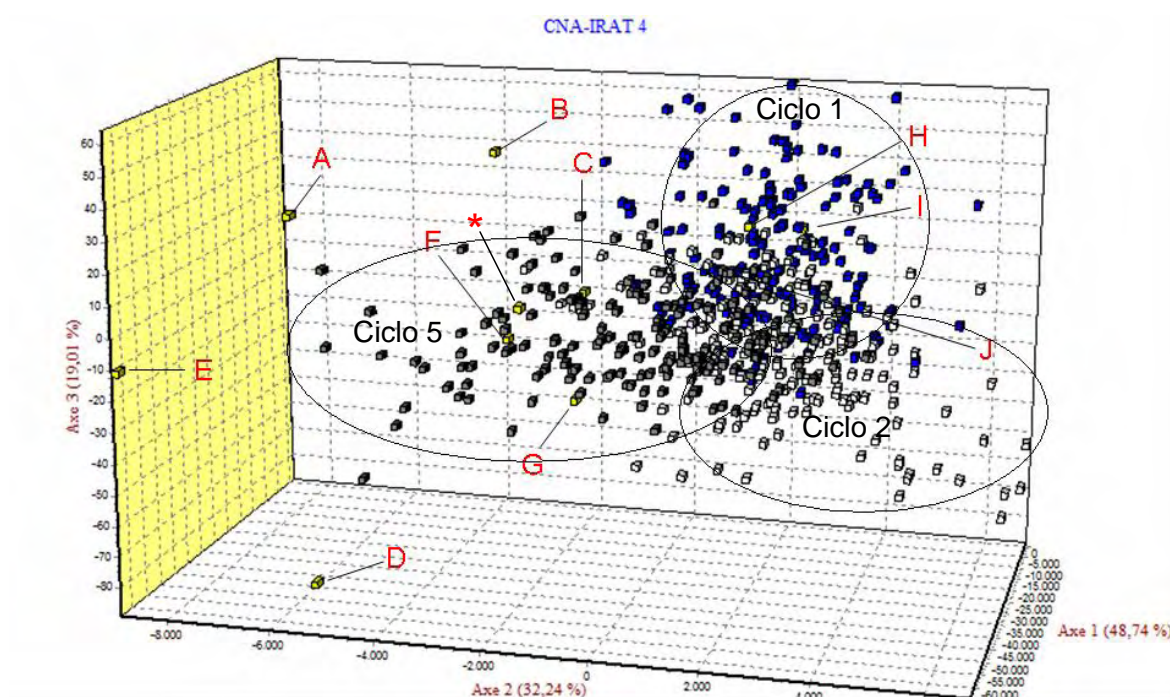


Figura 6. Análise fatorial de correspondência e o padrão de distribuição espacial entre os genitores e os ciclos de seleção recorrente da população CNA-IRAT 4. Estão destacados em azul os indivíduos do grupo Ciclo 1, em branco os indivíduos do grupo Ciclo 2 e em cinza os indivíduos do grupo Ciclo 5. Os genitores estão destacados em amarelo correspondentes às letras. A: Colômbia 1; B: IR 36; C: Eloni; D: UPR 103; E: CNA 7; F: BG90 2; G: Nanicão; H: CNA 3848; I: CNA 3815; J: CNA 3887. * Média da distribuição espacial dos genitores.

O genitor IR-36, fornecedor do gene da macho-esterilidade para a população, apesar de estar presente com 25% do genoma das plantas macho-estéreis do Ciclo 0 (que deu origem à população do ciclo 1), não foi incluída como próxima geneticamente aos indivíduos do ciclo 1. Provavelmente apenas um ciclo de recombinação e seleção foi suficiente para reduzir a sua representatividade na progênie. Os demais genitores estão localizados entre a concentração de indivíduos dos ciclos, indicando uma maior contribuição destes no background genético dos indivíduos componentes dos ciclos de seleção recorrente.

Na distribuição espacial dos diferentes ciclos da CNA-IRAT 4 pode-se notar a existência de um grupo de genótipos que compartilha a área central como uma interseção entre os diferentes ciclos, ou seja, para estes indivíduos, apesar da ocorrência dos alelos não esperados e a seleção (que pode causar a deriva genética), há um compartilhamento de alelos. A identificação de genitores afastados espacialmente dos indivíduos dos ciclos pode indicar que parte de seus alelos não estejam sendo selecionados, fazendo com que diminua o percentual de contribuição destes genitores gradativamente, à medida em que os ciclos forem sendo avançados, como observado na CNA-IRAT 4 (Figura 6).

Na AFC da população CNA 12 (Figura 7), a maioria dos indivíduos dos ciclos 1 e 2 formou grupos distintos, embora parte dos indivíduos de cada ciclo estiveram agrupados com indivíduos do outro ciclo. Os genitores da população CNA 12 estiveram agrupados com indivíduos dos dois ciclos, indicando maior contribuição do pool gênico destes genitores nesta população em relação à CNA-IRAT 4. O provável motivo foi que os cruzamentos direcionados realizados na CNA 12 aumentaram a probabilidade de manutenção de genes de todos os genitores ao longo dos ciclos de seleção recorrente.

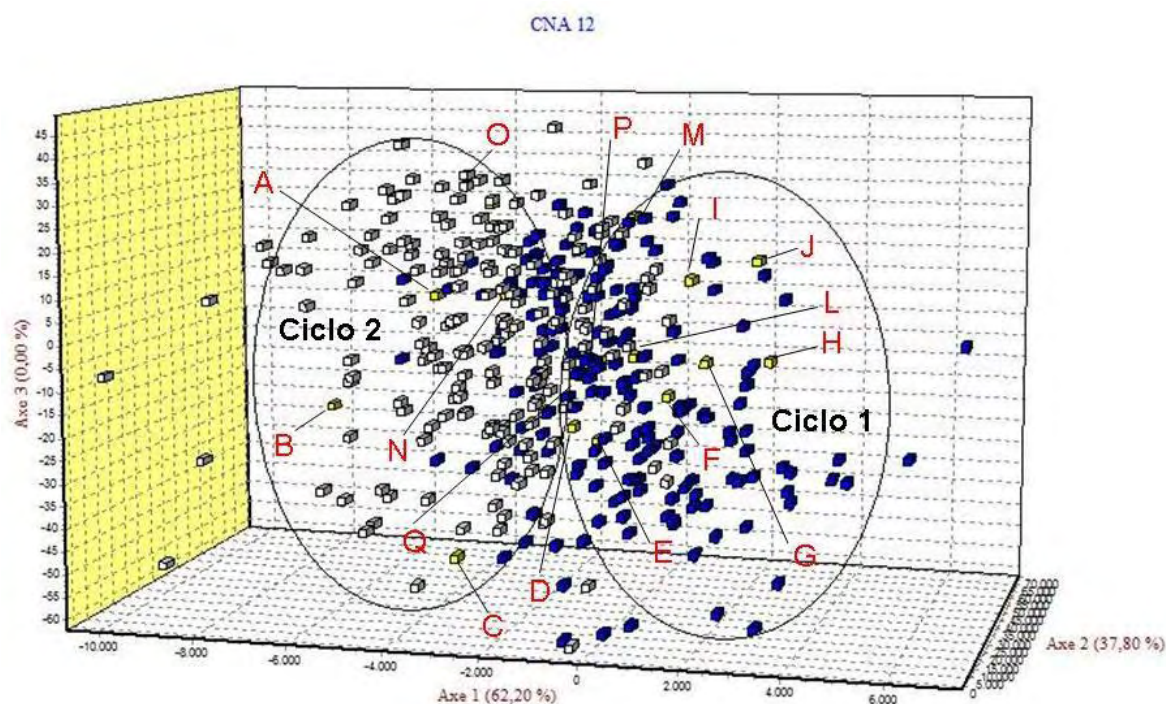


Figura 7. Análise fatorial de correspondência e o padrão de distribuição espacial entre os genitores e os ciclos de seleção recorrente da população CNA 12. Estão destacados em azul os indivíduos do grupo Ciclo 1, em branco os indivíduos do grupo Ciclo 2. Os genitores estão destacados em amarelo correspondentes às letras. A: IRGA 417; B: CNA 5287; C: Javaé; D: Diamante; E: CNA 8502; F: Marajó; G: CNA 9020; H: Oryzica 1; I: Taím; J: CNA 8621; L: Formoso; M: CNA 9029; N: Jequitibá; O: Chuí; P: Oryzica Llanos 4; Q: Huan Sen Goo.

5 DISCUSSÃO

A utilização do método de melhoramento populacional por seleção recorrente é uma importante alternativa para a obtenção de genótipos de ampla base genética, uma vez que pressupõe ciclos contínuos de recombinação, seleção de plantas cujas combinações resultam em melhor efeito fenotípico, e nova recombinação. A escolha dos genitores que darão início à formação de uma população recorrente é uma fundamental do método, pois os ganhos genéticos posteriores dependerão fundamentalmente da alta capacidade geral de combinação destes genitores. Quando esta informação não está disponível, o conhecimento do melhorista com relação aos genótipos de trabalho é fundamental para uma escolha adequada.

Este trabalho objetivou avaliar a variação alélica existente entre e dentro dos ciclos de duas populações de seleção recorrente, a CNA-IRAT 4 recombinada à campo através da presença do gene de macho-esterilidade, e a CNA 12, recombinada manualmente. Esta avaliação, somente se tornou possível após o desenvolvimento dos marcadores moleculares, sendo de fundamental importância para avaliar a participação dos alelos parentais no decorrer dos ciclos. Como são realizadas seleções ao longo dos ciclos, naturalmente haverá a diminuição do número de alelos parentais, ou seja, a variabilidade genética paulatinamente irá se exaurindo, o que poderá ser refletido na diminuição gradual dos ganhos genéticos. O monitoramento dos alelos a partir do uso de marcadores moleculares podem verificar esta situação antes que a redução dos ganhos seja efetivada. Com base nesta informação, caberá ao melhorista a decisão de começar uma nova população, ou adicionar novos genótipos geneticamente divergentes em relação aos genótipos presentes nos ciclos avançados das populações, e que possuam bons atributos agronômicos na etapa de recombinação, para recompor a variabilidade alélica da população. Novamente os marcadores moleculares podem contribuir decisivamente para o sucesso desta etapa, através da determinação e comparação dos perfis moleculares dos potenciais genitores com uma amostra dos indivíduos presentes nos ciclos avançados.

Os dendrogramas obtidos com os dez genitores da CNA-IRAT 4, e com os 16 genitores da CNA 12, indicam uma ampla variabilidade genética, resultante da boa escolha realizada pelos melhoristas. Preenchido este requisito, todo o sucesso no melhoramento populacional e na extração de linhagens elite dependerá da boa condução da população, que compreende a garantia da recombinação, e a condução de bons experimentos de campo, para permitir a seleção das melhores combinações alélicas.

Para que os marcadores sejam úteis no monitoramento da variabilidade alélica, são necessários dois requisitos básicos: a escolha de marcadores moleculares que possuam boa informatividade, isto é, capacidade de identificar variações alélicas entre os indivíduos, e uma amostragem com um número suficiente de indivíduos que permita que seja detectada a maioria, ou preferivelmente, a totalidade de alelos presentes na população a partir dos locos utilizados na análise molecular. Neste trabalho foram utilizados marcadores moleculares microssatélites, que é a classe mais informativa utilizada na caracterização de germoplasma, em testes de paternidade e determinação do grau de relacionamento genético entre indivíduos.

Foram amostrados 180 indivíduos de cada um dos ciclos, para as duas populações, o que em números absolutos, é bastante superior aos utilizados por Ferreira et al. (2000), Badan (2003) e Ramis et al. (2003) na caracterização de populações de seleção recorrente em arroz. A análise baseada no número reduzido de indivíduos amostrados pode subestimar a variabilidade genética encontrada nos ciclos de seleção e indicar erroneamente que variabilidade genética da população está exaurida.

O tamanho efetivo amostral encontrado para a CNA-IRAT 4 variou de 138 a 176 indivíduos, enquanto na CNA 12 o tamanho efetivo amostral foi de 112 e 116 indivíduos. O menor tamanho efetivo da CNA 12 foi resultante da maior endogamia desta população, e indica que quando avaliadas populações recombinadas manualmente, um número maior de indivíduos deve ser avaliado. Baseado no número de alelos parentais que não foram amostrados em um ciclo, e que voltaram a aparecer no ciclo subsequente, estima-se, para as duas populações, que 93% a 94% dos alelos dos genitores foram amostrados a cada ciclo, o que é um percentual bastante elevado e suficiente para avaliar adequadamente a variabilidade genética ao longo dos ciclos.

5.1 DETERMINAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA

Neste trabalho, os valores de alelos/loco da população sintetizada com o uso da macho-esterilidade não diferiram dos resultados das populações obtidas pela recombinação manual, indicando que a variabilidade genética presente ao longo dos ciclos não depende do método de condução das populações mas sim de uma boa escolha dos genitores para a formação da população base, aonde teoricamente está contido todo potencial de variabilidade genética da população.

Os valores do número de alelos/loco obtidos nas populações CNA-IRAT 4 e CNA 12 foram semelhantes às médias encontradas em outras populações de seleção recorrente de arroz. A população CNA 7, também desenvolvida através do uso da macho-esterilidade apresentaram médias de 5,3 e 5,0 alelos/loco para os ciclos 0 e 2 através da análise de 96 indivíduos por ciclo em dez marcadores SSR (Badan, 2003). A população proveniente de um programa de seleção recorrente venezuelano PFD-1 (Ramis, 2003), também recombinada à campo, encontrou valores semelhantes na análise com dez marcadores em 92 indivíduos de cada ciclo, com uma média de 5,3 e 4,6 alelos/loco para os ciclos 0 e 2 desta população. A análise de sete marcadores SSR em 55 indivíduos do ciclo 0 e 60 indivíduos do ciclo 3 da população de seleção recorrente CNA 5 (Ferreira et al., 2000) mostrou valores médios semelhantes ao encontrados neste trabalho, com 5,14 alelos/loco no ciclo 0 e 4,5 alelos/loco no ciclo 3.

A condução de populações de seleção recorrente, que é de longo prazo, induz a situação de flutuação da frequência alélica no decorrer dos ciclos, ou seja, determinado alelo raro pode tornar-se freqüente, ou ser eliminado da população, resultando na ocorrência de deriva genética. Este caso, juntamente com o acúmulo de alelos não esperados influenciam de modo importante a média de alelos detectados durante os ciclos de seleção. A ocorrência de alelos não esperados não está sob total controle, e a caracterização molecular dos indivíduos permitiu detectar e quantificar de modo inédito a sua ocorrência. As populações CNA-IRAT 4 e CNA 12 detectaram alelos não esperados em todos os ciclos avaliados.

Embora bem menos freqüentes que a população CNA-IRAT 4 os alelos não esperados na população CNA12 comprometeram apenas 2,78% dos indivíduos (cinco genótipos) do ciclo 1 e 7,78% dos indivíduos (14 genótipos) do ciclo 2. Na CNA-IRAT 4, essa taxa de alelos não-esperados chegou a comprometer cerca de 83,33% (149 indivíduos) da população no último ciclo analisado. Um número de alelos não-esperados na população CNA-IRAT 4 é esperado devido ao processo de recombinações à campo, aonde se tem um

menor controle dos cruzamentos que devem ser ao acaso. O número de alelos não-esperados nestas populações acabou sendo muito alto comprometendo mais da metade da população CNA-IRAT 4. E a população CNA 12, não conseguiu também eliminar completamente a presença desse tipo de alelo, apesar do rígido controle esperado através das recombinações dirigidas manualmente. Em um estudo de duas populações de seleção recorrente em milho, as progênies foram analisadas por marcadores RFLP e SSR, resultando na detecção de alelos não provenientes dos genitores em uma proporção de aproximadamente 10% nos últimos ciclos analisados em ambas as populações (Falke et al., 2007).

Os valores médio de PIC no decorrer dos ciclos em ambas populações apresentaram pouca variação, resultante da flutuação natural do número e frequência de alelos detectados na amostragem da população. Contudo, os grupos de genitores de cada uma das populações produziram um PIC médio maior do que o PIC médio encontrado nos ciclos, ou seja, apesar da variabilidade genética do grupo de genitores ser grande, observou-se uma tendência dos valores médios do PIC estabilizarem em um patamar inferior. Deste modo, é fundamental que as populações sejam desenvolvidas com genitores com pouco vínculo genético, a fim de assegurar que exista variabilidade genética suficiente para ser recombinada e selecionada ao longo dos programa de seleção recorrente.

Possivelmente o melhor aferidor da eficiência da etapa de recombinação dos dois métodos (macho-esterilidade e manual) seja o percentual de alelos dos parentais detectados ao longo dos ciclos, independente de sua frequência. Segundo este critério, a CNA 12 (recombinada manualmente) apresentou um aumento do número de alelos detectados, enquanto na CNA-IRAT 4, observou-se um decréscimo. Este resultado reflete a capacidade de serem realizadas combinações não-aleatórias quando do cruzamento manual, o que faz com que haja o acúmulo de alelos representativos dos genitores (devido ao sistema de cruzamento estar baseado no método de dialelo circulante), ou seja, ao longo dos cruzamentos, resultando no aumento da participação de diversos genitores na composição das progênies dos ciclos avançados de recombinação. A caracterização molecular deste trabalho comprovou que isto somente está sendo possível na recombinação manual.

5.2 ANÁLISE DA ESTRUTURA POPULACIONAL

De acordo com o teste realizado, determinou-se que as duas populações não estavam em Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW). Populações em EHW são capazes de manter suas frequências gênicas e genotípicas ao longo de várias gerações, sem que haja flutuações destas frequências ao longo dos anos, tornando possível a estimação de parâmetros e previsões sobre o comportamento e distribuição alélica ao longo do tempo. Populações de seleção recorrente, teoricamente poderiam se adequar ao EHW, desde que fossem panmíticas, ou seja, realizassem cruzamentos ao acaso, não existindo nenhum tipo de cruzamento preferencial, ausência de fluxo gênico, deriva genética ou mutação, e que pudessem ser suficientemente grandes a ponto de se comportarem como populações infinitas (Falconer, 1986). Contudo, populações de seleção recorrente não estão em EHW, pois são incapazes de ter todos os cruzamentos ao acaso, tanto no caso da macho-esterilidade, devido aos cruzamentos preferenciais ocasionados por plantas de maior altura ou que produzam mais pólen; quanto no caso dos cruzamento dirigido, pela limitação do número de combinações. Através da identificação de alelos não esperados, percebe-se que existe fluxo gênico nas populações de seleção recorrente, mesmo em populações recombinadas manualmente, como a CNA 12. Outro pressuposto para o EHW que não pode ser obtido em populações de seleção recorrente refere-se ao tamanho das populações, que são reduzidos devido a dificuldade de condução de populações grandes em campos experimentais. A seleção realizada dentro de cada ciclo induz ao processo de deriva genética.

A perda da variabilidade genética, ou aumento da endogamia, pode ser estimada pela estatística F de Wright, a qual é capaz de mensurar os efeitos da fragmentação da população (F_{st}) e do sistema reprodutivo (F_{is}). Em populações de espécies autógamas, como o arroz, a perda da variabilidade é principalmente devido ao sistema reprodutivo, que acaba aumentando a endogamia dentro da população, fazendo com que haja uma diminuição de indivíduos heterozigotos, aumentando-se consequentemente o número de homozigotos (Falconer, 1986). Em populações de seleção recorrente, por haver a etapa de recombinação entre indivíduos, os valores obtidos são diferentes do esperado para espécies preferencialmente autógamas. Na população CNA-IRAT 4, os valores comparativos de F_{st} dos genitores com os indivíduos dos ciclos sempre foram maiores ou iguais aos de F_{is} , indicando que a endogamia é devida principalmente à subdivisão, ou seja, oriunda do cruzamento preferencial entre determinado grupo de indivíduos. A análise comparativa também indicou que o valor da endogamia total (F_{it})

aumentou com o decorrer dos ciclos, o que indica que apesar da recombinação e dos alelos não esperados, está ocorrendo um aumento de endogamia em relação ao grupo de genitores. Provavelmente não está tendo o efeito compensatório da perda de variabilidade com a introdução dos alelos não esperados. Uma evidência do excesso de alelos raros foi o valor baixo dos alelos esperados em comparação ao número médio de alelos encontrados por ciclo. Por outro lado, na população CNA 12, a comparação da endogamia dos genitores e os indivíduos dos diferentes ciclos mostrou uma redução nos valores de F_{st} e F_{is} , os quais sempre foram de igual magnitude entre si, indicando que tanto o sistema reprodutivo quanto a subdivisão tiveram o mesmo efeito na endogamia dos ciclos. Diferentemente da CNA-IRAT 4, a endogamia total (F_{it}) dos ciclos diminuiu em relação a endogamia dos genitores, indicando que a recombinação manual está ampliando a variabilidade genética. Esta observação é de extrema relevância, pois reflete não somente a presença de alelos na população, mas o modo como estes estão sendo combinados, sendo então o melhor parâmetro para aferir a variabilidade genética de uma população de seleção recorrente.

Apesar das populações de seleção recorrente realizarem fecundação cruzada artificial, à medida em que vão sendo restringidos o número de alelos, alguns alelos vão sendo fixados. Devido à alta frequência deste alelo na população, haverá formação de um maior número de gametas que contenham esse alelo predominante. Esses alelos, por serem mais numerosos, acabam participando de um maior número de cruzamentos. Assim, mesmo realizando-se a fecundação cruzada, os alelos unidos no mesmo loco podem ser idênticos, aumentando o número de indivíduos contendo locos em homozigose. De acordo com os valores calculados para o F_{is} dentro de cada ciclo, as populações CNA-IRAT 4 e CNA 12 estão sendo levadas a resultados opostos: enquanto o número de heterozigotos caiu com o avanço dos ciclos na CNA-IRAT 4, na CNA 12 este número aumentou, novamente devido aos cruzamentos dirigidos, que estão possibilitando uma combinação mais efetiva de alelos diferentes. O esquema de cruzamentos em dialelo circulante permite a recombinação programada. A não aderência ao EHW e o déficit do número de heterozigotos também foram notados pelas populações de arroz PFD-1 e CNA 7 recombinadas com o gene da macho-esterilidade (Ramis, 2003; Badan, 2003). Ramis (2003) indicou três fatores como os responsáveis: existência de cruzamentos preferenciais, de ter havido poucas oportunidades de recombinação na população base e um certo grau de endogamia presente nas populações.

A AMOVA calculada para ambas populações mostrou que a maior parte da variação surgiu devido à diferenças entre os indivíduos, mas não entre ciclos, para as duas populações. Não há sugestão de estruturação em nenhum dos níveis hierárquicos analisados, assim as populações não possuem diferenças entre os ciclos a ponto de separá-los em grupos diferentes, ou seja, ao longo dos ciclos de seleção o número de recombinações e seleções não conseguiram alterar as frequências gênicas o suficiente a ponto de se caracterizarem como grupos divergentes. Embora não significativas, essas pequenas diferenças encontradas acabam indicando algum nível de divergência encontrada entre os ciclos, como sugere a análise fatorial de correspondência (AFC).

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A caracterização molecular da CNA-IRAT 4 foi fundamental para detectar a presença de alelos não-esperados (em baixa frequência) e a diminuição do número de alelos parentais sendo recombinados, o que pode exaurir rapidamente a variabilidade genética desta população, e que pode acarretar a redução de seus ganhos genéticos. Recomenda-se para esta população, e para as demais recombinadas utilizando o gene da macho-esterilidade, que a etapa de recombinação seja realizada em áreas isoladas, e com a instalação de bordadura com plantas de maior porte, como o milho. Para ampliar a base genética da CNA-IRAT 4, é recomendada a introdução de genótipos elite com maior Capacidade Geral de Combinação, que tenham sido caracterizados molecularmente, para que sejam selecionados os de base genética ampla, e que possuam também bons atributos agrônômicos, para não reduzir ainda mais os ganhos genéticos da população. Genótipos derivados de programas de pré-melhoramento devem atender estes requisitos, e por este motivo, devem fazer parte de programas modernos de melhoramento genético do arroz.

A metodologia de recombinação manual em populações de seleção recorrente mostrou-se mais eficiente que a recombinação utilizando o gene da macho-esterilidade em todos os aspectos, excetuando o custo envolvido para a realização dos cruzamentos dirigidos. Como foram detectados alelos não-esperados também na CNA 12, recomenda-se cuidados especiais durante os cruzamentos, realizados em casa de vegetação, e durante os ensaios de avaliação de progênie, quando também deverão ser observados os mesmos cuidados sugeridos para a recombinação a campo da CNA-IRAT 4. Com a eficiência comprovada do método de recombinação manual, não existe a necessidade de introdução de novos genótipos para ampliação da variabilidade genética da população CNA 12.

7 CONCLUSÕES

- 1) As populações CNA-IRAT 4 e CNA 12 foram estabelecidas a partir de genitores de base genética ampla;
- 2) Os marcadores moleculares SSR são capazes de detectar a presença de alelos que não foram provenientes dos genitores que deram origem às duas populações;
- 3) A utilização de 180 indivíduos por ciclo permitiu uma amostragem ao redor de 94% dos alelos dos genitores nas duas populações;
- 4) A estimativa do coeficiente de distância Rogers-W médio e o percentual de alelos parentais presentes nos indivíduos de cada ciclo são importantes parâmetros para mensurar a variabilidade genética entre ciclos, a partir da comparação com os valores encontrados nos genitores para estes parâmetros;
- 5) O estudo da análise de variância molecular (AMOVA) não indica nenhum tipo de estruturação entre os ciclos de seleção definindo que a maior parte da variação é encontrada entre os indivíduos dentro dos ciclos do que entre os ciclos em ambas as populações;
- 6) Os parâmetros Fis e Fit da estatística F de Wright indicam que a recombinação manual está ampliando a variabilidade genética da população CNA 12, enquanto que a recombinação via gene da macho-esterilidade está reduzindo a variabilidade genética da CNA-IRAT 4.
- 7) A AFC comprova que na CNA 12 todos os genitores fazem parte dos agrupamentos formados pelos indivíduos dos ciclos 1 e 2, ou seja, participam efetivamente do processo de recombinação.

8 REFERÊNCIAS

BADAN, A. C. C. **Ganho com seleção e diversidade genética: medidas para monitorar o melhoramento populacional de arroz.** 2003. 104 f. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular: Genética Vegetal e Melhoramento) - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

BASSINELO, P. Z.; NAVES, M. M. V. Bioquímica e saúde. In: SANTOS, A. B.; STONE, L. F.; VIEIRA, N. R. A. (Ed.). **A cultura do arroz no Brasil.** 2. ed. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2006. v. 1, cap. 2, p. 31-51.

BELKHIR, K.; BORSA, P.; CHIKHI, L.; RAUFASTE, N.; BONHOMME, F. **Genetix.** Univeristé de Montpellier Version 4.05.2. 2001. Disponível em: <<http://www.universitymontp2.fr/~genetix/genetix/genetix.htm>>. Acesso em: 5 mai. 2007.

BORBA, T. C. O. **Diversidade genética e mapeamento associativo para produção e qualidade de grãos dos acessos melhorados da coleção nuclear de arroz da embrapa.** 2007. 109 f. Tese (Doutorado em Agronomia: Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola de Agronomia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2007.

BORÉM, A.; MIRANDA, G. V. Seleção recorrente. In: BORÉM, A. (Ed.). **Melhoramento de plantas.** 4. ed. Viçosa: UFV, 2005. v. 1, cap. 19, p. 283-303.

BRESEGHELLO, F.; RANGEL, P. H. N.; MORAIS, O. P. Ganho de produtividade pelo melhoramento genético do arroz irrigado no nordeste do Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 34, n. 3, p. 399-407, 1999.

BRONDANI, C., BRONDANI, R.P.V., RANGEL, P.H.N.; FERREIRA, M.E. Development and mapping of *Oryza glumaepatula* – derived microsatellite markers in the interspecific cross *Oryza glumaepatula* x *Oryza sativa*. **Hereditas**, Lund, v. 134, n. 1, p. 59-71, 2001.

BRONDANI, C.; BRONDANI, R. P. V.; RANGEL, P. H. N.; FERREIRA, M. E. QTL mapping and introgression of yield related traits from *Oryza glumaepatula* to cultivated rice (*Oryza sativa*) using microsatellite markers. **Theoretical and Applied Genetics**, Heidelberg, v. 104, n. 6-7, p. 1192-1203, 2002.

BRONDANI, C.; BRONDANI, R. P. V.; BORBA, T. C. O.; BRUNES, T., RANGEL, P. H. N., GUIMARÃES, E. P. Microsatellite analysis of tio taka, the first rice commercial cultivar released from the recurrent selection breeding method. **Internacional Rice Commission Newsletter (FAO)**, Roma, v. 54, n. 5, p. 52-62, 2005.

- BRUNES, T. O.; RANGEL, P. H. N.; BRONDANI, R. P. V.; NETO, F. M.; NEVES, P. C.; BRONDANI, C. Fluxo gênico entre arroz vermelho e arroz cultivado estimado por meio de marcadores microssatélites. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 37, n. 2, p. 86-92, 2007.
- CASTRO, E. M.; BRESEGHELLO, F.; RANGEL, P. H. N.; MORAIS, O. P. Melhoramento do arroz. In: BORÉM, A. (Ed.). **Melhoramento de espécies cultivadas**. 1. ed. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1999. v.1, cap 4, p.95-130.
- CASTRO, E. M.; MORAIS, O. P., SANT'ANA, E. P, BRESEGHELLO, F.; NETO, F. P. M. Mejoramiento poblacional de arroz de tierras altas em Brasil. In: GUIMARÃES, E. P. (Ed.). **Avances en el mejoramiento poblacional en arroz**. 21. ed. Cali, Colômbia: Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), 2000. v. 1, cap. 14, p. 221-230.
- CHANG, T.T. **Manual on genetic conservation of rice germplasm for evaluation and utilization**. Filipinas: International Rice Research Institute (IRRI), 1976. 77 p.
- CHÂTEL, M; GUIMARÃES, E.P. Methodologies for managing recurrent selection. In: CHÂTEL, M.; GUIMARÃES, E. P. (Ed.). **Recurrent selection in rice, using a male-sterile gene**. 1. ed. Cali, Colômbia: Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), 1997. v. 1, cap. 1, p. 7-52.
- CHAVES, L. J. Critérios para escoger progenitors para un programa de selección recurrente. In: GUIMARÃES, E. P. (Ed.). **Selección recurrente en arroz**. Cali, Colômbia: Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), 1997. v. 1, cap. 2, p. 13-24.
- CHEN, W. B.; SATO, Y. I.; NAKAMURA, I.; NAKAI, H. Indica-japonica differentiation in Chinese rice landraces. **Euphytica**, Netherlands, v. 74, n. 3, p. 195-201, 1994.
- CHO, Y. G.; ISHII, T.; TEMNYKH, S.; CHEN, X.; LIPOVICH, L.; McCOUCH, S. R.; PARK, W. D.; AYRES, N.; CARTINHO, S. Diversity of microsatellites derived from genomic libraries and GenBank sequences in rice (*Oryza sativa* L.). **Theoretical Applied Genetics**, Heidelberg, v. 100, n. 5, p. 713-722, 2000.
- COCKERHAM, C.C. Variance of gene frequency. **Evolution**, Lancaster, v. 23, n. 1, p. 72-74, 1969.
- CONWAY, G.; TOENNIESSEN, G. Feeding the world in the twenty-first century. **Nature**, London, v. 402, n. 2, p. 55-58, 1999.
- COURTOIS, B.; FILLOUX, D.; AHMADI, N.; NOYER, J-L.; BILLOT, C.; GUIMARÃES, E. P. Uso de marcadores moleculares para el manejo de poblaciones de arroz mejoradas mediante selección recurrente. In: GUIMARÃES, E. P. (Ed.). **Mejoramiento poblacional, una alternativa para explorar los recursos genéticos del arroz en américa latina**. Cali, Colômbia: Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), 2003. v. 1, cap. 4, p. 53-75.

CRESTE, S.; TULMANN, A. N.; FIGUEIRA, A. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. **Plant Molecular Biology Reporter**, New York, v. 19, n. 5, p. 229-306. 2001.

DE KOYER, D.L.; STUTHMAN, D.D.; FULCHER, R.G. Effects of recurrent selection for grain yield on oat kernel morphology. **Crop Science**, Madison, v. 33, n. 2, p. 924-928, 1993.

DJÈ, Y.; HEUERTZ, M.; LEFÈBVRE, C.; VEKEMANS, X. Assessment of genetic diversity within and among germplasm accessions in cultivated sorghum using microsatellite markers. **Theoretical Applied Genetics**, Heidelberg, v. 100, n. 6, p. 918-925, 1999.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (Embrapa). **Sistemas de Produção**. n. 1, 2003. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br>>. Acesso em: 12 jun. 2007.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (Embrapa). **Sócio Economia**, 2007. Disponível em: <<http://www.cnpaf.embrapa.br/apps/socioeconomia/docs/arroz/sistemaplantioarroz.htm>>. Acesso em: 25 jan. 2008.

FALCONER, D. S. Pequenas populações: II. Condições menos simplificadas. In: FALCONER, D. S. **Introdução à genética quantitativa**. 1. ed. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1987. v. 1 cap. 4, p. 54-66.

FALKE, K. C.; FLACHENECKER, C.; MELCHINGER, A. E.; PIEPHO, H. P.; MAURER, H. P., FRISCH, M. Temporal changes in allele frequencies in two European F₂ flint maize populations under modified recurrent full-sib selection. **Theoretical and Applied Genetics**, Heidelberg, v. 114, n. 5, p. 765-776, 2007.

FAO: Food and Agriculture Organization. **FAOSTATS**. 2006. Disponível em <<http://www.faostat.fao.org>>. Acesso em: 30 fev. 2008.

FEDERER, W. T. Augmented (or hoonuiaku) designs. **Hawaiian Planter's Record**, Aiea, v. 55, n. 3, p. 191-208, 1956.

FEHR, W. R. **Principles of cultivar development: theory and technique**. New York: Mcmillan Publishing, 1987, v. 1, 536 p.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed. Brasília: Embrapa -Cenargen, 1998. 220 p.

FERREIRA, M. E.; PENTEADO, M. I. O.; BRONDANI, C.; BELÓ, A.; FERREIRA, M. A.; RANGEL, P. H. N. Caracterización y uso de marcadores RAPD y Microsatélites (SSR) em el monitoreo del programa de mejoramiento poblacional en arroz. In: GUIMARÃES, E. P. (Ed.). **Avances en el mejoramiento poblacional en arroz**. Cali, Colômbia: Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), 2000. v. 1, cap. 3, p. 37-64.

FERREIRA, C. M.; RUCATTI, E. G.; VILLAR, P. M. Produção e Aspectos Econômicos. In: SANTOS, A. B.; STONE, L. F.; VIEIRA, N. R. A. **A cultura do arroz no Brasil**. 2.ed. Santo Antônio de Goiás, Embrapa Arroz e Feijão, 2006. v. 1, cap. 4, p. 97-116.

FEUILLET, C.; KELLER B. Comparative genomics in the grass family: molecular characterization of grass genome structure and evolution. **Annals of Botany**, Oxford, v. 89, n. 1, p. 3-10, 2002.

FONSECA, J. R.; BRONDANI, C.; BRONDANI, R. P. V.; RANGEL, P. H. N. Recursos Genéticos. In: SANTOS, A. B.; STONE, L. F.; VIEIRA, N. R. A. **A cultura do arroz no Brasil**. 2. ed. Santo Antônio de Goiás, Embrapa Arroz e Feijão, 2006. v. 1, cap. 8, p. 257-288.

GARRIS, A. J.; TAI, T. H.; COBURN, J.; KRESOVICH, S.; McCOUCH, S. Genetic Structure and Diversity in *Oryza sativa* L. **Genetics**, Pittsburgh, v. 169, n. 5, p. 1631-1638, 2005.

GERALDI, I. O. Selección recurrente en el mejoramiento de plantas. In: GUIMARÃES, E. P. (Ed.). **Selección recurrente en arroz**. Cali, Colômbia: Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), 1997. v. 1, cap. 1, p. 3-11.

GERALDI, I. O.; SOUZA, C. L. J. Muestro genético para programas de mejoramiento poblacional. In: GUIMARÃES, E. P. (Ed.). **Avances en el mejoramiento poblacional en arroz**. 21 ed. Cali, Colômbia: Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), 2000. v. 1, cap. 1, p. 9-19.

GLASZMANN, J. C.; BENOIT, H.; ARNAUD, M. Classification de riz cultivés (*Oryza sativa*. L.): Utilization de la variabilité isoenzymatique. **Agronomie tropicale**, Ohio, v. 39, n. 1, p. 51-66, 1984.

GUIMARÃES, C. T.; SCHUSTER, I.; MAGALHÃES, J. V.; SOUZA JÚNIOR, C. L. Marcadores moleculares no melhoramento de plantas. In: BORÉM, A.; CAIXETA, E. T. (Eds.). **Marcadores Moleculares**, 4 ed. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2006. v. 1, cap. 4, p.107-144.

HALLAUER, A. R.; MIRANDA FILHO, J. B. **Quantitative genetics in maize breeding**. 2. ed, Ames: Iowa State University Press, 1982. 468 p.

HINZE, L. L.; KRESOVICH, S.; NASON, J. D.; LAMKEY. Population genetic diversity in a maize reciprocal recurrent selection program. **Crop Science**, Madison, v. 45, n. 2, p. 2435-2442, 2005.

HUANG, S.; ADAMS, W. R.; ZHOU, Q.; MALLOY, K. P.; VOYLES, D. A.; ANTHONY, J.; KRIZ, A. L.; LUETHY, M. H. Improving nutritional quality of maize proteins by expressing sense and antisense zein genes. **Journal of Agriculture Food and Chemistry**, Bethesda, v. 52, n. 7, p. 1958-1964, 2004.

HORST, W. W.; KRISTINA, M. **Identity 1.0**. Vienna: University of Agricultural Sciences /Centre for Applied Genetics, 1999. 5p. Disponível em: <<http://www.boku.ac.at/zag/forsch/MANUAL.doc>>. Acesso em: 10 dez. 2008.

HULL, F.H. Recurrent selection and specific combining ability in corn. **Journal American Society of Agronomy**, Madison, v. 37, n. 1, p. 137-145, 1945.

INTERNACIONAL RICE GENOME SEQUENCING PROJECT (IRGSP). The map-based sequence of the rice genome. **Nature**, London, v. 436, n. 8, p. 793-800, 2005.

INTERNACIONAL RICE RESEARCH INSTITUTE (IRRI). **Rice around the world**. Disponível em <<http://www.irri.org/science/cnyinfo>>. Acesso em: 27 dez. 2007.

IVANDIC, V.; THOMAS, W. T. B.; NEVO, E.; ZHANG, Z.; FORSTER, B. P. Associations of simple sequence repeats with quantitative trait variation including biotic and abiotic stress tolerance in *Hordeum spontaneum*. **Plant Breeding**, Malden, v. 122, n. 4, p. 300-304, 2003.

JUNG, K-H.; AN, G.; RONALD, P. C. Towards a better bowl of rice: assigning function to tens of thousands of rice genes. **Nature Reviews**, London, v. 9, n. 5, p. 91-101, 2008.

KARASAWA, M. M. G.; VENCOVSKY, R.; SILVA, C. M.; ZUCCHI, M.; OLIVEIRA, G. C. X.; VEASEY, E. A. Mating system of brazilian *Oryza glumepatula* populations studied with microsatellite markers. **Annals of Botany**, Oxford, v. 99, p. 245-253, 2007.

KHUSH, G. S. Origin, dispersal, cultivation and variation of rice. **Plant Molecular Biology**, Zurich, v. 35, n. 2-3, p. 25-34, 1997.

KHUSH, G.S. What it will take to feed 5.0 billion rice consumers in 2030. **Plant Molecular Biology**, Zurich, v. 59, n. 1, p. 1-6, 2005.

KURODA, Y., SATO, Y-I.; BOUNPHANOUSAY, C.; KONO, Y.; TANAKA, K. Gene flow from cultivated rice (*Oryza sativa* L.) to wild *Oryza* species (*O. rufipogon* Griff. and *O. nivara* Sharma and Sharstry) on the Vientiane plain of Laos. **Euphytica**, Netherlands, v. 142, n. 5, p. 75-83, 2005.

LEWIS, P. O., AND ZAYKIN, D. 2001. **Genetic Data Analysis: Computer program for the analysis of allelic data**. Version 1.0 (d16c). Disponível em: <<http://lewis.eeb.uconn.edu/lewishome/software.html>>. Acesso em: 07 jan. 2006.

LITT, M.; LUTY, J. A. A hypervariable microsatellite revealed in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. **American Journal of Human Genetics**, Boston, v. 44, n. 3, p. 398-401, 1989.

LIU, J.; LIU, L.; HOU, N.; ZHANG, A.; LIU, C. Genetic diversity of wheat gene pool of recurrent selection assessed by microsatellite markers and morphological traits. **Euphytica**, Netherlands, v. 155, p. 249-258, 2007.

MATSUO, T.; FUTSUHARA, Y.; KIKUCHI, F.; YAMAGUCHI, H. **Science of the rice plant**. Tokyo: Food and Agriculture Policy Research Center, 1997, v. 3, 1005 p.

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**, Zurich, v. 35, n 2-3, p. 89-99, 1997.

MESSEGUER, J.; MARFÀ, V.; CATLÀ, M. M.; GUIDERDONI, E.; MELÉ, E. A field study of pollen-mediated gene flow from Mediterranean GM rice to conventional rice and the red rice weed. **Molecular Breeding**, Netherlands, v. 13, n. 1, p. 103-112, 2004.

MORAIS, O. P.; CASTRO, E. M.; SANT`ANA, E. P. In: GUIMARÃES, E. P. (Ed.). **Seleccion recurrente en arroz**. Cali, Colômbia: Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), 1997. v. 1, cap. 8, p. 99-115.

MORAIS, O. P.; RANGEL, P. H. N.; FAGUNDES, P. R. R.; CASTRO, E. M.; NEVES, P. C. F.; CUTRIM, V. A.; PRABHU, A. S.; BRONDANI, C.; MAGALHÃES, A. M. J. Melhoramento Genético. In: SANTOS, A. B.; STONE, L. F.; VIEIRA, N. R. A. **A cultura do arroz no Brasil**. 2 ed. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2006. v. 1, cap. 11, p. 289-358.

MULLIS, K.; FALOONA, F. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalysed chain reaction. **Methods Enzymomolecular**, Netherlands, v. 55, n. 1, p. 335-350, 1987.

NAGARAJU, J.; KATHIRVEL, M.; RAMESH, R.; KUMAR, E.; SIDDIQ A.; HASNAIN, S. Genetic analysis of traditional and evolved Basmati and non-Basmati rice varieties by using fluorescence based ISSR-PCR and SSR markers. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 99, n. 9, p. 5836-5841, 2002.

NASS, L. L.; VALOIS, A. C. C.; MELO, I. S.; VALADARES-INGLIS, M. C. **Recursos genéticos e melhoramento – plantas**. Rondonópolis: Fundação MT, 2001. 1183 p.

NI, J.; COLOWIT, P. M.; MACKILL, D. J. Evaluation of Genetic Diversity in Rice Subspecies Using Microsatellite Markers. **Crop Science**, Madison, v. 42, n. 2, p. 601-607, 2002.

OKA, H.I. Intervarietal variation and classification of cultivated rice. **Indian Journal of Genetics & Plant Breeding**, New Delhi, v. 18, n. 1, p. 79-89, 1958.

OLUFOWOTE JO, XU Y, CHEN X, PARK WD, BEACHELL HM, DILDAY RH, GOTO M & MCCOUCH SR. Comparative evaluation of within-cultivar variation of rice (*Oryza sativa* L.) using microsatellite and RFLP markers. **Genome**, Toronto, v. 40, n. 3, p. 370-378, 1997.

PANAUD, O.; CHEN, X.; McCOUCH, S. R. Development of microsatellite markers and characterization of simple sequence length polymorphism (SSLP) in rice (*Oryza sativa* L.). **Molecular Genetics and Genomics**, Heidelberg v. 252, n. 5 p. 597–607, 1996.

PELEMAN, J. D.; VOORT, J. R. The challenges in Marker Assisted Breeding. **Eucarpia Leafy Vegetables**, Netherlands, v. 7, n.1, p. 132-140, 2003.

PINHEIRO, B. S. Características morfo-fisiológicas da planta relacionadas à produtividade. In: VIEIRA, N. R. A.; SANTOS, A. B.; SANT'ANA, E. P. (Ed.). **A cultura do arroz no Brasil**. 1.ed. Santo Antônio de Goiás, Embrapa Arroz e Feijão, 1999. v. 1, cap. 5, p. 117-147.

PINHEIRO, B. S. Características morfofisiológicas da planta relacionadas à produtividade. In: SANTOS, A. B.; STONE, L. F.; VIEIRA, N. R. A. **A cultura do arroz no Brasil**. 2.ed. Santo Antônio de Goiás, Embrapa Arroz e Feijão, 2006. v. 1, cap. 4, p. 209-256.

PINTO, L. R.; VIEIRA, M. L. C.; SOUZA, C. L. J.; SOUZA, A. P. Genetic-diversity assessed by microsatellites in tropical maize populations submitted to a high-intensity reciprocal recurrent selection. **Euphytica**, Netherlands, v. 134, n. 3, p. 277-286, 2003.

RAMIS, C.; BADAN, A. C. C.; DÍAZ, A.; GAMBOA, C. E. Marcadores moleculares como herramientas para el mejoramiento poblacional em arroz. In: GUIMARÃES, E. P. (Ed.). **Mejoramiento poblacional, una alternativa para explorar los recursos genéticos del arroz en américa latina**. Cali, Colômbia: Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), 2003. v. 1, cap. 5, p. 77-97.

RANGEL, P. H. N.; ZIMMERMANN, F. J. P.; NEVES, P. C. F. El CNAPAF investiga: decresce en Brasil el rendimiento del arroz de riego? **Arroz en las Americas**, Cali, v. 13, n. 1, p. 2-4, 1992.

RANGEL, P. H. N.; GUIMARÃES, E. P.; NEVES, P. C. F. Base genética das cultivares de arroz irrigado do Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Goiânia, v. 31, n. 5, p. 349-357, 1996.

RANGEL, P. H. N.; NEVES, P. C. F. Selección recurrente aplicada al arroz de riego en Brasil. In: GUIMARÃES, E. P. (Ed.). **Selección recurrente en arroz**. Cali, Colômbia: Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), 1997. v. 1, cap. 7, p. 79-97.

RANGEL, P. H. N.; MORAIS, O. P.; PFEILSTICKER, F. J. Grain yield gains in three recurrent selection cycles in the CNA-IRAT 4 irrigated rice population. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Viçosa, v. 2, n. 3, p. 369-374, 2002.

RANGEL, P. H. N.; CORDEIRO, A. C. C.; BRONDANI, C.; BRONDANI, R. P. V.; LOPES, S. I. G.; MORAIS, O. P.; SCHIOCCHE, M.; YOKOYAMA, S.; BACHA, R.; ISHIY, T. Avances en el mejoramiento poblacional del arroz de riego en Brasil. In: GUIMARÃES, E. P. (Ed.). **Mejoramiento poblacional, una alternativa para explorar los recursos genéticos del arroz en américa latina**. Cali, Colômbia: Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), 2003. v. 1, cap. 9, p. 151-198.

RANGEL, P. H. N.; BRONDANI, C.; MORAIS, O. P.; SCHIOCCHE, M.; BORBA, T. C. O.; RANGEL, P. N.; BRONDANI, R. P. V.; YOKOYAMA, S.; BACHA, R.; ISHIY, T. Establishment of the irrigated rice cultivar SCSBRS Tio Taka by recurrent selection. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Viçosa v. 7, n. 1, p. 103 - 110, 2007.

RAVI, M.; GEETHANJALI, S.; SAMEEYAFARHEEN, F.; MAHESWARAN, M. Molecular Marker based Genetic Diversity Analysis in Rice (*Oryza sativa* L.) using RAPD and SSR Markers. **Euphytica**, Netherlands, v.133, n. 2, p.243-252, 2003.

REN, F.; LU, B-R.; LI, S.; HUANG, J.; ZHU, Y. A comparative study of genetic relationships among the AA-genome *Oryza* species using RAPD and SSR markers. **Theoretical Applied Genetics**, Heidelberg, v. 108, n. 1, p. 113-120, 2003.

RODER, M. S.; PLASCHKE, J.; KONIG, S. U.; BORNER, A.; SORRELIS, M. A.; TANKSLEY, S. D.; GANAL, M. W. Abundance variability and chromosomal location of microsatellite in wheat. **Genome**, Toronto, v. 246, n. 3, p. 327-333, 1995.

ROHLF, F. J. Contributions to morphometrics. In: MARCUS. L. F.; BELLO, E.; GARCIA-VALDECASAS, A. (Eds). **Relative warp analysis and an example of its application to mosquito wings**. Madrid: Museo Nacional de Ciencias Naturales (CSIC), 1993, cap. 8. p. 131-159.

SCHENEIDER, S.; ROESSLI, D.; EXCOFFIER, L. **Arlequin ver 3.0**. Baltzerstrasse: University of Berne/Computation and molecular population genetics lab, 2000. 4p. Disponível em: <[http://www.la-press.com/redirect_file.php?fileId...1-Excoffier\(Sc\)...](http://www.la-press.com/redirect_file.php?fileId...1-Excoffier(Sc)...)> Acesso em: 3 jan. 2008.

SILVA, L. P.; WALTER, M.; FAGUNDES, C. A. A. Arroz além do prato. **Lavoura Arrozeira**, Porto Alegre, v. 53, n. 1, p. 56-61, 2004.

SINGH, R. J.; IKEHASHI, H. I. Monogenic male-sterility in rice: induction, identification and inheritance. **Crop Science**, Madison, v. 21, n. 3, p. 286-289, 1981.

SOARES, A. A. **Desempenho do Melhoramento Genético do Arroz de Sequeiro e irrigado na década de 80 em Minas Gerais**. 1992. 188 f. Tese (Doutorado em Agronomia: Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola de Agronomia, ESALQ: Piracicaba, 1992.

STRUSS, D.; PLIESKE, J. The use of microsatellite markers for detection of genetic diversity in barley populations. **Theoretical and Applied Genetics**, Heidelberg, n. 1-2, v. 97, p. 308-315, 1998.

TANKSLEY, S. D.; McCOUCH, S. R. Seed banks and molecular maps: unlocking genetic potencial from the wild. **Science**, Washington, v. 277, n. 5329, p. 1063-1066, 1997.

THABUIS, A.; LEFEBVRE, V.; BERNARD, G.; DAUBÈZE, A. M.; PHALY, T.; POCHARD, E.; PALLOIX, A. Pheotypic and molecular evaluation of a recurrent selection program for a polygenic resistance to *Phytophthora capsici* in pepper. **Theoretical Applied Genetics**, Heidelberg, v. 109, n. 2, p.342-351, 2004.

VAUGHAN D. A. **The Wild Relatives of Rice: A Genetic Resources Handbook**. Filipinas: International Rice Research Institute (IRRI), 1994, 250 p.

VAUGHAN, D. A.; MORISHIMA, H.; KADOWAKI, K. Diversity in the *Oryza* genus. **Current Opinion in Plant Biology**, Maryland Heights, v. 6, n. 2, p. 139-146, 2003.

VIEIRA, N. R. A.; CARVALHO, J. L. V. Qualidade tecnológica. In: VIEIRA, N. R. A.; SANTOS, A. B.; SANT`ANA, E. P. (Ed.). **A cultura do arroz no Brasil**. 1.ed. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 1999. v. 1, cap. 21, p. 582-604.

WATANABE, Y. Genomic constitution of genus *Oryza*. In: MATSUO, T.; FUTSUHARA, Y.; KIKUCHI, F.; YAMAGUCHI, H. (Ed.). **Science of the rice plant**. 1.ed. Tokio: Food and Agriculture Policy Research Center, 1997. v. 3, cap. 1, p. 29-68.

WEBER, J. L.; MAY, P.E. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. **American Journal of Human Genetics**, Boston, v. 44, n. 3, p. 388-396, 1989.

WELSH, J.; MCCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 18, p. 7213-7218, 1990.

WHEELER, N. C.; JERMSTAD, K. D.; KRUTOVSKY, K.; AITKEN, S. N.; HOWE, G. T.; KRAKOWSKI, J.; NEALE, D. B. Mapping of quantitative trait loci controlling adaptive traits in coastal Douglas-r. IV. Cold-hardiness QTL verification and candidate gene mapping. **Molecular Breeding**, Netherlands, v. 15, p. 145-156, 2005.

WILLIAMS, J. G.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, L. A.; TINGEY, S. V. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.18, p.6531-6535, 1990.

XIA, X. C.; REIF, J. C.; HOISINGTON, D. A.; MELCHINGER, A. E.; FRISCH, M.; WARBURTON, M. L. Genetic diversity among CIMMYT maize inbred lines investigated with SSR markers: I. Lowland tropical maize. **Crop Science**, Madison, v. 44, n. 1, p. 2230-2237, 2005.

YOUNG, A.; BOYLE, T.; BROWN, T. The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. **Trends in Ecology & Evolution**, Amesterdan, v. 11, n. 10, p. 413-418, 1996.

ZABEAU, M. Selective restriction fragment amplification: a general method for DNA fingerprinting. **European Patent Application** N.0534858 A1.

ZIMMER, P. D.; OLIVEIRA, A. C.; MALONE, G. **Ferramentas da biotecnologia no melhoramento genético vegetal**. 1ªed. Pelotas: Universidade Federal de Pelotas, 2005, 156 p.

ANEXOS

Anexo A. Descrição da obtenção da população de seleção recorrente CNA-IRAT 4.....77

Anexo B. Descrição da obtenção da população de seleção recorrente CNA 12.....80

Anexo A. Descrição da obtenção da população de seleção recorrente CNA-IRAT 4

A população CNA-IRAT 4 foi sintetizada objetivando o melhoramento populacional para a produção e qualidade de grão. Esta população foi desenvolvida de forma colaborativa entre Embrapa Arroz e Feijão e o Centro de Cooperação Internacional em Pesquisa Agronômica pelo Desenvolvimento (CIRAD). Inicialmente foram intercruzados dez genótipos de arroz irrigado da subespécie *Indica*, sendo que destes, 9 foram utilizados como parental masculino, e um como parental feminino, o mutante da cultivar IR-36 (ms/ms) que contém o gene da macho-esterilidade. O cruzamento F₁ gerou indivíduos com genótipos heterozigotos para o gene da esterilidade (Ms/ms).

Visando aumentar a participação das nove variedades usadas como genitores masculinos e também para que todos os citoplasmas estivessem presentes na população a ser formada, os genótipos (Ms/ms) foram retrocruzados com o respectivo parental masculino. Assim, as sementes provenientes desses retrocruzamentos foram homozigotas dominantes (Ms/Ms) ou heterozigotas (Ms/ms), ou seja, possuíam a capacidade de produção de pólen. Para que as recombinações à campo fossem possíveis, a macho-esterilidade teve que ser restaurada na população através da realização de auto-fecundações dos genótipos retrocruzados, recuperando assim alguns genótipos recessivos (ms/ms). As sementes resultantes dessa autofecundação foram colhidas e misturadas para compor o ciclo da população CNA-IRAT 4/0/0, o que corresponde ao primeiro ciclo de recombinação. Este germoplasma foi submetido a mais três ciclos de recombinação, resultando em plantas férteis e formação da população CNA-IRAT 4/0/3, também chamada de população base ou S₀. A participação de cada genitor na formação da população base está representada na Tabela I.

As sementes originadas da população base foram então semeadas, possuindo composição genética de duas plantas macho-férteis para uma planta macho-estéril (2 MF: 1 ME). Posteriormente foi feita uma seleção somente em plantas MF, as quais sofreram um ciclo de autofecundação, formando as famílias S_{0:1}. Parte destas sementes foram armazenadas, enquanto a outra parte foi semeada para a escolha de 200 famílias tendo como principais critérios de seleção o potencial produtivo, a resistência às doenças mais comuns e ao tipo de grão. Foi realizada uma segunda seleção, novamente em plantas MF, as quais foram avançadas até S_{0:2}.

Tabela I. Genealogia dos dez genótipos que originaram a população CNA-IRAT 4 e a participação genética relativa de cada genitor na formação da população base (S_0).

Genitores	Genealogia	Participação (%)
BG 90-2	IR262/Ramadja	8,33
CNA 7	T 141/IR665-1-1-75-3	8,33
CNA 3815	CICA 4/BG90-2//SML 5617	8,33
CNA 3848	IR36/CICA7//5461	8,33
CNA 3887	BG90-2/Tetep//4440	8,33
Colômbia 1	Napal/Takao Iku 18	8,33
Eloni	IR454/SML Kapuri//SML 66410	8,33
Nanicão	Cultivar Tradicional-Brasil	8,33
UPR 103.80.1.2	IR24/Cauvery	8,33
IR 36 (ms/ms)	Mutante de IR36	25,00

Fonte: Rangel & Neves (1997).

As famílias $S_{0:2}$ foram avaliadas no delineamento experimental de Blocos Aumentados de Federer (1956), onde a seleção foi feita principalmente sobre as principais características agronômicas, como a resistência à doenças, tipo de grão e ainda quanto ao rendimento médio das progênes. A intensidade de seleção utilizada foi de 25%, o que garantiu um tamanho efetivo de cinquenta plantas. Um segundo ponto crítico que deve ser levado em consideração nesta fase é o efeito do gene da macho-esterilidade na população. Quando selecionados erroneamente essas plantas, acaba ocorrendo uma subestimação do rendimento de grãos devido à taxa reduzida de formação de grãos, cerca de 12% menor que a taxa de plantas normais, devendo tomar esse tipo de cuidado extra. As sementes $S_{0:2}$ provenientes das cinquenta melhores famílias foram avaliadas em ensaios regionais de diferentes localidades, seguindo para extração de linhagens para localidades específicas. Por outro lado, as sementes $S_{0:1}$ das famílias selecionadas, e previamente armazenadas, foram identificadas e semeadas para a recombinação a campo e formação do primeiro ciclo de seleção da população CNA-IRAT 4/1/1.

A frequência das plantas macho-estéreis dentro da população é de grande importância para a recombinação a campo para a formação da geração seguinte. Ao se recombinar famílias $S_{0:1}$, tem-se uma proporção de três plantas normais para uma planta macho-estéril, enquanto ao se recombinar famílias $S_{0:2}$, aonde existe um ciclo de autofecundação a mais, há uma redução do número de plantas macho-estéreis. Esse aspecto é de extrema importância, já que pode resultar em uma influência negativa na recombinação, ou seja, pode ocorrer um número reduzido de sementes para a formação do próximo ciclo.

As sementes do primeiro ciclo são semeadas para se executar a seleção das plantas férteis para posterior avaliação quanto ao rendimento médio da população à campo. Logo após a escolha das melhores famílias inicia-se um novo ciclo de seleção, o qual é conduzido da mesma forma detalhada acima. Assim, cada ciclo de seleção recorrente é completado a cada dois anos, ou seja, é um programa de melhoramento populacional de longo prazo, pois as etapas de seleção e recombinação das melhores plantas deve ser repetido tantos ciclos quanto forem necessários. As populações de seleção recorrente, uma vez criadas, tornam possíveis a produção de diversos ciclos para a geração de genótipos superiores de combinações alélicas que permitam médias populacionais sempre superiores às geradas no ciclo anterior. A partir do momento que essas médias não são suficientemente superiores, pode-se encerrar o trabalho com esta população, ou adicionar variabilidade genética adicional, introduzindo novos genótipos na etapa de recombinação.

Anexo B. Descrição da obtenção da população de seleção recorrente CNA 12

A população CNA 12 foi elaborada com a finalidade de buscar o desenvolvimento de genótipos com resistência estável à brusone do arroz (*Pyricularia grisea*). Esta população é formada por seis fontes de resistência à brusone, que correspondem aos genótipos Huan-Sen-Goo, CNAi 9020, CNAi 9029, CNAi 5287, Oryzica Lhanos 4 e Oryzica 1; cruzadas com dez genótipos elite: Diamante, Javaé, BRS Formoso, Jequitibá, Marajó, BRS Taim, IRGA 417, BRS Chuí, CNA-8502 e CNA 8621. Os cruzamentos foram obtidos através de um esquema de dialelos parciais, cujas combinações estão descritas na Tabela II. A partir dos híbridos dos cruzamentos, foi realizado um retrocruzamento em direção ao genótipo elite, para diminuir a proporção do genoma das fontes de tolerância à brusone.

Tabela II. Esquema dos retrocruzamentos e da síntese da formação da população base CNA12

Cultivar/Linhagem	Fontes de Resistência à <i>Pyricularia grisea</i>					
	CNA 5287	CNAi 9020	Huan-Sen-Goo	CNAi 9029	Oryzica Llanos 4	Oryzica 1
Diamante	X	X	X			
Javaé				X	X	X
BRS Formoso	X			X		
BRS Taím			X			
IRGA 417					X	
CAN 8502	X					
Jequitiba		X	X			
CAN 8621				X		X
BRS Chuí					X	X
Marajó		X				

Fonte: Rangel et al. (2003).

As fontes de resistência à brusone atuaram como genitor masculino, enquanto os genótipos elite atuaram como genitor feminino. Esses cruzamentos foram gerados de forma manual, de forma tal que cada fonte de resistência foi cruzada pelo menos com 3 genótipos elite, totalizando 18 cruzamentos que resultaram em 18 famílias.

De acordo com Rangel (2003), para a obtenção dos ciclos foi utilizado o esquema de cruzamentos dialélicos parciais proposto por Bearzoti (1996). Neste tipo de cruzamento, cada família foi cruzada com pelo menos outras duas na formação do Ciclo 1

(Tabela III) conforme disposto a seguir para o desenvolvimento desta população. Na formação do ciclo 2 este esquema é repetido (Tabela IV).

A recombinação manual requer um controle rígido das combinações de cruzamentos. A cada ciclo de seleção são obtidas sementes F_2 , que seguem para ensaios de avaliações. Em cada família ou progênie foram inoculadas cerca de 2000 plantas, e destas, vinte plantas resistentes por família foram selecionadas, derivando famílias $F_{2,3}$. Estas 360 famílias (20 famílias x 18 combinações de cruzamentos) foram avaliadas quanto a tolerância à brusone, qualidade de grão e potencial produtivo no delineamento experimental de Blocos Aumentados de Federer (Rangel, 2003). Uma vez identificadas as melhores progênies para as características em evidência, as sementes $F_{2,4}$ das progênies escolhidas são inter cruzadas manualmente em ambientes controlados para a formação do ciclo 3.

Tabela III. Desenvolvimento da população do ciclo 1.

Número de Identificação	Famílias/Progênies
P1	Diamante/5287//Diamante
P2	Diamante/CNAi 9020//Diamante
P3	Diamante/Huan-Sen-Goo//Diamante
P4	Javaé/CNAi9029//Javaé
P5	Javaé/Oryzica Llanos 4//Javaé
P6	Javaé/Oryzica 1//Javaé
P7	Marajó/CNAi9020//Marajó
P8	Taim/Huan-Sen-Goo//Taim
P9	Marajó/Oryzica Llanos 4//Javaé
P10	BRS Chuí/Oryzica Llanos 4//BRS Chuí
P11	BRS Taim/CNAi9020//BRS Taim
P12	Jequitiba/CNAi 9020//Jequitiba
P13	BRS Formoso/5287//BRS Formoso
P14	CNA8502/5287//CNA8502
P15	BRS Chuí/Oryzica Llanos 4//BRS Chuí
P16	CNA8520/5287//CNA8520
P17	Marajó/CNAi9020//Marajó
P18	Marajó/Oryzica 1//Marajó

Fonte: Rangel et al. (2003).

Tabela IV. Desenvolvimento da população do ciclo 2 a partir das combinações dialélicas entre as famílias do ciclo 1.

População Ciclo 2	Combinações entre as populações do Ciclo 1
P ₂ 1	(1x5)/(9x13)
P ₂ 2	(2x6)/(10x14)
P ₂ 3	(3x7)/(11x15)
P ₂ 4	(4x8)/(12x16)
P ₂ 5	(5x9)/(13x17)
P ₂ 6	(6x10)/(14x18)
P ₂ 7	(7x11)/(15x1)
P ₂ 8	(8x12)/(16x2)
P ₂ 9	(9x3)/(17x3)
P ₂ 10	(10x14)/(18x4)
P ₂ 11	(11x15)/(1x5)
P ₂ 12	(12x16)/(2x6)
P ₂ 13	(13x17)/(3x7)
P ₂ 14	(14x18)/(4x8)
P ₂ 15	(15x1)/(5x9)
P ₂ 16	(16x2)/(6x10)
P ₂ 17	(17x3)/(7x11)
P ₂ 18	(18x4)/(8x12)

Fonte: Rangel et al. (2005).