



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA - MELHORAMENTO
GENÉTICO DE PLANTAS

DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES NATURAIS DE
***Gossypium mustelinum* MIERS EX WATT**

UIARA CAVALCANTE SILVA

RECIFE – PE
2012

UIARA CAVALCANTE SILVA

**DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES NATURAIS DE
Gossypium mustelinum MIERS EX WATT**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Melhoramento Genético de Plantas da UFRPE, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Agronomia, Área de concentração: Melhoramento Genético de Plantas.

COMITÊ DE ORIENTAÇÃO:

Orientador: Prof. Dr. Edson Ferreira da Silva

Co-Orientador: Pesquisador Dr. Paulo Augusto Vianna Barroso

**RECIFE-PE, BRASIL
2012**

UIARA CAVALCANTE SILVA

DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES NATURAIS DE *Gossypium mustelinum* MIERS EX WATT

Dissertação defendida e aprovada pela Banca Examinadora em: ____/____/2011.

ORIENTADOR:

Prof. Dr. Edson Ferreira da Silva
UFRPE

EXAMINADORES:

Dr. Paulo Augusto Vianna Barroso
EMBRAPA ALGODÃO
- Núcleo Cerrado -

Prof^a. Dr^a. Elisabeth Ann Vaesey
ESALQ-USP

Prof^a. Dr^a. Luiza Suely Semen Martins
UFRPE

RECIFE – PE, BRASIL

2012

AGRADECIMENTOS

A DEUS, razão de todas as minhas conquistas. Minha força, meu refúgio e fonte inesgotável de esperança!!! Poder Supremo que sempre estará me sustentando e guiando pelos caminhos de luz....à Ti, minha gratidão eterna!!!

A meus pais, que sempre acreditaram em mim e mesmo nas adversidades, estiveram sempre ao meu lado (mesmo que a distância impedisse um afago), o amor sempre foi maior!

A meu irmão, parceiro fiel e solidário em tudo. Confidente e conselheiro. Amigo incondicional que sempre estará comigo...

A toda minha família, que sempre me apoiaram e acreditaram que eu poderia vencer, meus sinceros agradecimentos!!!

Agradeço em especial a meu tio Valdemi, Maria Rosa, Rose, Lena, Meire e Claudemi, que me acolheram com tanto amor, apoio e carinho, que me fizeram permanecer em Brasília e amá-los ainda mais. Seus exemplos de garra e determinação; as palavras de encorajamento me fortaleceram bastante, muito obrigada!

A todos os funcionários do departamento de Agronomia da UFRPE, em especial a Bernardete pelas palavras de apoio e carinho; aos professores do PPGMGP pelo acolhimento e transmissão de conhecimentos e aos coordenadores Vívian e Dimas...

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível superior) pela concessão de bolsa de estudo durante o mestrado...

Aos meus amigos do mestrado, Morganna, Georgia, Carliane, Kaliny, Silvany, Amanda, Gemima, Aurélia, Taciana, Fábio, Paulo, Odemar, André e Pedro, com os quais vivi momentos de grande satisfação. Com vocês fui muito feliz!

As inseparáveis, Morganna, Georgia, Carliane, Kaliny e Silvany, que sempre estiveram comigo em todos os momentos, fossem de alegrias ou tristezas, no “Jamba” ou não. Conviver com vocês me fez melhor como ser humano, me fez ver quão rica sou por ter vocês em minha vida. Sempre unidas!

A Morganna, minha amiga, irmã, confidente, conselheira, que sempre esteve comigo nessa caminhada tão árdua, tão cheia de provações. Conviver contigo, foi o maior presente que

Deus poderia me dar, foram lágrimas e sorrisos, brigas e abraços, que fizeram de nós, grandes parceiras, guerreiras acima de tudo!!!

A Edson Ferreira, orientador, pela oportunidade, carinho e confiança depositada. Por todo estímulo, apoio e amizade, Obrigada!!!

A Paulo Barroso, co-orientador, pelo apoio, carinho e conhecimento depositado nesse trabalho e em tantos outros. Pela contribuição imprescindível e por todo desprendimento em sempre me ajudar, minha admiração e meus sinceros agradecimentos, nossa parceria ao longo desses seis anos foi muito valiosa.

Aos amigos da Embrapa Algodão, que acompanharam de perto o início da jornada, Fábria, seu Chico, Romero, Monaliza, Vanessa, Valeska, Joabson e Eliane (agora em Goiânia), por toda amizade, companheirismo e auxílio. Vocês são pessoas muito especiais!

Aos amigos do laboratório de Genética Vegetal do CENARGEN, Viviane, Natália, Rafaela e Ediene, que estiveram comigo me incentivando sempre e me ajudando no que podiam; a Nonato, amigo Piauiense, com quem dividi as angústias dessa caminhada e a Patrícia, em especial, pela disponibilidade em sempre me ajudar em tudo que precisei, não medindo esforços para isso!

Agradeço com grande satisfação a Dra. Vânia Azevedo e Dra. Ana Ciampi, que foram imprescindíveis no desenvolvimento desse trabalho, disponibilizando toda estrutura física, reagentes e conhecimentos valiosos. Muito Obrigada por tudo!

Aos amigos fiéis do laboratório de biotecnologia da Embrapa Arroz e Feijão, Bárbara, Bruna, Ricardo e Ivan, parceiros de aventuras, com vocês me diverti muito, aprendi a amar todos como verdadeiros irmãos e a Tereza, pesquisadora, que sempre me incentivou e me ajudou muito... obrigada!!!!

Aos que me ajudaram, mesmo que indiretamente, torcendo por mim, meus sinceros agradecimentos e que Deus os abençoe...

OBRIGADA!!!!

DEDICATÓRIA

A DEUS pelo dom da vida e inesgotável fonte de sabedoria... meu alicerce, refúgio e fortaleza, confiarei sempre em Ti.

Dedico.

Aos meus pais, Socorro e Hailton, meu irmão João Lopes e minha avó Quitéria (In memoriam), por toda dedicação, compreensão, apoio e carinho em toda minha caminhada; Pela certeza, de que mesmo nas adversidades eu poderei contar com o amor incondicional sempre devotado, o qual sempre me impulsiona em busca dos meus sonhos....

Ofereço.

APÊNDICE

VIDA DE VIAJANTE

*Minha vida é andar
Por este país
Prá ver se um dia
Descanso feliz
Guardando a recordação
Das terras onde passei
Andando pelos sertões
Dos amigos que lá deixei...
Chuva e sol
Poeira e carvão
Longe de casa
Sigo o roteiro
Mais uma estação
E a saudade no coração...
Minha vida é andar
Por este país
Prá ver se um dia
Descanso feliz
Guardando a recordação
Das terras onde passei
Andando pelos sertões
Dos amigos que lá deixei...
Mar e terra
Inverno e verão
Mostro um sorriso
Mostro alegria
Mas eu mesmo não
E a saudade no coração...*

Luiz Gonzaga / Herve Cordovil

SUMÁRIO

Lista de figuras.....	ix
Lista de tabelas.....	x
Resumo.....	xi
Capítulo 1.....	13
1. Introdução Geral.....	14
2. Revisão de Literatura.....	16
2.1. Taxonomia e evolução do algodoeiro.....	16
2.2. A cultura do algodão.....	19
2.3. Distribuição e diversidade do gênero <i>Gossypium</i> no Brasil.....	20
2.4. <i>Gossypium mustelinum</i> Miers ex Watt.....	22
2.5. Conservação da diversidade genética.....	25
2.6. Utilização de marcadores genéticos no estudo de plantas.....	27
2.6.1. <i>Simple Sequence Repeat</i> (SSR).....	31
2.6.2. Sistemas semi-automatizados de genotipagem utilizando SSRs.....	33
2.7. Diversidade e estrutura genética de populações.....	34
3. Referências Bibliográfica.....	37
Capítulo 2	52
Diversidade e estrutura genética de populações naturais de <i>Gossypium mustelinum</i> Miers ex Watt.....	54
• Material e métodos.....	58
▪ Amostragem das populações avaliadas.....	58
▪ Extração e quantificação de DNA.....	59
▪ Condições de amplificação dos microssatélites.....	59
▪ Análises estatísticas.....	61
• Resultados.....	61
▪ Frequências alélicas e diversidade genética.....	61

▪ Índice de fixação estrutura genética.....	62
• Discussão.....	63
▪ Frequências alélicas e diversidade genética.....	63
▪ Índice de fixação estrutura genética.....	66
▪ Agradecimentos.....	69
▪ Literatura citada.....	69
▪ Figuras.....	73
▪ Tabelas.....	76
• Conclusões gerais.....	81
• Anexos.....	82

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1	13
FIGURA 1. Filogenia e evolução de espécies de <i>Gossypium</i> . Adaptado de Zhang et al. (2008).....	17
CAPÍTULO 2	52
FIGURA 1. Mapa do Brasil, em destaque os Estados do Rio Grande do Norte e da Bahia onde ocorrem as populações de <i>Gossypium mustelinum</i> Miers ex Watt foram coletadas.....	73
FIGURA 2. Árvores filogenéticas construídas pelo agrupamento <i>Neighbor Joining</i> a partir entre populações (A) e regiões (B)	74
FIGURA 3. Diagrama de dispersão da distância (F_{ST}) e distância geográfica (Km) considerando-se pares de populações (A) e os pares de regiões (B)	67

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1	13
TABELA 1. Características dos diversos marcadores moleculares (adaptado de TIKADER et al., 2009).....	30
CAPÍTULO 2	52
TABELA 1. Relação das populações de <i>Gossypium mustelinum</i> Miers ex Watt, número de indivíduos (n) e descrição dos locais de coleta e Latitude e Longitude média de cada população.....	76
TABELA 2. Frequência dos alelos exclusivos, alelos raros ($p \leq 0,05$) e alelos de baixa frequência ($0,05 > p < 0,25$) encontrados para os diferentes locos analisados <i>G. mustelinum</i> na análise por população e por região.....	77
TABELA 3. Estimativas obtidas para heterozigosidade observada (H_o), heterozigosidade esperada (H_e) e índice de fixação (f), nas análises <i>Gossypium mustelinum</i> por população e região.....	78
TABELA 4. Distância genética entre <i>Gossypium mustelinum</i> das 16 populações, aos pares, estimada a partir o F_{ST}	79
TABELA 5. Distância genética entre <i>Gossypium mustelinum</i> das cinco regiões, aos pares, estimada a partir o F_{ST}	65

RESUMO

No Brasil ocorrem três espécies de algodoeiro: *G. barbadense*, *G. hirsutum* e *G. mustelinum*, sendo a última silvestre e nativa do Brasil, encontrada, apenas no semi-árido dos Estados do Rio Grande do Norte e Bahia. As populações estudadas distribuem-se preferencialmente próximas de cursos de água, como vegetação predominante de mata ciliar. A degradação do ambiente por pastejo de caprinos e atividades antrópicas, provocou a redução dessas populações e conseqüentemente da variabilidade. Entretanto, apesar da reduzida variabilidade existente nessas populações, todo esse conjunto gênico poderá, futuramente, ser útil nos programas de melhoramento. Para tanto, o conhecimento detalhado da estruturação da variabilidade existente é essencial para melhor utilização dessa espécie como recurso de variabilidade alélica. Como as variedades comerciais apresentam base genética estreita, devido a forte seleção praticada para o melhoramento e derivarem em sua maioria de apenas uma espécie, a *G. hirsutum* var. *latifolium*, a utilização de novos alelos é fundamental para aumentar as combinações alélicas, de maneira que germoplasma de espécies silvestres do gênero *Gossypium*, como *G. mustelinum*, se torna uma alternativa para tal ampliação. Com o objetivo de determinar a variabilidade e estrutura genética de 16 populações naturais de *G. mustelinum*, foram feitas extrações de DNA, reações de PCR com marcadores SSR e os alelos amplificados foram empregados para estimar as frequências alélicas, a heterosigozidade esperada e observada, a análise de diversidade genética e as estatísticas *G* de Nei, como também, as análises de agrupamento, usando a distância de Nei e *Neighbor-Joining*. A distância entre os genótipos foi calculada com base na proporção de alelos usando o programa MICROSAT e os genótipos agrupados a partir do método de UPGMA no MEGA 4. Para determinar se a diversidade de cada uma das populações se apresentava numa estrutura espacial organizada, a matriz de distância genética foi comparada com a matriz de distância física usando o teste de Mantel. Os resultados demonstraram que a maior diversidade encontra-se entre as populações, com elevado nível de endogamia intrapopulacional, provavelmente devido aos efeitos de deriva genética, evidenciado pelo elevado número de alelos exclusivos.

Palavras-chave: *Malvaceae*, algodão silvestre, marcador molecular.

Capítulo 1

1. INTRODUÇÃO GERAL

Durante o processo de domesticação, as características que dificultavam a utilização das plantas silvestres na agricultura foram reduzidas consideravelmente. Entretanto, esse referido processo, ao longo dos anos, em muitos casos, gerou o estreitamento da base genética e contribuiu para tornar as plantas mais susceptíveis a pragas e doenças. Esse fato influenciou o desenvolvimento de máquinas e insumos que combatem as pragas e doenças que causam perdas a lavoura. Apesar do grande avanço tecnológico aplicado na agricultura, ainda persistem alguns problemas referentes aos progressos genéticos em programas de melhoramento, que visam obter cultivares adaptadas aos variados sistemas de cultivo e ambientes.

No gênero *Gossypium*, muitas variedades têm sido desenvolvidas a partir de cruzamentos entre genitores aparentados, contudo o ganho de produtividade se tornou progressivamente limitado, conduzindo os pesquisadores a procura de diferentes germoplasmas que possibilitem a inclusão de variabilidade nos programas de melhoramento. No caso do algodão, apesar dos métodos de melhoramento terem aumentado a eficiência da transferência de alelos para o *pool* gênico dos materiais melhorados, as fontes de germoplasma ainda permanecem subutilizadas (VAN ESBROECK e BOWMAN, 1998).

No Brasil ocorrem diferentes tipos de algodoeiro: *Gossypium barbadense* raças *barbadense* e *brasiliense*, encontrados em todas as regiões, porém limitado a populações de fundos de quintais; *G. hirsutum* r. *marie galante*, com ocorrência principalmente na região Nordeste do país e *G. hirsutum* r. *latifolium*, cultivada em quase todos os Estados e que compreende a grande maioria das cultivares brasileiras. A única espécie silvestre do gênero que ocorre no país é *G. mustelinum* Miers ex Watt, encontrada apenas no semi-árido dos Estados do Rio Grande do Norte e da Bahia (BARROSO et al., 2010).

O desaparecimento de tipos silvestres das espécies cultivadas é um fenômeno documentado com maior intensidade com o avanço da modernização da agricultura, principalmente após a metade do século passado (BORÉM et al., 2003). O desaparecimento desses algodoeiros reduz a variabilidade disponível para uso nos programas de melhoramento, e por isso, a crescente substituição dos tipos silvestres por cultivares melhoradas, tem causado preocupação entre os curadores

dos bancos de germoplasma do algodoeiro. Contudo, Freire (2002a) afirma que é importante que tanto as espécies silvestres quanto as asselvajadas sejam preservadas como reservatório de variabilidade do algodoeiro. No caso de *G. mustelinum* a importância da sua preservação está associada ao fato da espécie ser importante em seu *habitat* e por pertencer ao *pool* gênico primário do algodoeiro cultivado (SILVA et al., 2008).

Até 2006 eram conhecidas apenas quatro populações naturais de *G. mustelinum* localizadas em Caicó (RN), Macururé e Jaguarari (BA), sendo que o número de indivíduos não ultrapassava 200 (BARROSO et al., 2005). Em 2007, pesquisadores da Embrapa em expedições de coleta, identificaram novas populações em bacias de alguns rios na Bahia. Essas populações, em sua maioria, apresentavam indivíduos adultos e alguns jovens, como evidência de que essa espécie é encontrada de modo espontâneo, preferencialmente na mata ciliar de rios e lagos temporários, e menos frequente em várzeas.

Considerando-se que as espécies silvestres são importantes reservatórios de variabilidade com possibilidade de ser transferida para as espécies cultivadas, diversos trabalhos reportam sobre a introgressão de genes que conferem características de interesse agrônomo, como resistência a insetos, doenças, estresses abióticos, entre outras. Apesar de *G. mustelinum* não apresentar características que permitam seu uso diretamente na agricultura, essa espécie possui especial importância como recurso genético e fonte alélica para utilização futura em programas de melhoramento.

Para o melhor emprego dos recursos genéticos, é fundamental o conhecimento da variabilidade e estrutura genética das populações naturais. Esse conhecimento também se torna determinante para o delineamento e adoção de ações de conservação *in situ* e *ex situ* do germoplasma. Objetivando caracterizar a diversidade estrutura genética da espécie *G. mustelinum*, indivíduos de 16 populações conhecidas foram avaliados por meio de marcadores SSR.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Taxonomia e evolução do algodoeiro

Existem muitos estudos sobre a classificação taxonômica e evolução do gênero *Gossypium*. De acordo com Ballaminut (2007) a taxonomia do algodoeiro determinada por Linnaeu em 1753, é:

Divisão: Embriophita sifanogamae

Subdivisão: Fanerogamae ou espermatophita

Filo: Angiospermae

Classe: Dicotiledoneae

Subclasse: Archichlamidae

Ordem: Malvales

Família: Malvaceae

Tribo: Hibisceae

Gênero: *Gossypium*

De acordo com Fryxell (1965) e Valicek (1978), a origem e diferenciação do gênero *Gossypium* data de 5 a 15 milhões de anos atrás, no período Mesozóico, tendo como centro de origem a África Central. Atualmente, o referido gênero inclui 50 espécies, sendo 45 diplóides ($2n=2x=26$) e cinco tetraplóides ($2n=4x=52$) (FRYXELL et al., 1992). As espécies que compreendem esse gênero localizam-se em seus respectivos centros primários de diversidade (FRYXELL, 1979), distribuídas da seguinte forma: 18 espécies encontram-se no Centro-Oeste e Sul do México, 14 espécies no Nordeste da África e Arábia, 17 espécies na Austrália e uma no Nordeste do Brasil (TOMKINS et al., 2001).

As espécies diplóides são agrupadas em oito tipos genômicos (A-G e K), a partir de similaridades cromossômicas e comportamento de pareamento meiótico de híbridos interespecíficos (BEASLEY, 1942, ENDRIZZI et al., 1985) e esses diferentes genomas estão distribuídos em três grupos. Grupo Africano, que compreende as espécies de genomas A, B, E e F, ocorrendo naturalmente na África e Ásia; grupo Americano, que compreende as espécies diplóides de genoma D e o

grupo com os genomas C, G e K, originários da Austrália (WENDEL e CRONN, 2003).

As espécies que possuem 52 cromossomos são consideradas alotetraplóides naturais, originados pela hibridização interespecífica ocorrida no Novo Mundo, provavelmente no México (LIU et al., 2001), entre espécies ancestrais Africanas do genoma A e ancestrais Americanos do genoma D (CHEN et al., 2007). Os parentes mais próximos dos prováveis progenitores do genoma A são *G. herbaceum* (A1) *G. arboreum* (A2) e do genoma D, *G. raimondii* (D5). Acredita-se que a poliploidização tenha ocorrido entre um e dois milhões de anos atrás, no Médio-Pleistoceno, seguindo a hipótese da dispersão trans-oceânica. Supõem-se que uma espécie proveniente da Ásia, parental de *G. herbaceum* ou *G. arboreum*, seja o genitor feminino e o ancestral de *G. raimondii* o genitor masculino (Figura 1), (PENNA, 1999; ADAMS e WENDEL, 2004). Análises citogenéticas têm revelado que *G. herbaceum* (A1) e *G. arboreum* (A2) diferem por uma simples translocação, bem como o genoma At (subgenoma A no tetraplóide) difere do A, D e Dt (subgenoma D no tetraplóide) por duas translocações recíprocas (BADIGANNAVAR, 2010).

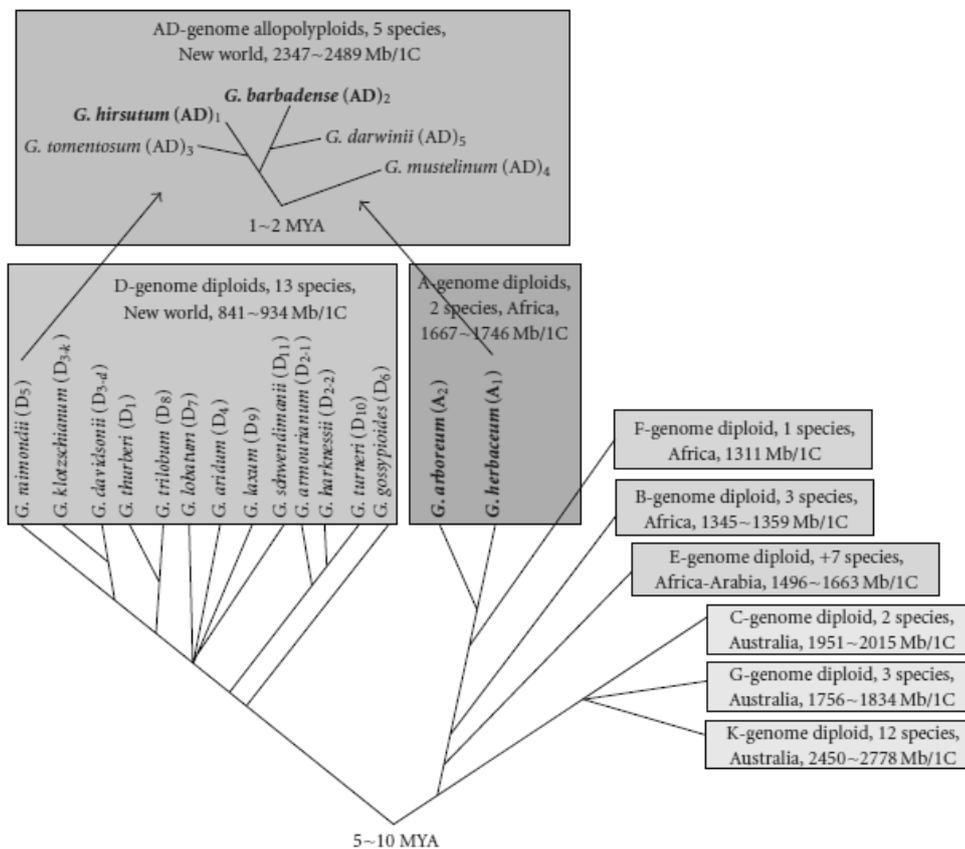


Figura 1. Filogenia e evolução de espécies do gênero *Gossypium*. Adaptado de Zhang et al., (2008).

A alopoliploidia em *Gossypium* conduziu ao estabelecimento de um subtipo novo e bem sucedido, bem como a aparente conquista de novos nichos ecológicos em detrimento do ganho com a junção dos genomas. Após a hibridização, formou-se o grupo genômico AD que gerou as cinco espécies tetraplóides existentes (AADD), *G. hirsutum* L. (algodão herbáceo), *G. barbadense* L. (algodão Pima e Sea Island), *G. tomentosum* Nutt, *G. darwinii* e *G. mustelinum* Miers ex Watt (IQBAL et al., 2001), originárias de centros diferentes. *G. hirsutum* tem como centro de origem a América Central, *G. barbadense* o Norte do Peru e Sul do Equador, *G. darwinii*, nativa das ilhas Galápagos, *G. tomentosum* Nutt de ilhas do Havaí e *G. mustelinum* do Nordeste do Brasil (STEPHENS, 1973; BRUBAKER et al., 1999).

Diferente da maioria das espécies diplóides que compõem esse gênero, as espécies alopoliplóides silvestres ocorrem normalmente no litoral (BRUBAKER e WENDEL, 1994), com exceção de *G. mustelinum*, que é encontrado próximo de rios e lagos temporários e áreas não litorâneas, embora haja relatos de ocorrência próximas do litoral (BARROSO, 2010, comunicação pessoal). Assim, dentre as cinco espécies alopoliplóides, duas são restritas a proximidades litorâneas, endêmicas de ilhas (*G. darwinii* das Ilhas Galápagos e *G. Tomentosum* do Havaí), outras duas (*G. barbadense* e *G. hirsutum*) ocorrem em *habitats* litorâneos do Golfo do México, Noroeste da América do Sul e até nas longínquas Ilhas do Pacífico (ADAMS e WENDEL, 2004). Dessas espécies, *G. mustelinum*, *G. darwinii* e *G. tomentosum* são silvestres e apenas *G. hirsutum* e *G. barbadense* são cultivadas, mas, todas são sexualmente compatíveis (FREIRE, 2002b).

Com base nas afinidades genômicas entre as espécies de *Gossypium*, Harland e De Wet (1971), classificaram o germoplasma desse gênero em três categorias: primário, secundário e terciário. Sendo que a categoria principal é a primária e inclui as espécies que podem facilmente ser cruzadas produzindo híbridos férteis. Todas as espécies tetraplóides pertencem a este grupo, assim, pode facilmente ser utilizado como recurso em programas de melhoramento de algodoeiro herbáceo. Os cruzamentos do algodão herbáceo com as espécies incluídas nas categorias secundária e terciária, normalmente geram híbridos de baixa fertilidade. O cruzamento de raças de *G. hirsutum* com espécies silvestres tetraplóides têm sido utilizado para transferência de características agronômicas desejáveis, tais como folhas com nectários suaves, genes de resistência a insetos, doenças causadas por

bactérias, resistência à ferrugem, murcha do *Fusarium* e ao bicudo (WENDEL et al., 1994; ZENG et al., 2007).

2.2A cultura do algodão

Atualmente quatro espécies possuem seus produtos comercializados, sendo duas alotetraplóides provenientes do Novo Mundo (*G. hirsutum* L. e *G. barbadense* L.), usadas predominante na produção mundial do algodão para a fibra e produtos de sementes e, duas diplóides provenientes do Velho Mundo (*G. herbaceum* L. e *G. arboreum* L. (IQBAL et al., 2001), com maior produção na Ásia.

Das quatro espécies de algodão cultivadas, *G. hirsutum* produz mais de 90% do algodão mundial, *G. barbadense* contribui com 8% e *G. herbaceum* e *G. arboreum* produzem juntos, 2% de todo algodão (ZHANG et al., 2008), destinados em sua maioria, para refinamento de produtos secundários. Os quatro maiores produtores são China, Índia, Estados Unidos e Paquistão, contabilizando aproximadamente 72% da produção de algodão mundial (BADIGANNAVAR, 2010; CHAUDHARY et al., 2010; COTTON INCORPORATED, 2010).

Os produtos derivados do algodão comercializados mundialmente são diversos, incluem fibras e sementes com grande variedade de uso. A fibra, além de sustentar a indústria têxtil, também é matéria prima para o fornecimento de suprimentos médicos. Já as sementes, segundo Nascimento (2007), são usadas para extração de óleo, além de servir também como matéria prima na industrialização de alguns produtos como: cosméticos, itens farmacêuticos, produção de biodiesel, além de grande aceitação comercial, como óleo refinado alimentício, margarinas e ração animal (MCCARTY JR. e JENKINS, 2001; FRELICHOWSKI JR et al., 2006; ZHANG et al, 2008).

A produção de algodão no Brasil é proveniente apenas de cultivares da espécie *G. hirsutum*, sendo que a cultura algodoeira apresenta algumas limitações para produção no Brasil, especialmente os altos preços dos insumos e a queda das cotações da pluma. Além de ser mais dispendiosa que outras grandes culturas, a cotonicultura brasileira enfrenta a concorrência de produtos manufaturados (fios e tecidos) provenientes da Ásia (CARVALHO, 2009). No entanto, nos últimos 15 anos o algodão tornou-se uma das grandes forças do agronegócio brasileiro (HOLTZ, 2008).

A partir de 2001 as exportações brasileiras ganharam nova dimensão no comércio internacional, com aumento de mais de 300% nas exportações (ABRAPA, 2010), sendo que os principais produtores são os Estados de Mato Grosso e Bahia, responsáveis por aproximadamente 82% da produção nacional (RIGON et al., 2008). Toda essa produção colocou o Brasil na quarta colocação no cenário mundial de exportação até a safra 2009/2010 (DESENBAHIA, 2009).

Segundo a Cotton Incorporated (2010), nos últimos anos o Brasil passou de importador para exportador e atualmente consome 3,6% da produção mundial, representando o 5º lugar no *ranking* dos países que mais produzem algodão, o que corresponde a 6,4% da produção mundial (DESENBAHIA, 2009).

2.3 Distribuição e diversidade do gênero *Gossypium* no Brasil

O Brasil é um dos detentores da maior variabilidade existente em algodoeiros tetraplóides e, o conhecimento a respeito desta variabilidade é pequeno, e, em boa parte, desatualizado, com o agravante de que estudos apontam que tal variabilidade está sendo paulatinamente depauperada devido a fatores agrícolas, socioculturais, econômicos e ambientais (VILARINHO, 2006).

Das três espécies encontradas no Brasil, *Gossypium hirsutum* está representado por duas raças exóticas, *G. hirsutum* raça *latifolium* Hutch e *G. hirsutum* r. *marie galante*. A primeira é denominada algodoeiro herbáceo, nativa do México e introduzida via Estados Unidos, amplamente cultivada no Brasil, sendo responsável por mais de 90% da produção de algodão mundial (WENDEL e CRONN, 2003). A segunda raça é conhecida como algodoeiro mocó e é encontrada apenas no semi-árido da região Nordeste do país, na forma de variedades cultivadas, populações ferais e de fundo de quintais (PERCY et al., 2006). Originária das Antilhas e trazida para o Brasil provavelmente por holandeses ou africanos, durante o período colonial, foi cultivada no semi-árido do Nordeste até a década de 80 (BARROSO et al., 2005).

A espécie *G. barbadense* possui duas raças botânicas, a *barbadense* e a *brasiliense*, sendo que os centros de domesticação são o Norte do Peru e Sul do Equador (BRUBAKER et al, 1999) e foi introduzida no Brasil por povos pré-colombianos. Seu uso como planta têxtil se difundiu entre os colonizadores, mas, entrou em decadência com a disseminação das duas raças de *G. hirsutum*, que

além de não ser encontrada em ambientes naturais, é mantida, basicamente, como planta de fundo de quintal. Sua distribuição é ampla, presente em praticamente todo o território brasileiro. Sua conservação *in situ* é muito importante, pois, embora não seja nativa do país, o Brasil é considerado um importante centro de diversidade da espécie (BARROSO et al., 2006; ALMEIDA, 2007). Contudo essa conservação está diretamente relacionada à manutenção das tradições de sua utilização como planta medicinal.

A única espécie nativa do Brasil é *G. mustelinum*, que apresenta distribuição restrita ao Semi-árido Nordeste na forma de populações silvestres, disposta ao longo das margens rios e lagos temporários (BARROSO et al., 2007; FREITAS et al., 2008). O principal problema para a manutenção *in situ* de *G. mustelinum* é a prática da pecuária extensiva, particularmente de caprinos. Os animais se alimentam de brotos, folhas, frutos, sementes e da casca do caule, prejudicando o desenvolvimento e, em alguns casos, provocando a morte das plantas adultas. Além disso, a renovação das populações também é comprometida, uma vez que o pastejo em indivíduos jovens ocasiona sua completa destruição (BARROSO et al., 2005).

O conhecimento relacionado à diversidade genética das espécies pode proporcionar vantagens aos programas de melhoramento, pois a introdução de variabilidade pode reduzir a vulnerabilidade à pragas e doenças. Além da grande variabilidade, as espécies de algodoeiro encontradas no Brasil apresentam simpatria e podem trocar material genético entre si gerando descendentes férteis, favorecendo com isso a ampliação da heterogeneidade e o surgimento de novas combinações alélicas. Muitas variedades de algodoeiro têm sido desenvolvidas a partir desses materiais, entretanto, o ganho de produtividade limitada tem levado ao uso mais extensivo de germoplasma até então não utilizado.

Apesar dos métodos de melhoramento terem aumentado a eficiência na transferência alélica de diferentes genótipos para o genoma dos algodoeiros melhorados, as fontes de germoplasma ainda são pouco utilizadas (VAN ESBROECK e BOWMAN, 1998).

O desenvolvimento de cultivares visa atender as demandas da cadeia produtiva das culturas. Segundo Rigon et al. (2008), uma importante base da cotonicultura brasileira é a pesquisa, pois o conhecimento, traduzido em tecnologias, impulsionam a lavoura e toda a cadeia produtiva. Para que continue havendo

ganhos de produtividade, é essencial introduzir novos alelos em sucessivos ciclos de recombinação. Dessa maneira, a exploração de espécies silvestres tetraplóides de algodão, como *G. tomentosum*, *G. darwinii* e *G. mustelinum*, podem constituir importante fonte de alelos associados a diversas características de interesse agrônomo, como resistência a doenças fúngicas, bacterianas e viróticas, características especiais de fibra e características morfológicas que conferem resistência a condições adversas de clima e solo (HASENKAMPF e MENZEL, 1980; GIL, 1996; JIANG et al., 1998; SARANGA et al., 2001).

2.4 *Gossypium mustelinum* Miers ex Watt

De acordo com Freire (2002a), Barroso et al. (2005) e Liu (2006), *G. mustelinum* é a única espécie do gênero *Gossypium* nativa do Brasil. Os primeiros relatos são de Watt em 1907, que a descreveu como uma espécie silvestre a partir das características do material coletado por Gardner em 1838 no Estado do Ceará, próximo ao município do Crato (PICKERGILL et al., 1975). Posteriormente, pesquisadores em expedição pelo Nordeste, localizaram exemplares de algodoeiros silvestres na Serra da Formiga, município de Caicó – Rio Grande do Norte, que apresentavam capulhos pequenos e cônicos, bem espaçados, sementes pequenas com líter curto e fibras escassas na cor marrom, características que o distanciavam bastante dos algodoeiros cultivados, logo, concluíram que se tratava de uma espécie morfológicamente diferente de *G. hirsutum* e *G. barbadense* e primariamente a denominaram de *G. caicoense* (ARANHA et al., 1969).

No entanto, Pickergill et al. (1975) apontam que essa espécie, poderia ser a mesma anteriormente catalogada por George Gardner em 1838 no Ceará, por Green em 1916 e Pearse em 1921, ambos no Vale do Seridó - Rio Grande do Norte. Os exemplares coletados apresentavam características morfológicas muito similares quanto ao tamanho de folhas, pilosidade acentuada nos caules e folhas, tamanho de cápsula, capulho e sementes, cor e estrutura de fibra (marrom e curta), cor e tamanho de flor e semelhança nas estruturas reprodutivas (STEPHENS e PHILLIPS, 1972). Após novas coletas, estudos de comparação morfológica e análise de bandeamento cromossômico, realizados por Valicek (1977) e Fryxell (1984), apontaram que os exemplares de *G. mustelinum* e *G. caicoense*, foram identificados como mesma espécie, sendo então, classificados como *Gossypium mustelinum*

Miers ex Watt (FREIRE et al., 1998).

Por apresentar fibra pouco evoluída quanto as características têxteis (NEVES et al., 1965), *G. mustelinum* foi a espécie alotetraplóide menos conhecida do gênero (WENDEL et al., 1994). Por não ter sido avaliada quanto a características de interesse agrônômico, nunca foi melhorada ou explorada comercialmente (FREIRE et al., 2003). No entanto, muitos trabalhos estão sendo desenvolvidos com essa espécie, e atualmente, foi identificado grandes quantidades de terpenóides e aldeídos, que conferem resistência a insetos (BADIGANNAVAR, 2010), além de possível resistência a variações térmicas, que pode ser utilizada futuramente nas cultivares (HAZENKAMPF e WENZEL, 1980; SANTOS, 1985; LIU, 2006).

Em análises de conglomerados e análises de componentes principais entre os tipos de algodoeiros encontrados no Brasil, *G. mustelinum* apresentou-se isolado em relação aos demais algodoeiros, mesmo levando em conta variações na raça mocó com aparência fenotípica semelhante à espécie estudada (FREIRE et al., 1998; FREIRE, 2002a). Dentre os tipos silvestres encontradas no Brasil, *G. mustelinum* é a única de origem distinta, além de ser considerada a mais primitiva na escala evolutiva (FREIRE et al., 1998) e diferenciar-se dos demais algodoeiros tetraplóides por apresentar *habitat* preferencial ao longo das margens de rios e lagos temporários (BARROSO et al., 2007).

A espécie *G. mustelinum* diverge consideravelmente quando observada pela posição filogenética, em que há formação de dois ramos, um que conduz ao *G. mustelinum* e outro aos demais tetraplóides (Figura 1), de maneira que estes formam dois grupos irmãos, um constituído por *G. hirsutum* e *G. tomentosum* e o outro por *G. barbadense* e *G. darwinii* (LIU et al., 2001; WENDEL e CRONN, 2003). Por serem espécies sexualmente compatíveis, a introgressão genética de materiais silvestres para cultivados torna-se perfeitamente possível, especialmente porque há relatos de híbridos férteis e potencialmente viáveis de *G. hirsutum* x *G. mustelinum* (FREIRE et al., 2002a).

Porém, o fluxo gênico interespecífico não parece ser um risco para a adequada conservação das populações. Este fato deve-se à maioria das populações estarem muito afastadas de outros tipos de algodoeiro, em distâncias maiores do que os insetos polinizadores são capazes de transpor (ALVES, 2009). Quanto á preservação *in situ* a simpatria não é desejada, pois o fluxo gênico, quando intenso

pode causar danos, como descaracterização da espécie e perda da variabilidade presente nas espécies silvestres e variedades crioulas, ou ainda resultar em alteração da adaptabilidade dos híbridos e seus descendentes, devido à introgressão de transgenes (ANDOW et al., 2006).

Freire (2002b) destaca que cruzamentos controlados em casa de vegetação, entre algodão transgênico (Monsanto BG e RR) e os tipos encontrados no Brasil, não foi observado nenhuma alteração morfológica em cruzamentos com variedades comerciais, pois são oriundas da mesma espécie (*G. hirsutum*). Já os cruzamentos com tipos asselvajados como *G. barbadense* r. *brasiliense* (rim-de-boi) e silvestre como *G. mustelinum*, proporcionou a ocorrência de 1,2% a 4,6% de mutantes na geração F₂, incluindo os deletérios do tipo *corky*, resultantes, provavelmente, de cruzamentos entre espécies diferentes.

Mesmo apresentando fecundação cruzada com outros algodoeiros, *G. mustelinum* apresenta alta endogamia. Nos primeiros estudos realizados com populações de *G. mustelinum* (BARROSO et al., 2010), a endogamia intrapopulacional foi muito elevada, sendo a autofecundação, o tipo preferencial de propagação, por isso, constatou-se baixa heterozigosidade e conseqüentemente, baixa diversidade, apesar de verificar significativo número de alelos exclusivos e considerável diversidade entre as populações (BARROSO et al., 2010).

Apesar do primeiro sítio em que houve a descrição da espécie ter sido no município do Crato – CE, nenhum outro material semelhante foi encontrado na região pelas expedições realizadas por Neves et al. (1965), Freire et al. (1990) e Vidal Neto et al. (2005). Estes autores relatam que a devastação e a exploração agrícola da região (Cariri cearense) não possibilitaram a preservação desta espécie de algodão. Para as populações de *G. mustelinum*, esta redução de variabilidade, considerada erosão genética, consiste na perda de alelos ou combinações alélicas que possuem potencial para a agricultura.

A introdução de espécies exóticas no *habitat*, devido à implementação de campos de pastagens e avanços no setor agropecuário (criação de caprinos e bovinos), presença de roedores e o grande avanço agrotecnológico, como construção de rodovias e outras ações antrópicas, são algumas das causas que dificultam a renovação e preservação *in situ* de *G. mustelinum*. Esse fator pode provocar a redução dos nichos ocupados pela espécie, além de reduzir a

variabilidade existente (BARROSO et al., 2005).

2.5 Conservação da diversidade genética

Segundo HÜBNER, et al. (2008), a América Latina é a região com a maior diversidade biológica e com o maior número de espécies endêmicas do planeta, sendo o Brasil o quarto na lista dos países com o maior número de espécies. No entanto, atividades humanas e alterações climáticas têm provocado a degradação progressiva e a fragmentação do habitat, com conseqüente redução da diversidade genética. Segundo Azevedo (2007), a preocupação com as conseqüências da degradação dos ecossistemas vem sendo objeto de discussão e estudos nos últimos anos. Zhang et al. (2010), acreditam que cerca de 2/3 das plantas vasculares poderão desaparecer até o final do século, caso nenhuma ação efetiva seja realizada.

A perda da diversidade dentro das espécies está frequentemente associada com a redução da adaptabilidade (ZHANG et al., 2010), pois a diversidade genética é uma condição fundamental para que ocorra evolução. Assim, a seleção natural atua entre as variantes que ocorrem dentro das populações em função da adaptação ao ambiente, convergindo para a variação entre populações e, finalmente, para variação entre espécies (TORGGLER et al., 1995). Logo, a vulnerabilidade de ecossistemas a mudanças bruscas, causadas, sobretudo, pela aceleração da modernização na agricultura, especialmente após a metade do século passado, tem por conseqüência a redução do tamanho de populações naturais ou mesmo o seu desaparecimento (ZUCCHI, 2002).

O interesse acerca do estudo e da preservação da biodiversidade tem aumentado principalmente, devido à necessidade de novas fontes de variabilidade genética (BARROSO et al., 2007). Esse entendimento é a base para a aplicação das técnicas de manejo, além de contribuir para o estabelecimento da conservação *in situ* de populações naturais. A conservação é de fundamental importância, devido ao grande potencial que espécies ainda não exploradas apresentam (ALVES, 2009). Além disso, a substituição das espécies silvestres por variedades que apresentam características adaptativas mais favoráveis às condições ambientais pode conduzir a perda de biodiversidade das populações silvestres, antes mesmo que o seu potencial seja conhecido (ALVES et al., 2008b).

A conservação *in situ* permite que as espécies continuem com seu processo evolutivo natural, representando, assim, a forma mais eficaz de conservação. Entretanto, segundo Ulloa et al. (2006) esse tipo de conservação é ameaçado pelo crescimento da população humana, modernização da agricultura e urbanização. A conservação *ex situ*, é mais utilizada onde condições adequadas são fornecidas para a manutenção da composição genética do material coletado, que pode ser em forma de pólen, sementes, tecidos, entre outros, estando, dessa forma, menos favorável a ação de forças seletivas. Geralmente essas coleções são denominadas bancos de germoplasma, que segundo Ramalho et al. (2008) armazenam diferentes alelos que caracterizam a existência de diversidade genética.

É importante considerar que a metade de todos os acessos conservados *ex situ* são plantas cultivadas ou linhagens melhoradas, enquanto que apenas 1/3 são plantas nativas e 15% são plantas silvestres, incluindo aquelas relacionadas às plantas cultivadas. Muitas plantas nativas e plantas silvestres, relacionadas às plantas cultivadas, oriundas de seus respectivos centros de origem não são adequadamente representadas nos bancos de germoplasma (FALEIRO, 2010). Uma vez disponível o germoplasma, torna-se necessário o desenvolvimento de procedimentos para a caracterização e avaliação do mesmo, visando definição de estratégias que permitam sua adequada utilização e conservação.

Segundo Barroso et al. (2007) a variabilidade é utilizada para suprir carências de genes ausentes dentro do conjunto gênico adaptado e que controlam características de herança simples com elevada importância agrônômica, como por exemplo, a resistência a algumas doenças, ou para ampliar a base genética da cultura.

No caso de *G. mustelinum*, por se tratar de uma espécie silvestre e, portanto, apresentar características indesejáveis agronomicamente, o uso de sua variabilidade nos programas de melhoramento não pode ser direto. É necessário a realização do pré-melhoramento (SILVA et al., 2008), que pode ser mais eficiente e rápido caso sejam conhecidas as potencialidades de combinação dos acessos a serem cruzados com genótipos adaptados de algodoeiro herbáceo, bem como as correlações existentes, de modo que apenas os alelos de interesse sejam introgrididos, eliminando durante o processo características indesejáveis presentes em *G. mustelinum*, como ciclo excessivamente longo, porte alto e baixa qualidade

de fibra. Para conhecer essa variabilidade o uso de ferramentas biotecnológicas, como marcadores genéticos, auxilia e possibilita resultados com maior precisão.

2.6 Utilização de marcadores genéticos no estudo de plantas

Os primeiros marcadores genéticos foram os derivados de características fenotípicas, os quais são controlados por genes dominantes que permite apenas a identificação de homozigotos. Por apresentar um número baixo de marcadores fenotípicos, a utilização é limitada, o que dificulta a estimativa de diversos parâmetros importantes para o estudo de populações naturais (ALMEIDA, 2007), que além de serem influenciados pelo ambiente, apresentam redução na robustez dos dados.

Segundo Fromentini et al. (2009), os marcadores genéticos classificam-se em dois grandes grupos: os baseados no polimorfismo de DNA e no polimorfismo de outras biomoléculas, esses últimos são os marcadores bioquímicos, utilizados em análises genéticas e no melhoramento vegetal, os quais se baseiam em isoenzimas ou aloenzimas (FREITAS e BERED, 2003), que são formas diferentes de uma enzima que ocorrem no mesmo organismo, com afinidade por um mesmo substrato (funções idênticas ou similares) controlado por um ou vários genes situados no mesmo loco ou em locos diferentes, respectivamente (GONÇALVES et al., 2010). Os marcadores aloenzimáticos complementam os métodos tradicionalmente empregados no melhoramento, no manejo e conservação de espécies (ALFENAS et al., 1998).

A eletroforese de isoenzimas surgiu na década de 60 como uma nova fonte de marcadores genéticos capazes de identificar indivíduos homozigotos e heterozigotos (KANTARTZI et al., 2009). Até então, a genética se valia em suas investigações de um número limitado de caracteres morfológicos de herança mendeliana. No entanto, o nível de polimorfismo dos marcadores isoenzimáticos é baixo para várias espécies, isso levou a substituição gradualmente dos marcadores bioquímicos (ALMEIDA, 2007).

O desenvolvimento de marcadores moleculares impulsionou a pesquisa genética, propiciando a detecção de polimorfismo de DNA. Marcador molecular pode então ser definido como qualquer fenótipo molecular derivado de um polimorfismo específico na sequência de DNA, conhecido ou anônimo, que pode corresponder ou

não a um gene expresso (GRATTAPAGLIA, 2001). Por ser considerado um marcador neutro, a expressão é menos influenciada pelo ambiente e pode ser identificada por ensaios laboratoriais de forma direta, através da sequência de nucleotídeos, ou indireta no caso das isoenzimas (BERTINI et al., 2006).

A caracterização de germoplasma usando técnicas moleculares tem importância significativa no manejo e utilização dos recursos genéticos vegetais, além de auxiliar no melhoramento de plantas (KHAN et al., 2009). São também relevantes na avaliação da biodiversidade, reconstrução das relações filogenéticas e na melhor compreensão da estrutura e evolução das plantas. O grupo de marcadores que se baseiam no polimorfismo de DNA, dependendo do método utilizado, pode ser detectado por PCR ou por outras técnicas, como por exemplo, hibridização, observado no marcador RFLP (FROMENTINI et al., 2009)

Preetha e Raveendren (2008) apontam cinco propriedades que distinguem os marcadores moleculares com superioridade aos morfológicos. As propriedades são: (1) o genótipo pode ser determinado por toda a planta, tecido e/ou a nível celular, (2) ocorrência de grande número relativo de alelos existentes naturalmente em muitos locos, (3) neutralidade fenotípica, ou seja, efeitos deletérios não estão associados usualmente com diferentes alelos, (4) os alelos de muitos locos são codominantes, assim todos os genótipos possíveis podem ser distinguíveis e (5) poucos efeitos epistáticos e pleiotrópicos são observados.

A utilização dos marcadores de DNA, baseados em PCR (reação de polimerase em cadeia) desenvolvido por Kary Mullis em 1983 (SAIKI et al., 1988), oferece diversos subsídios que auxiliam nos procedimentos de análise de diversidade genética (RANA et al., 2005; BERTINI et al., 2006; LACAPE et al., 2007; RIBEIRO, 2008), estrutura de populações (ZUCCHI, 2002; WESTENGEN et al., 2005; AZEVEDO, 2007), manutenção e enriquecimento de coleções de germoplasma (ULLOA et al., 2006; ALMEIDA, 2007), estudos de filogenia (KHAN et al., 2000) e desenvolvimento de mapa genéticos (SHAPPLEY et. al., 1998; ZHANG et. al., 2002; RONG et. al., 2004; GUO et al., 2008). Logo, marcadores de DNA são ferramentas poderosas e viáveis para analisar a variação genética dentro e entre populações (ZHANG et al., 2010).

As caracterizações que envolvem essas ferramentas biotecnológicas têm promovido informações úteis para a compreensão da diversidade e estrutura

genética dos vários conjuntos gênicos dos algodoeiros encontrados em diferentes regiões geográficas. Essas informações são incorporadas no manejo efetivo do germoplasma de algodão e em alguns programas de melhoramento para controle da diversidade genética. Em geral, baixos níveis de diversidade genética são encontrados nas cultivares modernas de algodão, as quais corroboram a hipótese de estreitamento da base genética do germoplasma de algodão, utilizado nos programas de melhoramento (BARROSO et al., 2007; KHAN et al., 2009).

Esforços têm sido feito para caracterizar o germoplasma de algodão, utilizando diversos tipos de marcadores moleculares desenvolvidos ao longo dos anos, dentre os quais se destacam alguns, como, polimorfismo de fragmentos de restrição (RFLP - *restriction fragment length polymorphism*) (WENDEL e BRUBAKER, 1993) (Tabela 1), desenvolvido na década de 70 (SOLLER e BECKMANN, 1983). Esse tipo de marcador baseia-se na ação de enzimas de restrição que reconhecem sequências de DNA específicas (GRODZICKER et al., 1974). Os RFLP foram os marcadores moleculares com maior impacto biotecnológico na agricultura (FROMENTINI et al., 2009).

O surgimento da técnica de PCR em meados da década de 80 acelerou o surgimento de novas classes de marcadores. A primeira delas foi o marcador RAPD (*Randomly Amplified Polymorphic DNA*) (Tabela 1). Essa classe de marcadores surge ainda na década de 80 (BORÉM e SANTOS, 2004). Devido à sua simplicidade e rapidez, esta técnica tornou-se uma ferramenta de elevado valor na identificação de cultivares e em estudos de similaridade genética em plantas (NICESE et al., 1998; WÜNSCH e HORMAZA, 2002), uma vez que associa a vantagem de não utilizar sondas radioativas à possibilidade de amplificação de fragmentos do genoma, sem necessidade do conhecimento prévio da sequência do mesmo (FROMENTINI et al., 2009).

Outro marcador muito utilizado é o AFLP (Tabela 1), polimorfismo de fragmentos amplificados (AFLP - *amplified fragment length polymorphism*) (IQBAL et al., 2001) que baseia-se na amplificação seletiva de fragmentos de restrição, resultantes da digestão do DNA genômico total. Existem ainda os marcadores ISSR, repetição entre sequências simples, (ISSR - *Inter Simple Sequence Repeats*) (Tabela 1), que não requerem informações prévias de seqüências de DNA da espécie-alvo, produzem fragmentos com grande reprodutibilidade, quando

comparados a outros marcadores com base em PCR não-específico como RAPD (SOUZA et al., 2008).

Tabela 1. Características dos diversos marcadores moleculares (adaptado de TIKADER et al., 2009).

CARACTERÍSTICAS	RFLP	RAPD	AFLP	ISSR	SSR	SNP
Quantidade de DNA (µg)	>10	0.02	<10	0.02	<10	<10
Pureza do DNA	Alta	Alta	Moderada	Moderada	Moderada	Alta
Técnica usada	Hibridização	PCR	PCR	PCR	PCR	PCR
Informação genômica prévia	Precisa	Não	Não	Não	Precisa	Precisa
Reprodutibilidade	Alta	Baixa	Alta	Alta	Alta	Alta
Custo para desenvolver	Alto	Alto	Moderado	Alto	Alto	Alto
Acessibilidade de automação	Baixa	Moderado	Moderado	Moderado	Alto	Alto
Natureza dos marcadores	Co-dominante	Dominante	Dominante	Dominante	Co-dominante	Co-dominante
Custo por análise	Alto	Baixo	Moderado	Baixo	Baixo	Baixo

Dentre a classe de marcadores, o polimorfismo de nucleotídeos simples (SNP - *Single Nucleotide Polymorphism*) (Tabela 1) (KHAN et al., 2009) destaca-se pela pequena mudança, ou variação, que pode ocorrer numa sequência de DNA em uma porção significativa (mais de 1%) de uma população. Os SNPs têm se tornado os marcadores de preferência pela sua grande abundância e pelo desenvolvimento de tecnologias de genotipagem em larga escala. Porém, o marcador molecular mais utilizado para estudo de diversidade, são os microssatélites ou simples sequências repetidas (SSR - *Simple Sequence Repeat*) (LIU et al., 2000; REDDY et al., 2001; LACAPE et al., 2007; ZHANG et al., 2007) (Tabela 1).

2.6.1 *Simple Sequence Repeat* (SSR)

Os microssatélites (SSR) ou *Short Tandem Repeats* (STR), são matrizes de nucleotídeos abundantes, constituídas pela repetição ininterrupta de 1-6 pb em um único padrão de nucleotídeos (FRELICHOWSKI JR et al., 2006; ZHU et al., 2009), amplamente distribuídos no genoma, hipervariáveis, codominantes e multialélicos, reconhecíveis como matrizes em tandem, além de serem empregados na maioria

dos genomas de organismos eucarióticos de diferentes culturas (ZHANG et al., 2007). O isolamento e a clonagem de microssatélites em plantas ocorreram, pela primeira vez, em espécies de árvores tropicais (VIEGAS, 2009).

As primeiras pesquisas utilizando microssatélites foram realizadas em meados da década de 80. Desde então, os métodos de isolamento de locos microssatélites têm sido aperfeiçoados e vários protocolos publicados. Os microssatélites tornaram-se durante a última década ferramentas moleculares proeminentes, pela sua extrema versatilidade.

Os microssatélites de plantas são cerca de cinco vezes menos abundantes que os SSR de humanos, onde ocorre um microssatélite (maior que 20 pb) a cada 6 kb. Nas monocotiledôneas, é esperado um microssatélite a cada 65 kb enquanto nas dicotiledôneas, um SSR ocorre a cada 21 kb. Já em milho estima-se que ocorra um microssatélite a cada 58 kb (LAGERCRANTZ et al., 1993; WANG et al., 1994). O dinucleotídeo AT/TA é o mais comum, seguido de AA/TT e GA/CT. Dentre os trinucleotídeos, existe uma variação entre os trabalhos, sendo o TAT/ATA, na maioria deles, o mais abundante. Em algodoeiros, Lacape et al. (2006) encontraram microssatélites com a presença da repetição GA com mais alelos do que a repetição CA. Em trigo, Thuillet et al. (2004) mostraram que microssatélites CA tem significativamente mais alelos que o microssatélite GA.

Vários modelos de dinâmica evolucionária dos microssatélites foram propostos, sendo que a maioria deriva do modelo de mutação definido como *stepwise*, que ocorre por *slippage* ou “escorregamento” (AZEVEDO, 2007). Devido a sua alta mutabilidade, os microssatélites revelam detalhes importantes na evolução do genoma, criando e mantendo variações genéticas (TÓTH et al., 2000). Esses marcadores apresentam várias vantagens sobre os morfológicos, dentre elas, destaca-se o polimorfismo, a independência entre os efeitos ambientais e o estágio fisiológico da planta. Todas as características pertinentes aos marcadores SSR, além de se basearem em PCR, os tornam consideravelmente úteis em estudos de diversidade genética (REDDY et al., 2001) e caracterização de populações naturais de plantas (COLLEVATTI et al., 1999; LEMES et al., 2002), através de estudos da genética de populações, fluxo gênico e análise de paternidade.

Cada loco microssatélite é analisado individualmente, sendo obtido pela utilização de um par de iniciadores específicos (com vinte a trinta pares de bases)

complementares às sequências únicas que flanqueiam e, portanto, definem o microssatélite. Estas sequências são conservadas, permitindo que *primers* específicos a elas sejam sintetizados e utilizados para amplificar especificamente esta região (HARDY et al., 2003).

As reações de amplificação podem ser iniciadas com pequenas quantidades de DNA e os produtos da amplificação são visualizados em géis de agarose ou poliacrilamida através de nitrato de prata ou brometo de etídeo (ALVES, 2009). Géis de poliacrilamida desnaturante permitem separação de fragmentos que diferem em apenas um par de bases, enquanto géis de agarose apresentam um limite de resolução acima de quatro pares de bases. A resolução dos géis de poliacrilamida leva à detecção de um número maior de alelos por loco, o que é essencial na análise de polimorfismos de microssatélites de repetições dinucleotídicas (BORÉM e SANTOS, 2004).

O maior objetivo da ICGI - Iniciativa Internacional de Genoma do Algodão (*International Cotton Genome Initiative*) (<http://icgi.tamu.edu>) tem sido facilitar o desenvolvimento e distribuição de marcadores de DNA (BRUBAKER et al., 2000). Estão disponíveis bases de dados de algodão, com informações de sequências de SSR, sequências de *primers*, motivo de repetição, dentre outras descritas no CottonDB (<http://cottondb.org/>) e CMD (<http://cottonmarker.org>) (BLENDA et al., 2006) e atualmente, de acordo com o CMD, estão disponíveis 16.162 *primers* SSR avaliados e publicados (CMD, 2011).

A grande limitação dessa técnica está na execução, pois envolve um processo demorado, trabalhoso e com alto custo, devido à necessidade de construção de bibliotecas genômicas e *screening* de milhares de clones com sondas apropriadas (KÖLLIKER et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2008). Atualmente, a hibridização seletiva com sondas repetitivas tem proporcionado melhores resultados no isolamento de microssatélites (ZANE et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2005).

No caso do algodão, microssatélites possibilitam acelerar os trabalhos de mapeamento do genoma (PREETHA e RAVEEDREN, 2008). Utilizando a técnica de marcadores moleculares do tipo SSR, Pang et al. (2006), através da identificação de variedades agrícolas e identificação de elementos genéticos exóticos em híbridos interespecíficos, realizaram avaliação de hibridação para altos valores de

germoplasma específicos e para ampliar a aplicação efetiva desses híbridos no melhoramento genético.

2.6.2 Sistemas semi-automatizados de genotipagem utilizando SSRs

O uso de microssatélites nos estudos populacionais, a partir da genotipagem de muitos indivíduos, evoluiu para análises semi-automatizadas, que utilizam sistema *multiplex* e possibilitam a redução da marcação fluorescente, sem perder a qualidade e precisão da genotipagem, com alto potencial de repetibilidade entre laboratórios. Esse sistema baseia-se na técnica de PCR, em que os microssatélites apresentam um dos iniciadores marcado com fluorocromo (6-FAM, NED ou HEX).

O uso de marcadores microssatélites em estudos populacionais evoluiu consideravelmente após o desenvolvimento desse sistema, em que os alelos podem ser visualizados no gel como bandas, como por exemplo, em sequenciador ABI 377, ou ser representados por picos em eletroferogramas, que buscam a informação de sistemas *multiplex*, escolhendo locos cujas amplitudes no comprimento dos alelos não se sobreponham (AZEVEDO, 2007).

Sistemas automáticos de capilares de eletroforese separam o DNA por tamanho, através da aplicação de uma corrente elétrica, para detecção de alelos por fluorescência, obtidos pela utilização de *primers* marcados. Esta técnica permite a análise simultânea entre 1 e 96 amostras de DNA em capilares separados dependendo do instrumento usado (KOUMI et al., 2004). Embora sejam utilizados principalmente para análises de sequenciamento, sistemas de eletroforese capilar são usados amplamente para genotipagem (FLORES et al., 2005).

Os rápidos avanços na área da biologia molecular têm fornecido uma série de novos métodos para estudos genéticos de populações naturais. Assim, a caracterização da variabilidade entre e dentro das populações naturais dessa espécie pode trazer subsídios para a implantação de estratégias de conservação e de programas de melhoramento genético (SILVEIRA et al., 2009).

2.7 Diversidade e estrutura genética de populações

A diversidade genética é o componente fundamental para evolução dos seres vivos (ZHANG et al., 2010). Além de ser o meio pelo qual as espécies se

mantêm ao longo do tempo permitindo adaptações em decorrência das mudanças ambientais (ANGRIZANI, 2008).

A diversidade genética é a base para o melhoramento genético. Ao estudar as relações genéticas entre os indivíduos de uma ou várias populações em diversas regiões ecológicas, é possível não apenas estabelecer uma base teórica para a conservação do germoplasma do algodão, mas também orientar e melhorar certas características, tais como precocidade, resistência ao estresse e doenças (KANTARTZI et al., 2006). Dados de diversidade e estrutura genética populacional são considerados essenciais na formulação de projetos de manejo de populações naturais de espécies ecologicamente importantes.

Várias tecnologias têm sido utilizadas para estudar a diversidade genética e as relações sistemáticas das espécies do gênero *Gossypium* (WENDELL et al., 1992; ABDALLA et al., 2001) e estes estudos têm demonstrado que existe um baixo nível de polimorfismo, principalmente, dentro de cultivares de *G. hirsutum*. De acordo com Kantartzi et al. (2006), a transferência de genes desejáveis através da introgressão de germoplasma de outras espécies de *Gossypium* poderá desempenhar papel importante no aumento da variabilidade genética do algodão.

De acordo com Angrizani (2008), outro fator que influencia negativamente na variabilidade é a fragmentação de *habitats*, que pode levar a um desequilíbrio e perda da variabilidade genética em populações naturais por meio de deriva genética via “*bottlenecks*” e restrição ao fluxo gênico. Dessa forma, ocorre um maior isolamento e aumento da divergência genética entre as populações. Outro fator de grande importância é o sistema de reprodução, o qual determina o modo de transmissão dos genes de uma geração para outra, que pode ser por autofecundação, fecundação cruzada ou sistema misto.

Análises de genética populacional podem fornecer dados sobre vários parâmetros evolutivos importantes, incluindo os níveis de variação genética, a participação dessa variabilidade dentro e entre populações, níveis gerais de endogamia, autopolinização *versus* cruzamento, os tamanhos e dinâmica das populações.

Em populações naturais, a distribuição da diversidade genética é influenciada pelo modo de reprodução, distribuição geográfica, fluxo gênico e estruturação no tempo e no espaço (WADT, 2001), além de sofrer forte influência da

gestão dos agricultores locais, que também interferem na distribuição e redução de diversidade (PUSADEE et al., 2009). Além disso, a diversidade genética de materiais silvestres não apresenta uso imediato, por isso não possuem valor comercial á curto prazo. Para conservação e uso eficiente desses germoplasmas em pesquisas, é essencial conhecer como está estruturada a diversidade genética dessas populações por meio das estimativas de diversidade gênica e genotípica (GONÇALVES et al., 2010). A diversidade gênica refere-se ao número e frequência de alelos em um loco individual na população. Enquanto que a diversidade genotípica corresponde ao número de indivíduos geneticamente distintos na população (MAIA, 2009).

A Lei do equilíbrio de Hardy-Weinberg afirma que, na ocorrência de cruzamentos ao acaso e na ausência de fatores evolutivos como seleção, mutação, deriva e migração, as proporções alélicas e genotípicas permanecem constantes de geração para geração. Entretanto, quando violada essa lei, Reis et al. (2009) afirmam que um dos parâmetros mais utilizados para medir esse desequilíbrio é o coeficiente de endogamia (f), que avalia a endogamia, a qual reduz o número de indivíduos heterozigotos, acarretando assim aumento no grau de parentesco entre indivíduos e na expressão de alelos recessivos em sucessivas gerações.

De acordo com Alves (2009), a mensuração da diversidade genética é refletida principalmente pela heterozigosidade, a frequência dos alelos e fixação na população. A heterozigosidade esperada (H_e) diz respeito à probabilidade de dois gametas, tomados ao acaso de uma população, apresentarem alelos diferentes em um determinado loco, definida como diversidade genética de Nei (1972), e a heterozigosidade observada (H_o) que representa a taxa real de indivíduos heterozigotos na população estudada. Podendo ser obtido esses resultados em dois níveis:

a) em nível de loco	b) média entre locos
$\hat{f} = 1 - \frac{\hat{H}_o}{\hat{H}_e}$	$\hat{f} = 1 - \frac{\sum \hat{H}_o}{\sum \hat{H}_e}$

Vários métodos e modelagens têm sido propostos para estimar a estrutura populacional (PRITCHARD et al., 2000; PELEG et al., 2008). A distribuição da variação dentro e entre populações pode ser estimada pelas estatísticas **F** de Wright ou **G** de Nei.

Segundo Fromentin et al. (2009) e Solano et al. (2009), a estatística F de Wright são os parâmetros mais utilizados para descrever a estrutura da população e foram inicialmente definidos para três níveis hierárquicos da estrutura populacional (indivíduos, subpopulações e total). Para estrutura, três índices de fixação ou estatísticas F podem ser definidas:

$$(1 - F_{IT}) = (1 - F_{IS})(1 - F_{ST})$$

Em que, o F_{IS} é uma medida de endogamia dos indivíduos, resultante do desvio de panmixia dentro de cada população. O F_{ST} é uma medida de endogamia dos indivíduos devido à estrutura da população (distribuição não aleatória dos indivíduos entre populações), que também quantifica a diferenciação entre subpopulações na população total e corresponde ao G_{ST} da estatística de Nei. Já o F_{IT} é uma medida de endogamia dos indivíduos resultantes da união não-aleatória dos gametas dentro das populações e da estrutura da população (desvio de panmixia de todos os indivíduos da população total). Estas estatísticas F , são classicamente calculadas por estimadores imparciais de Weir e Cockerham (1984).

As distâncias baseadas em estimativas de estrutura populacional, são geralmente fundamentadas no agrupamento de indivíduos em pares, estimando a distância genética entre os indivíduos (NEI, 1972; NEI, 1978). No entanto, a escala na qual a estrutura genética é considerada torna-se importante, pois diferentes padrões podem ser obtidos dependendo da importância relativa dos fatores que afetam a estrutura genética em determinada escala espacial. Modelos de autocorrelação espacial também podem ser usados para avaliar a estrutura genética de populações (WADT, 2001).

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDALLA, A. M.; REDDY, O. U. K.; EL-ZIK, K. M.; PEPPER, A. E. Genetic diversity and relationships of diploid and tetraploid cottons revealed using AFLP. **Theoretical Applied Genetics**, Stuttgart, v. 102, p. 222-229, 2001.
- ABRAPA, Associação brasileira dos produtores de algodão. **Exportações e importações brasileiras relatório março 2010**. Brasília, DF, 2010, 12p.
- ADAMS, K. L.; WENDEL, J. F. Exploring the genomic mysteries of polyploidy in cotton. **Biological Journal of the Linnean Society**, London, v. 82, p. 573-58, 2004.
- ALFENAS, A. C.; BRUNE, W.; OLIVEIRA, J. R.; KUNIEDA, S.; SCORTICHINI, M. Extração de proteínas para eletroforese. In: ALFENAS, A.C. (Ed.) **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos**. Viçosa, UFV. 1998. p. 85-113.
- ALMEIDA, V. C. **Caracterização genética e *in situ* de *Gossypium barbadense* na região norte do Brasil**. 2007. 52p. Dissertação de Mestrado, UFRN, Natal, RN, Brasil.
- ALVES, M. F. **Caracterização *in situ* e estrutura genética de populações de *Gossypium mustelinum* Miers ex Watt**. 2009. 98p. Dissertação de mestrado, UFRN, Natal, RN, Brasil.
- ALVES, M. F.; SILVA, U. C.; FREITAS, R. B.; CIAMPI, A. Y.; HOFFMANN, L.; BARROSO, P. A. V. Estrutura e variabilidade genética de populações de *Gossypium mustelinum* no Estado da Bahia visando a conservação. In: **Anais II Simpósio brasileiro de recursos genéticos**. Brasília, DF, p. 214, 2008a.
- ALVES, M. F.; DANTAS, A. C. A.; SILVA, U. C.; BARROSO, P. A. V.; HOFFMANN, L. V. Caracterização genética de acessos de *Gossypium mustelinum* em municípios do Estado da Bahia visando a conservação. In: **Anais II Simpósio brasileiro de recursos genéticos**. Brasília, DF, p. 147, 2008b.
- ANDOW, D. A.; BARROSO, P. A. V.; FONTES, E. M. G.; GROSSI-DE-SA, M. F.; HILBECK, A.; FITT, G. P. Improving the scientific basis for environmental risk assessment through the case study of Bt cotton in Brazil. In: HILBECK et al. (eds.)

Environmental risk assessment of genetically modified organisms, methodologies for assessing Bt cotton in Brazil. Brasília, Cabi Publishing, v.2, 2006. p.1-92.

ANGRIZANI, R. C. **Desenvolvimento e caracterização de marcadores de DNA microssatélites para *Aniba rosaeodora* Ducke (Lauraceae): uma espécie florestal amazônica ameaçada.** 2008, 50p. Dissertação de Mestrado, INPA/UFAM, Manaus, AM, Brasil.

ARANHA, C.; LEITÃO FILHO, H. F.; GRIDI-PAPP, I. L. Uma nova espécie para o gênero *Gossypium* L. **Bragantia**. Campinas, n. 28, p. 273-290, 1969.

AZEVEDO, C. R. V. **Desenvolvimento e aplicação de microssatélites, análise de cpDNA e modelagem computacional para estudos da estrutura e dinâmica genética de maçaranduba – *Manilkara huberi* (Ducke) Chev. Sapotaceae.** 2007. 207p. Tese de Doutorado. UNB, Brasília, DF, Brasil.

BADIGANNAVAR, A. **Characterization of quantitative traits using association genetics in tetraploid and genetic linkage mapping in diploid cotton (*Gossypium* spp.).** 2010, 157p. A Dissertation of Doctor. Faculty of the Louisiana State University, Dharwad, India.

BALLAMINUT, C. **Cultura do algodão.** Disponível em: < <http://www.algodao.agr.br> >. Acesso em: 25 out. 2007.

BARROSO, P. A. V.; FREIRE, E. C.; AMARAL, J. A. B.; SILVA, M. T. **Zonas de exclusão de algodoeiros transgênicos para a preservação de espécies de *Gossypium* nativas ou naturalizadas.** Campina Grande: Embrapa Algodão. Comunicado Técnico, n. 242, 2005, 7p.

BARROSO, P. A. V.; FREIRE, E. C.; AMARAL, J. A. B. do; HOFFMANN, L. V. Zona de exclusão de transgênicos preserva populações *in situ*. **Visão Agrícola**, São Paulo, n. 6, p. 224-227, 2006.

BARROSO, P. A. V.; HOFFMANN, L. V.; ALVES, M. F.; FREITAS, R. B. **Aplicabilidade de marcadores SSR em estudos genéticos em *Gossypium***

mustelinum Miers. Campina Grande: Embrapa Algodão. Comunicado Técnico, Novembro, 2007, 6p.

BARROSO, P. A. V.; HOFFMANN, L. V.; FREITAS, R. B.; BATISTA, C. E.; ALVES, M. F.; SILVA, U. C.; ANDRADE, F. P. In situ conservation and genetic diversity of three populations of *Gossypium mustelinum* Miers ex Watt. **Genetic Resource Crop Evolution**, Witzzenhausen, v. 57, p. 343–349, 2010.

BEASELY, J. Meiotic chromosome behaviour in species hybrids, haploids, and induced polyploids of *Gossypium*. **Genetics**, Pittsburgh, v. 27, p. 25–54, 1942.

BERTINI, C. H. M.; SCHUSTER, I.; SEDIYAMA, T.; BARROS, E. G.; MOREIRA, M. A. Characterization and diversity analysis of cotton cultivars using microsatellites. **Genetic Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 29, p. 321–329, 2006.

BLENDIA, A.; SCHEFFLER, J.; SCHEFFLER, B.; PALMER, M.; et al. CMD: A Cotton Microsatellite database resource for *Gossypium* genomics. **BMC Genomics**, London, v. 7, p. 132, 2006.

BORÉM, A.; FREIRE, E. C.; PENNA, J. C. V.; BARROSO, P. A. V. Considerations about cotton gene escape in Brazil. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Viçosa, v. 3, n. 4, p. 315-332, 2003.

BORÉM, A.; SANTOS, F. R. **Biotecnologia simplificada**. Editora UFV: Viçosa, 2004. 258p.

BRUBAKER, C. L.; WENDEL, J. F. Reevaluating the origin of domesticated cotton (*Gossypium hirsutum*, Malvaceae) using nuclear restriction fragment length polymorphisms (RFLPs). **American Journal of Botany**, Baltimore, v. 81, p. 1309-1326, 1994.

BRUBAKER, C. L.; BOURLAND, F. M.; WENDEL, J. F. The origin and domestication of cotton. In: SMITH, C. W., COTHREN, J. T. **Cotton: origin, history, technology and production**. New York: John Wiley and Sons, 1999. p. 03-30.

BRUBAKER, C. L.; CANTRELL, R. G.; GIBAND, M.; LYON, B. R.; WILKINS, T. A. Letter to journal of cotton science community: formation of the international cotton

genome initiative, ICGI. **Journal of Cotton Science**, Baton Rouge. v. 4, p. 149-151. 2000.

CARVALHO, R. H. R. de. **Avaliação da eficiência de catalisadores comerciais na obtenção de biodiesel de algodão (*Gossypium hirsutum* L.)**. 2009. 110p. Dissertação de mestrado, UFRN, Natal, RN, Brasil.

CHAUDHARY, L.; SINDHU, A.; KUMAR, M.; KUMAR, R.; SAINI, M. Estimation of genetic divergence among some cotton varieties by RAPD analysis. **Journal of Plant Breeding and Crop Science**, Nairobi. v. 2, n. 3, p. 39-43, 2010.

CHEN, Z. J.; CHEFFLER, B. E.; DENNIS, E., et al. Toward Sequencing Cotton (*Gossypium*) Genomes. **Plant Physiology**, Massachusetts, v. 145, p. 130–1310, 2007.

COLLEVATTI, R. G.; BRONDANI, R. V.; GRATTAPAGLIA, D. Development and characterization of microsatellite markers for genetic analysis of a Brazilian endangered tree species *Caryocar brasiliense*. **Heredity**, London, v. 83, p. 748-756, 1999.

COTTON INCORPORATED. Disponível em: <<http://www.cottoninc.com/marketInformation/monthlyeconomicLetter/>> acesso em 22-11-2010.

COTTON MARKER DATABASE. Disponível em: <<http://www.cottonmarker.org/Primer.shtml>> acesso em 22-03-2011.

DESENBAHIA, **Boletim anua do mercado de grãos: Algodão. Safra 2008/09 e expectativas 2009/10**. Março, 2009, 13p.

ENDRIZZI, J., TURCOTTE, E., KOHEL, R.. Genetics, cytology, and evolution of *Gossypium*. **Advances in Genetics**, Berlin, v. 23, p. 271–375, 1985.

FALEIRO, F. G. Preservação da variabilidade genética de plantas: um grande desafio Disponível em: <<http://www.boletimpecuario.com.br/artigos/showartigo.php?arquivo=artigo350.txt&tu do=sim>> Acesso em: 15-abril- 2010.

FERNANDES, M. G.; BUSOLI, A. C.; BARBOSA, J. C. Distribuição Espacial de *Alabama argillacea* (Hübner) (Lepidoptera Noctuidae) em algodoeiro. **Neotropical Entomology**, Piracicaba, v. 32, n. 1, p. 107-115, 2003.

FLORES, M.; MORALES, L.; AVILA, A.; GONZÁLEZ, V.; BUSTOS, P.; GARCÍA, D.; MORA, Y.; GUO, X.; VIDES, J. C.; PEÑERO, D.; DÁVILA, G.; PALÁCIOS, R. Diversification of DNA sequences in the symbiotic genome of *Rhizobium etli*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 187, p. 7185-7192, 2005.

FREIRE, E. C.; MOREIRA, J. A. N.; SANTOS, J. W. dos.; ANDRADE, F. P. de. Relações taxonômicas entre os algodoeiros mocó e *Gossypium mustelinum* do Nordeste brasileiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 33, n. 10, p. 1555–1561, 1998.

FREIRE, E. C. Viabilidade de cruzamentos entre algodoeiros transgênicos e comerciais e silvestres do Brasil. **Revista Brasileira de Oleaginosas e Fibrosas**, Campina Grande, v.6, n.1, p.465-470, 2002a.

FREIRE, E. C. Fluxo gênico entre algodoeiros convencionais e transgênicos. **Revista Brasileira de Oleaginosas e Fibrosas**, Campina Grande, v. 6, n. 1, p. 471–482, 2002b.

FREIRE, E. C.; BARROSO, P. A. V.; PENNA, J. C. V.; BORÉM, A. Fluxo gênico: Análise do caso do algodão no Brasil. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v. 29, p. 104-113, 2003.

FREITAS, L. B.; BERED, F. B. **Genética e evolução vegetal**. Editora da UFRGS: Porto Alegre, 2003, 307p.

FREITAS, R. B., SILVA, U. C., ALVES, M. F., CIAMPI, A, Y., HOFFMANN, L., BARROSO, P. A. V. Diversidade genética de populações de *Gossypium mustelinum* MIERS e estratégia para a conservação *in situ*. In: **Anais II Simpósio brasileiro de recursos genéticos**. Brasília, DF, p. 196, 2008.

FRELICHOWSKI JR, J.; PALMER, M. B.; MAIN, D.; TOMKINS, J. P.; CANTRELL, R. G.; STELLY, D. M.; YU, J.; KOHEL, R. J.; ULLOA, M. Cotton genome mapping with

new microsatellites from Acala 'Maxxa' BAC-ends. **Molecular Genetics Genomics**, Berlin, v. 275, p. 479–491, 2006.

FROMENTINI, J.; ERNANDE, B.; FABLET, R.; PONTUAL, H. Importance and future of individual markers for the ecosystem approach to fisheries. **Aquatic Living Resource**, Tahiti, v. 22, p. 395–408, 2009.

FRYXELL, P. A. Stages in the evolution of *Gossypium*. **Advancing Frontiers of Plant Sciences**, Jodhpur, v. 10, p. 31-56, 1965.

FRYXELL, P. A. Taxonomy and germoplasm resources. **American Society of Agronomy**, Madison, p. 27-58, 1984.

FRYXELL, P. A. **The natural history of the cotton tribe (Malvaceae, tribe Gossypieae)**. Texas: Texas A&M University Press (College Station), 1979. 245p.

FRYXELL, P. A.; CRAVEN, L. A.; STEWART, J. McD. A revision taxonomic interpretation of *Gossypium* L. (Malvaceae). **Rheedea**, Calicut, p. 108-165, 1992.

GIL, A. P. Distribucion, colecta y uso de las espécies silvestres de algodón en México. **Ciencia México**, Cidade do México, p. 359-369, 1996.

GONÇALVES, A. C.; REIS, C. A. F.; VIERIA, F. A.; CARVALHO, D. Estrutura genética espacial em populações naturais de *Dimorphandra mollis* (Fabaceae) na região norte de Minas Gerais, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 33, n. 2, p. 325-332, 2010.

GRATTAPAGLIA, D. Marcadores moleculares em espécies florestais: *Eucalyptus* como modelo. In: NASS, L. L., VALOIS, A. C. C., MELO, I. S., VALADARES-ILGLIS, M. C. **Recursos genéticos e melhoramento: plantas**, Rondonópolis, Fundação MT, p.967-1010, 2001.

GRODZICKER, T.; WILLIAMS, J.; SHARP, P.; SAMBROOK, J. Physical mapping of temperature-sensitive mutations of adenoviruses. **Cold Spring Harbor Symposia Quantitative Biology**, Woodbury, v. 39, p. 439–446, 1974.

GUO, W.; CAI, C.; WANG, C.; ZHAO, L.; WANG, L.; ZHANG, T. A preliminary analysis of genome structure and composition in *Gossypium hirsutum*. **BMC Genomics**, London, v. 9, p.314, 2008.

HARDY, O. J.; CHARBONNEL, N.; FRÉVILLE, H.; HEUERTZ, M. Microsatellite allele sizes: a simple test to assess their significance on genetic differentiation. **Genetics**, Pittsburgh, v. 163, p. 1467–1482, 2003.

HARLAN, J. R.; DE WET, J. M. J. Towards a rational classification of cultivated plants. **Taxon**, Oxford, v. 20, p. 509-517, 1971.

HAZENKAMPF C. A.; MENZEL, M. Y. Incipient genome differentiation in *Gossypium*. II comparison of 12 chromosomes in *G. hirsutum*, *G. mustelinum* and *G. tomentosum* using heterozygous translocations. **Genetics**, Pittsburgh, v. 95, p. 971–983, 1980.

HOLTZ, M. **Utilização de resíduos de algodão da indústria têxtil para a produção de corpos frutíferos de *Pleurotus ostreatus* (DSM 1833)**. 2008, 102p. Dissertação de mestrado em Engenharia de Processos, Universidade da Região de Joinville, Joinville, SC.

HÜBNER, D. B.; BAHIA, E. T.; FORTES, M.; FERREIRA, W. R. Sustentabilidade e biodiversidade em unidades de conservação do Brasil. **Reuna**, Belo Horizonte, v. 13, p. 61-67, 2008.

IQBAL, M. J.; REDDY, O. U. K.; EL-ZIK, K. M.; PEPPER, A. E. A genetic bottleneck in the 'evolution under domestication' of upland cotton *Gossypium hirsutum* L. examined using DNA fingerprinting. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 103, p. 547-554, 2001.

JIANG, C.; WRIGHT, R.; EI-ZIK, K.; PATERSON, A. H. Polyploid formation created unique avenues for response to selection in *Gossypium* (cotton). **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America – PNSA**, Chicago, v. 95, p. 4419-4424, 1998.

KANTARTZI, S.; ULLOA, M.; STEWART, J. M. Genetic diversity of A-genome cotton. Summaries of Arkansas Cotton Research. **AAES Research Series**, Alabama, v. 552, p. 112-116, 2006.

KANTARTZI, S. K.; ULLOA, M.; SACKS, E.; STEWART, J. McD. Assessing genetic diversity in *Gossypium arboreum* L. cultivars using genomic and EST-derived microsatellites **Genetica**, São Paulo, v. 136, p. 141–147, 2009.

KHAN S. A.; HUSSAIN D.; ASKARI E.; STEWART J. M.; MALIK K. A.; ZAFAR, Y. Molecular phylogeny of *Gossypium* species by DNA fingerprinting. **Theoretical Applied Genetics**, Stuttgart, v. 101, p. 931-938, 2000.

KHAN, Z. I.; FU, Y.; KHAN, I. A. Genetic diversity of Pakistani cotton cultivars as revealed by simple sequence repeat markers A. **Communications in Biometry and Crop Science**, Poland, v. 4, n. 1, p. 21–30, 2009.

KÖLLIKER, R.; JONES, E. S.; DRAYTON, M. C.; DUPAL, M. P.; FOSTER, J. W. Development and characterisation of simple sequence repeat (SSR) markers for white clover (*Trifolium repens* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, Stuttgart, v. 102, n. 2-3, p. 416-424, 2001.

KOUMI, P.; GREEN, H. E.; HARTLEY, S.; JORDAN, D.; LAHEC, S.; LIVETT, R. J.; TSANG, J. W.; WARD, D. M. Evaluation and validation of the ABI 3700, ABI 3100, and the MegaBACE 1000 capillary array electrophoresis instruments for use with short tandem repeat microsatellite typing in a forensic environment. **Electrophoresis**, Weinheim, v.25, p. 2227–2241, 2004.

LACAPE, J. M.; DESSAUW, D.; RAJAB, M.; NOYER, J. L.; HAU, B. Microsatellite diversity in tetraploid *Gossypium* germplasm: assembling a highly informative genotyping set of cotton SSRs. **Molecular Breeding**, New York, v. 19, n. 1, p. 45-58, 2007.

LAGERCRANTZ, U.; ELLEGREN, H.; ANDERSON, L. The abundance of various polymorphic microsatellite motifs differs between plants vertebrates. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 21, n.5, p.1111-1115, 1993.

LEMES, M. R.; BRONDANI, R. P. V.; GRATTAPAGLIA, D. Multiplexed systems of microsatellite markers for genetic analysis of mahogany, *Swietenia macrophylla* King (Meliaceae), a threatened neotropical timber species. **The Journal of Heredity**, Oxford, v. 93, n. 4, p. 287-291, 2002.

LIU, L. Genetic mapping and QTL analysis of fiber-related traits in cotton *Gossypium hirsutum* x *G. mustelinum*. **Crop and Soil Sciences Seminar**, Athens, synopsis, Miller Plant Sciences Building., 2006, 1 p.

LIU, Q.; BRUBAKER, C. L.; GREEN, A. G.; MARSHALL, D.R.; SHARP, P. J.; SINGH, S. P. Evolution of the FAD-2 fatty acid desaturase 5' UTR intron and the molecular systematics of *Gossypium* (Malvaceae), **American Journal of Botany**, Baltimore, v. 88, p. 92-102, 2001.

LIU, S.; CANTRELLY, R. G.; MACCARTY, J. C.; STEWART, J. M. Simple sequence repeat-based assessment of genetic diversity in cotton race stock accessions. **Crop Science**, Houston, v. 40, p. 1459-1469, 2000.

MAIA, T. A. **Análise de estrutura genética de populações de *hemileia vastatrix* com base no marcador AFLP**. 2009. 38p. Dissertação de mestrado. UFV, Viçosa, Brasil.

McCARTY JR.; JENKINS, J. N. Primitive cotton germplasm: yield and fiber traits for 16 day-neutral accessions. **Research Report**, Mississippi, v. 22, n. 19, p. 1-6, 2001.

NASCIMENTO, R. A. O óleo de algodão como fonte para o biodiesel. Aspectos técnicos. In: **Anais VI congresso brasileiro do algodão**. Uberlândia, MG, 2007.

NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics**, Pittsburgh, v. 89, n.3, p. 583-590, 1978.

NEI, M. Genetic distance between populations. **The American Naturalist**, Chicago, v. 106, p. 283-292, 1972.

NEVES, O. da S.; CAVALERI, P. A.; GRIDI-PAPP, I. L.; FUZATTO, M. G. Algodoeiro silvestre no Nordeste do Brasil. **Bragantia**, Campinas, v. 24, p. 19-25, 1965.

NICESE, F. P.; HORMAZA, J. I.; McGRANAHAN, G. H. Molecular characterization and genetic relatedness among walnut (*Juglans regia* L.) genotypes based on RAPD markers. **Euphytica**, Dordrecht, v. 101, p. 199–206, 1998.

OLIVEIRA, E. J. de; DANTAS, J. L. L.; CASTELLEN, M. DA S.; MACHADO, M. D. Identificação de microssatélites para o mamoneiro por meio da exploração do banco de dados de DNA. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 30, n. 3, p. 841-845, 2008.

OLIVEIRA, E. J.; PÁDUA, J. G.; ZUCCHI, M. I.; CAMARGO, L. E. A.; FUNGARO, M. H. P.; VIEIRA, M. L. C. Development and characterization of microsatellite markers from the yellow passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*). **Molecular Ecology Notes**, Oxford, v.5, n.2, p.331-333, 2005.

PANG, C.; DU, X.; MA, Z. Evaluation of the introgressed lines and screening for elite germplasm in *Gossypium*. **Chinese Science Bulletin**, Shanghai, v. 51, n. 3, p. 304-312, 2006.

PELEG, Z.; FAHIMA, T.; ABBO, S.; KRUGMAN, T.; SARANGA, Y. Genetic structure of wild emmer wheat populations as reflected by transcribed versus anonymous SSR markers. **Genome**, Toronto, v. 51, p. 187-195, 2008.

PENNA, J. C. V. Melhoramento do algodão. In: BORÉM, A. (ed). **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa: UFV, 1999. p. 15-50.

PERCY, R. G.; CANTRELL, R. G.; ZHANG, J. Genetic variation for agronomic and fiber properties in an introgressed recombinant inbred population of cotton. **Crop Science**, Houston, v. 46, p.1311-1317, 2006.

PICKERSGILL, B.; BARRETT, S. C. H.; LIMA, A. D. Wild cotton in northeast Brazil. **Biotropica**, Zurich, v.7, p.42-54, 1975.

PREETHA, S.; RAVEENDREN, T. S. Molecular marker technology in cotton. **Biotechnology and Molecular Biology Review**, Coimbatore, v. 3, n. 2, p. 32-45, 2008.

PRICHARD, J. K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, Pittsburgh, v. 155, p. 945–959, 2000.

PUSADEEA, T.; JAMJODA, S.; CHIANGB, Y.; RERKASEMA, B.; SCHAALC, B. A. Genetic structure and isolation by distance in a landrace of thai rice. **Proceedings of the Nacional Academy of Sciences of the United States of America – PNAS**, Chicago, v. 106, n. 33, 2009.

RAMALHO, M. A. P.; SANTOS, J. B.; PINTO, C. A. B. P. **Genética na agropecuária**, Ed. UFLA: Lavras, 2008, 258p.

RANA, M. K.; SINGH, V. P.; BHAT, K. V. Assessment of genetic diversity in upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.) breeding lines by using amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers and morphological characteristics. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Witzzenhausen, v. 52, p. 989–997, 2005.

REDDY, O. U.; PEPPER, A. E.; ABDURAKHMONOV, I.; SAHA, S.; JENKINS, J. N.; BROOKS, T.; BOLEK, Y.; ELZIK, K. M. New dinucleotide and trinucleotide microsatellite marker resources for cotton genome research. **Crop Science**, Houston, v. 5, p. 103-113, 2001.

REIS, R. L.; MUNIZ, J. A.; SILVA, F. F.; SÁFADIL, T.; AQUINO, L. H. Abordagem bayesiana da sensibilidade de modelos para o coeficiente de endogamia. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.39, n.6, p.1752-1759, 2009.

RIBEIRO, C. S. N. **Caracterização *in situ*, molecular e morfológica de acessos de *Gossypium* do estado de Pernambuco**. 2008. 78p. Dissertação de Mestrado. UFRPE, Recife, Pernambuco.

RIGON, L.; CORRÊA, S.; BELING, R. R.; REETZ, E. R.; VENCATO, A.; SANTOS, C. Anuário brasileiro do algodão 2008. **Gazeta Santa Cruz**, Santa Cruz do Sul, 2008, 138p.

RONG, J.; ABBEY, C.; BOWERS, J. E.; et al. A 3347-locus genetic recombination map of sequence-tagged sites reveals features of genome organization, transmission and evolution of cotton (*Gossypium*). **Genetics**, Pittsburg, v. 166, p. 389-417, 2004.

SAIKI, R. K.; GELFAND, D. H.; STOFFEL, S.; SCHARF, S. J.; HIGUCHI, R.; MULLIS, K. B.; ERLICH, H. A. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**, Baton Rouge, v. 239, p. 487-491, 1988.

SANTOS, E. B. **Caracterização botânica de híbridos interespecíficos em *Gossypium***. 1985, 52p. Dissertação de Mestrado, UFPB, Areia, Paraíba.

SARANGA, Y.; MENZ, M.; JIANG, C.; WRIGHT, R. J.; YAKIR, D.; PATERSON, A. H. genomic dissection of genotype x environment interactions conferring adaptation of cotton to arid conditions. **Genome Research**, Baltimore, v. 11, p. 1988-1995, 2001.

SHAPPLEY, Z. W.; JENKINGS, J.; ZHU, J. C.; MCCARTY JR. Quantitative trait loci associated with agronomic and fiber traits of upland cotton. **Cotton Science**, Baton Rouge, v. 2, p. 153-163, 1998.

SILVA, A. L.; NASCIMENTO, I. M.; MACÊDO, L. B. Ensaio de campo visando ao controle da lagarta rosada do algodoeiro *Pectinophora gossypiella* (Saund., 1844). **Anais: Escola de Agronomia e Veterinária, Goiânia**, v. 27, n. 2, p. 9-12, 1997.

SILVA, U. C.; ALVES, M. F.; FREITAS, R. B.; BARROSO, P. A. V.; HOFFMANN, L. V. Uso de marcadores SSR na tomada de decisões em programas de pré-melhoramento do algodoeiro (*Gossypium hirsutum*). In: **Anais 54º Congresso Brasileiro de Genética, Bahia**, p. 79, 2008.

SILVEIRA, D. G.; AMORIM, E. P.; JESUS, O. N.; SOUZA, F. V. D.; PESTANA, K. N. Variabilidade genética de populações naturais de caroá por meio de marcadores RAPD. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 44, n. 3, p. 283-290, 2009.

SOARES, J. J.; SILVA, M. S.; MELO, R. S. Efeito da época de plantio na produção e na ocorrência de pragas em culturas do algodoeiro (*Gossypium hirsutum*). **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 28, n. 3, p. 337-343, 2006.

SOLANO, P.; RAVEL, S.; BOUYER, J.; CAMARA, M.; KAGBADOUNO, M. S.; et al. The Population Structure of *Glossina palpalis gambiensis* from Island and Continental Locations in Coastal Guinea. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, Washington, v. 3, n. 3, p. 1-9, 2009.

SOLLER, M.; BECKMANN, J. S. Genetic polymorphism in varietal identification and genetic improvement. **Theoretical Applied Genetics**, Stuttgart, v. 67, p. 25-33, 1983.

SOUZA, G. A.; CARVALHO, M. R. O.; MARTINS, E. R.; GUEDES, R. N. C.; OLIVEIRA, L. O. Diversidade genética estimada com marcadores ISSR em populações brasileiras de *Zabrotes subfasciatus*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, n. 7, p. 843-849, 2008.

STEPHENS, S. G.; PHILLIPS, L. L. The history and geographical distribution of a polymorphic system in new world cottons. **Biotropica**, Zurich, v. 4, n. 2, p. 49-60, 1972.

STEPHENS, S. G. Geographical distribution of cultivated cottons relative to Probable centers of domestication in the new world. In: ADRIAN M. **Genes, enzymes and populations**, New York: Plenum press, 1973. p.239–254.

THUILLET, A. C.; BATAILLON, T.; SOURDILLE, P.; DAVID, J. L. Factors affecting polymorphism at microsatellite loci in bread wheat [*triticum aestivum* (L.) Thell]: effects of mutations processes and physical distance from the centromere. **Theoretical Applied Genetics**, Stuttgart, v. 108, n. 2, p. 368-377, 2004.

TIKADER, A.; VIJAYAN, K.; KAMBLE, C. K. Conservation and management of mulberry germplasm through biomolecular approaches – a review. **Biotechnology and Molecular Biology Reviews**, New York, v. 3, n. 4, p. 92-104, 2009.

TOMKINS, J. P.; PETERSON, D. G.; YANG, T. J.; MAIN, D.; WILKINS, T. A.; PATERSON, A. H.; WING, R. A. Development of genomic resources for cotton (*Gossypium hirsutum* L.): BAC library construction, preliminary STC analysis, and identification of clones associated with fiber development. **Molecular Breeding**, Lleida, v. 8, p. 255-261, 2001.

TORGGLER, M. G. F.; CONTEL, E. P. B.; TORGGLER, S. P. **Isoenzimas: variabilidade genética em plantas**. Ribeirão Preto: SBG, 1995.

TÓTH, G.; GÁSPARI, Z.; JURKA, J. Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. **Genome Research**, Baltimore, v. 10, p. 967-981, 2000.

ULLOA, M.; STEWART, J. McD.; GARCIA, E. A. C.; GODOY, S. A.; GAYTAN, A. M.; ACOSTA, S. N. Cotton genetic resources in the western status of Mexico: *in situ*

conservation status and germplasm collection for *ex situ* preservation. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Witzenhhausen, v. 53, p. 653-668, 2006.

VALICEK, P. Cotton fiber tropical. In: **Wild and cultivated cottons.**, v. 33, p. 363-385, 1978.

VALICEK, P. Some notes on the taxonomy of the new specie *Gossypium caicoense* Aran. **Agricultura Trópica e Subtrópica**, Campinas, v. 10, p. 119-123, 1977.

VAN ESBROECK, G. A.; BOWMAN, D. T. Cotton germplasm diversity and its importance to cultivar development. **Journal of Cotton Science**, Baton Rouge, v.2, p. 121-129, 1998.

VIDAL NETO, F. da S. C.; BARROSO, P. A. V.; SANTOS, J. W DOS.; ARAÚJO, G. P. Perfil do algodão arbóreo no Estado do Ceará. In: **Anais V congresso brasileiro do algodão**. Salvador, BA, 2005.

VIEGAS, M. P. **Diversidade genética em populações de *Myracrodruon urundeuva* Fr. All., sob diferentes tipos de perturbação antrópica**. 2009, 70p. Dissertação de mestrado. UNESP, Ilha Solteira, SP, Brasil.

VILARINHO, A. A. **Desenvolvimento Econômico e Social vs Patrimônio Cultural e Genético** (25/12/2006). Disponível em: <http://www23.sede.embrapa.br:8080/aplic/rumos.nsf/b1bbbc852ee1057183256800005ca0ab/454fad6c6bb2a4dfa03256f7a00456acf?OpenDocument> acesso em: 25-12-2009.

WADT, L. H. O. **Estrutura genética de populações naturais de pimenta longa (*piper hispidinervum* c.dc.) visando seu uso e conservação**. 2001, 109p. Tese de Doutorado. Esalq/USP, Piracicaba, SP, Brasil.

WANG, Z.; WEBER, J.L.; ZHONG, G.; TANKSLEY, S.D. Survey of plant short tandem DNA repeats. **Theoretical Applied Genetics**, Stuttgart, v.88, p.1-6, 1994.

WEIR, B. S.; COCKERHAM, C. C. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. **Evolution**, San Francisco, v. 38, p. 1358–1370, 1984.

WENDEL, J. F.; ROWLEY, R.; STEWART, J. McD. Genetic diversity in and phylogenetic relationships of the Brazilian endemic cotton, *Gossypium mustelinum* (Malvaceae). **Plant Systematics and Evolution**, Jena, v. 192, n. 1-2, p.49-59, 1994.

WENDEL J. F.; BRUBAKER C. L.; PERCIVAL A. E. Genetic diversity in *Gossypium hirsutum* and the origin of upland cotton, **American Journal of Botany**, Baltimore, v. 79, p. 1291-1310, 1992.

WENDEL, J. F.; BRUBAKER, C. L. RFLP diversity in *Gossypium hirsutum* L. and new insights into the domestication of cotton. **American Journal of Botany**, Baltimore, v. 80, p. 71, 1993.

WENDEL, J. F.; CRONN, R.C. Polyploidy and the evolutionary dispersed repetitive DNA has spread to new genomes since polyhistory of cotton. **Advanced Agronomy**, London, v. 78, p. 139–186, 2003.

WESTENGEN, O. T.; HUAMÁN, Z.; HEUN, M. Genetic diversity and geographic pattern in early South American cotton domestication. **Theoretical Applied Genetics**, Stuttgart, v. 110, p. 392–402, 2005.

WÜNSCH, A.; HORMAZA, J. I. Cultivar identification end genetic fingerprinting of temperate fruit tree species using DNA markers. **Euphytica**, Dordrecht, v. 125, p. 59-67, 2002.

ZANE, L.; BARGELLONI, L.; PATARNELLO, T. Strategies for microsatellite isolation: a review. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 11, n. 1, p. 1-16, 2002.

ZENG, L.; MEREDITH, W. R.; BOYKIN, D. L.; TALIERCIO, E. Evaluation of an exotic germplasm population derived from multiple crosses among *Gossypium* tetraploid species. **The Journal of Cotton Science**. Baton Rouge, v. 11, p. 118–127, 2007.

ZHANG, H.; LI, Y.; WANG, B.; CHEE, P. W. Recent advances in cotton genomics. **International Journal of Plant Genomics**. Hindawui, v. 2008, p 1-20, 2008.

ZHANG, J.; GUO, W.; ZHANG, T. Molecular linkage map of allotetraploid cotton (*Gossypium hirsutum* L. x *Gossypium barbadense* L.) with a haploid population. **Theoretical Applied Genetics**, Stuttgart, v. 105, p. 1166–1174, 2002.

ZHANG, J.; YE, Q.; YAO, X.; HUANG, H. Microsatellite diversity and mating system of *Sinojackia xylocarpa* (Styracaceae), a species extinct in the wild. **Biochemical Systematics and Ecology**, Switzerland, v. 38, p. 154–159, 2010.

ZHU, H.; ZHANG, T.; YANG, L.; GUO, W. EST-SSR sequences revealed the relationship of D-genome in diploid and tetraploid species in *Gossypium*. **Plant Science**, Rio de Janeiro, v. 176, p. 397–405, 2009.

ZUCCHI, M. I. **Análise da estrutura genética de *Eugenia dysenterica* DC utilizando marcadores RAPD e SSR**. 2002, 148p. Tese de Doutorado. Esalq/USP, Piracicaba, SP, Brasil.

Capítulo 2

Uiara Cavalcante, Paulo Augusto Vianna Barroso, Milena Ferreira Alves, Lúcia Vieira Hoffmann, Edson Ferreira da Silva, Vânia Cristina Rennó Azevedo e Ana Yamagushi Ciampi

**Diversidade e estrutura genética de populações naturais de
Gossypium mustelinum Miers ex Watt**

Enviado ao periódico:

Scientia Agricola

1 **Diversidade e estrutura genética de populações naturais de *Gossypium mustelinum***
2 **Miers ex watt¹**

3 UIARA S. CAVALCANTE^{2,*6}, PAULO A. V. BARROSO³, MILENA F. ALVES⁴,
4 LÚCIA, V. HOFFMANN³, EDSON F. SILVA^{2,5}, VÂNIA C. R. AZEVEDO⁶, ANA Y.
5 CIAMPI⁶

6 ²Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Melhoramento Genético de Plantas,
7 Departamento de Agronomia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, CEP: 52171-
8 900, Recife, Pernambuco, Brasil, ³Pesquisador da Embrapa Algodão, Núcleo Cerrado,
9 Área de Biotecnologia Vegetal, CEP: 75375-000, Goiânia, Goiás, Brasil, ⁴Programa de
10 Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, Departamento de Agronomia,
11 Universidade Federal de Goiás, CEP: 74001-970, Goiânia, Goiás, Brasil,

12 ⁵Departamento de Biologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, CEP: 52171-
13 900, Recife, Pernambuco, Brasil, E ⁶pesquisadora da Embrapa Cenargen, Área Genética
14 Vegetal, CEP: 70770-917, Brasília, Distrito Federal, Brasil.

15 **Resumo:** *Gossypium mustelinum* é uma espécie silvestre de algodão endêmica do
16 Nordeste brasileiro, que ocorre preferencialmente em matas ciliares, próximo de fontes
17 de água perenes ou temporárias. Essa espécie é importante fonte de genes que podem
18 ser introduzidos nas espécies cultivadas. A conservação *in situ* está associada à
19 preservação das matas ciliares, redução da ação antrópica e avanço da pecuária, que
20 provocam redução populacional e de variabilidade. O objetivo deste trabalho foi
21 determinar a variabilidade e estrutura genética de 16 populações do Semi-árido do
22 Nordeste brasileiro. Foram feitas extrações de DNA e PCR com marcadores SSR. Esses
23 marcadores foram empregados para estimar a frequências e a diversidade alélica, bem
24 como diversidade e estrutura genética pelas estatísticas *G* de Nei. Treze pares de
25 *primers* amplificaram 113 alelos, sendo 44 exclusivos e 35 considerados raros. A
26 diversidade genética média foi alta tanto nas populações ($H_e=0,228$) como na análise
27 por região ($H_e=0,474$) e a diferenciação entre as populações foi bastante alta

¹ Artigo recebido para publicação em _____ e aceito em _____

^{*6}Correspondência do autor (e-mail: uiaracavalcante@yahoo.com.br)

28 ($F_{ST}=0,521$), tendo valor menor na análise por região ($F_{ST}=0,235$). Observou-se alto
29 índice de endogamia tanto nas populações ($f=0,876$) como nas regiões ($f=0,922$). Esses
30 resultados comprovam, que essa espécie se reproduz predominantemente por
31 autofecundação. A estruturação da variabilidade genética nas populações e o alto índice
32 de diferenciação sugerem que para eficiente preservação *in situ* de *G. mustelinum*,
33 devem ser contempladas mais de uma população. Além da manutenção *in situ*, a
34 conservação *ex situ* também se faz necessária e, neste caso, a coleta deve ser feita em
35 todas as populações para que haja representatividade da diversidade genética.

36 *Palavras-chave: Malvaceae; algodão silvestre; marcador SSR; endogamia e populações*
37 *naturais.*

38 **Introdução**

39 O gênero *Gossypium* possui 50 espécies, das quais 45 são diplóides
40 ($2n=2x=26$) e cinco são tetraplóides ($2n=4x=52$), estas últimas originaram-se por
41 hibridização interespecífica entre espécies ancestrais Africanas de genomas A e D (Liu
42 et al., 2001, Chen et al., 2007).

43 No Brasil ocorrem três espécies do gênero *Gossypium*, *G. hirsutum* L., *G.*
44 *barbadense* L., e *G. mustelinum* Miers ex Watt, todas tetraplóides (Iqbal et al., 2001).
45 As duas primeiras são domesticadas e foram introduzidas visando à exploração
46 econômica, enquanto a última (*G. mustelinum*) é silvestre e ocorre apenas no Brasil,
47 próximo a lagos e rios temporários na região semiárida dos Estados da Bahia e Rio
48 Grande Norte (Barroso et al., 2010). Quanto à posição filogenética, *G. mustelinum*
49 diverge consideravelmente das demais espécies, inclusive em relação às demais
50 tetraplóides (Liu et al., 2001, Wendel e Cronn, 2003). Segundo Barroso et al. (2010)
51 apesar de apresentar fecundação cruzada, as populações naturais de *G. mustelinum* se
52 reproduzem preferencialmente por autofecundação, por isso apresentam alto nível de
53 endogamia.

54 Assim como as demais espécies tetraplóides desse gênero, *G. mustelinum* é
55 sexualmente compatível com as espécies cultivadas. A ocorrência de híbridos férteis e
56 potencialmente viáveis entre *G. hirsutum* x *G. mustelinum* é relatado por Freire, (2002).
57 A cruzabilidade entre espécies é uma condição que pode facilitar a utilização na
58 introgressão genética, portanto, amplia as possibilidades de utilização das fontes de
59 variabilidade genética em programas de melhoramento.

60 A exploração de espécies silvestres tetraplóides de algodão, como *G.*
61 *tomentosum*, *G. darwinii* e *G. mustelinum* em programas de melhoramento genético
62 pode permitir a adição de alelos associados características de interesse, como resistência
63 a doenças, características especiais de fibra e resistência a condições ambientais
64 adversas (Hasenkanpf e Menzel, 1980, Gil, 1996, Jiang et al., 1998, Saranga et al.,
65 2001). Apesar de *G. mustelinum* não apresentar características adequadas para sua
66 exploração econômica direta, caracteres de interesse têm sido identificados e poderão
67 ser transferidos para as espécies cultivadas. Badigannavar (2010) identificou grandes
68 quantidades de terpenóides e aldeídos que conferem resistência a insetos em genótipos
69 desta espécie e Wang et al., (2010) identificaram QTL's que condicionam boa qualidade
70 de fibra. Por ser nativa de ambientes muitas vezes degradados, em que ocorrem altas
71 temperaturas na maior parte do ano, acredita-se que esse germoplasma também pode
72 possuir alelos que confirmam resistência a estresses abióticos, como variações térmicas
73 (Hazenkanpf e Wendel, 1980, Liu, 2006).

74 De acordo com Khan et al., (2009) as técnicas moleculares tem grande
75 importância para a caracterização de germoplasma, manejo e utilização dos recursos
76 genéticos vegetais, além de auxiliar no melhoramento de plantas. No caso do algodão,
77 Preetha e Raveedren, (2008) ressaltam que a utilização de marcadores microssatélites
78 pode acelerar os trabalhos de mapeamento do genoma de *G. mustelinum*. Marcadores

79 SSR têm sido utilizados em estudos de espécies do gênero *Gossypium*, para
80 enriquecimento de bibliotecas genômicas (Xiao et al., 2009), seleção assistida e
81 piramidação de genes de resistência (Preetha e Raveendren, 2008), no acompanhamento
82 de introgressão e mapeamento de QTLs (Jiang et al., 1998), fertilização e competição de
83 pólen (Pereira et al. 2012) e também para estimar a diversidade genética de populações
84 (Bertini et al., 2006, Lacape et al., 2007, Alves, 2009, Barroso et al., 2010).

85 Os conhecimentos sobre a variabilidade e estrutura genética das populações
86 naturais fornecem subsídio à realização de trabalhos de pré-melhoramento que
87 maximizem o aproveitamento de genes das espécies silvestres relacionadas às
88 cultivadas. O objetivo desse trabalho foi avaliar a diversidade e estrutura genética de 16
89 populações naturais de *G. mustelinum* que ocorrem nos Estados da Bahia e do Rio
90 Grande do Norte – Brasil, com base nos resultados obtidos de marcadores SSR.

91 **Material e Métodos**

92 *Amostragem das populações*

93 Foram amostrados indivíduos de 16 populações de *Gossypium mustelinum*,
94 sendo uma localizada no município de Caicó, no Estado do Rio Grande do Norte (RN) e
95 15 localizadas no Estado da Bahia (BA), distribuídas em 11 municípios (Figura 1). Foi
96 amostrado um total de 564 indivíduos e para cada população o número de indivíduos
97 variou de 5 a 138, dependendo do tamanho da população (Tabela 1).

98 A amostragem foi feita de forma aleatória ao longo das populações, de modo
99 que toda a área de ocorrência das plantas fosse representada. Além da amostragem feita
100 nas populações, também foram coletados indivíduos isolados que ocorrem entre as
101 populações, os quais de acordo com a localização, foram agrupados para análise em
102 uma das cinco regiões relacionadas a seguir; Caicó-RN, Norte-BA, Riachão, Itaberaba e
103 Jequié (Tabela 1).

104 As amostras constituíram-se de folhas jovens e/ou de pétalas; os tecidos
105 coletados foram identificados e acondicionados em tubos tipo *falcon*, contendo sílica
106 gel (8mm), a qual era trocada sempre que necessário para proporcionar a rápida
107 secagem dos tecidos. As amostras foram mantidas em tubos com sílica até o momento
108 do processamento da extração do DNA.

109 *Extração e quantificação de DNA*

110 O DNA total foi extraído no Laboratório de Biotecnologia e Genética Vegetal
111 da Embrapa Algodão, usando o protocolo CTAB - *Cationic hexadecyl trimethyl*
112 *ammonium bromide*, descrito por Doyle e Doyle (1990), com modificações propostas
113 por Vidal et al. (2003) e Barroso et al. (2006). A quantificação do DNA purificado foi
114 realizada utilizando alíquotas de cada genótipo, que foram comparadas com uma série
115 de concentrações conhecidas de DNA do fago Lambda (λ) (50 a 300 ng), através da
116 intensidade de fluorescência observada em géis de agarose 0,8% (p/v) submetidos à
117 eletroforese. Os géis foram visualizados em transluminador sob luz UV, após coloração
118 com Sybr Green. O DNA de cada indivíduo foi diluído em água *milliq* para
119 concentração de 1ng/ μ L, para utilização nas reações de PCR e posterior identificação
120 dos marcadores de SSR.

121 *Condições de amplificação dos microssatélites*

122 Para análise da diversidade genética das populações foram utilizados
123 marcadores previamente selecionados de acordo com o perfil de polimorfismo
124 observado para a espécie. Os iniciadores utilizados foram desenvolvidos por Liu et al.
125 (2000) e Nguyen et al. (2004) e estão relacionados na Tabela 2. Foram utilizadas
126 condições de PCR *multiplex* para desenvolver ensaios e detectar locos microssatélites.
127 Os oligonucleotídeos fluorescentes foram obtidos da *Integrated DNA Technologies/IDT*,
128 os quais apresentam a posição 5' do *primer forward* marcada com um dos

129 fluorocromos: 6-FAM (6-carboxyfluorescein), HEX (4,7,2',4',5'7'-hexachloro-6-
130 carboxyfluorescein) ou NED (2,7',8'-benzo-5'-fluoro-2',4,7-trichloro-5-
131 carboxyfluorescein).

132 Os fragmentos de DNA foram amplificados em PCR utilizando o *Multiplex* PCR
133 Kit (Qiagen, Inc., Valencia, CA), que apresenta todos os componentes necessários para
134 reações de PCR, além da enzima HotStar Taq DNA Polimerase e o Q-Solution 5x, que
135 reduz os efeitos de produtos secundários. Em cada *multiplex* foram utilizados de 2 a 3
136 pares de *primers*, marcados com diferentes fluorocromos, ou com o mesmo fluorocromo
137 quando possuíam amplitudes alélicas distintas. As reações foram realizadas para um
138 volume total de 5,0 μ L contendo: 1,0ng de DNA genômico, 0,2 μ M de cada par de
139 primers, 2,5 μ L de 2x QIAGEN Multiplex PCR Master Mix (HotStar Taq DNA
140 Polymerase, PCR amplification buffer, 3mM de $MgCl_2$), 0,5 μ L de Q-solution 5x e 0,7
141 μ L H_2O .

142 As condições físicas da PCR foram as seguintes: 15 minutos de desnaturação a
143 95°C, seguida por 30 ciclos de 60 segundos de desnaturação inicial a 94°C, 60 segundos
144 de anelamento a 51°C-57°C (dependendo da temperatura ideal para os pares de primers
145 utilizados), e 90 segundos de extensão a 72°C. Para minimizar a formação de picos
146 inespecíficos e permitir o *multiplex* de vários locos na mesma reação PCR, foram
147 acrescentados 30 minutos de extensão final a 60°C. Nos sistemas *multiplex* os produtos
148 de cada loco foram analisados conjuntamente nos capilares para detecção de alelos por
149 fluorescência, em analisador automático de fragmentos ABI Prism modelo 3700
150 (Applied Biosystems, Foster City, CA). As amostras foram diluídas 2 vezes com água
151 ultrapura, e 1,0 μ L desta diluição foi transferido para uma nova placa para PCR e
152 adicionado 10 μ L do marcador de referencia, denominado ROX (Brondani e
153 Grattapaglia, 2001), (2,5% ROX [carboxy-x-rhodamine], 90% HI-DI formamida),

154 aquecidas por 5 minutos a 94°C e colocadas imediatamente em gelo. A detecção e a
155 estimativa do tamanho de alelos em pares de bases foram realizadas com a utilização do
156 software ABI Prism GeneScan versão 3.7 (Applied Biosystems). Logo, os valores
157 foram importados para o software ABI Prism Genotyper versão 2.0 NT (Applied
158 Biosystems) para filtragem de picos e interpretação dos dados, definindo o genótipo de
159 cada indivíduo.

160 *Análises estatísticas*

161 Foram obtidas as estimativas de frequência alélica por loco (A), número médio
162 de alelos por população (n_A), heterozigosidade observada (H_o) e esperada (H_e) conforme
163 Nei (1972) tanto para as populações como para as regiões. Estimativas de alelos
164 exclusivos para cada população e região foram obtidas utilizando o programa GDA
165 (Lewis e Zaykin, 2001). As estatísticas F de Wright foram estimadas de acordo com
166 Weir e Cockerham (1984) e o coeficiente R_{ST} foi estimado pela estatística de Slatkin
167 (1995). O intervalo de confiança das estimativas (95%) foi obtido por *bootstrap*,
168 utilizando 10000 reamostragens. Estas análises foram realizadas usando os programas
169 GDA e Fstat (Goudet, 2001).

170 O nível de correlação entre as matrizes de distância genética e distância
171 geográfica entre populações e regiões foi estimado utilizando-se o teste de Mantel
172 (1967), para verificar se havia estruturação espacial da diversidade genética para as
173 populações e regiões.

174 **Resultados**

175 *Frequências alélicas e diversidade genética*

176 Treze locos microssatélites analisados proporcionaram o total de 113 alelos na
177 análise por população, sendo que o número de alelos por loco (A) observados variou de
178 2 (BNL2496) a 16 (BNL1421) com média igual a 9,25 e, o número efetivo de alelos por

179 loco (A_e) foi 2,94. Na análise por região observou-se o total de 118, o número de alelos
180 por loco variou de 4 a 16 alelos, com média de 9,50 e o número efetivo de alelos por
181 loco (A_e) foi 4,59.

182 Os alelos exclusivos, os raros e os de baixa frequência observados nas análises
183 por população e por região são relacionados na tabela 2. Na análise por população
184 foram observados 38 alelos exclusivos, revelados a partir de dez dos 13 locos analisados
185 e, também foram observados 44 alelos exclusivos e 22 alelos raros. Na análise por
186 região, foram observados 44 alelos exclusivos, 35 alelos raros e seis de baixa frequência
187 (Tabela 2).

188 A heterozigidade observada média (H_o) foi 0,029 na análise por população,
189 com valores variando entre 0,000 (Itaberaba, Euclides e Mororó) a 0,070 (Cativara) e a
190 heterozigidade esperada média (H_e) foi 0,229 com valores variando de 0,000
191 (Itaberaba e Euclides) a 0,596 (Cativara). Na análise por regiões o valor médio de (H_o)
192 foi 0,037 tendo havido variação entre 0,016 na região Jequié a 0,052 na região Itaberaba
193 (Tabela 3).

194 *Índice de fixação e estrutura genética*

195 O índice de fixação médio (f) na análise por população foi 0,876 com variação
196 entre 0,650 na população Jequié a 1,000 nas populações Itaberaba, Euclides e Mororó.
197 Já na análise por região o índice de fixação médio foi 0,9224 tendo variado entre 0,888
198 na região Caicó a 0,966 na região Jequié (Tabela 3). O índice de diferenciação genética
199 (F_{ST}) entre as populações foi 0,508 (IC=0,44 - 0,58) e entre as regiões foi 0,235
200 (IC=0,00 - 0,610). Já a diferenciação genética para locos (R_{ST}) foi de 0,521 e 0,280
201 (IC=0,44 - 0,58) entre populações e regiões, respectivamente. Os intervalos de
202 confiança *bootstrap* indicam que os valores de f , de F_{ST} e de R_{ST} diferentes de zero
203 ($p<0,01$) tanto nas análises por população quanto por região.

204 A distância genética de Nei (1972), considerando-se as populações aos pares
205 com base no F_{ST} variou de 0,235 (Toco x Capivara) a 1,000 (Itaberaba x Euclides)
206 (Tabela 4) e, considerando os pares de regiões a distancia genética variou de 0,145
207 (Riação x Itaberaba) a 0,313 (Jequié x Caicó), Tabela 5. O agrupamento das populações
208 e das regiões pelo método de Neighbor-Joining considerando o F_{ST} é apresentado na
209 figura 1. Pela figura 2, verifica-se melhor agrupamento na análise por região do que por
210 população (Figura 2).

211 A correlação entre as populações indica que não há estruturação entre as mais
212 próximas, comprovada pela distribuição aleatória e baixa correlação mostrada pelo teste
213 de Mantel. A relação entre a distância geográfica e o F_{ST} estimado para pares de
214 populações foi pequena e não significativa ($r=0,06$, $p>0,05$) (Figura 3A). Entretanto, a
215 correlação feita considerando as regiões mostrou considerável estruturação, portanto,
216 significativo ($R^2=0,56$, $r=0,75$, $p<0,05$) (Figura 3B). Elevado coeficiente de correlação
217 de Spearman (0,81) também é indicativo da estruturação geográfica da diversidade
218 quando considerado a análise por região.

219 **Discussão**

220 *Frequências alélicas e diversidade genética*

221 Na análise, considerando as 16 populações, as estimativas do número de alelos
222 por loco (A) e do número de alelos efetivo por loco (A_e), evidenciou elevado nível de
223 multialelismo em todos os locos polimórficos, valores superiores aos verificados em
224 estudos anteriores obtidos em avaliação de duas populações de *G. mustelinum* (Alves,
225 2009, Barroso et al, 2010). Isto se deve provavelmente ao maior número de populações
226 e de indivíduos utilizados no presente estudo, que resultou em maior representatividade
227 amostral. Na análise por região, tanto o índice A quanto A_e foram superiores aos obtidos

228 na análise por população e isto se deve à inclusão de indivíduos presentes entre as
229 populações a essa análise.

230 Quanto aos alelos exclusivos, os números observados nas populações (38) e
231 nas regiões (44) indicam que há dissimilaridade genética tanto entre as populações
232 como entre regiões. Nas populações, o maior número de alelos exclusivos (8) foi
233 observado na Capivara (Tabela 2), portanto, nessa população, podem ser encontrados
234 alelos que não estão presentes nas demais populações. Na análise por região, o maior
235 número de alelos exclusivos foi observado na região Itaberaba (21), na qual está
236 incluída a população Capivara. Considerando que alelos com frequência inferior a 5%
237 são raros (Azevedo, 2007; Veigas, 2009), neste estudo foram encontrados 28 alelos
238 raros na análise por população, e, 35 na análise por região tendo ocorrido o maior
239 número na região na Itaberaba (18). Ressalta-se que na população Capivara ocorreu
240 também o maior número de alelos raros (17) (Tabela 2). Portanto, em caso de adoção de
241 estratégias de conservação genética *in situ*, em termos de população deve-se priorizar a
242 Capivara e em termos de região deve ser priorizada a Itaberaba, por apresentarem os
243 maiores números de alelos exclusivos e também de alelos raros.

244 Verifica-se pela tabela 3 que a heterozigose observada (H_o) foi inferior a
245 heterozigose esperada (H_e), tanto nas médias quanto nas populações e regiões,
246 evidenciando que há menos heterozigotos do que a probabilidade esperada. Os valores
247 médios obtidos para heterozigose esperada (H_e), que corresponde a diversidade
248 genética, tanto na análise por população (0,229) quanto na análise por região (0,474) são
249 considerados altos, principalmente por se tratar de uma espécie que segundo Barroso et
250 al. (2010) apresenta alta taxa de autofecundação. Ressalta-se que em espécies
251 autógamias, H_e corresponde mais a diversidade entre indivíduos do que a heterozigose
252 destes. O conhecimento dos dados sobre heterozigosidade são de extrema importância,

253 pois, altos níveis de variabilidade genética possibilitam a ocorrência de um grande
254 número de combinações genotípicas, que aumenta o potencial evolutivo das espécies em
255 relação à capacidade de adaptação as possíveis mudanças ambientais (Sebbenn et al.,
256 2000). A ausência de diversidade genética foi observada nas populações Euclides e
257 Itaberaba (Tabela 3) e se deve, principalmente ao reduzido tamanho dessas populações,
258 das quais foram amostrados 5 e 7 indivíduos, respectivamente. A redução do tamanho
259 populacional nas populações de *G. mustelinum* deve-se principalmente à ação antrópica,
260 como a expansão das fronteiras agrícolas, e pastoreio de caprinos e de outros animais. A
261 maior diversidade genética foi observada nas populações Capivara (H_e 0,596) e Tocó
262 (H_e 0,522) que são as maiores e encontram-se melhor preservadas. Esses valores de H_e
263 corroboram com os resultados obtidos para polimorfismo de alelos e ocorrência de
264 alelos exclusivos e raros que foram mais altos, principalmente na população Capivara
265 (Tabela 2). A redução de tamanho em populações naturais propicia a perda de alelos e,
266 além disso, quanto menor for o número de indivíduo também será menor a
267 probabilidade de ocorrência de mutações e, portanto, é um fator que influencia
268 negativamente a porcentagem de diversidade genética. O valor médio de H_e observado
269 na análise por região (0,474) foi bem superior ao observado na análise por população
270 (0,474) e isto se deve à inclusão de indivíduos que ocorrem entre as populações na
271 análise por região. Entre as regiões os maiores valores foram observados na Itaberaba
272 (H_e 0,591) e na Riachão (H_e 0,566), sendo que em cada uma delas incluem uma das
273 populações que apresentaram a maior diversidade genética. O fato da região Caicó ter
274 apresentado a menor diversidade genética deve-se ao maior isolamento geográfico da
275 mesma em relação às demais (ver figura 1), o que restringe qualquer possibilidade de
276 fluxo gênico e, além disso, a referida região é representada por uma única população, a
277 qual tem pequeno número de indivíduos.

278 *Índice de fixação e estrutura genética*

279 O índice de fixação foi positivo e alto em todas as populações e regiões e,
280 significativamente diferente de zero, considerando-se 95% de probabilidade para
281 intervalo de confiança, evidenciando alto nível de endogamia nas populações (Tabela
282 3). Os altos níveis de homozigotos em todas as populações também indicam desvios da
283 panmixia e do equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW). Tais resultados decorrem e
284 corroboram com informações a cerca do sistema reprodutivo dessa espécie que é misto
285 e propicia a endogamia em decorrência da autofecundação, geitonogamia e cruzamentos
286 entre indivíduos aparentados. Além disso, segundo Alves (2009) o fato dos indivíduos
287 de *G. mustelinum* ocorrerem distribuídos em pequenas comunidades compostas por
288 poucas dezenas de indivíduos ao longo dos fragmentos da mata ciliar, é que mesmo as
289 pequenas distâncias que ocorrem entre as comunidades vizinhas restringem o fluxo
290 gênico.

291 A endogamia foi máxima ($f=1$) nas populações Itaberaba, Euclides e Mororó,
292 principalmente por serem constituídas de um reduzido número indivíduos o que
293 favorece a autofecundação e/ou cruzamento entre indivíduos aparentados. Entre as
294 regiões, o menor valor de f foi observado na região CaicóRN (0,888). Isto deve-se ao
295 fato dessa região ser representada apenas por uma população, a qual é composta por
296 pequeno número de indivíduos.

297 Os altos índices de fixação observados nas populações de *G. mustelinum*
298 também permitem inferir que caso haja alelos deletérios nas referidas populações a
299 frequência seja muito baixa, pois o processo de endogamia reduz a heterozigose e
300 elimina os alelos recessivos que são normalmente mantidos em heterozigose.

301 Quanto ao índice de diferenciação genética (F_{ST}) e ao índice de diferenciação
302 genética para os locos (R_{ST}), os valores obtidos foram bastante elevados, 0,5079 e

303 0,5209 (IC 0,44 – 0,58), respectivamente, entretanto são similares a outros estudos
304 também realizados com *G. mustelinum* (Freitas et al.,2008; Alves et al., 2009; Barroso
305 et al., 2010). O R_{ST} é um coeficiente considerado mais apropriado para locos com
306 elevada taxa de mutação, como é o caso dos microssatélites, por levar em consideração
307 o modelo de mutações *stepwise*. Porém, neste estudo F_{ST} e R_{ST} apresentaram a mesma
308 capacidade de distinguir a diferenciação entre populações de *G. mustelinum*. Tais
309 resultados indicam que as populações são bastante distintas e que caso ocorra fluxo
310 gênico entre as populações, se dá com frequência muito baixa, portanto, caso seja
311 adotado a estratégia de preservação *in situ* deve-se utilizar mais de uma população, afim
312 de que tenha maior representatividade do pool gênico.

313 Os valores de F_{ST} e R_{ST} para as regiões, apesar de altos 0,235 e 0,280 (IC 0,00 -
314 0,61) foram inferiores ao observados na análise por população 0,521 e 0,280 (IC=0,44 -
315 0,58) em decorrência da inclusão nessa análise de indivíduos que ocorrem entre as
316 populações e que não foram inclusos na análise por população. Portanto, indicativo de
317 que possa ocorrer maior fluxo gênico entre regiões do que entre populações deve ser
318 visto com reserva. Mesmo porque pode ter havido certa atenuação nas análises por
319 região, de tal modo que a as diferenças nas frequências alélicas entre uma dada
320 população tenha sido compensada por outra população na análise por região. Os altos
321 valores de F_{ST} e R_{ST} observados também são indício de que a formação ou separação das
322 populações não tenha ocorrido recentemente, a menos que o processo tenha envolvido
323 forte deriva genética.

324 A distância genética de Nei (1972) entre pares de populações estimada com
325 base no F_{ST} (Tabela 4) mostra que não há correlação entre as distâncias físicas e
326 genéticas das populações. Pois a maior distância genética (1,000) verificada entre as
327 populações Itaberaba e Euclides não corresponde à maior distância física entre as

328 populações (Figura 1) e, as mais próximas geneticamente que foram Tocó e Capivara
329 (0,235) também não são as mais distantes fisicamente. Ressalta-se que neste estudo as
330 maiores distâncias físicas envolvem a população Caicó, a qual ocorre no Estado do Rio
331 Grande do Norte e as demais ocorrem no Estado da Bahia (Figura 1). Entretanto, na
332 análise comparando as distâncias físicas e genéticas entre as regiões houve maior
333 correlação (Tabela 5). Pelas árvores filogenéticas construídas por meio do método
334 Neighbor-Joining utilizando-se o F_{ST} com média de diversidade (Figura 2), houve maior
335 consistência em relação à estruturação da variabilidade genética no espaço entre regiões
336 do que em relação às populações, provavelmente por terem sido inclusos indivíduos que
337 ocorrem entre as populações na análise por região.

338 Entretanto coeficiente de determinação (R^2) obtido pelo teste de Mantel
339 mostrou que a distância física entre as populações explica 41% da distância genética
340 observada e na análise por região a distância física explica 56% da distância genética.
341 Estes resultados mostram que há estruturação da diversidade de *G. mustelinum* no
342 espaço, como pode ser observado na Figura 3.

343 Informações a cerca da diversidade e estrutura genética das populações, bem
344 como da estruturação da diversidade no espaço servirão como subsídio para manutenção
345 dos acessos de *G. mustelinum* mantidos pela Embrapa nas unidades Embrapa Algodão e
346 Cenargen, principalmente para se evitar a perda de diversidade durante a renovação dos
347 acessos. Tais informações também são fundamentais caso seja necessária a realização
348 de outras coletas. Em relação à conservação *in situ*, apesar da vulnerabilidade inerente à
349 a esse método, a vulnerabilidade das populações de *G. mustelinum* atualmente é menor
350 do que em alguns anos anteriores e, isto se deve à implementação de políticas públicas
351 de conservação de matas ciliares e redução do desmatamento, maior fiscalização dos
352 órgãos ambientais e a colaboração de alguns proprietários das terras de ocorrência das

353 populações. Dentre as populações estudadas, Caicó é a que necessita de maiores
354 cuidados.

355 Apesar de *G. mustelinum* ter sido ainda pouco estudada quanto aos caracteres de
356 importância agrônômica e ocorrer apenas no Brasil, está restrita às 16 populações
357 mencionadas neste estudo. Seu *pool gênico* necessita ser preservado e melhor estudado
358 visando a utilização em introgressões para as espécies cultivadas.

359 **Agradecimentos**

360 Ao Probio/MMA e à Embrapa pelo apoio financeiro; ao CNPq pela cessão de bolsa para
361 a primeira autora. As coletas foram realizadas com autorização do IBAMA, processo
362 02001.004259/2004. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior,
363 CAPES pela concessão da bolsa de estudo ao primeiro autor. À Embrapa algodão pela
364 disponibilização de toda estrutura necessária para desenvolvimento desta pesquisa e aos
365 funcionários Francisco Alves, Fábila Lima Pinto e Joabson Araújo pelo suporte técnico.

366 **Literatura Citada**

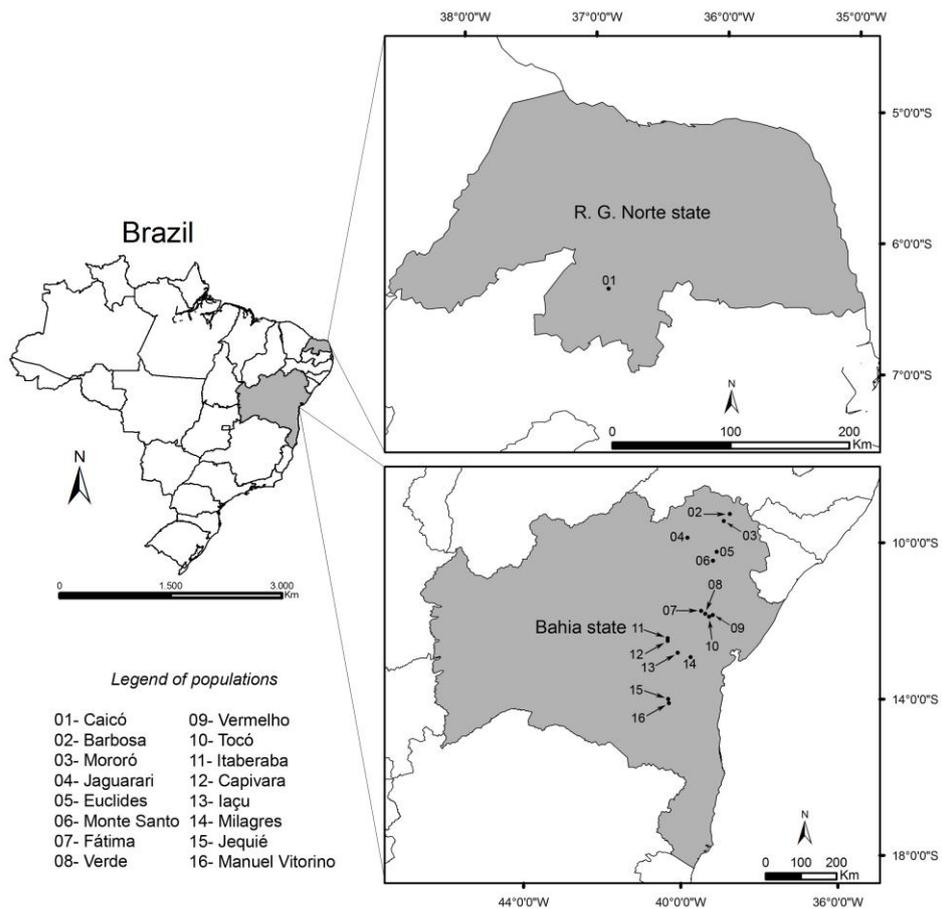
- 367 Alves, M. F. 2009. *Caracterização in situ e estrutura genética de populações de*
368 *Gossypium mustelinum Miers ex Watt*. 98p. Dissertação de mestrado. UFRN,
369 Natal, RN.
- 370 Azevedo, C. R. V. 2007. *Desenvolvimento e aplicação de microssatélites, análise de*
371 *cpDNA e modelagem computacional para estudos da estrutura e dinâmica*
372 *genética de maçaranduba – Manilkara huberi (Ducke) Chev. Sapotaceae*. 207p.
373 Tese de Doutorado. UNB, Brasília, DF.
- 374 Badigannavar, A. 2010. *Characterization of quantitative traits using association*
375 *genetics in tetraploid and genetic linkage mapping in diploid cotton (Gossypium spp.)*.
376 157p. A Dissertation of Doctor. Graduate Faculty of the Louisiana State University,
377 Dharwad.
- 378 Barroso, P. A. V., Freire, E. C., Amaral, J. A. B., Silva, M. T. 2005. Zonas de exclusão
379 de algodoeiros transgênicos para a preservação de espécies de *Gossypium* nativas
380 ou naturalizadas. Embrapa Algodão, Campina Grande, Comunicado Técnico 242:
381 7.
- 382 Barroso, P. A. V., Freire, E. C., Amaral, J. A. B. Do, Hoffmann, L. V. 2006. Zona de
383 exclusão de transgênicos preserva populações *in situ*. *Visão Agrícola* 6: 224-227.
- 384 Barroso, P. A. V., Hoffmann, L. V., Freitas, R. B., Batista, C. E., Alves, M. F., Silva, U.
385 C., Andrade, F. P. 2010. *In situ* conservation and genetic diversity of three

- 386 populations of *Gossypium mustelinum* Miers ex Watt. *Genetic Resource Crop*
387 *Evolution* 57: 343–349.
- 388 Beasley, J. 1942. Meiotic chromosome behaviour in species hybrids, haploids, and
389 induced polyploids of *Gossypium*. *Genetics* 27: 25–54.
- 390 Bertini, C. H. M., Schuster, I., Sediya, T., Barros, E. G., Moreira, M. A. 2006.
391 Characterization and diversity analysis of cotton cultivars using microsatellites.
392 *Genetic Molecular Biology* 29: 321–329.
- 393 Brondani, R. P., Grattapaglia, D. 2001. Cost-effective method to synthesize a
394 fluorescent internal DNA standard for automated fragment sizing. *Biotechniques*.
395 31: 793-800.
- 396 Brubaker, C. L., Bourland, F. M., Wendel, J. F. 1999. The origin and domestication of
397 cotton. In: SMITH, C. W., COTHREN, J. T. *Cotton: origin, history, technology*
398 *and production*. John Wiley and Sons, New York.
- 399 Chen, Z. J., Cheffler, B. E., Dennis, E., et al. 2007. Toward sequencing cotton
400 (*Gossypium*) genomes. *Plant Physiology* 145: 1303–1310.
- 401 Doyle J. J., Doyle, J. L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12: 13–
402 15.
- 403 Endrizzi, J., Turcotte, E., Kohel, R. 1985. Genetics, cytology, and evolution of
404 *Gossypium*. *Advances in Genetics* 23: 271–375.
- 405 Freire, E. C. 2002. Viabilidade de cruzamentos entre algodoeiros transgênicos e
406 comerciais e silvestres do Brasil. *Revista Brasileira de Oleaginosas e Fibrosas* 6:
407 465-470.
- 408 Freitas, R. B., Silva, U. C., Alves, M. F., Ciampi, A. Y., Hoffmann, L., Barroso, P. A.
409 V. 2008. *Diversidade genética de populações de Gossypium mustelinum MIERS e*
410 *estratégia para a conservação in situ*. In: II Simpósio brasileiro de recursos
411 genéticos. 196.
- 412 Fryxell, P. A., Craven, L. A., Stewart, J. Mcd. 1992. A revision taxonomic
413 interpretation of *Gossypium* L. (Malvaceae). *Rheedea*, 108-165.
- 414 Gil, A. P. 1996. Distribucion, colecta y uso de las espécies silvestres de algodón en
415 México. *Revista Ciencia*, 359-369.
- 416 Goudet, J. 2001. *FSTAT*: a program to estimate and test gene diversities and fixation
417 índices (Software). Version 2.9.3, Disponível em:
418 <http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm> Acesso em: 27 de julho de 2010.
- 419 Hazenkampf C. A., Menzel, M. Y. 1980. Incipient genome differentiation in
420 *Gossypium*. II comparison of 12 chromosomes in *G. hirsutum*, *G. mustelinum* and
421 *G. tomentosum* using heterozygous translocations *Genetics*. 95: 971–983.
- 422 Iqbal, M. J., Reddy, O. U. K., El-Zik, K. M., Pepper, A. E. 2001. A genetic bottleneck
423 in the ‘evolution under domestication’ of upland cotton *Gossypium hirsutum* L.
424 examined using DNA fingerprinting. *Theoretical and Applied Genetics* 103: 547-
425 554.
- 426 Jiang, C., Wright, R., El-Zik, K., Paterson, A. H. 1998. Polyploid formation created
427 unique avenues for response to selection in *Gossypium* (cotton). *Proceedings of*
428 *the Nacional Academy of Sciences of the United States of America – PNSA* 95:
429 4419–4424.
- 430 Khan, Z. I., Fu, Y., Khan, I. A. 2009. Genetic diversity of Pakistani cotton cultivars as
431 revealed by simple sequence repeat markers A. *Communications in Biometry and*
432 *Crop Science*. 4: 21–30.

- 433 Lacape, J. M., Dessauw, D., Rajab, M., Noyer, J. L., Hau, B. 2007. Microsatellite
434 diversity in tetraploid *Gossypium* germplasm: assembling a highly informative
435 genotyping set of cotton SSRs. *Molecular Breeding* 19 (1): 45-58.
- 436 Lewis, P. O., Zaykin, D. 2001. Genetic Data Analysis: Computer program for the
437 analysis of allelic data. Version 1.0 (d16c). Disponível na internet em:
438 <<http://lewis.eeb.uconn.edu/lewishome/software.html>> Acesso em: 17 de junho
439 de 2009.
- 440 Liu, L. 2006. Genetic mapping and QTL analysis of fiber-related traits in cotton
441 *Gossypium hirsutum* x *G. mustelinum*. *Crop and Soil Sciences Seminar*, Miller
442 Plant Sciences Building, Athens.
- 443 Liu, S., Saha, S., Stelly, D., Burr, B., Cantrell, R.G. 2000. Chromosomal assignment of
444 microsatellite loci in cotton, *Journal of Heredity* 9: 326-332.
- 445 Liu, Q., Brubaker, C.L., Green, A.G., Marshall, D.R., Sharp, P.J., Singh, S.P. 2001.
446 Evolution of the FAD-2 fatty acid desaturase 5' UTR intron and the molecular
447 systematics of *Gossypium* (Malvaceae). *American Journal Botany* 88: 9–102.
- 448 Mantel, N. A. 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression
449 approach. *Cancer Research*, 27:209-220.
- 450 Nei, M. 1972. Genetic distance between populations. *The American Naturalist*, 106:
451 283-292.
- 452 Nguyen, T. B., Giband, M., Brottier, P., Risterucci, A. M., Lacape, J. M. 2004. Wide
453 coverage of the tetraploid cotton genome using newly developed microsatellite
454 markers. *Theoretical and Applied Genetics* 109:167–175.
- 455 Pereira, G. S ; Sousa, R. L. ; Araújo, R. L. ; Hoffmann, L. V. ; Silva, E. F. ; Barroso, P.
456 A. V. 2012. Selective fertilization in interspecific crosses of allotetraploid species
457 of *Gossypium*. *Botany* 90:159-166.
- 458 Preetha, S., Raveendren, T. S. 2008. Molecular marker technology in cotton.
459 *Biotechnology and Molecular Biology Review* 3:032–045.
- 460 Saranga, Y., Menz, M., Jiang, C., Wright, R. J., Yakir, D., Paterson, A. H. 2001.
461 Genomic dissection of genotype × environment interactions conferring adaptation
462 of cotton to arid conditions. *Genome Research* 11: 1988-1995.
- 463 Sebbenn, A. M., Siqueira, A. C. M. F., Gurgel Garrido, L. M. A. 2000. Interação
464 progênes x locais e variabilidade genética em jequitibá-rosa - *Cariniana legalis*
465 (Mart.) O. Ktze. *Revista do Instituto Floricultura* 12: 13-23.
- 466 Silva, E. F., Martins, L. S. S., Oliveira, V. R. 2009. Diversity and genetic structure in
467 cajá tree (*Spondias mombin* L.) populations in Northeastern Brazil. *Revista*
468 *Brasileira de Fruticultura* 31:171-181.
- 469 Slatkin, M. 1995. A measure of population subdivision based on microsatellite allele
470 frequencies. *Genetics* 139:457-62.
- 471 Stephens, S. G. 1973. Geographical distribution of cultivated cottons relative to
472 probable centers of domestication in the new world. In: ADRIAN M. *Genes,*
473 *enzymes and populations*. Plenum press, New York.
- 474 Van Esbroeck, G. A., Bowman, D. T. 1998. Cotton germplasm diversity and its
475 importance to cultivar development. *Journal of Cotton Science* 2: 121-129.
- 476 Vidal, M. S., Coutinho, T. C. Hoffmann, L. V. 2003. Comparação entre protocolos de
477 extração de DNA de algodão para emprego em ensaios com marcadores
478 moleculares, Embrapa Algodão (Circular técnica, 74).
- 479 Viegas, M. P. 2009. Diversidade genética em populações de *Myracrodruon urundeuva*
480 Fr. All., sob diferentes tipos de perturbação antrópica. UNESP.

- 481 Wang, B., Chee, P. W., Liu, L., et al. 2010. Exploiting agriculturally valuable alleles
482 from *Gossypium mustelinum* to improve fiber quality in upland cotton., *Beltwide*
483 *Cotton Conferences*. New Orleans, Louisiana.
- 484 Weir, B. S., Cockerham, C. C. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of
485 population structure. *Evolution* 38: 1358–1370.
- 486 Wendel, J. F., E Cronn, R. C. 2003. Polyploidy and the evolutionary dispersed repetitive
487 DNA has spread to new genomes since polyhistory of cotton. *Advanced*
488 *Agronomy* 78: 139–186.
- 489 Xiao, J., Wu, K., Fang, D. D., Stelly, D. M., Yu, J., Cantrell, R. G. 2009. New SSR
490 markers for use in cotton (*Gossypium* spp.) improvement. *The Journal of Cotton*
491 *Science* 13:75–157.
- 492

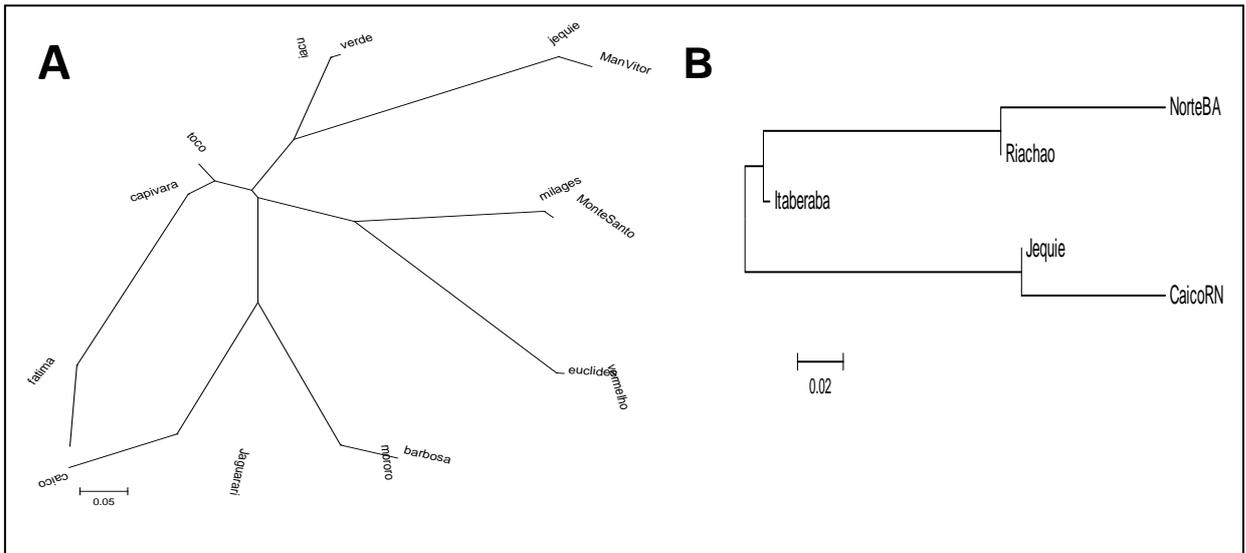
493 Figuras
494



495

496 **Figura 1.** Mapa do Brasil, em destaque os Estados do Rio Grande do Norte e da Bahia
497 onde ocorrem as populações de *Gossypium mustelinum* Miers ex Watt foram coletadas.

498



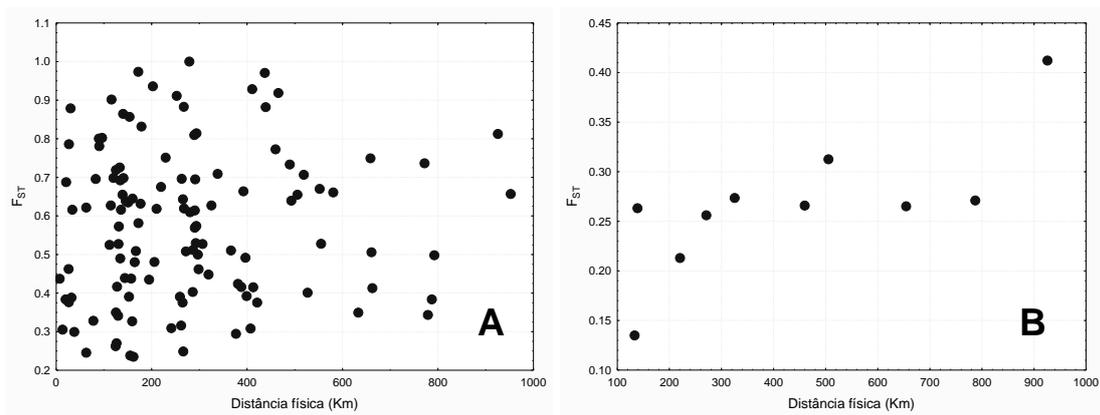
499

500 **Figura 2.** Árvores filogenéticas construídas pelo agrupamento *Neighbor Joining* a partir

501 entre populações (A) e regiões (B).

502

503



504

505 **Figura 3.** Diagrama de dispersão da distância (F_{ST}) e distância geográfica (Km)

506 considerando-se pares de populações (A) e os pares de regiões(B).

507

508 **Tabelas**

509

510 **Tabela 1.** Relação das populações de *Gossypium mustelinum* Miers ex Watt, número de
 511 indivíduos (n) e descrição dos locais de coleta e Latitude e Longitude média de cada
 512 população.

Nº/nome da população	(n)	Município	Local/Estado	Região	Latitude/Longitude
05-Euclides	5	Euclides da cunha	Próximo a uma lagoa/BA	NorteBA	S10 14' 13,30" / W39 05' 12,30"
11-Itaberaba	7	Itaberaba	Mata ciliar depredada/BA	Itaberaba	S12 26' 40,00" / W40 19' 44,59"
03-Mororó	7	Macururé	São Francisco/BA	NorteBA	S09 26' 44,90" / W38 54' 13,50"
16-Manoel Vitorino	9	Manoel Vitorino	Fazenda São Gabriel/BA	Jequié	S14 06' 32,79" / W40 18' 00,20"
01-Caicó	10	Caicó	Serra da Formiga/RN	CaicóRN	S06 20' 31,32" / W36 54' 48,48"
13-Iaçu	16	Iaçu	Rio da Lapa/BA	Itaberaba	S12 49' 13,90" / W40 04' 35,70"
06-Monte Santo	17	Monte Santo	Contendas/BA	NorteBA	S10 27' 39,90" / W39 10' 42,79"
15-Jequié	19	jequié	Fazenda Graciosa/BA	Jequié	S14 00' 06,00" / W40 19' 11,00"
14-Milagres	20	Milagres	Zona Rural/BA	Itaberaba	S12 55' 57,70" / W39 45' 01,00"
09-Vermelho	20	Candeal Riachão do	Riacho Vermelho/BA	Riachão	S11 51' 05,69" / W39 11' 14,20"
07-Fátima	30	Jacuípe Riachão do	BR234/BA	Riachão	S11 44' 46,09" / W39 28' 53,20"
08-Verde	33	Jacuípe	Foz do Rio Verde/BA	Riachão	S11 49' 08,30" / W39 22' 28,20"
02-Barbosa	55	Macururé	Lagoa dos Algodões/BA	NorteBA	S09 15' 55,92" / W38 45' 00,90"
04-Jaguarari	62	Jaguarari Riachão do	Pilar/BA	NorteBA	S09 52' 27,60" / W39 49' 38,79"
10-Tocó	116	Jacuípe	Rio Tocó/BA	Riachão	S11 53' 50,05" / W39 16' 48,70"
12-Capivara	138	Itaberaba	BR242/BA	Itaberaba	S12 30' 52,00" / W40 19' 45,40"

513

514

515 **Tabela 2.** Frequência dos alelos exclusivos, alelos raros ($p \leq 0,05$) e alelos de baixa
 516 frequência ($0,05 > p < 0,25$) encontrados para os diferentes locos analisados *G.*
 517 *mustelinum* na análise por população e por região.

Loco	Alelo (pb)	Frequência	População	Loco	Alelo (pb)	Frequência	Região
BNL1421	198	0,500	Vermelho	BNL1421	198	0,058	Riachão
BNL1421	206	0,012	Capivara	BNL1421	206	0,009	Itaberaba
BNL1421	210	0,029	Jequié	BNL1421	210	0,007	Jequié
BNL1421	248	1,000	Euclides	BNL1421	248	0,046	NorteBA
BNL1421	250	0,010	Tocó	BNL1421	250	0,006	Riachão
BNL1434	230	1,000	ManVitor	BNL1434	244	0,037	Itaberaba
BNL1434	246	0,116	Barbosa	BNL1434	248	0,006	Itaberaba
BNL1434	248	0,008	Capivara	BNL1434	250	0,009	Itaberaba
BNL1434	250	0,012	Capivara	BNL1434	266	0,027	Itaberaba
BNL1434	266	0,036	Capivara	BNL1551	162	0,006	Jequié
BNL1551	170	0,050	Vermelho	BNL1551	166	0,013	NorteBA
BNL1551	174	0,017	Capivara	BNL1551	170	0,005	Riachão
BNL1551	196	0,125	Verde	BNL1551	174	0,013	Itaberaba
BNL1551	198	0,036	Verde	BNL1551	176	0,348	Itaberaba
BNL256	208	1,000	Jaguarari	BNL1551	196	0,019	Riachão
BNL3103	168	0,031	Tocó	BNL1551	198	0,005	Riachão
BNL3103	204	0,015	Capivara	BNL2496	131	0,012	Jequié
BNL3103	206	0,038	Capivara	BNL2496	134	0,006	Jequié
BNL3103	208	0,008	Capivara	BNL256	208	0,746	NorteBA
CIR148	136	0,008	Capivara	BNL3103	168	0,014	Riachão
CIR148	150	0,200	Caicó	BNL3103	204	0,012	Itaberaba
CIR212	132	0,007	Capivara	BNL3103	206	0,030	Itaberaba
CIR212	134	0,031	Tocó	BNL3103	208	0,006	Itaberaba
CIR212	136	0,007	Capivara	BNL840	148	0,486	Jequié
CIR212	140	0,007	Capivara	CIR148	136	0,006	Itaberaba
CIR212	146	0,714	Milagres	CIR148	138	0,011	Riachão
CIR212	156	0,027	Capivara	CIR148	150	0,200	Caicó
CIR212	158	0,010	Tocó	CIR203	256	0,109	Riachão
CIR212	160	1,000	Itaberaba	CIR212	132	0,004	Itaberaba
CIR212	170	0,016	Tocó	CIR212	134	0,017	Riachão
CIR246	160	0,037	Capivara	CIR212	136	0,004	Itaberaba
CIR246	170	0,009	Capivara	CIR212	140	0,004	Itaberaba
CIR246	172	0,023	Capivara	CIR212	146	0,091	Itaberaba
CIR246	174	0,009	Capivara	CIR212	156	0,018	Itaberaba
CIR249	190	0,062	Iaçu	CIR212	158	0,006	Riachão
CIR311	166	0,020	Barbosa	CIR212	170	0,009	Riachão
CIR311	188	0,019	Capivara	CIR246	170	0,007	Itaberaba
CIR311	190	0,006	Tocó	CIR246	172	0,017	Itaberaba
-	-	-	-	CIR246	174	0,007	Itaberaba
-	-	-	-	CIR249	186	0,052	Jequié
-	-	-	-	CIR311	166	0,005	NorteBA
-	-	-	-	CIR311	184	0,091	Itaberaba
-	-	-	-	CIR311	188	0,014	Itaberaba
-	-	-	-	CIR311	190	0,003	Riachão

518

519

520 **Tabela 3.** Estimativas obtidas para heterozigidade observada (H_o), heterozigidade
 521 esperada (He) e índice de fixação (f), nas análises *Gossypium mustelinum* por
 522 população e região.

População	H_o	He	f
Tocó	0,049	0,522	0,906
Capivara	0,070	0,596	0,882
Itaberaba	0,000	0,000	1,000
Fátima	0,049	0,298	0,839
Iaçu	0,051	0,416	0,882
Verde	0,057	0,268	0,791
Jequié	0,009	0,025	0,650
Manoel Vitorino	0,015	0,129	0,890
Milagre	0,020	0,319	0,938
Monte Santo	0,005	0,090	0,948
Euclides	0,000	0,000	1,000
Vermelho	0,008	0,124	0,939
Barbosa	0,034	0,270	0,874
Mororó	0,000	0,140	1,000
Jaguarari	0,057	0,175	0,677
Caicó	0,033	0,284	0,888
Médias	0,029	0,229	0,876 IC(0,82-0,92)
Região	H_o	He	f
NorteBA	0,040	0,450	0,912
Riachão	0,045	0,566	0,921
Itaberaba	0,052	0,591	0,912
Jequié	0,016	0,477	0,966
Caicó	0,033	0,284	0,888
Médias	0,037	0,474	0,922 IC(0,89-0,95)

523 **Tabela 4.** Distância genética entre *Gossypium mustelinum* das 16 populações, aos pares, estimada a partir o F_{ST} .

Populações	Tocó	Capivara	Itaberaba	Fátima	Iaçu	Verde	Jequié	ManVitor	Milagre	MtSanto	Euclides	Vermelho	Barbosa	Mororó	Jaguarari	Caicó
Tocó		0,235	0,437	0,299	0,238	0,388	0,530	0,448	0,327	0,416	0,390	0,462	0,375	0,309	0,481	0,349
Capivara	-		0,437	0,350	0,245	0,341	0,480	0,435	0,32872	0,390	0,403	0,439	0,392	0,294	0,500	0,343
Itaberaba	-	-		0,698	0,622	0,719	0,973	0,936	0,696	0,911	1,000	0,865	0,664	0,510	0,810	0,736
Fátima	-	-	-		0,270	0,305	0,643	0,574	0,490	0,638	0,581	0,616	0,512	0,316	0,618	0,506
Iaçu	-	-	-	-		0,262	0,655	0,509	0,383	0,508	0,462	0,573	0,415	0,415	0,627	0,383
Verde	-	-	-	-	-		0,696	0,614	0,527	0,635	0,632	0,687	0,569	0,248	0,675	0,413
Jequié	-	-	-	-	-	-		0,879	0,725	0,928	0,970	0,883	0,670	0,401	0,772	0,812
ManVitor	-	-	-	-	-	-	-		0,645	0,882	0,918	0,814	0,661	0,528	0,733	0,657
Milagre	-	-	-	-	-	-	-	-		0,610	0,527	0,692	0,375	0,491	0,709	0,498
MtSanto	-	-	-	-	-	-	-	-	-		0,786	0,857	0,698	0,902	0,802	0,707
Euclides	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		0,832	0,627	0,800	0,781	0,639
Vermelho	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		0,695	0,619	0,751	0,749
Barbosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		0,376	0,616	0,424
Mororó	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		0,525	0,308
Jaguarari	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		0,655
Caicó	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

Tabela 5. Distância genética entre *Gossypium mustelinum* das cinco regiões, aos pares, estimada a partir o F_{ST} .

Regiões	NorteBA	Riachão	Itaberaba	Jequiá	Caicó
NorteBA		0,213	0,273	0,266	0,313
Riachão	-	-	0,135	0,256	0,265
Itaberaba	-	-		0,263	0,271
Jequié	-	-	-		0,412
Caicó	-	-	-	-	

CONCLUSÕES GERAIS

- Há elevada variabilidade genética entre as populações de *Gossypium mustelinum*;
- A preservação adequada da variabilidade da espécie *G. mustelinum* deve envolver mais de uma região;
- Estudos de caracterização e cruzamentos são essenciais para a utilização desses recursos em programas de pré-melhoramento com essa espécie nativa.

Anexos

NORMAS DA REVISTA *Scientia Agricola*

PREPARAÇÃO DO MANUSCRITO

- Texto e ilustrações dos originais submetidos à apreciação pelo corpo editorial devem ser escritos em língua inglesa, segundo as regras de ortografia e gramática norte-americana.
- Manuscritos deverão ser organizados em MS Word para Windows ou software compatível, fonte Times New Roman 12, margens 3,0 cm, espaçamento duplo.
- O manuscrito deve ter um máximo de 30 páginas (papel A4); linhas e páginas devem ser numeradas sequencialmente, ilustrações e tabelas inclusive.
- Tabelas e Figuras devem ser incluídas como parte do seu arquivo. Para fins de revisão os arquivos TIFF (300 DPI), devem ser inseridos no documento de processamento de texto, porém, deverão também ser apresentados em arquivos separados (uma figura sem legenda por arquivo enviado como arquivo suplementar). Isto é solicitado porque arquivos TIFF podem perder resolução após a inserção.

Página de rosto:

- O manuscrito deve ter uma página de rosto com o título (máximo de 15 palavras), nomes dos autores e afiliações completas.
- Deverá ser fornecido um título abreviado de 40 caracteres ou menos (além do título do trabalho completo).
- Os autores devem selecionar uma categoria: Engenharia Agrícola; Microbiologia Agrícola; Agrometeorologia; Ciência Animal e Pastagens; Biometria, Modelagem e Estatística; Fitotecnia; Ecologia; Entomologia; Ciência e Tecnologia de Alimentos; Ciências Florestais; Genética e Melhoramento de Plantas; Fitopatologia; Fisiologia Vegetal e Bioquímica; Solos e Nutrição de Plantas; Zoologia.
- O autor correspondente deve ser identificado(a) por um asterisco e um endereço eletrônico institucional do autor(a) correspondente deve ser informado.
- A afiliação/endereço funcional dos autores(as) deve ser informado da maneira mais detalhada possível.
- O autor correspondente deverá assumir a responsabilidade plena e igualitária para o manuscrito, incluindo o cumprimento das políticas do periódico, e será o contato prioritário com a revista.
- Por favor, forneça afiliação institucional de cada autor no momento que a pesquisa foi realizada.
- Se um autor se mudou para uma instituição diferente, o novo local pode ser indicado em nota de rodapé. Números sobrescritos separados por vírgulas (sem espaços) são utilizados para filiações dos autores. Símbolos sobrescritos separados por vírgulas (sem espaços) são utilizados para notas de rodapé do autor. Use na ordem §, ¶, §§, ¶¶.

Submissão para a capa:

Para cada um de seus fascículos, a Scientia Agricola poderá utilizar uma imagem representativa de um artigo publicado no volume. Os autores são convidados a submeter imagens para a capa que tenham apelo visual e que sejam cientificamente interessantes. As imagens devem ter alta resolução (300dpi) e medir 17x17cm. As imagens para a capa podem ser de organismos, habitat, montagens de diferentes imagens, diagramas, mapas ou dados. As ilustrações não precisam estar nos artigos, devem sim ser representativas do trabalho publicado. As imagens devem ser originais e os autores cedem os direitos de publicação exclusivamente a Scientia Agricola. Carregue o arquivo contendo a imagem como um arquivo suplementar junto com um arquivo texto que deverá conter uma breve descrição de um parágrafo da imagem relacionando-a com o manuscrito publicado. Se o autor não tiver os direitos autorais da imagem submetida, ele é responsável por obter a permissão necessária para poder utilizá-la.

Organize os manuscritos seguindo a ordem: página de rosto, resumo (máximo 250 palavras) Introdução (20-30 linhas), Material e Métodos, Resultados, Discussão, Agradecimentos (opcional), Referências, Tabelas e Figuras.

O item Conclusão é opcional e, quando utilizado deverá vir após a seção de discussão. O item Resultados e Discussão podem ser combinados e, a conclusão pode ser incorporada à discussão.

Tabelas e Figuras

Tabelas:

- **Cada tabela** deve iniciar em uma **nova página**.
- Devem ser numeradas sequencialmente com algarismos arábicos, e geradas com a ferramenta "Tabela" do MS Word ou MS Excel (manuscritos contendo tabelas coladas como figuras serão devolvidos aos autores).
- Os títulos devem aparecer imediatamente acima do corpo das tabelas.
- Numere figuras e gráficos sequencialmente usando algarismos arábicos.

Figuras/Gráficos:

- **Cada Figura/Gráfico** deve iniciar em uma **nova página**.
- As legendas das figuras devem aparecer abaixo de cada figura.
- Gráficos devem ser gerados em MS Excel.
- Fotografias devem ser apresentadas como arquivo "tagged image format [TIFF]", 300 DPI.
- Numere figuras e gráficos sequencialmente segundo a ordem em que aparecem no texto.
- As figuras devem fornecer informações suficientes para que o leitor possa compreendê-las sem uma contribuição significativa do texto.

- Para as figuras que contêm mais de um painel, designar os painéis com letras maiúsculas (sem parênteses e sem pontos após as letras) no canto superior esquerdo de cada painel, se possível.
- As palavras utilizadas nas figuras devem ser iguais as utilizadas no manuscrito no que diz respeito a capitalização, itálico e símbolos.

INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

- Manuscritos envolvendo avaliação da bioatividade de produtos químicos e/ou biológicos, incluindo reguladores do crescimento, em insetos, ácaros, fungos, bactérias, nematóides e plantas daninhas, não serão objeto de análise para publicação na *Scientia Agricola*.
- Manuscritos que reportarem a avaliação de melhorias ou protocolos de cultura de tecidos baseados no teste de aditivos, explantes ou condições de crescimento, ou ainda que falhem em mostrar uma melhoria substancial que não poderia ser deduzida da literatura existente, não serão considerados para publicação na *Scientia Agricola*.
- Os manuscritos devem obedecer aos critérios estabelecidos nos Códigos Internacionais de cada área.
- Os conceitos e opiniões contidos nos artigos são de exclusiva responsabilidade dos(as) autores(as).

Referências Bibliográficas

As referências e citações para artigos da *Scientia Agricola* serão organizadas utilizando o estilo de formato mínimo 'autor, ano' ou 'nome (ano)'. Checar se todas as citações no texto constam da lista de referências bibliográficas. Os exemplos:

1. Apenas um autor: Reichardt (2000) ou (Reichardt, 2000).
2. Dois autores: Fiorio and Demattê (2009) ou (Fiorio and Demattê, 2009).
3. Três ou mais autores: Rosso et al. (2009) ou (Rosso et al., 2009).
4. Organizar as referências em ordem alfabética e cronologicamente dentro de parênteses, e use (;) ponto e vírgula para separar citações múltiplas dentro de parênteses, por exemplo: (Boleli, 2003; Boerjan, 2006; Muraroli and Mendes, 2003).
5. Identificar múltiplas citações 'mesmo autor, mesma data' com a ajuda de letras minúsculas, por exemplo: (Cyrino, 2004a, b).
6. Usar o estilo "autor-ano" para ordenar a lista de referências, e: (i) abreviar os primeiros e segundos nomes dos autores, mas nenhuma outra palavra; (ii) usar letras maiúsculas para todos os acrônimos, isto é, quando o autor for uma organização; (iii) utilizar letras maiúsculas para a 1ª letra do sobrenome e demais iniciais dos autores, que deverão ser separados por um ponto (.); (iv) separar autores por ponto-e-vírgula; (v) não usar "e comercial" (&) nas citações, nem na lista de referência; (vi) não usar caracteres grifados ou negritados para destacar qualquer parte da referência; (vii) usar letras maiúsculas na 1ª letra dos títulos de livros e de

periódicos; (viii) não usar vírgula (,) para separar o título do periódico e o volume; (ix) separar os números de volume do periódico das páginas por dois pontos (:); (x) usar os números completos das páginas; (xi) separar os números de página por um traço (-); (xii) separar os grupos de páginas por uma vírgula se o artigo foi publicado em páginas descontinuas; (xiii) discriminar o número da edição de um livro ou manual como "2ed", por exemplo; (xiv) sobre livros e manuais, nomear os editores ou a editora antes de discriminar a localidade sede dos editores ou da editora; (xv) separar os editores ou a editora da localidade por meio de uma vírgula (,); e (xvi) nestes casos, declarar os nomes da cidade, do estado e do país.

6.1 Revistas/Periódicos Científicos

Guillard, R.R.L.; Wangersky, P. 1958. The production of extracellular carbohydrates by some marine flagellates. *Limnology and Oceanography* 3: 449-454.

6.2 Livros

6.2.1 Livros com autores

Pais, I.; Jones Jr., J.R. 1998. *The Handbook of Trace Elements*. St. Lucie Press, Boca Raton, FL, USA.

6.2.2 Livros com editores/organizadores

Day, W.; Atkin, R.K., eds. 1985. *Wheat Growth and Modelling*. Plenum Press, New York, NY, USA.

6.2.3 Livros (e manuais) com organização/instituição como autor ou editora/organizadora

Association of Official Analytical Chemists - International [AOAC]. 2005. *Official Methods of Analysis*. 18ed. AOAC, Gaithersburg, MD, USA.

6.3 Capítulo de Livro

Sharpley, A.N.; Rekolainen, S. 1997. Phosphorus in agriculture and its environmental implications. p. 1-53. *In*: Tunney, H.; Carton, O.T.; Brookes, P.C.; Johnston, A.E., eds. *Phosphorus loss from soil to water*. CAB International, New York, NY, USA.

6.4 Fontes eletrônicas

6.4.1 Elementos necessários para listar citações de sites da rede mundial de computadores:

A autoria, autor ou fonte. Ano. O título do documento da web ou página da web (isto é, título principal da página). [meio] (data de atualização). Disponível em: endereço completo para localizar o recurso (URL / endereço) [Accessed Sep. 19, 1992]

6.4.2 Elementos necessários para listar publicações disponíveis na rede mundial de computadores:

A autoria, autor ou fonte. Ano. O título do documento ou página da web. [meio] Produtor/Editor. Disponível em: endereço completo para localizar o recurso [Accessed Sep. 19, 1992]

6.5 Listagem de referências não escritas em inglês

A *Scientia Agricola* não incentiva os autores a usarem referências que não podem ser facilmente acessadas e compreensíveis por leitores do exterior. No entanto, se essas referências forem essenciais para interpretação dos resultados, relatados no texto, forneça o título em inglês, informando adicionalmente a linguagem do artigo original no final da referência, como exemplificado a seguir:

Baretta, D.; Santos, J.C.P.; Figueiredo, S.R.; Klauberg-Filho, O. 2005. Effects of native pasture burning and Pinus monoculture on changes in soil biological attributes on the Southern Plateau - Brazil of Santa Catarina Revista Brasileira de Ciência do Solo 29: 715-724 (in Portuguese, with abstract in English).