



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR E GENÉTICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR**

**CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA E *in situ* DE *Gossypium
barbadense* NA REGIÃO NORTE DO BRASIL**

VANESSA CAVALCANTE DE ALMEIDA

**NATAL-RN
2007**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR E GENÉTICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR**

**CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA E *in situ* DE *Gossypium
barbadense* NA REGIÃO NORTE DO BRASIL**

VANESSA CAVALCANTE DE ALMEIDA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular do Centro de Bociências da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Orientador. Prof. Dr. Paulo Augusto Vianna Barroso

**NATAL-RN
2007**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL DA UFCG

A447c Almeida, Vanessa Cavalcante de
2007 Caracterização genética e *in situ* de *Gossypium barbadense* na região norte do Brasil / Vanessa Cavalcante de Almeida. — Natal, 2007.
67 f. : il.

Referências.

Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Centro de Biociências.

Orientador: Paulo Augusto Vianna Barroso.

1— *G. barbadense* 2— Conservação genética 3— Marcadores SSR I—
Título

CDU 633.511

Aos meus pais, Maria das Graças e Severino (in memoriam), cujos exemplos de fé, perseverança e coragem são meus guias.

Aos meus irmãos, Fabiano e Larissa, pela amizade, carinho, incentivo e compreensão.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

- À Deus, pelo maravilhoso dom da vida.
- À Paulo Augusto Vianna Barroso, pela amizade, generosidade, ensinamentos e valiosa orientação, durante todas as fases deste trabalho.
- À Embrapa Algodão pelas facilidades concedidas e pelo apoio prestado à carreira científica.
- Aos docentes do curso de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRN, pelos ensinamentos.
- Aos colegas do curso: Valeska, Cíntia, Leonardo, Rodrigo, Tiago, Viviane, Cristiane, Giva, Jales, Lorena, Lourena, Ingrid, Matheus.
- Aos colegas de laboratório: Milena, Carol, Ivan, Guilherme, Jair;
- Aos funcionários da Embrapa Algodão, em especial, Fábiana, Francisco Alves, Zé Carlos, Zé Menezes, Jânio, Diva, e todos aqueles aqui não citados, porém guardados com gratidão na minha lembrança, pela ajuda e agradável convivência.
- À Dr. Raul Porfírio, pelas valiosas colaborações no desenvolvimento e apresentação deste trabalho.
- À Jane pela colaboração na tabulação dos dados.
- À Iane, amiga de todas as horas.
- À minha mãe Maria das Graças, por todo o seu empenho, apoio e incentivo durante todos os momentos da minha vida.
- À minha avó Leopoldina, pela criação e dedicação.

A todas as pessoas que não foram citadas, pois são muitas, mas que fizeram parte da minha vida e história, parte do meu presente e que, de alguma forma, contribuíram para meu futuro.

A todos, o meu sincero agradecimento!

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Municípios e localização das áreas de coleta de <i>G. barbadense</i> no estado do Pará.....	24
Figura 2. Número de plantas amostradas segundo o município no estado do Pará.....	25
Figura 3: Municípios e localização das áreas de coleta de <i>G. barbadense</i> no estado do Amapá.....	25
Figura 4. Número de plantas amostradas segundo o município no estado do Amapá.....	26
Figura 5. Número de plantas amostradas segundo o estado.....	26
Figura 6. Percentagem de plantas segundo o tipo de propriedade.....	27
Figura 7. Percentual de plantas coletadas segundo a espécie.....	28
Figura 8. Percentual de plantas segundo o tipo de população.....	29
Figura 9. Flores de <i>Gossypium</i> com e sem mancha nas pétalas	30
Figura 10. Percentual de plantas coletadas segundo a presença de mancha na flor.....	30
Figura 11. Plantas amostradas segundo a presença e o tipo de semente.....	31
Figura 12. Plantas amostradas segundo a presença e o tipo de línter.....	32
Figura 13. Plantas amostradas segundo a cor da folha nos estados do Amapá (A) e do Pará (B).....	32
Figura 14. Plantas amostradas segundo o armazenamento das sementes nos estados do Amapá (A) e do Pará (B).....	33
Figura 15: Plantas amostradas segundo o beneficiamento nos estados do Amapá (A) e do Pará (B).....	34
Figura 16: Plantas amostradas segundo a altura em metros.....	34
Figura 17: Plantas amostradas segundo a idade.....	35
Figura 18: Géis de poliacrilamida mostrando locos microssatélites em <i>G. barbadense</i> . A) BNL3103; B) CIR148.....	50
Figura 19: Padrão de divergência genética entre os municípios do Pará e	

Amapá, baseado no agrupamento de UPGMA utilizando as distâncias genéticas de Nei (1978).....	56
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Genótipos amostrados no estado do Pará.....	43
Tabela 2: Genótipos amostrados no estado do Amapá.....	44
Tabela 3: Descrição de Pares de Primers usado para Amplificar Marcadores em Algodão.....	49
Tabela 4: Número de alelos por loco, segundo as populações de <i>G. barbadense</i>	51
Tabela 5: Alelos exclusivos segundo o loco e a população de <i>G. barbadense</i>	52
Tabela 6: Resumo das análises das populações com marcadores SSR. Em que: (H_o) heterozigidade obseada e (F_{IS}) coeficiente de endogamia intrapopulacional.....	53
Tabela 7: Diversidade Total (H_T), divergência genética dentro dos estados (H_s), Diversidade entre estados (D_{st}), proporção da diversidade total que esta entre os estados (G_{st}) e coeficiente de endogamia intrapopulacional (G_{IS}) em análises considerando todos os estados e para cada um dos estados separadamente.....	55
Tabela 8: Média da diversidade genética dentro de cada município amostrado, segundo o estado.....	55

SUMÁRIO

Lista de Figuras.....	i
Lista de Tabelas.....	ii
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	04
2.1– O gênero <i>Gossypium</i>	04
2.1.1 – A espécie <i>Gossypium barbadense</i>	05
2.2 – Conservação genética de populações naturais.....	06
2.2.1 – Conservação genética <i>in situ</i>	07
2.2.2 – Conservação genética <i>ex situ</i>	07
2.3 – Marcadores moleculares no estudo de plantas.....	09
2.3.1 – Marcadores SSR.....	11
2.4 – Diversidade genética em populações de plantas.....	12
3. OBJETIVOS.....	16
3.1 - Objetivo Geral.....	16
3.2 - Objetivos específicos.....	16
4. CARACTERIZAÇÃO <i>IN SITU</i> DO GÊNERO <i>Gossypium</i> NO ESTADO DO PARÁ E AMAPÁ.....	17
RESUMO.....	18
ABSTRACT.....	18
4.1 – INTRODUÇÃO.....	20
4.2 - MATERIAL E MÉTODOS.....	22
4.2.1 – Caracterização das expedições.....	22
4.3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	24
4.3.1 – Dados Geográficos.....	24
4.3.2 – Dados da população.....	27
4.3.3 – Dados culturais.....	33
4.3.4 – Dados fenológicos.....	34
4.4 – CONCLUSÕES.....	37
5. CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE <i>G. barbadense</i> NOS ESTADOS DO PARÁ E AMAPÁ ATRAVÉS DE MARCADORES SSR.....	38
RESUMO.....	39

ABSTRACT.....	39
5.1 – INTRODUÇÃO.....	41
5.2 - MATERIAL E MÉTODOS.....	42
5.2.1 - Material vegetal.....	42
5.2.2 – Extração do DNA genômico.....	42
5.2.3 – Quantificação do DNA.....	45
5.2.4 – Condições de Amplificação.....	46
5.2.5 – Detecção dos Marcadores SSR.....	47
5.2.6 – Seleção de Primers.....	47
5.2.7 – Análise estatística dos dados.....	47
5.3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	49
5.3.1 – Seleção de primers.....	49
5.3.2 – Caracterização dos locos microssatélites.....	49
5.3.3 – Diversidade genética.....	50
5.3.4 – Estrutura da população.....	54
5.4 – CONCLUSÕES.....	58
6 – REFÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59
7 – ANEXO.....	67

A large group of white egrets perched on tree branches against a blue sky. The birds are mostly white with some darker feathers on their heads and necks. They are perched on thin, brown branches. The background is a clear blue sky. The overall scene is a natural, outdoor setting.

Introdução

Três espécies do gênero *Gossypium* ocorrem no Brasil, todas alotetraplóides, perenes e sexualmente compatíveis: *G. hirsutum*, *G. mustelinum* e *G. barbadense* (Freire et al., 2002). A espécie mais difundida é *G. hirsutum*, com a existência de duas variedades botânicas: a variedade *latifolium* ou algodoeiro herbáceo responsável pela quase totalidade da produção comercial de fibra de algodão no Brasil, e a variedade *marie galante* ou algodoeiro Mocó, encontrado principalmente no semi-árido nordestino, na forma de variedades cultivadas, populações ferais e de fundo de quintal. A espécie *G. mustelinum* é a mais restrita das três espécies, ocorrendo apenas no semi-árido nordestino. Já a espécie *G. barbadense* é amplamente distribuída, sendo encontrada em quase todo território nacional. Embora não seja nativa do país, o Brasil é considerado um importante centro de diversidade da espécie.

Duas variedades botânicas de *G. barbadense* são encontradas no Brasil, ambas na forma semi-domesticada, porém sem qualquer esforço contínuo de melhoramento genético. O rim-de-Boi (*G. barbadense* var. *brasiliense*) possui sementes sem línter, fortemente coladas em forma de rim, enquanto que a outra variedade é comumente conhecida como “Quebradinho” ou “Maranhão”, possuindo sementes sem línter, deslocadas, facetadas ou não. Ambas são arbóreas e de ciclo perene e muito similar geneticamente (Freire, 2000).

Acredita-se que grande parte da variabilidade genética de *G. barbadense* presente no Brasil esteja sendo perdida. Os fatores responsáveis por esta redução estão associados a atividades agrícolas, alterações e hábitos culturais e problemas econômicos. Em algumas regiões em que variedades locais de *G. barbadense* eram cultivadas, a expansão da fronteira agrícola resultou em substituição de práticas agrícolas tradicionais pela chamada agricultura moderna. Isto resultou no abandono do cultivo de roças, em cujas bordaduras *G. barbadense* era plantado, por pastagens e lavouras (Barroso et al., 2005a). Parte das áreas em que ocorrem estão sendo aos poucos ocupadas pelo plantio de algodão herbáceo, principalmente nos cerrados, na região Norte do país e parte da Amazônia legal. Esta expansão do algodoeiro herbáceo pode comprometer a manutenção da variabilidade existente

principalmente devido aos efeitos do fluxo gênico, seja de variedades convencionais ou transgênicas (Freire et al., 2002).

Ainda há muito há fazer para que a variabilidade genética de algodoeiros presente no Brasil esteja adequadamente representada nos bancos de germoplasma. Embora os esforços de coleta tenham aumentado nos últimos anos, sua ampla distribuição geográfica e a grande variabilidade presente tornam a tarefa difícil e dispendiosa.

Um amplo conhecimento das características demográficas, morfológicas e genéticas da espécie é fundamental para a conservação e manejo sustentável, destacando-se a intensidade do fluxo gênico, o sistema reprodutivo e a diversidade entre e dentro das populações. Estas informações fornecem subsídios para delinear estratégias adequadas de conservação *in situ* e *ex situ*, que podem prevenir ou reduzir possíveis perdas genéticas. Com base nas informações pode-se, por exemplo, estabelecer áreas que contenham maior variabilidade, prioritárias para efeitos de coletas e preservação.

O principal objetivo deste trabalho foi caracterizar a diversidade genética de populações de *Gossypium barbadense* com vistas em definir estratégias para a conservação desses algodoeiros em dois estados da região Norte do Brasil, Pará e Amapá, utilizando Marcadores SSR.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 – O gênero *Gossypium*

O algodoeiro é uma dicotiledônea pertencente ao gênero *Gossypium*, da família Malvaceae. Todas as espécies desse gênero possuem flores completas, com sementes recobertas por fibra, das quais se prepara fio para tecidos. As sementes, que são oleaginosas, são fontes de óleo comestível e de torta para gado (JOLY, 1991).

É uma espécie que apresenta um sistema misto de reprodução, isto é, que pratica fecundação cruzada em frequência entre 5% e 95% (MORESCO, 2003), valores limites para autogamia e alogamia. No entanto essa taxa de fecundação cruzada dependerá da presença e número de polinizadores, podendo variar muito em relação aos fatores bióticos, abióticos e o manejo da cultura.

O gênero *Gossypium* possui 50 espécies, sendo 45 diplóides ($2n = 26$) e cinco alotetraplóides ($2n = 52$). Os diplóides podem ser divididos em dois grupos: diplóides originárias da África, Ásia e Oceania, e diplóides da América. As espécies da América possuem cromossomos relativamente pequenos, enquanto as demais espécies diplóides possuem cromossomos maiores. Os alotetraplóides são todos originários das Américas e foram formados pela hibridação, seguida de duplicação cromossômica, entre espécies de cromossomo pequeno e grande (Freire, 2000).

Wendel e Cronn (2003) relataram que não é de surpreender a disseminação do gênero *Gossypium* mundialmente, com vários centros primários de diversidade nos trópicos, em regiões áridas ou semi-áridas. Os grupos genômicos das espécies diplóides são comercialmente denominados A, B, C, D, E, F, G e K. As cinco espécies alotetraplóides são anfidiplóides formados a partir da duplicação de cromossomos em cruzamentos entre os genomas A e D.

Apenas quatro espécies são cultivadas, apresentando fibras com valor comercial. Duas são diplóides (*G. arboreum* L. e *G. herbaceum* L.) e duas

alotetraplóides (*G. hirsutum* L. e *G. barbadense* L). As demais espécies são silvestres (Freire, 2000).

No Brasil são encontradas três espécies, todas alotetraplóides: *G. hirsutum*, *G. barbadense* e *G. mustelinum*.

2.1.1 – A espécie *Gossypium barbadense*

Gossypium barbadense é uma planta endêmica na América do sul, cujo centro de origem é o Norte do Peru e o Sul do Equador (Brubaker et al., 1999). No Brasil, a espécie é encontrada na forma domesticada, presente em áreas indígenas e em fundos de quintais (Barroso et al., 2005a). Duas variedades estão presentes no Brasil: *G. barbadense* var. *brasiliense*, conhecida como Rim-de-boi, e *G. barbadense* var. *barbadense*, comumente denominada Quebradinho ou Maranhão (Freire, 2000). A variedade *brasiliense* foi domesticada na Amazônia, possui sementes sem línter, fortemente coladas umas às outras, conferindo um aspecto de um rim e mostra evidências de melhoramento. A outra variedade, *G. barbadense* var. *barbadense* possui sementes sem línter e descoladas. Seu centro de domesticação é o norte do Peru e o sul do Equador e deve ter sido introduzida no Brasil por populações indígenas, cujos descendentes até hoje utilizam sua fibra na confecção de têxteis artesanais, pavios para lamparinas e como planta medicinal (Barroso et al., 2005b).

Ambas as variedades são arbóreas, perenes e muito similares geneticamente, diferindo, basicamente, na característica sementes em forma de rim. Como a presença de sementes em forma de rim é determinada por um gene de efeito principal e de herança recessiva, há tendência de se considerar a existência de apenas uma variedade botânica (Brubaker et al., 1999). A variedade botânica *brasiliense* é mais apropriadamente classificada como uma forma domesticada local. Porém, enquanto uma nova classificação taxonômica não for realizada, continua-se considerando materiais com sementes agrupadas como *G. barbadense* var. *brasiliense*.

A distribuição da espécie no Brasil é ampla, sendo encontrada em quase todos os estados do país (Barroso et al., 2005b). A dispersão das duas

variedades de *G. barbadense* pelos diferentes locais ocorreu devido a práticas de agricultura (Boulanger & Pinheiro, 1972). Na atualidade, são mantidas a muitas gerações, principalmente na forma de variedades locais, cultivadas em pequenas lavouras não comerciais e em fundos de quintais (Barroso et al., 2005b).

2.2 – Conservação genética de populações naturais

Conservação é definida como o manejo pelo homem da biosfera para que possa produzir o maior benefício sustentável às atuais gerações, mantendo seu potencial de satisfazer às necessidades e aspirações das gerações futuras. Nesse sentido, a conservação é positiva e compreende a preservação, manutenção, utilização sustentável, restauração e melhoria do ambiente natural (Nass, 2001).

A conservação e o manejo da biodiversidade, mesmo em áreas protegidas, constituem-se em desafios complexos que requerem conhecimento básico sobre a distribuição e abundância de espécies, suas interações mutualísticas, sua biologia reprodutiva e a estrutura genética de suas populações (Mittermeier et al., 1992).

De acordo com Querol (1993), do ponto de vista etimológico, germoplasma é uma palavra de duas raízes: *germo*, do latim germen, que significa “princípio rudimentar de um novo ser orgânico”; e *plasma*, do grego plasma, que significa “a formação” e, em sentido geral, “a matéria não definida”. Portanto, germoplasma significa a matéria onde se encontra um princípio que pode crescer e se desenvolver, sendo definido por Allard (1960) como a soma total dos materiais hereditários de uma espécie.

Por ocasião da coleta de germoplasma faz-se necessário o registro da maior quantidade de informações disponíveis. Tais informações constituem os chamados dados de passaporte, os quais devem ser os mais completos possíveis. Cada instituição pode desenvolver seu próprio modelo de passaporte, entretanto, dados básicos como a exata localização geográfica e uma descrição pormenorizada do ambiente é imprescindível para trabalhos futuros, onde o potencial de utilização do acesso será avaliado (Nass, 2001).

Considerando que o germoplasma esteja disponível, seja por ações de coleta, de introdução ou intercâmbio, a seqüência dos trabalhos exige procedimentos no sentido da sua caracterização e avaliação. Querol (1993) definiu a caracterização como sendo a coleta de dados, sobretudo qualitativos, para descrever, e com isso diferenciar, acessos de uma mesma espécie. Em termos gerais, a caracterização pode ser morfológica, reprodutiva, agrônômica, bioquímica, citogenética e molecular; baseando-se na classificação dos acessos por seus caracteres qualitativos, enquanto que a avaliação considera os caracteres quantitativos (Vilela-Morales, 1988; Valois et al., 2001).

Basicamente, existem duas estratégias de conservação denominadas *in situ* e *ex situ*. É importante enfatizar que essas estratégias não são excludentes, devendo ser consideradas complementares (Nass, 2001).

2.2.1 – Conservação genética *in situ*

Na conservação genética *in situ*, amostras de populações de uma espécie são mantidas em seu ecossistema natural, com condições de diversidade genética que permitam o seu desenvolvimento, a preservação de suas populações e a continuidade de evolução (Kageyama et al, 2001) Essa conservação permite, em teoria, manter espécies cultivadas e silvestres sem necessidade de grandes gastos, dependendo apenas de decisões políticas das autoridades (Querol, 1993).

Essa estratégia é mais indicada para parentes silvestres das plantas cultivadas, forrageiras, fruteiras e espécies florestais. Hoyt (1992) ressaltou que somente as espécies silvestres podem ser candidatas à conservação *in situ*, uma vez que somente elas vivem em comunidades naturais.

2.2.2 – Conservação genética *ex situ*

A conservação *ex situ* de germoplasma pode ser definida como aquela em que o germoplasma é conservado fora de seu ambiente natural, por estar sofrendo pressões que podem levá-lo à extinção ou para estar mais facilmente

disponível. Na medida do possível esta conservação é feita sob condições de armazenamento que propiciem o aumento do período de sobrevivência e garantam a estabilidade genética do material conservado (Valois et al., 2001).

Basicamente existem três formas de conservação *ex situ*, que dependem de características reprodutivas do germoplasma que se quer conservar:

- a) Conservação de sementes, indicada para conservar espécies que produzem sementes ortodoxas e propagadas sexualmente;
- b) Conservação *in vitro*, para plantas de propagação vegetativa e/ou que produzem sementes recalcitrantes ou intermediárias;
- c) Conservação no campo, para espécies produtoras de sementes recalcitrantes ou intermediárias, de propagação vegetativa ou perene.

Segundo Valois et al., (2001) muitas são as vantagens da conservação *ex situ*, com destaque para as seguintes: mantém o material em um espaço pequeno sob cuidado intensivo, facilitando a aquisição pelos usuários do sistema, garante a sobrevivência de germoplasma que foi substituído, dá grande segurança ao germoplasma, independe da ação antrópica, evita erosão genética e disponibiliza a diversidade máxima do germoplasma. Além disso, o fato de reunir muitos acessos em um só local facilita a caracterização e avaliação das coleções de campo; as coleções *in vitro* mantêm material indexado e livre de patógenos dispensando a quarentena na sua entrada ou saída do país ou da região. No entanto, dependendo da forma de conservação, existem algumas desvantagens como a interrupção da evolução quando são usadas técnicas que reduzem drasticamente as atividades vitais do germoplasma por longos períodos; o risco de instabilidade genética nas coleções de sementes ortodoxas e *in vitro*; o alto custo de algumas técnicas como a regeneração no campo de coleções de sementes ortodoxas ou aquelas que requerem mão-de-obra especializada; o alto consumo de eletricidade e equipamentos sofisticados ou o uso de grandes áreas de campo de boa fertilidade por longos períodos. Outras desvantagens são a deriva genética, perda aleatória de alelos devido à amostragem ou à multiplicação de amostras muito pequenas, e a presença de pressão de seleção, pois o material geralmente é multiplicado em áreas com condições edafoclimáticas distinta do

seu local de coleta.

2.3 – Marcadores moleculares no estudo de plantas

Um marcador molecular pode ser definido como todo e qualquer fenótipo molecular oriundo de um polimorfismo específico na seqüência de DNA, conhecido ou anônimo, que pode corresponder ou não a um gene expresso (Ferreira & Grattapaglia, 1998). Eles possuem herança mendeliana simples, facilmente reconhecidas e cuja expressão é menos influenciada pelo ambiente.

Os primeiros marcadores genéticos utilizados foram características morfológicas. Os marcadores morfológicos freqüentemente são controlados por genes dominantes, não permitindo distinguir plantas heterozigotas. O número de marcadores morfológicos que se têm à disposição é geralmente baixo, o que limita a sua aplicação e dificulta a estimativa de diversos parâmetros importantes para o estudo de populações naturais (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Com o desenvolvimento dos marcadores isoenzimáticos, seguido pelo uso de técnicas de biologia molecular, ocorreu o surgimento de métodos para a detecção de polimorfismo genético diretamente no DNA; assim, o número de marcadores genéticos disponíveis aumentou significativamente (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

A introdução da técnica de eletroforese de isoenzimas no início da década de 1960, além de iniciar a era dos marcadores moleculares, ampliou em pelo menos uma ordem de magnitude o número de marcadores que poderiam ser utilizados e a aplicabilidade da técnica passou a incluir potencialmente todas as espécies de plantas. A literatura sobre estudos de isoenzimas em plantas é muito extensa, o que mostra sua utilidade em diversas investigações, como: caracterização da variabilidade genética de populações naturais e de espécies cultivadas, estudos de evolução e dispersão de espécies e análises filogenéticas (Caixeta et al., 2006). O nível de polimorfismo dos marcadores isoenzimáticos é baixo para várias espécies, devido a isso, estes foram gradualmente substituídos pelos marcadores de DNA.

O desenvolvimento de marcadores moleculares veio dar um impulso maior à pesquisa genética, propiciando a detecção de polimorfismo de DNA com comportamento Mendeliano, passível de ser utilizado em diferentes áreas da genética e do melhoramento de plantas (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

O primeiro marcador molecular, denominado RFLP (Restriction Fragment Length Polimorphism) surgiu na década de 70, e baseia-se na ação de enzimas de restrição, as quais reconhecem uma seqüência de DNA, e clivam a molécula nestes sítios específicos (Grodzicker et al., 1974). As variações detectadas por esta técnica, decorrem da criação ou eliminação de sítios de restrição, mutações, deleções, inserções, inversões ou translocações ocorridas nas fitas de DNA. Apesar de ser um tipo de marcador muito robusto para análises genéticas e uso em programas de melhoramento, as limitações e dificuldades impostas pela técnica tem dificultado o emprego rotineiro dos marcadores RFLP em muitos laboratórios (Caixeta et al., 2006).

Na década de 80, surgiram os marcadores minissatélites ou VNTR (Variable Number of Tandem Repeats), que são regiões dispersas no genoma constituídas por um número variável de seqüências idênticas repetidas lado a lado (tandem). Essas seqüências repetitivas possuem de 15 a 100 pares de bases e são repetidas até 50 vezes em cada loco hipervariável (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

A tecnologia da reação da polimerase em cadeia (PCR – Polymerase Chain Reaction) foi desenvolvida por Mullis & Faloona (1987) em meados da década de 80 e causou uma verdadeira revolução nos estudos de biologia molecular. Esta técnica permite a síntese enzimática *in vitro* de milhões de cópias de um segmento específico de DNA na presença da enzima DNA polimerase. RAPD, AFLP e SSR são algumas das muitas técnicas baseadas em PCR.

O marcador RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), desenvolvido por Welsh & McClelland (1990) e Williams et al., (1990), destaca-se por sua simplicidade. Ele tem como base a amplificação de um segmento de DNA, delimitado por dois iniciadores (*primers*), comumente com 10 pares de bases, que são complementares a dois sítios de nucleotídeos, um em cada fita do DNA, posicionados inversamente a uma distância menor que 4Kb (Conte, 2004).

Os marcadores AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) resultam do uso combinado de enzimas de restrição e da ação da polimerase em cadeia; apresentam especificidade, resolução e poder de amostragem (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Os microssatélites ou SSR (Simple Sequence Repeats) são constituídos por seqüências curtas de DNA de até seis pares de bases repetidas várias vezes em tandem. Eles são considerados marcadores com elevado conteúdo de informação genética por loco (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Os dados oriundos dos marcadores moleculares, entre outras aplicações, podem fornecer uma estimativa de distâncias ou similaridades genéticas que quantificam o grau de diferenciação entre dois táxons (conjunto de organismos). Portanto, permitem a transformação de toda a informação genética disponível sobre as relações entre dois táxons em um único número que pode ser utilizado para proporcionar uma classificação objetiva e estável, tanto quanto possível, dos itens sob estudo (Mota, 2003).

A seguir serão apresentados mais detalhes sobre o marcador SSR, o qual foi empregado na caracterização genética das amostras do presente trabalho.

2.3.1 – Marcadores SSR

Os genomas eucariotos são densamente povoados por seqüências simples repetidas, com um a seis nucleotídeos repetidos em tandem. Essas regiões são denominadas microssatélites ou SSR (Simple Sequence Repeats).

Um microssatélite é, geralmente, flanqueado por seqüências conservadas, a partir do qual são sintetizados primers específicos para reações PCR. Quando individualmente amplificado, quase que invariavelmente apresenta extensivo polimorfismo para tamanho de bandas. A variação do tamanho dos produtos de PCR, geralmente, resulta da ocorrência de diferentes números de unidades repetidas dentro da estrutura do microssatélite (Caixeta et al., 2006; Souza, 2001).

De modo geral, observa-se que as classes de dinucleotídeos mais abundantes em plantas são AT/TA e AG/TC. Dentre os trinucleotídeos, existe

uma variação maior entre os trabalhos, sendo o TAT/ATA, na maioria deles, o mais abundante. Em algodoeiros, Lacape et al. (2006) encontrou que microssatélites com a presença da repetição GA apresentam mais alelos do que microssatélites com a repetição CA. Em trigo, Thuillet et al. (2004) encontrou que microssatélites CA tem significativamente mais alelos do que microssatélites GA.

Independentemente da origem da variação e do elemento repetitivo, cada microssatélite constitui um loco genético altamente variável, multialélico, de grande conteúdo informativo e suficientemente estáveis para serem utilizados em análises genéticas e evolução de populações naturais, além de serem codominantes, isto é, ambos os alelos de um indivíduo são visualizados no gel. Essa natureza altamente informativa, combinada com a especificidade e rapidez da tecnologia do PCR, faz desses marcadores uma eficiente ferramenta para estudos de genes eucariotos (Caixeta et al., 2006).

Um dos grandes entraves para a utilização desses marcadores é o grande trabalho necessário para o desenvolvimento de primers específicos para os locos microssatélites de cada espécie. Porém, tem sido observado que ocorre conservação de sítios microssatélites entre espécies relacionadas. É possível, portanto, aproveitar primers denominados heterólogos, que foram desenvolvidos para uma espécie e empregá-los nas demais espécies do gênero (Ferreira & Grattapaglia, 1998). Para o caso do algodoeiro, há grande quantidade de primers já desenvolvidos (Nguyen et al., 2004; Liu et al., 2000).

2.4 – Diversidade genética em populações de plantas

A variabilidade genética manifesta-se em indivíduos dentro de populações e em populações dentro da espécie e o conhecimento do nível de variação genética e de sua distribuição entre e dentro de populações é importante para dar suporte às estratégias de domesticação, manejo e conservação das espécies (Carthew, 1993; Alves, 2002).

O conhecimento do padrão de variação genética entre e dentro de populações remete ao conceito de estrutura genética de populações, que, segundo Hamrick (1982) refere-se à distribuição heterogênea (não aleatória)

dos alelos e genótipos no espaço e no tempo resultante da ação de forças evolutivas, como variação no conjunto gênico, sistema de reprodução, mutação, migração, seleção e deriva genética. Tais fatores atuam dentro de cada espécie e população, ou ainda, determinando a forma como a variabilidade genética é distribuída entre e dentro dos níveis hierárquicos de subdivisão de uma espécie (Brown, 1978; Alves, 2002).

O estudo da variação genética em populações naturais de uma espécie envolve basicamente duas questões: quantificar os níveis de variabilidade dentro das populações e caracterizar o nível de estruturação genética entre populações (Hamrick, 1983).

As medidas de variabilidade mais utilizadas são: percentagem de locos polimórficos (P), número de alelos por loco (A), número médio de alelos observados, incluindo-se todos os locos examinados, a heterozigosidade (H) e o índice de fixação de alelos na população (F) (Robinson, 1998).

A estrutura genética entre populações a partir de dados de marcadores genéticos codominantes pode ser realizada por três metodologias básicas:

1. estatística F de Wright, a qual fornece os índices de fixação dos alelos para o total das populações, com base em medidas de probabilidade de identidade por descendência (Wright, 1965 e Nei, 1977).
2. análise de variância das freqüências gênicas, que fornece a distribuição da variabilidade genética em diversos níveis hierárquicos (Cockerham, 1969).
3. a diversidade genética de Nei, que fornece a proporção da variabilidade genética contida entre e dentro de populações e os níveis de heterozigosidade esperados para o total e média das populações (Nei, 1973, 1977, 1987).

O parâmetro utilizado para medir o grau de fixação gênica resultante da endogamia biparental são as estatísticas F (Wright, 1965). Ela foi inicialmente utilizada para descrever a endogamia sob diferentes esquemas de cruzamento e, posteriormente, estendida para quantificar a diferenciação genética de populações segundo níveis hierárquicos de endogamia (Robinson, 1998).

Assim, conforme Wright (1965):

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

onde,

F_{IT} = índice de fixação ou coeficiente de endogamia para o conjunto das populações (devido ao sistema reprodutivo e subdivisão),

F_{IS} = índice de fixação ou coeficiente de endogamia intrapopulacional (devido ao sistema reprodutivo).

F_{ST} = índice de fixação ou divergência genética entre populações (devido a subdivisão populacional).

Para análise das freqüências gênicas, assume-se que as tais populações são oriundas de uma única população ancestral e que, na ausência de forças perturbadoras, todas as populações teriam as mesmas freqüências alélicas (Dias, 1998), permitindo assim a estimativa do coeficiente de parentesco (coancestralidade) e endogamia. As análises de freqüências gênicas também fornecem os níveis de fixação médios dentro das populações (f), do conjunto das populações (F) e da divergência genética entre populações ou o coeficiente de parentesco entre dois indivíduos dentro de populações (θ_P) (Conte, 2004), parâmetros relacionado por:

$$f = (F - \theta_P) / (1 - \theta_P)$$

A estatística F e a variância de freqüências gênicas admite que todos os desvios de panmixia ocorrem devido aos efeitos da deriva genética e do sistema de reprodução (Conte, 2004).

A heterozigosidade (H) é uma medida de diversidade genética elaborada por Nei (1973) que é independente de freqüências genotípicas, adequando-se igualmente para espécies autógamas e alógamas. A estatística de Nei é mais facilmente estendida para locos multialélicos do que a estatística de Wright. Entretanto, ambos os procedimentos levam ao mesmo resultado (Robinson, 1998).

O grau de diferenciação entre subpopulações é estimado decompondo-se a heterozigosidade total (H_T), referente ao conjunto das populações, em seus componentes:

$$H_T = H_S + D_{ST}$$

Onde,

H_S = a média ponderada dos valores de H calculados para subpopulações e representa a parte atribuída a variabilidade genética dentro de populações.

D_{ST} = componente de variabilidade atribuível à diferenciação entre subpopulações e é calculado como $D_{ST} = H_T - H_S$.

A razão entre D_{ST} e H_T expressa a proporção da variabilidade total

explicada por diferenças genética entre as subdivisões da população:

$$G_{ST} = D_{ST} / H_T$$

As estatísticas de Wright e de Nei tem correspondência entre si. Considerando, por exemplo, três níveis de subdivisão hierárquica, como colônias (C), dentro de subpopulações (S) e subpopulações dentro da população total (T), tem-se:

segundo Nei:
$$\frac{H_{CT} + H_{CS} + D_{ST}}{H_T} = 1$$

segundo Wright:
$$(1 - F_{IT}) = (1 - F_{IC})(1 - F_{CS})(1 - F_{ST})$$

em que os seguintes termos são equivalentes:

$$H_C/H_T = (1 - F_{CT}) \quad D_{CS}/H_T = (F_{CT} - F_{ST}) \quad D_{ST}/H_T = F_{ST}$$

chegando-se, assim, a seguinte igualdade de importância prática:

$$G_{ST} = F_{ST}$$

Quando se usa a estatística de Nei, o interesse se concentra especificamente nas populações examinadas. Ao usar a estatística de Wright, visa-se fazer inferências sobre a distribuição teórica da variabilidade genética (Robinson, 1998).

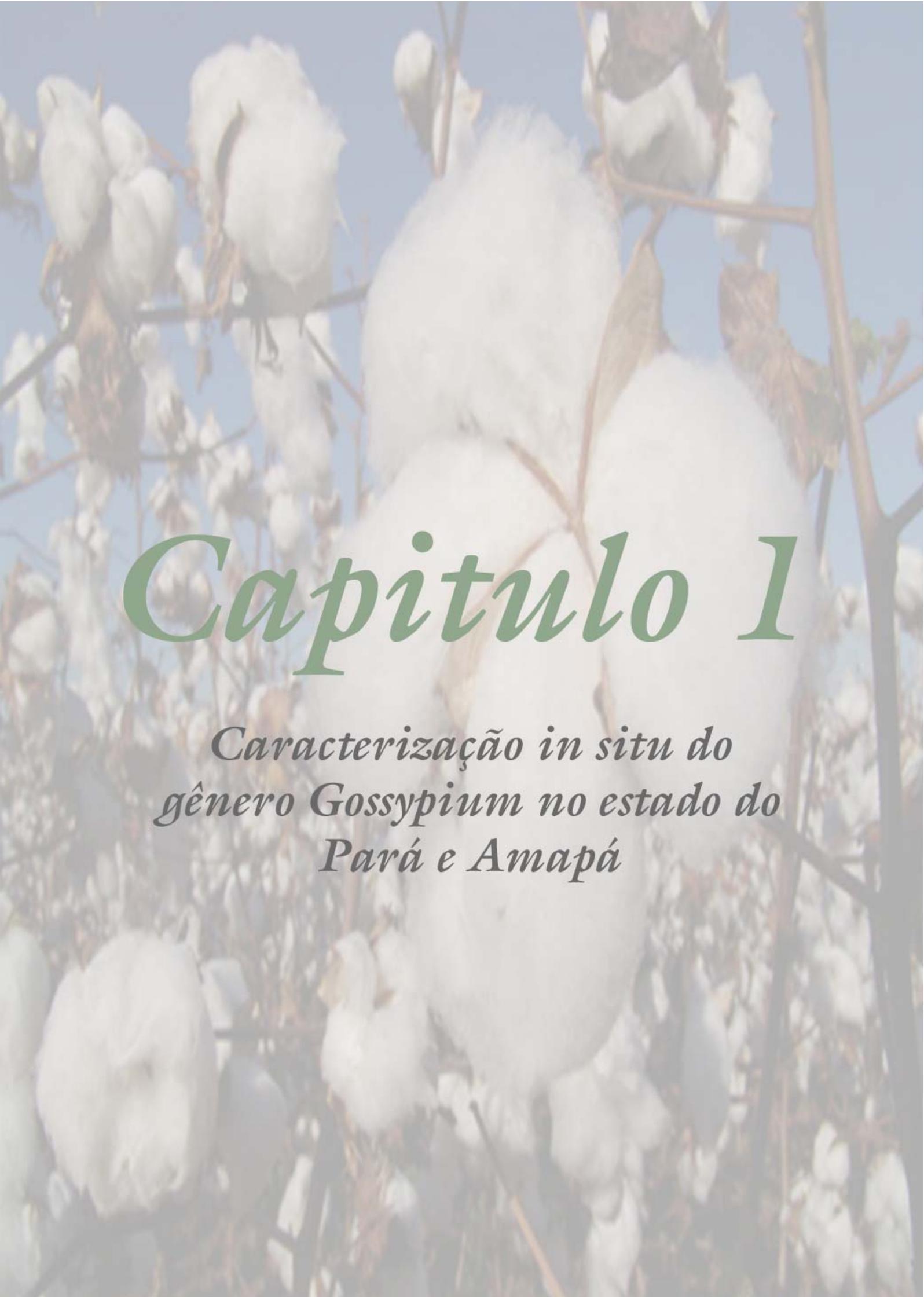
3. OBJETIVOS

3.1 - Objetivo Geral:

- Definir uma estratégia para conservação *in situ* e *ex situ* dos algodoeiros *G. barbadense* em dois estados da região Norte do Brasil.

3.2 - Objetivos específicos;

- Determinar como *G. barbadense* é mantido *in situ* nos estados do Pará e do Amapá;
- Estimar a diversidade genética dentro e entre populações de *G. barbadense* originárias dos estados do Pará e do Amapá.



Capítulo 1

*Caracterização in situ do
gênero Gossypium no estado do
Pará e Amapá*

RESUMO

O Brasil é considerado um dos centros de diversidade da espécie *Gossypium barbadense*. Acredita-se que grande parte da variabilidade genética de *G. barbadense* esteja sendo perdida, em virtude de problemas econômicos, culturais e agrícolas. O primeiro passo para reduzir a perda de diversidade e estabelecer estratégias de conservação *in situ* é realizar um diagnóstico de como a espécie se encontra nos locais em que ocorre. Os objetivos deste trabalho foram identificar populações de *Gossypium* presentes no estado do Pará e Amapá, caracterizá-las, determinar os principais riscos e coletar acessos para armazenamento em bancos de germoplasma. Foram realizadas expedições em Novembro de 2004, e a caracterização *in situ* de *G. barbadense* foi realizada por entrevista do proprietário da planta e da análise do ambiente em que as plantas estavam inseridas. Foram coletadas 179 plantas em 22 municípios no estado do Pará e 117 plantas em nove municípios no estado do Amapá. A maioria das plantas pertence à espécie *G. barbadense* (98% no Amapá e 94% no Pará). As plantas ocorrem em fundo de quintal, beira de estrada e de modo espontâneo, sendo as de fundo de quintal bem mais abundantes (97% no Amapá e 95% no Pará) e mantidas com a finalidade principal de serem usadas como plantas medicinais. Os moradores não possuem o hábito de armazenar e beneficiar as sementes, no Pará apenas 1% dos proprietários relatou armazenar as sementes e no Amapá esse índice foi de 11%. A maioria das plantas coletadas tinha de dois a três anos de idade (58% no Amapá e 93% no Pará). Conclui-se então que *G. barbadense* é a espécie mais difundida nos dois estados e que são encontradas em fundo de quintal. No estado do Amapá predomina a variedade botânica *barbadense* ou Quebradinho, enquanto que no Pará predomina a variedade *brasiliense* ou Rim-de-boi. Não foram encontradas plantas em ambientes naturais nos dois estados, portanto a criação de reservas e o emprego de outros métodos convencionais de manutenção *in situ* não parecem ser aplicáveis a *G. barbadense* em ambos os estados. A adequada conservação dessas espécies deve ser realizada em coleções de germoplasma mantidas *ex situ*.

ABSTRACT

Brazil has been considered one of the diversity centers of *Gossypium barbadense* species. It is believed that a relatively big erosion genetic process occurs with the species, due to economic, cultural and agricultural problems. A local diagnostic about species situation is the first step for reducing the diversity loss and establishing conservation strategies *in situ*. This research aimed the identification of the presence of *Gossypium* populations, characterization, determination of the main risks and collection of the accesses to store in germoplasm banks, in Para and Amapa States. Expeditions were conducted in November 2004. An interview was carried out with the plant proprietor for characterizing *in situ* of *G. barbadense* species and of the environment where the plants were inserted. On hundred seventy nine plants in 22

municipal districts were collected in Para State and 117 plants in nine municipal districts in Amapa State. The majority of plants belong to *G. barbadense* species (98% in Amapa and 94% in Para). Plants occur in back yards, beside roads and spontaneously. That ones from back yards were more abundant (97% in Amapa and 95% in Para) and maintained as medicinal plants as the principal reason. Plants in natural environments in both states evaluated were not found, therefore, the creation of reserves and the application of others conventional methods of maintenance *in situ* are not applicable. The plant proprietors do not use to store or process seeds. Seed storage was reported as a practice by only 1% of the plant proprietors from Para and 11% from Amapa. The most plants collected were from two to three years of age (58% in Amapa and 93% in Para). As conclusions *G. barbadense* is the species most spread in the two studied states and are found in back yards. In Amapa State the botanical variety *barbadense* or Quebradinho is predominant, whereas in Para State the predominant variety is *brasiliense* or Rim-de-boi. Adequate conservation of the studied species must be carried out in germoplasm collections maintained *ex situ*.

4.1 - INTRODUÇÃO

Atualmente, estão identificadas cinquenta espécies de algodão do gênero *Gossypium*, distribuídas na Ásia, África, Austrália e América. Cinco dessas espécies são alotetraplóides ($2n = 4x = 52$) e quarenta e cinco diplóides ($2n = 2x = 26$). Apenas quatro são cultivadas comercialmente, sendo duas diplóides (*G. arboreum* e *G. herbaceum*) e duas alotetraplóides (*G. hirsutum* e *G. barbadense*). As espécies mais importantes cultivadas são *G. hirsutum* e *G. barbadense*. O Brasil é centro de origem da espécie alotetraplóide *G. mustelinum*, endêmica do semi-árido Nordeste. O país também é centro de variabilidade secundária de *G. barbadense* L. e de *G. hirsutum* var. *marie galante*, nativos do norte do Peru e sul do Equador e da América Central, respectivamente.

O uso de *G. barbadense* no país é muito antigo, sendo cultivada por indígenas antes da chegada de Cabral ao Brasil. Embora não seja nativa do país, sua origem é atribuída ao sul do Equador e norte do Peru (BRUBAKER et al., 1999). Acredita-se que um processo de perda de diversidade relativamente grande esteja ocorrendo com a espécie, em virtude de problemas econômicos, culturais e agrícolas (Barroso et al., 2005b). Além disso, parte das áreas em que este algodoeiro ocorre está sendo, aos poucos, ocupada pelo plantio do algodoeiro herbáceo. Esta expansão do algodoeiro herbáceo pode comprometer a manutenção da variabilidade existente, principalmente devido aos efeitos de fluxo gênico, seja entre variedades convencionais ou transgênicas (Freire et al., 2002).

Na atualidade, a região Norte do País é responsável pelo plantio de, apenas, 1344 hectares com algodão herbáceo, produzindo 2847 toneladas de algodão (IBGE, 2005). Com a expansão da cultura algodoeira para o cerrado essa área tende a aumentar nos próximos anos. Esse crescimento pode ser acompanhado por alterações em costumes e tradições locais, alguns dos quais provavelmente associados ao uso e manutenção de *G. barbadense*, fato que segundo Barroso et al., (2005a), aconteceu no Mato Grosso. O primeiro passo para reduzir a perda de diversidade e estabelecer estratégias de conservação *in situ* é realizar um diagnóstico de como a espécie se encontra nos locais em que ocorre (Barroso et al., 2005b).

Face aos problemas descritos, este trabalho teve por objetivos identificar populações de *Gossypium* presentes nos estados do Pará e do Amapá, caracterizá-las, determinar os principais riscos e coletar acessos para armazenamento em bancos de germoplasma.

4.2 - MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 – Expedições

Foram realizadas expedições em Novembro de 2004, visando caracterizar as populações de *G. barbadense* e de outros tipos de algodoeiros ocorrentes nos estados do Pará e Amapá. A caracterização *in situ* de *G. barbadense* foi realizada por meio de entrevista ao proprietário da planta e da análise do ambiente em que as plantas estavam inseridas (Anexo 1). Foram levantados os dados descritos abaixo, que foram tabulados e sistematizados em gráficos.

4.2.1.1) Dados Geográficos:

- a) Localização geográfica
- b) Tipo de propriedade
- c) Número de plantas por ponto de coleta

4.2.1.2) Dados da população:

- a) Espécie
- b) Tipo de população
- c) Origem declarada
- d) Mancha na flor
- e) Forma das sementes
- f) Presença de línter nas sementes
- g) Cor da folha

4.2.1.3) Dados culturais:

- a) Armazenamento das sementes
- b) Adubação
- c) beneficiamento

4.2.1.4) Dados fenológicos:

- a) Época de florescimento
- b) Altura das plantas
- c) Idade da plantas

4.3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 – Dados Geográficos

No estado do Pará as plantas foram coletadas em 21 municípios: Castanhas do Pará, Terra Alta, São Caetano de Odivelas, Santa Maria do Pará, São Miguel do Guamá, Irituia, Capitão Poço, Ourém, Garrafão do Norte, Bonito, Capanema, Tracuateua, Bragança, Mãe do Rio, Aurora do Pará, Ipixuna, Paragominas, Moju, Abaetetuba, Marituba e Benevides (Figura 1). O maior número de plantas foi coletado no município de Capitão Poço com 33 plantas. Apenas uma planta foi encontrada nos municípios de Castanhas do Pará, São Caetano de Odivelas e Aurora do Pará (Figura 2).

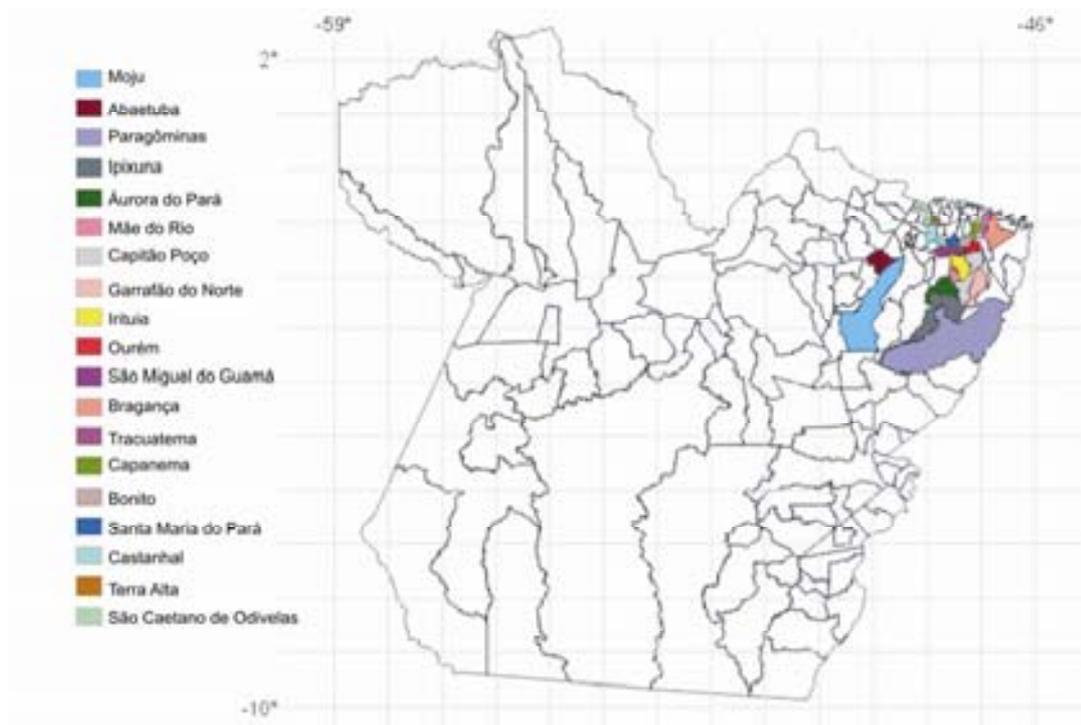


Figura 1: Municípios e localização das áreas de coleta de *G. barbadense* no estado do Pará

No estado do Amapá as plantas coletadas estavam distribuídas em nove municípios: Macapá, Porto Grande, Ferreira Gomes, Amapá, Calçoene, Pracuúba,

Tartarugalzinho, Pedra Branca do Amapari e Serra do Navio (Figura 3). O maior número de plantas foi encontrada no município de Macapá (26 plantas) e o menor em Serra do Navio (2 plantas) (Figura 4). As coordenadas (latitude e longitude) foram estabelecidas utilizando-se o Sistema de Posicionamento Global (GPS).

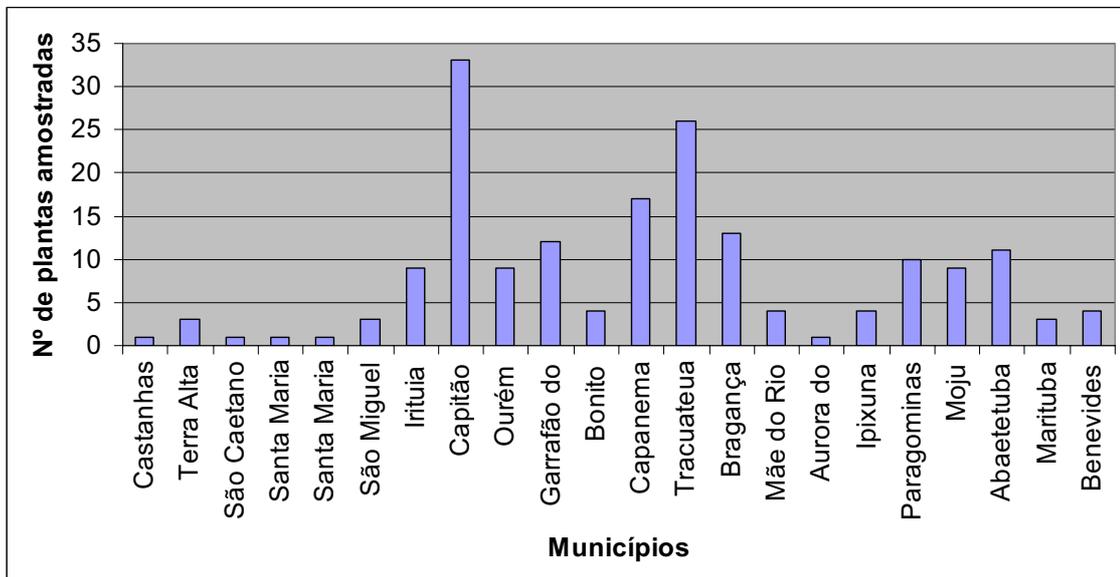


Figura 2: Número de plantas amostradas segundo o município no estado do Pará

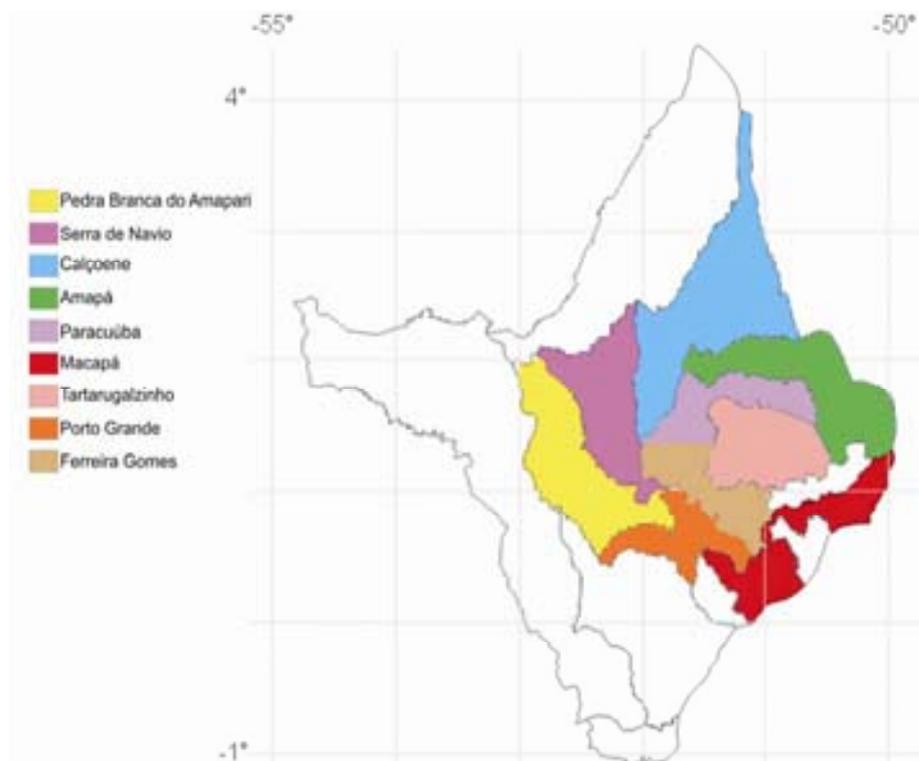


Figura 3: Municípios e localização das áreas de coleta de *G. barbadense* no estado do Amapá

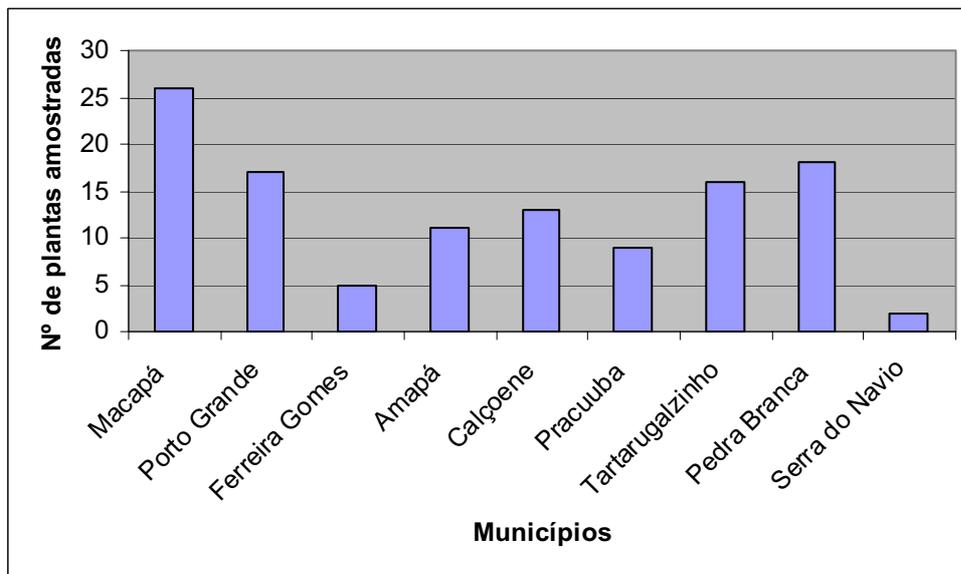


Figura 4: Número de plantas amostradas segundo o município no estado do Amapá

De acordo com a Figura 5, um maior número de plantas foi coletado no estado do Pará (179) do que no estado do Amapá (117). Entretanto, as plantas do Amapá abrangeram todas as mesorregiões (duas) do estado, enquanto as plantas coletadas no Pará abrangeram três das seis mesorregiões. A amostragem em apenas 50% das regiões do Pará deve-se ao grande tamanho do estado e da maior dificuldade em acessar algumas localidades. Por isso é possível que a expedição realizada não tenha sido capaz de coletar toda a variabilidade existente no estado, sendo recomendável realizar uma nova expedição que abranja as mesorregiões não visitadas.

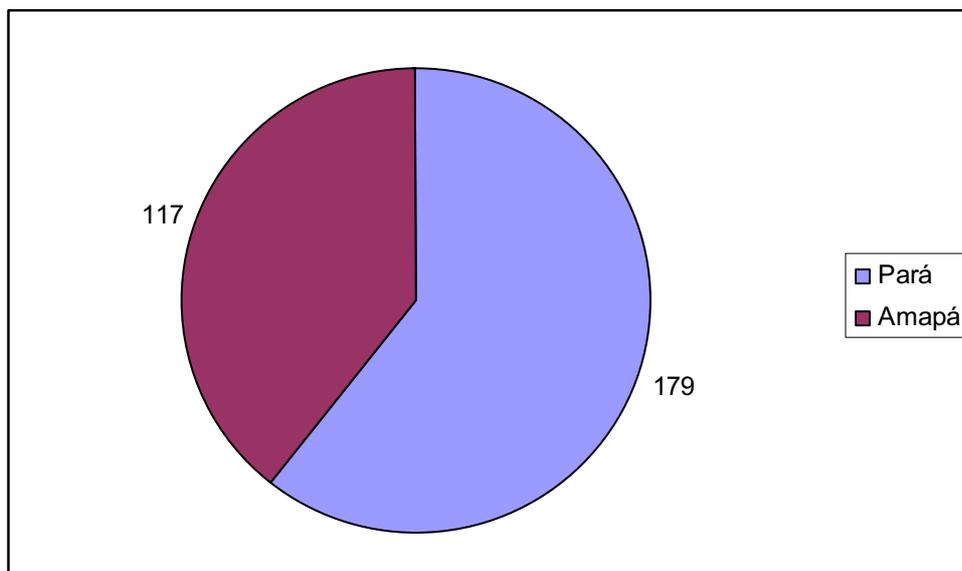


Figura 5: Número de plantas amostradas segundo o estado.

As plantas coletadas foram encontradas em residências urbanas e rurais, na beira de estradas, em pequenas e médias propriedades, em terrenos nas cidades e em escolas.

Tanto no Pará como no Amapá, a grande maioria das plantas foi encontrada em propriedades urbanas, 82% e 68%, respectivamente. Poucas plantas foram encontradas em residência rural e apenas algumas em beira de estrada e em pequenas propriedades. Apenas no estado do Amapá foram encontradas plantas em média propriedade, em terrenos abandonados e em escolas (Figura 6).

A freqüência de domicílios e de habitantes em zonas urbanas é de 68,4 e 66,5% no Pará (IBGE, 2000), respectivamente. No Amapá, 88,9% dos domicílios e 89,0% dos habitantes estão na zona urbana (IBGE, 2000). Portanto, para ambos os estados, a freqüência de plantas coletadas em domicílios na zona urbana é similar à população e à freqüência de residências nestes locais. Sendo assim, a proporção de residências na zona urbana e rural que contêm plantas de *G. barbadense* é similar.

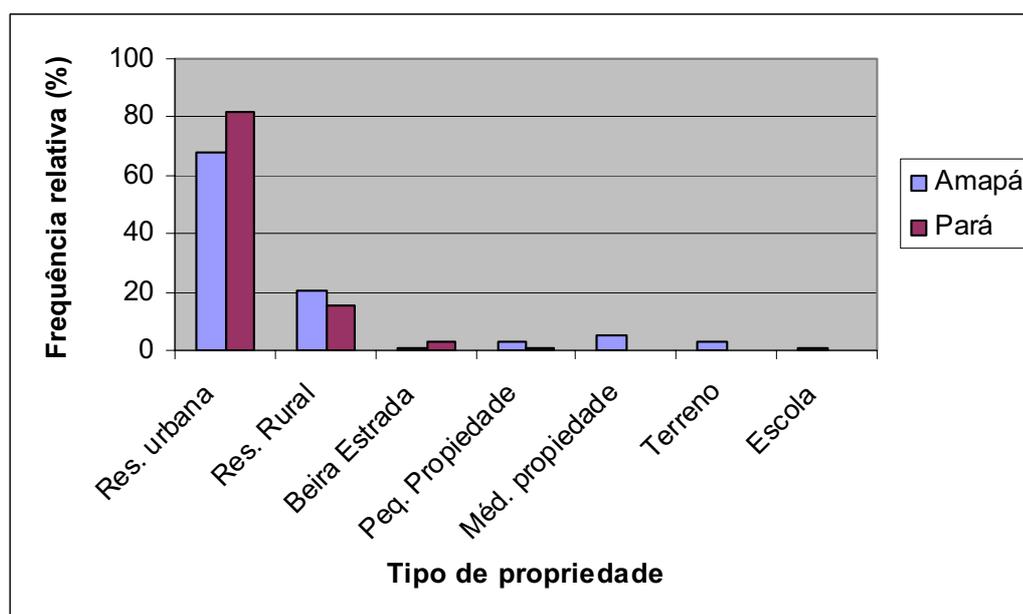


Figura 6: Percentagem de plantas segundo o tipo de propriedade.

4.3.2 – Dados da população

A grande maioria das plantas coletadas nos dois estados é da espécie *G. barbadense*, com freqüência de 98% no Amapá e 94% no Pará. Algumas plantas pertencem à espécie *G. hirsutum* com freqüência de 2% e 6% para o Amapá e Pará,

respectivamente (Figura 7). As duas únicas plantas de *G. hirsutum* coletadas no Amapá foram encontradas em uma só localidade. Elas foram trazidas do Maranhão por imigrantes e suas características coincidem com as plantas de porte arbóreo coletadas neste estado (Barroso, comunicação pessoal). No Pará foram encontradas quatro plantas no município de Tracuateua, uma em Castanhas do Pará e uma em Bragança.

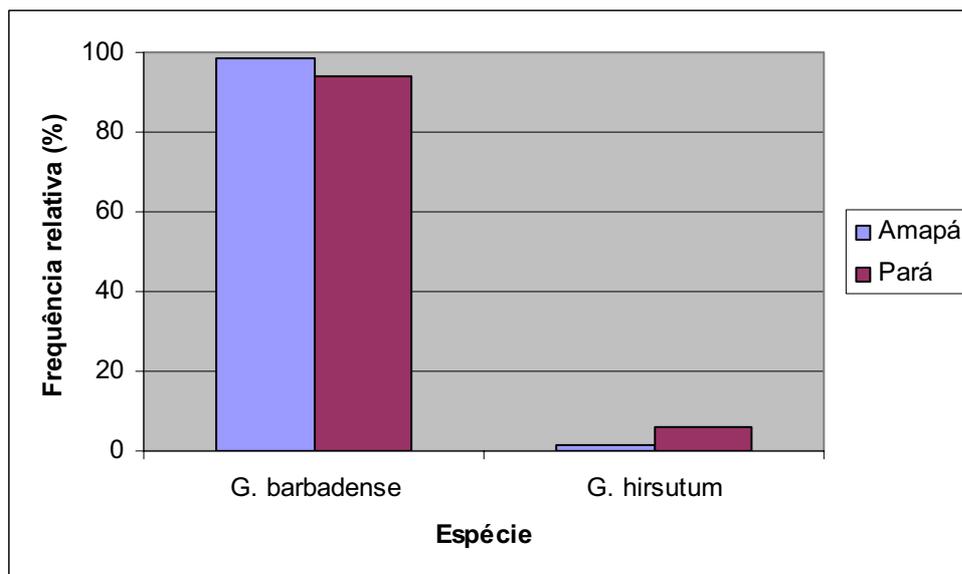


Figura 7: Percentual de plantas coletadas segundo a espécie.

Verificou-se que as plantas coletadas ocorrem em fundo de quintal, na beira de estrada e de modo espontâneo (Figura 8). As plantas de fundo de quintal aparecem com frequência bem mais elevada do que os demais tipos, 97% no Amapá e 95% no Pará, e são mantidas com a finalidade principal de serem usadas como plantas medicinais. Apenas uma planta foi encontrada em beira de estrada no estado do Amapá e oito no estado do Pará. A predominância de plantas *G. barbadense* em fundo de quintais também foi observada por Barroso et al., (2005a) no estado do Mato Grosso e por Ulloa et al. (2006) no México. Em outros 22 estados do Brasil não foram encontradas plantas fora de ambientes antrópicos, sendo muito mais freqüente as plantas de fundo de quintal (Barroso, comunicação pessoal).

Dois plantas no estado do Amapá foram coletadas em situações que permitiram classificá-las como espontâneas. A primeira estava localizada no município de Tartarugalzinho e a outra em Pracuúba, ambas em terrenos baldios. Apesar de, aparentemente, não terem sido plantadas, as duas plantas ocorriam em

locais que haviam sido capinados recentemente, prática que, segundo informação das pessoas do local, era comum em ambos os terrenos. A ação antrópica parece ser essencial para que plantas de *G. barbadense* estabeleçam-se.

Não se observaram plantas de algodão em ambientes naturais nos dois estados. Todas as buscas nestes locais resultaram em insucesso e os relatos de moradores dos dois estados sempre concordavam na ausência de plantas em ambientes naturais. Portanto a criação de reservas e o emprego de outros métodos convencionais de manutenção *in situ* não são aplicáveis. Devido à redução do número de plantas mantidas pela população, a conservação da diversidade em bancos de germoplasma (*ex situ*) é a maior e melhor garantia de preservação em longo prazo dos recursos genéticos existentes.

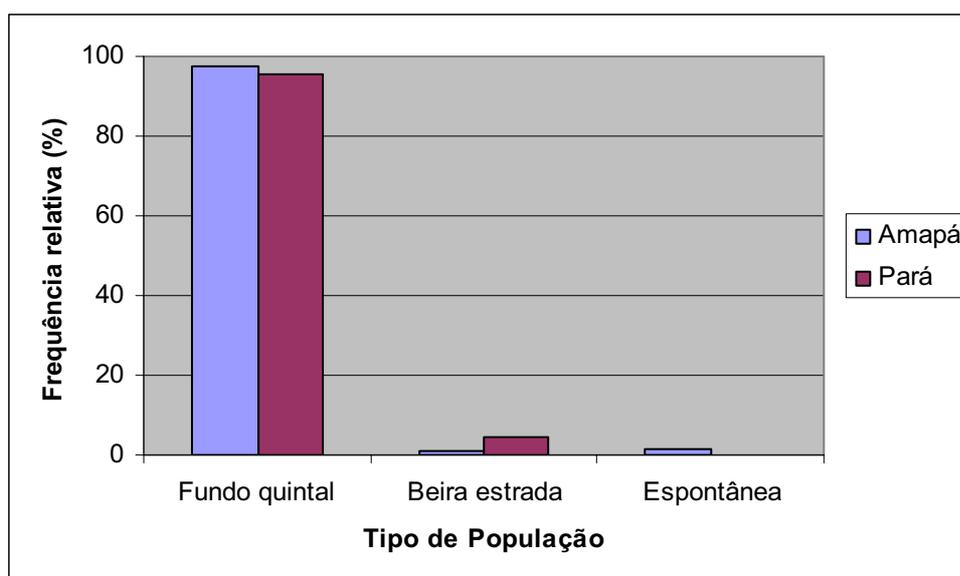


Figura 8: Percentual de plantas segundo o tipo de população.

Grande parte das plantas no estado do Pará não apresentava flores (42%). Entre as plantas que tinham flores, 31% não possuíam mancha vermelha nas pétalas, 16% tinham mancha forte, 5% apresentavam mancha média e 6% mancha fraca nas flores (Figura 9).



Figura 9: Flores de *Gossypium* com e sem mancha nas pétalas

No estado do Amapá, a maioria das plantas apresentava manchas nas flores, sendo 45% das plantas com mancha forte, 13% com mancha média e 8% com mancha fraca. Apenas 8% tinham flores sem mancha e 26% das plantas não possuíam flor (Figura 10). Embora a presença de manchas nas pétalas seja predominante em *G. barbadense*, a ausência é bem documentada na literatura (Barroso et al., 2005a). Portanto, o fato de manchas não ocorrerem nas pétalas não indica, necessariamente, que tenha ocorrido fluxo gênico com algodoeiros herbáceos cultivados.

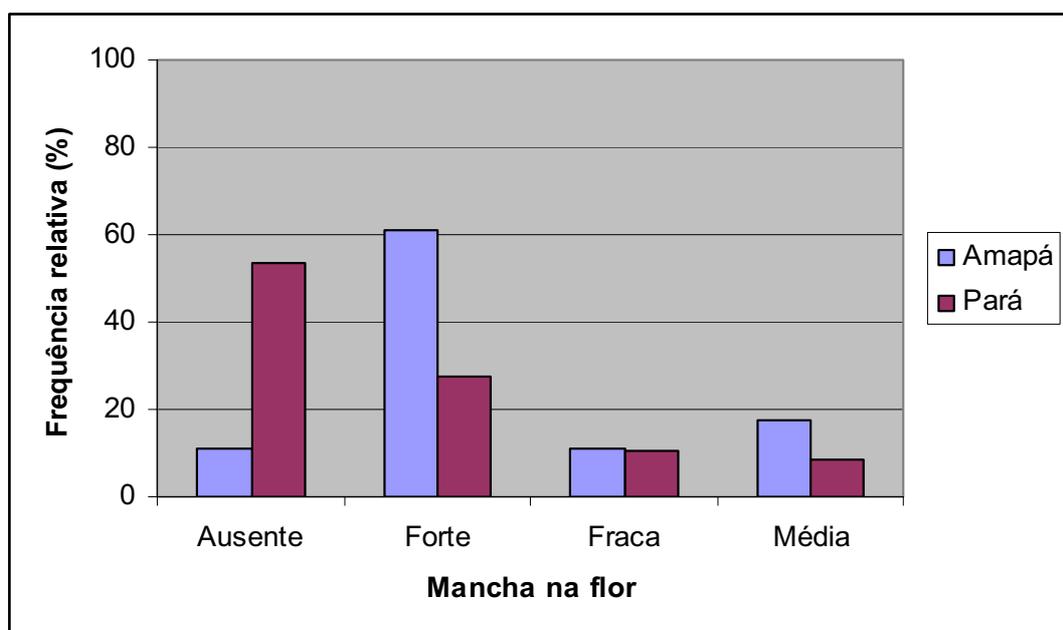


Figura 10: Percentual de plantas coletadas segundo a presença de mancha na flor.

A avaliação do tipo de semente remete à variedade botânica de *G. barbadense*. No estado do Amapá predomina sementes separadas ou soltas o que caracteriza a variedade *barbadense* ou Quebradinho (Figura 11). No estado do Pará predomina as sementes do tipo rim firme, característica da variedade botânica *brasiliense*, cujas sementes são aderidas umas às outras formando uma figura similar a um rim, razão pela qual é chamada rim-de-boi. A predominância da variedade *brasiliense* no Pará em relação à *barbadense* deve ter origem histórica, visto que indígenas e caboclos sempre cultivaram de modo mais intenso a primeira. Adicionalmente, há uma crença que as propriedades medicinais de algodoeiros rim-de-boi são mais intensas e sua fibra apresenta melhor qualidade (Barroso et al., 2005a).

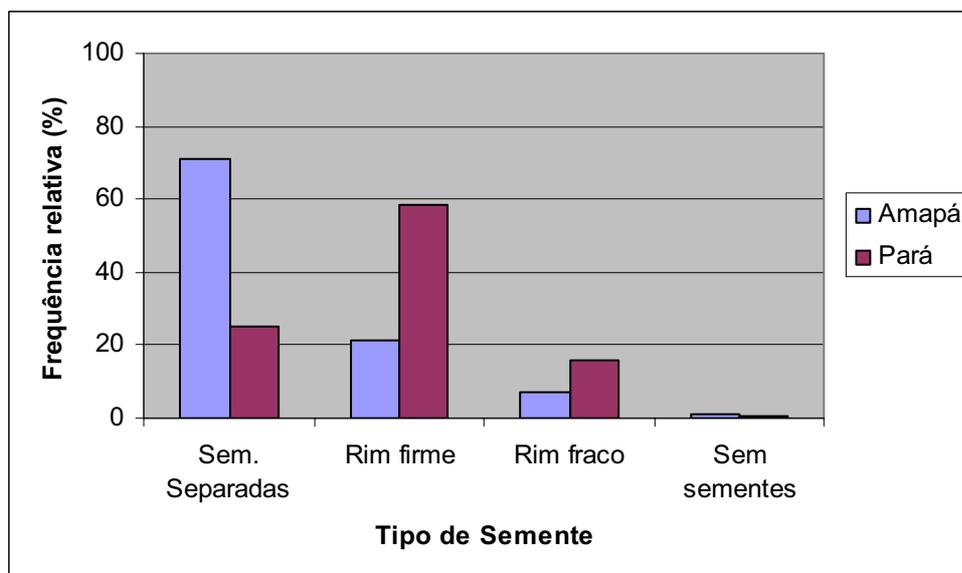


Figura 11: Plantas amostradas segundo a presença e o tipo de semente.

A presença de línter nas sementes foi verificada quase que exclusivamente nas plantas do Pará (Figura 12), que apresenta predominância da variedade rim-de-boi. Apenas 3,4% das plantas do Amapá apresentaram línter nas sementes, os quais apresentava coloração esverdeada e aspecto aveludado. Em 96,6% das plantas do Amapá o línter estava ausente.

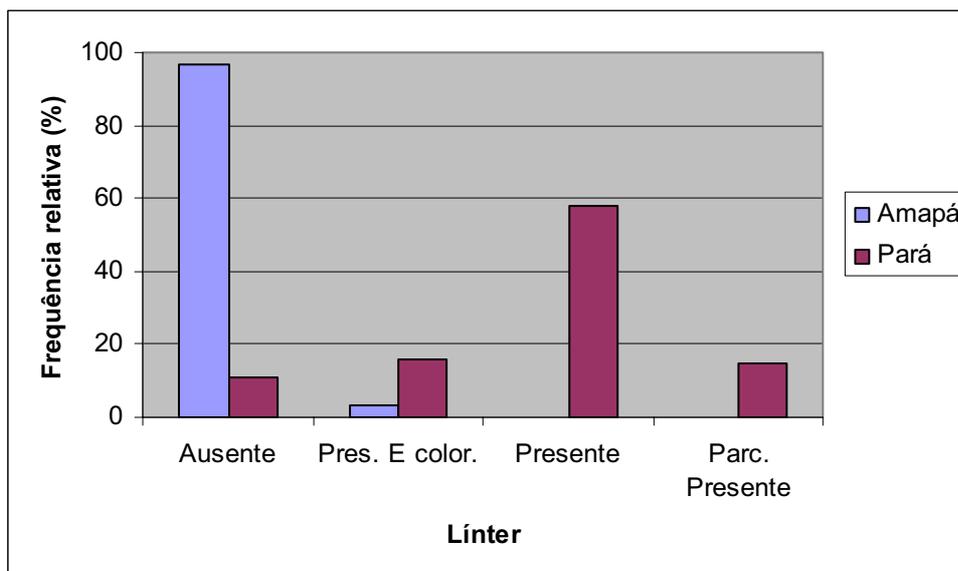


Figura 12: Plantas amostradas segundo a presença e o tipo de línter.

Quanto à cor da folha, a coloração verde é predominante nos dois estados (Figura 13). No estado do Amapá, plantas com folhas verdes são bem mais abundantes com percentual de 93%, em relação às roxas (7%). Para o estado do Pará, a frequência das duas colorações de folha são mais similares, apresentando 59% de folhas verdes e 41% de folhas roxas. No Pará, atribui-se propriedades medicinais mais acentuadas aos algodoeiros de folha roxa, fato menos evidente no Amapá. Esta associação entre a cor da folha e as características terapêuticas deve ter ocasionado a maior conservação de algodoeiros de folhas roxas no Pará.

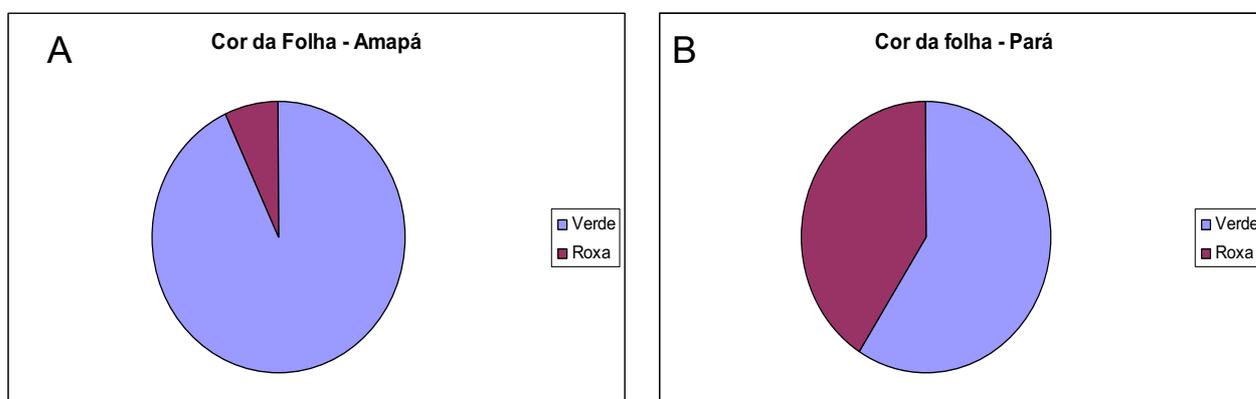


Figura 13: Plantas amostradas segundo a cor da folha no estado do Amapá (A) e no estado do Pará (B).

4.3.3 – Dados culturais

Tanto no Pará quanto no Amapá poucos moradores têm o hábito de armazenar as sementes (Figura 14). No Pará, apenas em três locais (1%) os proprietários relataram realizar o armazenamento, uma no município de São Caetano de Odivelas, em uma pequena propriedade localizada na zona rural; outra dentro do perímetro urbano de Moju; e a terceira uma pequena propriedade na zona urbana de Irituia. No estado do Amapá 11% dos proprietários realiza o armazenamento. O armazenamento é feito em sacos plásticos ou em vidros com a finalidade de realizar o replantio ou para fornecer para outras pessoas.

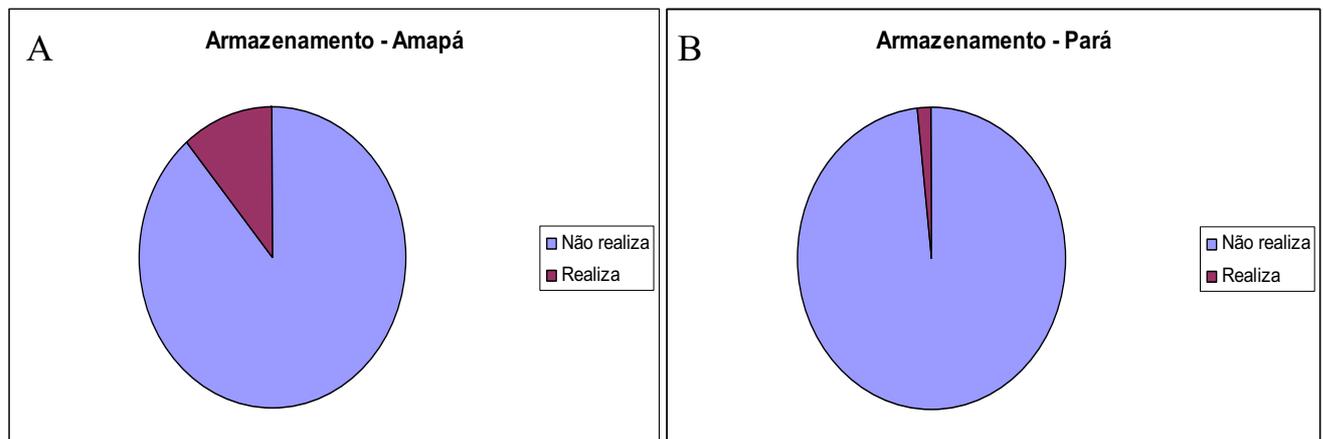


Figura 14: Plantas amostradas segundo o armazenamento das sementes no estado do Amapá (A) e do Pará (B).

Fato similar é observado quanto ao beneficiamento (Figura 15). No estado do Pará apenas dois proprietários realizavam o beneficiamento, os mesmos que armazenavam as sementes em Moju e em Irituia. No estado do Amapá 17% dos proprietários realizam o beneficiamento, que é feito exclusivamente de forma manual e para fins doméstico da fibra, em assepsias de fermentos e em limpezas de modo geral.

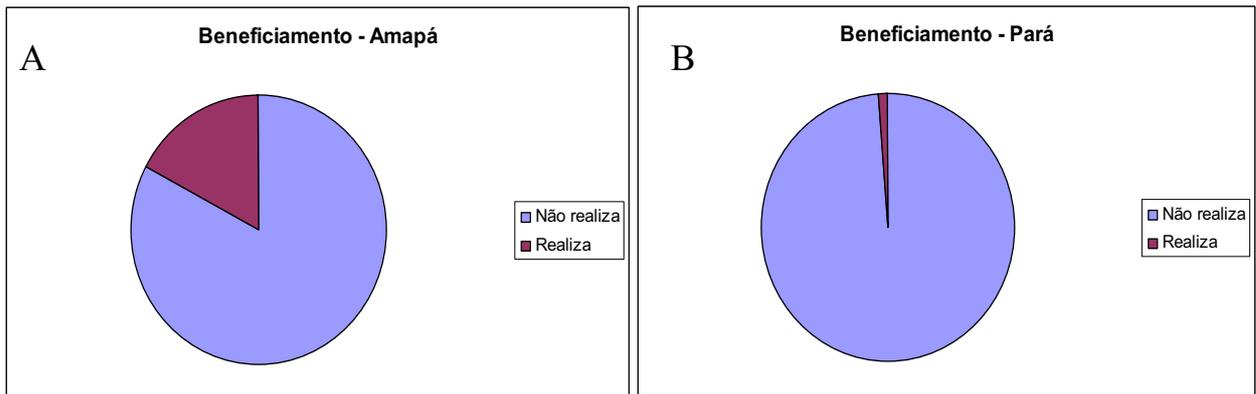


Figura 15: Plantas amostradas segundo o beneficiamento das sementes nos estados do Amapá (A) e Pará (B).

4.3.4 – Dados fenológicos

A maioria das plantas do estado do Pará apresentava dois a três metros de altura (Figura 16). As plantas do Amapá tendem a ser mais altas, com valor modal acima de três metros.

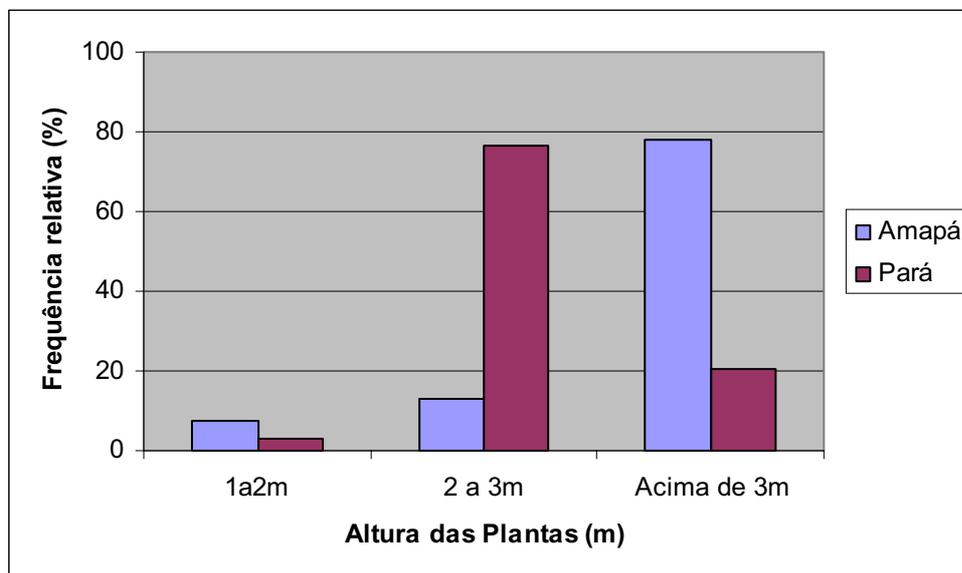


Figura 16: Plantas amostradas segundo a altura em metros.

A maior parte das plantas tinha de dois a três anos, correspondendo a 58% e 93% do total das plantas amostradas no Amapá e Pará, respectivamente (Figura 17). A planta mais velha foi encontrada no estado do Amapá, com seis anos segundo os proprietários. No Amapá também foi encontrado o maior número de

plantas jovens, com até um ano (35%). Pela idade das plantas, é possível presumir que a renovação das plantas ocorre rapidamente, sendo a grande maioria substituída entre um e três anos após o plantio.

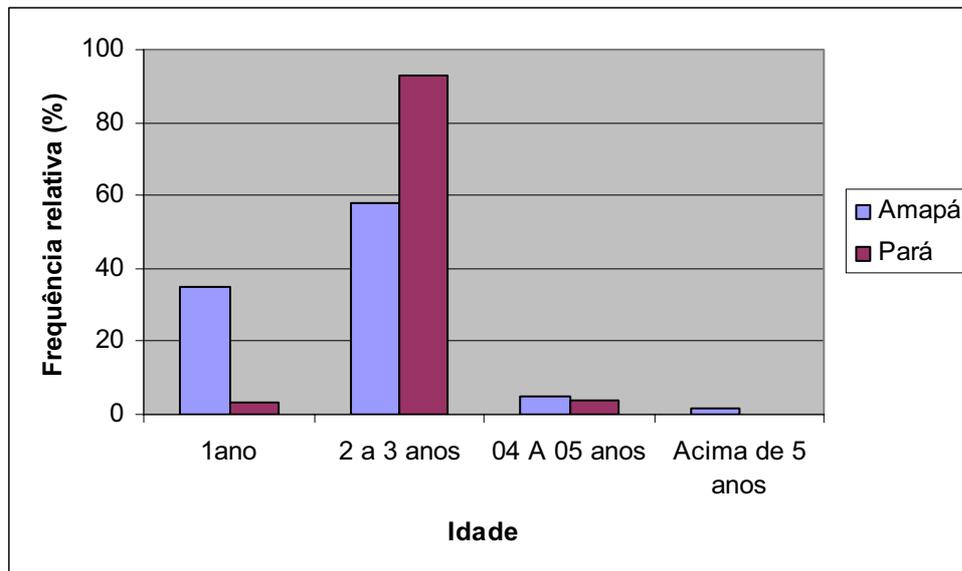


Figura 17: Plantas amostradas segundo a idade.

Gossypium barbadense é mantido nos estados da região Norte quase que exclusivamente na forma de plantas de fundo de quintal e muito associado às propriedades medicinais atribuídas a espécie. Plantas destinadas a outros fins foram encontradas em pequenas quantidades e mantidas por pessoas que conservavam as tradições culturais de modo mais forte.

Os proprietários das plantas nessas localidades as usam exclusivamente para fins caseiros, não sendo detectado nenhum uso têxtil da fibra. O uso medicinal é hoje, sem dúvida, o principal motivo para que *G. barbadense* esteja sendo conservado no Pará e Amapá. As plantas são mantidas pela camada mais pobre da população de ambos os estados, aquela que tem maior dificuldade para ter acessos a médicos e medicamentos. Embora não quantificado, também foi possível perceber que o uso medicinal do algodoeiro vem sendo, lenta e paulatinamente, substituído pelo emprego de medicamentos adquiridos em farmácias. Caso o acesso à assistência médica e a medicamentos industrializados seja ampliado, o algodoeiro perderá a função e deve ter o número de plantas reduzido.

Diferente de outros parentes de espécies cultivadas, *G. barbadense* não ocorre em ambientes naturais nas cidades visitadas do Pará e Amapá. Portanto, a

criação de reservas e o emprego de outros métodos convencionais de manutenção *in situ* não parecem ser aplicáveis à *G. barbadense* em ambos os estados. Para que a manutenção *in situ* seja realizada adequadamente é necessário que o conhecimento popular associado aos algodoeiros e os produtos gerados a partir de *G. barbadense* sejam valorizados sob o ponto de vista econômico e cultural.

Diante das evidências de acentuada perda de diversidade genética em *G. barbadense* em ambos os estados, a conservação da diversidade em bancos de germoplasma (*ex situ*) é a maior e melhor garantia da preservação a longo prazo dos recursos genéticos existentes, sendo necessário intensificar as ações de coleta e avaliação.

4.4 - CONCLUSÕES

- *Gossypium barbadense* é a espécie mais difundida nos dois estados;
- A grande maioria das plantas é encontrada em fundo de quintal;
- No estado do Amapá predomina a variedade botânica *barbadense* ou quebradinho, enquanto no estado do Pará predomina a variedade *brasiliense* ou rim-de-boi;
- A manutenção *in situ* de *G. barbadense* está intimamente ligada ao uso caseiro de diferentes partes da planta, particularmente no preparo de medicamentos.
- Mantidas as condições atuais, a apropriada conservação dos recursos genéticos de *Gossypium* presentes nos dois estados deve ser realizada em coleções *ex situ* de germoplasma.



Capítulo 2

*Caracterização genética de G. barbadense
nos estados do Pará e Amapá
com marcadores SSR*

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo estimar a diversidade e a estrutura genética das populações de *G. barbadense* no estado do Pará e Amapá, visando definir estratégias de conservação *ex situ*. Foram utilizados 141 genótipos, sendo 84 coletados no estado do Pará e 57 no estado do Amapá. Os 12 pares de primers SSR utilizados amplificaram 15 locos e um total de 39 alelos com média de 2,53 alelos por loco. Os alelos variaram entre 1 e 3 alelos por loco para o estado do Amapá e entre 1 e 4 para o estado do Pará. O estado do Pará apresentou cinco alelos exclusivos e o estado do Amapá obteve 3 alelos exclusivos. O total de alelos exclusivos nas duas populações foi igual a 8 (20,5% do total de alelos amplificados). A endogamia intrapopulacional obteve um valor bastante elevado ($G_{IS} = 1,00$) o que mostra que as populações não estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg. A razão mais provável para a ausência de heterozigotos deve ser o isolamento ao qual a planta é mantida *in situ*. A proporção da variabilidade presente entre os acessos coletados nos dois estados é considerada muito alta ($G_{st} = 0,37$). Na análise do agrupamento observou-se que os municípios pertencentes ao estado do Pará e os do estado do Amapá formam dois grupos bem distintos, confirmando as diferenças existentes entre os algodoeiros dos dois estados. Conclui-se então que *G. barbadense* se reproduzem basicamente por autofecundação e que existe grandes diferenças genéticas entre os algodoeiros presentes no Pará e no Amapá, sendo necessária a preservação em bancos de germoplasma de acessos provenientes de cada estado.

ABSTRACT

The present work had as objective to estimate the diversity and the genetic structure of *G. barbadense* populations in Para and Amapa States, aiming to define conservation strategies *ex situ*. On hundred forty one genotypes were used in this research, with 84 and 57 collected in Para and Amapa States, respectively. The 12 pairs of primers SSR used amplified 15 loci and a total of 39 alleles with an average of 2.53 alleles per loci. The alleles varied between 1 and 3 alleles per loci to Para State and between 1 and 4 to Amapa State. Para State presented five exclusive alleles and Amapa State obtained three. The total of exclusive alleles in the two populations was equal to eight (20.5% of the total amplified alleles). The population inbreeding obtained a very high value ($G_{IS} = 1.00$) showing that the populations are not in Hardy-Weinberg equilibrium. The most probable reason for heterozygous absence may be the isolation in what the plant is kept *in situ*. The variability proportion present among the collected accesses in the two studied States is considered

very high ($Gst = 0.37$). In the clustering analyses was observed that the municipal districts belonged to Para and Amapa State formed two distinct groups, confirming the existing difference among the cottons from the two States. It was concluded that *G. barbadense* reproduce basically via self pollination and exist high genetic differences between the cottons present in Para and Amapa States. The preservation in germoplasm banks of accesses collected from each State is needed.

5.1 - INTRODUÇÃO

A espécie *G. barbadense*, arbórea e perene, era cultivada por indígenas de diversas etnias quando da chegada dos colonizadores, sendo difundida entre estes. Porém, foi paulatinamente substituída por algodoeiros da espécie *G. hirsutum*. Atualmente, sua manutenção *in situ* é devida, principalmente, ao uso como planta medicinal (Barroso et al., 2005b) e a variabilidade existente não está adequadamente representada nos bancos de germoplasma. Para que a conservação genética desta espécie seja feita de modo adequado é importante conhecer a estrutura genética e a variabilidade presente.

O procedimento básico para determinar como uma dada espécie está geneticamente estruturada é a análise das populações com marcadores moleculares. O desenvolvimento dos marcadores moleculares possibilitou a ampliação dos conhecimentos sobre espécies nativas ou naturalizadas. Marcadores microssatélites (SSRs) são os mais utilizados em estudos de populações naturais (Collevatti et al., 1999; Dayanadan et al., 1999; Gaiotto, 2001 e Zucchi, 2002), pois são codominantes e altamente polimórficos quando comparados com outras classes de marcadores. Os marcadores SSR tem sido muito utilizado para responder a diversas questões sobre a genética de populações, fluxo gênico e análise de paternidade (Wright & Bentzen, 1994).

O presente trabalho teve como objetivo estimar a diversidade e a estrutura genética das populações de *G. barbadense* no estado do Pará e Amapá, visando definir estratégias de conservação *ex situ*.

5.2 - MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1 - Material vegetal

O material usado neste estudo constituiu-se de folhas de indivíduos adultos de algodoeiros da espécie *G. barbadense*, coletadas em dois estados da região Norte do Brasil: Pará e Amapá. No estado do Pará foram coletadas 179 plantas das quais 84 foram utilizadas no estudo; no Amapá coletou-se 117 plantas e o estudo foi feito com 57 genótipos. Os municípios amostrados durante as expedições estão relacionados nas tabelas 1 e 2. As amostras foram coletadas em viagens de prospecção e coleta realizadas durante o mês de Novembro de 2004.

As folhas coletadas *in situ* foram postas em tubos de ensaio contendo tampão TE (10mM Tris; 1mM EDTA), acondicionadas em gelo e transportadas para o Laboratório de Biotecnologia da Embrapa Algodão, onde foram armazenadas a -20°C até o momento de extração de DNA.

5.2.2 – Extração do DNA genômico

As folhas foram retiradas do TE e secas em papel toalha e empregadas na extração e purificação do DNA genômico. O método empregado foi descrito por Ferreira & Grattapaglia (1998), com modificações. O protocolo apresenta os seguintes passos:

1. Colocou-se aproximadamente 100mg de tecido em tubos de microcentrífuga de 1,5mL, congelando a amostra em nitrogênio líquido;
2. Macerou-se o tecido vegetal, com o auxílio de um pistilo de vidro previamente resfriado, até se obter um pó bem fino;

Tabela 1: Genótipos amostrados no estado do Pará

Genótipo	Município	Genótipo	Município	Genótipo	Município
PA-04-02	Terra Alta	PA-04-45	Ourém	PA-04-108	Bragança
PA-04-03	Terra Alta	PA-04-47	Ourém	PA-04-119	Bragança
PA-04-04	São Caetano de Odivelas	PA-04-49	Ourém	PA-04-112	Bragança
PA-04-06	Santa Maria	PA-04-50	Capitão Poço	PA-04-73	Bonito
PA-04-08	São miguel do Guamá	PA-04-51	Capitão Poço	PA-04-75	Bonito
PA-04-10	São miguel do Guamá	PA-04-52	Capitão Poço	PA-04-77	Capanema
PA-04-11	Irituia	PA-04-53	Capitão Poço	PA-04-83	Tracuateua
PA-04-13	Irituia	PA-04-54	Capitão Poço	PA-04-86	Tracuateua
PA-04-14	Irituia	PA-04-55	Capitão Poço	PA-04-87	Tracuateua
PA-04-15	Irituia	PA-04-56	Capitão Poço	PA-04-92	Tracuateua
PA-04-19	Capitão Poço	PA-04-57	Capitão Poço	PA-04-98	Tracuateua
PA-04-20	Capitão Poço	PA-04-66	Garrafão do Norte	PA-04-31	Capitão Poço
PA-04-21	Capitão Poço	PA-04-67	Garrafão do Norte	PA-04-121	Capanema
PA-04-22	Capitão Poço	PA-04-68	Garrafão do Norte	PA-04-123	Capanema
PA-04-23	Capitão Poço	PA-04-69	Garrafão do Norte	PA-04-125	Capanema
PA-04-25	Capitão Poço	PA-04-70	Garrafão do Norte	PA-04-136	Mãe do Rio
PA-04-26	Capitão Poço	PA-04-72	Bonito	PA-04-137	Mãe do Rio
PA-04-27	Capitão Poço	PA-04-76	Capanema	PA-04-138	Aurora de Pará
PA-04-28	Capitão Poço	PA-04-82	Tracuateua	PA-04-140	Ipixuna
PA-04-33	Capitão Poço	PA-04-88	Tracuateua	PA-04-141	Ipixuna
PA-04-34	Capitão Poço	PA-04-90	Tracuateua	PA-04-146	Paragominas
PA-04-35	Capitão Poço	PA-04-94	Tracuateua	PA-04-147	Paragominas
PA-04-37	Capitão Poço	PA-04-95	Tracuateua	PA-04-149	Paragominas
PA-04-39	Capitão Poço	PA-04-96	Tracuateua	PA-04-169	Moju
PA-04-41	Capitão Poço	PA-04-97	Tracuateua	PA-04-174	Marituba
PA-04-42	Ourém	PA-04-99	Tracuateua	PA-04-175	Marituba
PA-04-43	Ourém	PA-04-100	Tracuateua	PA-04-176	Marituba
PA-04-44	Ourém	PA-04-103	Tracuateua	PA-04-179	Benevides

Tabela 2: Genótipos amostrados no estado do Amapá

Genótipo	Município	Genótipo	Município	Genótipo	Município
AP-04-01	Macapá	AP-04-63	Tartarugalzinho	AP-04-73	Pedra Branca
AP-04-02	Macapá	AP-04-85	Pedra Branca	AP-04-21	Amapá
AP-04-03	Porto Grande	AP-04-70	Porto Grande	AP-04-78	Serra do Navio
AP-04-06	Porto Grande	AP-04-75	Pedra Branca	AP-04-79	Serra do Navio
AP-04-07	Porto Grande	AP-04-87	Pedra Branca	AP-04-69	Porto Grande
AP-04-08	Porto Grande	AP-04-93	Porto Grande	AP-04-55	Tartarugalzinho
AP-04-09	Porto Grande	AP-04-98	Macapá	AP-04-44	Pracuúba
AP-04-10	Porto Grande	AP-04-101	Macapá	AP-04-45	Pracuúba
AP-04-11	Porto Grande	AP-04-103	Macapá	AP-04-47	Pracuúba
AP-04-13	Ferreira Gomes	AP-04-110	Macapá	AP-04-50	Tartarugalzinho
AP-04-14	Ferreira Gomes	AP-04-111	Macapá	AP-04-51	Tartarugalzinho
AP-04-17	Amapá	AP-04-113	Macapá	AP-04-54	Tartarugalzinho
AP-04-19	Amapá	AP-04-117	Macapá	AP-04-28	Calçoene
AP-04-22	Amapá	AP-04-97	Macapá	AP-04-12	Ferreira Gomes
AP-04-34	Calçoene	AP-04-72	Pedra Branca	AP-04-49	Pracuúba
AP-04-38	Calçoene	AP-04-96	Macapá	AP-04-53	Tartarugalzinho
AP-04-43	Pracuúba	AP-04-65	Tartarugalzinho	AP-04-46	Pracuúba
AP-04-57	Tartarugalzinho	AP-04-20	Amapá	AP-04-66	Porto Grande
AP-04-61	Tartarugalzinho	AP-04-42	Pracuúba	AP-04-71	Porto Grande

3. Em capela de exaustão foi adicionado 600µL de tampão de extração (2% CTAB; 1,4M de NaCl; 0,2M de EDTA; 0,1M de Tris HCl pH 8,0; 2% de PVP e 0,2% β-mercaptoetanol), agitado em vórtex por 30 segundos, ou até que todo o tecido vegetal macerado entrasse em contato com o tampão de extração;
4. Incubou-se os tubos em banho-maria por 30 minutos à 60°C, agitando-os a cada 5 minutos;
5. Retirou-se os tubos do banho-maria, deixando-os esfriar até temperatura ambiente. Ainda em capela de exaustão, adicionou-se 600µL de clorofórmio-álcool isoamílico na proporção de 24:1 (v/v). Os tubos foram agitados por inversão durante cinco minutos, ou até se obter uma emulsão homogênea;
6. Centrifugou-se a 12000rpm por 10 minutos a 4°C;
7. A fase aquosa (superior) foi transferida para novo tubo, ao qual se adicionou um volume de isopropanol gelado (-20°C);
8. Misturou-se a solução por inversão dos tubos para a precipitação de ácidos nucléicos;
9. O DNA precipitado foi sedimentado por centrifugação a 12000rpm por 10 minutos a 4°C;
10. Os pellets foram lavados duas vezes com 500µL de etanol 70% gelado e uma vez com etanol absoluto e secos ao ar por 5 a 10 minutos
11. O DNA foi ressuspensão 100 -200µL (dependendo do tamanho do pellet) em água bidestilada ou TE (10mM Tris; 1mM EDTA).

5.2.3 – Quantificação do DNA

A quantificação do DNA purificado foi realizada em géis de agarose 0,8% (p/v) submetidos a eletroforese. Alíquotas da solução de DNA de cada planta foram aplicadas nos poços do gel ao lado de uma série de DNA do fago lambda com concentrações conhecidas (50 a 300ng). Após eletroforese e coloração com 10µL de brometo de etídeo (10mg/mL) diluído em 100mL de tampão TBE (89 mM de Tris, 2 mM de EDTA, 89 mM de borato de sódio pH 8,3), a concentração de DNA nas amostras foi estimada por comparação visual

da intensidade de fluorescência das bandas do DNA do fago λ . Posteriormente o DNA foi diluído (10ng/ μ L) em água bidestilada para as reações de SSR.

5.2.4 – Condições de Amplificação

Após a quantificação do DNA, as reações de amplificação foram feitas num volume de 20 μ L contendo: tampão PCR (10mM de Tris-HCl, pH 8,3, 50mM de KCl e 0,1% de Triton X-100), 0,2mM dNTP, 1 unidade Taq DNA polimerase, 4mM de cada par de primer e 20 a 25ng de DNA genômico. Às reações também foi adicionado cloreto de magnésio em quantidade adequada ao par de primer, sempre entre 2mM e 4mM. Os primers foram desenvolvidos especificamente para algodoeiro e são denominados **Cir** (Nguyen et. al., 2004) e **BNL** (Liu et. al., 2000).

Para amplificação dos fragmentos por PCR usando os primers **Cir** utilizou-se o seguinte programa: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos compostos por uma desnaturação a 94°C por 30 segundos, temperatura de anelamento de acordo com cada par de primer (46°C a 55°C) por 1 minuto e uma extensão a 72°C por 1 minuto. Seguiu-se uma extensão final a 72°C por 8 minutos.

Para amplificação dos marcadores gerados com os primers **BNL** utilizou-se o seguinte programa: desnaturação inicial a 95°C por 12 minutos, seguido de 30 ciclos de temperatura, sendo cada ciclo composto por 93°C por 1 minuto, 55°C por 2 minutos e 72°C por 3 minutos, com uma extensão final de 72°C por 7 min.

Após a reação foram adicionados 10 μ L de solução formamida 95% contendo 0,05% de azul de bromofenol, 10mM de EDTA. OS produtos de amplificação foram desnaturados a 95°C por 5 minutos no termociclador e transferidos imediatamente para gelo.

5.2.5 – Detecção dos Marcadores SSR

Os produtos de amplificação (marcadores microssatélites) foram submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida 6% contendo 7M de uréia. Os géis foram preparados utilizando tampão TBE (89mM de Tris, 2mM de EDTA, 89mM de borato de sódio pH 8,3).

Géis de acrilamida foram corados com nitrato de prata, de acordo com procedimento descrito por Creste et al., (2001).

5.2.6 – Seleção de Primers

Foram testados 156 pares de primers **Cir** e **BNL**. Para verificação do perfil de amplificação de cada primer foram utilizados dois acessos de *G. barbadense* coletados no Pará e Amapá e a cultivar Deltaopal.

5.2.7 – Análise dos dados

Para cada loco SSR, os indivíduos foram genotipados de acordo com os alelos que possuíam. Os dados da genotipagem foram empregados para estimar as freqüências alélicas para os acessos agrupados de acordo com a microrregião do estado em que foi coletado.

A diversidade genética e estatísticas G foram estimadas sob modelo fixo de acordo com Nei (1973a). As freqüências alélicas, o número de alelos por loco (A), a heterozigozidade observada (H_o) e esperada (H_e) e as estatísticas G de Nei (H_T , H_S , D_{ST} , G_{IT} e G_{ST}), foram estimadas utilizando os programas GDA (Lewis & Zaykin, 2000) e FSTAT (Goudet, 2001).

A estruturação da variabilidade dentro de cada município, entre municípios de cada estado e entre estados foi determinada segundo o índice de diversidade de Nei e pela análise de agrupamento, usando a distância de Nei (1978) e UPGMA.

5.3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.3.1 – Seleção de primers

Os 156 pares de primers utilizados amplificaram 163 locos, dos quais 96 foram polimórficos entre *G. barbadense* e Deltaopal (*G. hirsutum*). Entre os acessos de *G. barbadense*, apenas 11 locos foram polimórficos. O polimorfismo relativamente elevado observado entre *G. barbadense* e Deltaopal reflete as diferenças existentes entre as duas espécies de algodão, e deve tornar fácil a realização de estudos de fluxo gênico entre cultivares e as populações de *G. barbadense*. Já o baixo nível de polimorfismo entre os acessos de *G. barbadense* é função da menor diversidade dentro da espécie e do reduzido número de indivíduos usados no teste. Doze pares de primers SSR (Tabela 3) foram escolhidos para a avaliação da estrutura das populações de *G. barbadense*. Eles foram selecionados devido ao polimorfismo, à localização no genoma e pelo padrão de amplificação que permitia a inequívoca genotipagem.

Tabela 3: Descrição de Pares de Primers usado para Amplificar Marcadores em Algodão

Primer	Cromossomo	Motivo	Primer	Cromossomo	Motivo
Cir169	C ₇	AT5GT7	Cir222	D08 e C ₄	GT14
Cir148	C ₁₂	TG8	Cir272	C ₁₂ e C ₁₆	CA8
Cir246	C ₁₄	TG6	Cir187	C ₂₀	TG6
Cir372	C ₁₀	GT12	Cir203	C ₆	CA16
Cir381	C ₂ e C ₁₄	AC7	BNL1414	C ₂₃ e C ₉	AG16
Cir228	C ₃ e C ₁₄	TG12N3T GTA11	BNL3103	C ₂₅	GA13 e TC14

5.3.2 – Caracterização dos locos microssatélites

Foram genotipadas 141 plantas, sendo 84 do estado do Pará e 57 do Amapá (Tabela 1 e 2). Os 12 pares de primers utilizados amplificaram 15 locos, sendo 13 polimórficos e dois monomórficos. Dois exemplos da amplificação

obtida podem ser observados na figura 18. Inicialmente um número maior de plantas foi usado para realizar as análises. Porém, logo após as primeiras reações PCR uma parte deixou de amplificar, embora a qualidade e a quantidade de DNA fossem, aparentemente, adequadas. Fato similar é citado por (Koonjul et al., 1999), que atribuiu a ineficácia do DNA das amostras de algodão como molde à excessiva quantidade de compostos fenólicos.

O marcador mais polimórfico para *G. barbadense*, tendo como base as duas populações, foi o Cir203 com quatro alelos. Já os marcadores Cir169 e Cir246 foram monomórficos, portanto não informativos.

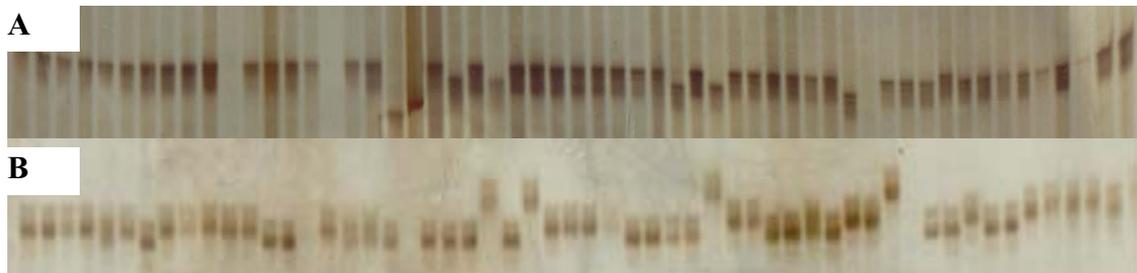


Figura 18: Géis de poliacrilamida mostrando locos microssatélites em *G. barbadense*. A) BNL3103; B) CIR148

5.3.3 – Diversidade genética

A amplificação do DNA genômico com os 12 oligonucleotídeos gerou 38 alelos (Tabela 4), sendo observados 35 alelos no Pará e 33 alelos no Amapá. O número de alelos por loco variou de 1 a 4 na população do Pará e entre 1 e 3 na população do Amapá (Tabela 4). A quantidade de alelos por loco depende do número de acessos e da diversidade do conjunto de genótipos avaliados. Os resultados obtidos são similares àqueles encontrados por Bertini et al. (2005), que obtiveram 65 alelos a partir da análise de 30 cultivares de algodoeiro herbáceo com 31 pares de primers. Porém, são inferiores aos observados por outros autores. Lacape et al. (2006) reportam que um conjunto de 201 primers microssatélites amplificou de 2 a 17 alelos por loco em 47 acessos de algodoeiros tetraplóides; Liu et al., (2000) relatam a obtenção de 2

a 11 alelos por loco em 97 acessos tetraplóides; Liu et al., (2005) encontraram entre 1 e 8 alelos em algodoeiros diplóides da espécie *G. arboreum*.

Tabela 4: Número de alelos por loco, segundo as populações de *G. barbadense*

Loco	Pará	Amapá	Total
Cir169	1	1	1
Cir148	3	3	3
Cir246	1	1	1
Cir372	2	3	3
Cir381	2	2	2
Cir228a	3	2	3
Cir228b	3	2	3
Cir222	2	2	2
BNL1414a	2	2	3
BNL1414b	2	2	3
Cir272a	2	2	2
Cir272b	3	3	3
BNL3103	3	3	3
Cir187	2	2	2
Cir203	4	3	4
Alelos por população	35	33	38

Verificou-se que os primers Cir372, Cir228, Cir203 e BNL1414 amplificaram oito alelos presentes em uma população mais ausentes na outra, como descritos na Tabela 5. O estado com maior número de alelos exclusivos foi o Pará com 5 alelos, o estado do Amapá apresentou apenas 3 alelos exclusivos. A soma dos alelos exclusivos nas duas populações foi igual a 8 (20,5% do total de alelos amplificados). Elevado número de alelos exclusivos também foi observado em *G. mustelinum* (Batista, 2005), sendo possível realizar uma discriminação relativamente fácil das populações por meio dos primers que amplificam os alelos exclusivos.

As freqüências dos alelos exclusivos apresentam grande amplitude de variação no estado do Pará, cujas freqüências máximas e mínimas foram de 95% e 1,7%, respectivamente. No estado do Amapá a variação foi bem menor com freqüências máximas e mínimas de 23% e 5,6%, respectivamente. As maiores freqüências dos alelos exclusivos foram observadas no primer BNL1414, que amplificou dois locos. No primeiro loco (BNL1414a), o terceiro

alelo estava presente em 94,7% nos indivíduos do Pará; no segundo (BNL1414b), 94,8% dos indivíduos do Pará continham o alelo 3. É provável que o isolamento genético dos algodoeiros dos dois estados e a origem diferente do material tenham contribuído para a presença dos alelos exclusivos. Fato que corrobora a origem diferenciada dos algodoeiros de ambos os estados são: a coloração das folhas, roxa na maioria dos acessos coletados no Pará e predominantemente verde nas plantas do Amapá; o tipo de semente, predominantemente separada no Amapá e agrupada no Pará; e a presença de línter na grande maioria das plantas do Pará e sua ausência nas plantas do Amapá.

Tabela 5: Alelos exclusivos segundo o loco e a população de *G. barbadense*

Locos	Nº do alelo	Freqüência	População
Cir372	3	0,0566	Amapá
Cir228a	3	0,259	Pará
Cir228b	3	0,155	Pará
BNL1414a	1	0,230	Amapá
BNL1414a	3	0,947	Pará
BNL1414b	1	0,117	Amapá
BNL1414b	3	0,948	Pará
Cir203	1	0,017	Pará

As duas populações apresentaram pequeno número de alelos por loco (Tabela 6), com média geral de 2,53 alelos. O número de alelos amplificados nas plantas de cada estado foi similar, sendo ligeiramente superior no estado do Pará, com 2,33, em relação ao Amapá, 2,20. De modo geral, a análise intraespecífica de algodoeiros gera um pequeno número de alelos por loco. Os valores obtidos neste estudo foram substancialmente maiores do que o verificado em *G. mustelinum*, em que apenas 1,59 alelos por loco foram amplificados (Batista, 2005). Resultado similar foi obtido por Bertini et al., (2005) e Gutiérrez et al., (2000), que obtiveram uma média de 2,13 e dois alelos por loco microssatélite em algodoeiros herbáceos, respectivamente. Por outro lado, Lacape et al., (2006) e Liu et al., (2000) obtiveram uma média de 5,6 e cinco alelos por loco microssatélite, respectivamente. O valor mais elevado encontrado por estes autores deve-se a um maior número de espécies incluídas nas análises.

Tabela 6: Resumo das análises das populações com marcadores SSR. Em que: (H_o) heterozigidade observada e (F_{IS}) coeficiente de endogamia intrapopulacional

Popul.	N° médio indivíduos*	% locos polimórficos	Alelos por loco	Alelos polimórficos por loco**	H_o	F_{IS}
Pará	73,26	87	2,33	2,53	0,0	1,0
Amapá	51,86	87	2,20	2,38	0,0	1,0
Total	125,12	87	2,53	2,77	0,0	1,0

* Média de genótipos amplificados

** Considera apenas os locos polimórficos

O percentual médio de locos polimórficos verificado nas populações de *G. barbadense* foi de 87%. As duas populações apresentaram percentuais iguais de locos polimórficos. Observa-se na tabela 6 que a média total de alelos polimórficos por loco foi de 2,77. O estado que apresentou maior número de alelos polimórficos por loco foi o Pará com 2,53, a população do Amapá apresentou 2,38.

A heterozigidade observada (H_o) foi zero nos dois estados (Tabela 6), o que refletiu no índice de fixação ou de endogamia (F_{IS}), que obteve o valor máximo. A ausência de heterozigotos mostra que as plantas se reproduzem, basicamente, por autofecundações. Considerando que a flor do algodoeiro é grande, com cores chamativas para os polinizadores, particularmente abelhas, e que não existe sistemas que favoreçam a autofecundação, tal resultado não pode ser explicado pelo sistema reprodutivo da espécie.

A razão mais provável para a ausência de heterozigotos deve ser o isolamento ao qual a planta é mantida *in situ*. A presença de poucas plantas, uma a duas em cada local de coleta, o distanciamento entre os pontos de ocorrência e a presença de barreiras físicas que dificultam a locomoção dos polinizadores, como muros, deve fazer com que a taxa de fecundação cruzada seja zero ou muito próxima a zero. A reprodução por autofecundação deve estar ocorrendo a diversas gerações, pois um isolamento genético recente resultaria em desvios menores da panmixia. Por exemplo, se um loco contém apenas dois alelos, cada um com frequência de 0,5, o coeficiente de

endogamia esperado seria de 0,25, 0,125 e 0,0675 após uma, duas e três gerações de autofecundação, respectivamente. Estes valores seriam passíveis de serem detectados com os tamanhos de amostras usados no presente estudo.

O coeficiente de endogamia verificado poderia, também, ser causado pelo cruzamento entre indivíduos aparentados. Porém, os valores da diversidade dentro de cada município não são muito baixos, particularmente no Amapá, tornando improvável que o cruzamento entre parentes seja a principal causa da presença exclusiva de homozigotos.

5.3.4 – Estrutura da população

Considerando as duas populações, os índices de diversidade de Nei (1973) revelaram que a endogamia intrapopulacional (G_{IS}) foi igual a um, refletindo a completa ausência de heterozigotos para todos os locos estudados (Tabela 7). A diversidade genética total foi elevada ($H_T=0,477$), indicando haver grande variabilidade nas populações. A partição da diversidade mostrou que a maior parte da diversidade está dentro das populações ($H_S=0,307$), mas a quantidade de diversidade presente entre os estados ($D_{ST}=0,170$) é bastante expressiva. Ela representa 36,9% da diversidade total, podendo ser classificada como muito alta. Novamente, este elevado valor da diversidade entre populações pode ser confirmado pelos marcadores morfológicos tipo de semente, coloração da folha e presença de línter, bastante distintos entre os dois estados. Tal resultado já era esperado uma vez que espécies com pequenas populações, que se reproduzem basicamente por autofecundação e com limitada dispersão de pólen e sementes deverão mostrar uma elevada variabilidade entre populações (Lovelless & Hamrick, 1984; Hamrick & Lovelless, 1986 e Alves, 2002).

Tabela 7: Diversidade Total (H_T), divergência genética dentro dos estados (H_s), Diversidade entre estados (D_{st}), proporção da diversidade total que esta entre os estados (G_{ST}) e coeficiente de endogamia intrapopulacional (G_{IS}) em análises considerando todos os estados e para cada um dos estados separadamente.

População	H_T	H_s	D_{st}	G_{ST}	G_{IS}
Todos	0,477	0,307	0,170	0,369	1,000
Pará	0,293	0,222	0,071	0,243	1,000
Amapá	0,357	0,328	0,029	0,082	1,000

Os algodoeiros de ambos os estados apresentaram diversidade genética de magnitude similar (Tabela 7), sendo um pouco maior no Amapá ($H_T = 0,357$) do que no Pará ($H_T = 0,293$). A decomposição da diversidade mostrou que a proporção entre os municípios do Pará é alta ($G_{ST} = 0,242$) e no Amapá é apenas moderada ($G_{ST} = 0,082$). Analisando a diversidade genética dentro dos municípios do estado do Amapá (Tabela 8), verifica-se que o município com maior diversidade foi Amapá com 0,406 e o de menor diversidade foi Macapá (0,244). Já no estado do Pará o município com a maior diversidade foi Bragança, com 0,466 e o de menor diversidade foi Garrafão do Norte com 0,08 (Tabela 8).

Tabela 8: Média da diversidade genética dentro de cada município amostrado, segundo o estado

Estado	Municípios							
Amapá	Amapá	Pracuúba	Tartaru galzinho	Calçoene	Ferreira Gomes	Macapá	Pedra Branca	Porto Grande
	0,406	0,368	0,388	0,333	0,355	0,244	0,257	0,292
Pará	Tracuateua	Capanema	Capitão Poço	Bragança	Bonito	Ourém	Irituia	Garrafão do Norte
	0,360	0,200	0,193	0,466	0,150	0,193	0,133	0,080

Na análise do agrupamento (figura 19) observa-se que os acessos coletados em cada município formam dois grupos distintos. Os municípios do Pará formam o primeiro grupo e os municípios do Amapá formam o segundo grupo. Este dendrograma mostra que geneticamente o agrupamento seguiu as diferenças morfológicas e também geográficas entre os algodoeiros dos dois estados.

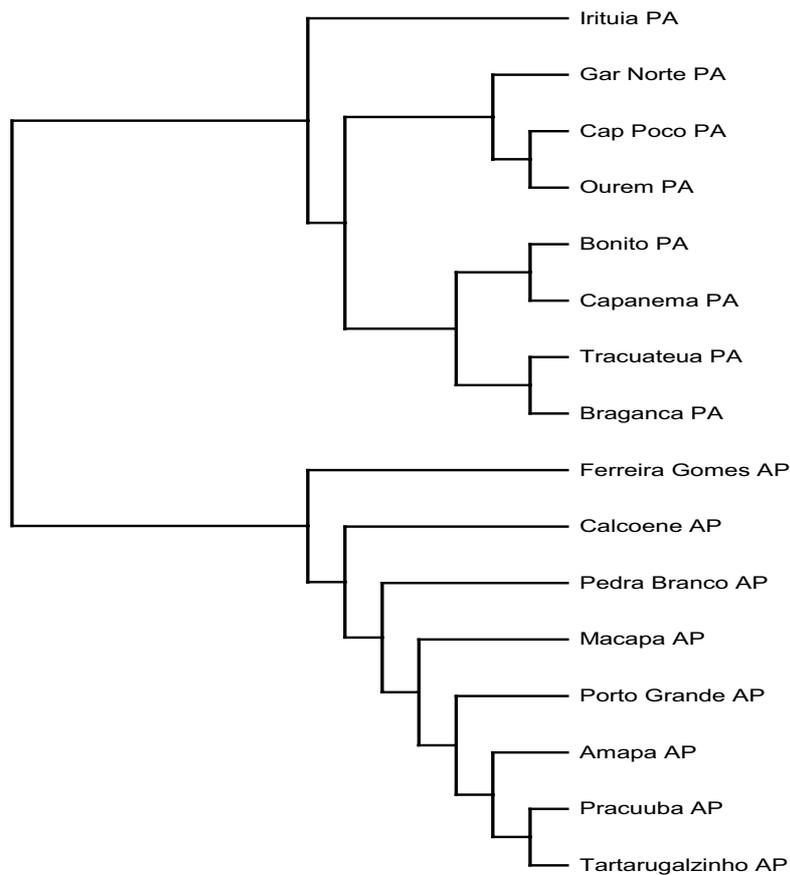


Figura 19: Padrão de divergência genética entre os municípios do Pará e Amapá, baseado no agrupamento de UPGMA utilizando as distâncias genéticas de Nei (1978).

Os valores relativamente elevados de diversidade entre os estados têm conseqüências diretas no planejamento das estratégias de conservação. Para que a variabilidade presente esteja adequadamente conservada não é possível priorizar a conservação dos algodoeiros de um estado em detrimento do outro. A manutenção deve ser realizada de modo que os algodoeiros presentes no Pará e no Amapá estejam devidamente representados em bancos de germoplasma.

A diversidade apenas moderada dos algodoeiros entre os municípios do Amapá e elevada entre os municípios do Pará conduz a estratégias diferentes de coleta e conservação *ex situ* de algodoeiros dos dois estados. Em ambos o número a ser coletado e armazenado pode ser similar, visto que a diversidade presente em cada um é relativamente semelhante. Para o Pará, que possui

elevada diversidade entre municípios, a estratégia deverá envolver a coleta e armazenamento de algodoeiros provenientes do maior número de cidades possível, sendo necessário um pequeno número de indivíduos de cada localidade. A maior homogeneidade entre os algodoeiros presentes nos municípios do Amapá permite que as coletas sejam realizadas em um menor número de pontos amostrais.

A magnitude da diversidade entre populações é também um indicativo da intensidade de fluxo gênico entre populações. Desta maneira, o elevado valor do G_{ST} entre os dois estados sugere que o fluxo gênico de um estado para outro é pequeno. Como a taxa de alogamia foi zero e há um grande obstáculo natural separando os dois estados, o Rio Amazonas, é quase certo que a pequena comunicação entre os algodoeiros do Amapá e do Pará ocorra via sementes transportada por pessoas.

Usando o mesmo raciocínio para interpretar a diversidade dentro de cada estado, a maior homogeneidade genética entre os algodoeiros do Amapá permite inferir que o fluxo gênico é muito mais intenso do que no Pará. Da mesma forma que entre os estados, o fluxo gênico deve decorrer do trânsito de sementes.

O conhecimento dos níveis de variação genética em plantas tem implicações imediatas sobre as estratégias ótimas de amostragem de indivíduos ou populações, na conservação e manutenção da diversidade genética do germoplasma tanto *in situ* quanto *ex situ*. Isto é particularmente verdadeiro para a espécie *G. barbadense* naturalizada no Brasil, considerando que as informações em torno de sua diversidade e estrutura genética são poucas e insuficientes. Estudos similares aos realizados neste trabalho devem ser repetidos em outros locais no intuito de aumentar os conhecimentos sobre a espécie e para determinar a melhor abordagem de coleta e de conservação.

5.4 - CONCLUSÕES

- *G. barbadense* presentes nos estados do Pará e do Amapá se reproduzem, basicamente, por autofecundações;
- Há grandes diferenças genéticas entre os algodoeiros presentes nos dois estados, sendo necessário a preservação em bancos de germoplasma (*ex situ*) de acessos provenientes de cada estado.

A large group of white birds, possibly terns, perched on branches against a blue sky. The birds are densely packed, with many in the foreground and others visible in the background. The branches are thin and brown, and there are some dried leaves. The overall scene is bright and clear.

*Referências
Bibliográficas*

ALLARD, R.W. ,(1960), *Principles of plant breeding*. London: John Wiley.

ALVES, R.M. (2002), Caracterização genética de populações de cupuaçuzeiro, *Theobroma grandiflorum* (Wild. Ex. spreng.) Schum. Por marcadores microssatélites e descritores botânico-agronômicos. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 159p.

BATISTA, C.E.A. (2005), Conservação, diversidade e estrutura genética de populações de *Gossypium mustelinum* presente no semi-árido Nordeste. Monografia – Universidade Estadual da Paraíba UEPB, Campina Grande-PB, 54p.

BARROSO, P.A.V.; COSTA, J.N.; CIAMPI, A.Y.; RANGEL, L.E.P.,HOFFMANN, L.V. (2005a), Caracterização in situ de populações de *Gossypium barbadense* do estado do Mato Grosso. Campina Grande: Embrapa Algodão. Comunicado Técnico, n.244, 8p.

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

BERTINI, C.H.C. DE M.; SCHUSTER, I.; SEDIYAMA, T.; BARROS, E.G. DE.;MOREIRA, M.A. (2005), Analysis of cotton genetic diversity by microsatellites and pedigree. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, v.5, p.369-378.

BOULANGER J. & PINHEIRO D., (1972), Consequências Genéticas da Evolução da Cultura Algodoeira do Nordeste do Brasil. *Pesq.Agrop. no Nordeste*, 4:45-52.

BROWN, A.H.D., (1978), Isozymes, plant population genetics structure and genetic conservation. *Theoretical and Applied Genetics*, v.52, p.145-157.

BRUBAKER C. L.; BOURLAND F. M.; WENDEL J. F. (1999), The origin and domestication of cotton. In: *Cotton: Origin, History, Technology and Production* (Smith, C. W.; Cothen, J. T.). John Wiley e Sons, New York, pp.23-32.

CAIXETA, E.T., OLIVEIRA, A.C.B. DE., BRITO, G.G. DE., SAKIYAMA, N. S. (2006), *Tipos de marcadores moleculares In: BORÉM, A., CAIXETA, E.T. (Editores). Marcadores Moleculares, Viçosa – MG. P. 09-78.*

CARTHEW, S.M. (1993), Population genetic structure of *Banksia spinulosa*. *Heredity*, v.70, n.6, p.566-573.

COCKERHAM, C.C (1969), Variance of gene frequencies. *Evolution*, v. 23, pm72-84.

COLLEVATTI, R.G.; BRONDANI, R.V.; GRATTAPAGLIA, D. (1999), Development and characterization of microsatellite markers for genetic analysis of a Brazilian endangered tree species *Caryocar brasiliense*. *Heredity*, v.38, n.6, p.748-756.

CONTE, R. (2004), Estrutura genética de populações de *Euterpe edulis* Mart. Submetidas à ação antrópica utilizando marcadores alozímicos e microsatélites. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 135p.

CRESTE, S.; TULMANN NETO, A.; FIGUEIRA, A. (2001), Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. *Plant Mol. Biol. Rep.*. 19: 299-306.

DAYANANDAN, S.; DOLE, J.; BAWA, K.S.; KESSELI, R. (1999), Population structure delineated with microsatellite markers in fragmented population of a tropical tree *Carapa guianenses* (Meliaceae). *Molecular Ecology*, v.8, n.10, p.1585-1592.

DIAS, L. A. dos S. (1998), Análises multidimensionais. In: ACELINO, A.C. (Ed.) *Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos*. Viçosa:UFV, p.404-475.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. (1998), *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética*. 3ª ed: Embrapa – Cenargem, Brasília.

FREIRE, E.C. (2000), *Distribuição, coleta, uso e preservação das espécies silvestres de algodão no Brasil*. Embrapa Algodão: Campina Grande.

FREIRE, E. C.; BARROSO, P. A. V.; PENNA, J. C. V. & BORÉM, A. (2002) Fluxo Gênico: Análise do caso de Algodão no Brasil. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**. N 29, 2002. p.104-113. Disponível na Internet.

www.biociologia.com.br. Acesso em 14/03/03.

GAIOTTO, F.A.; BRONDANI, R.P.V.; GRATTAPAGLIA, D. (2001), Microsatellites markers for heart of palm – *Euterpe edulis* and *E. oleracea* Mart. (Arecaceae). *Molecular ecology*, v.1, n.1, p.86-88.

GOUDET, J. (2001), *FSTAT*: a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (Software). Version 2.9.3, 2001 <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html> (16 Nov 2006).

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

GUTIÉRREZ, O. A.; BASU, S.; SAHA, S.; JENKINS, J.N.; SHOEMAKER, D.B.; CHEATHAM, C.L.A.; McCARTY, J.C. (2002), Genetic distances among select cotton genotypes and its relationship with F2 performance. *Crop Science*, v. 42, p.1841-1847.

HAMADA, H.; PETRINO, M.G.; KAKUNAGA, T. (1982), A novel repeated element with Z-DNA forming potencia is widely found in evolutionarily diverse eukaryotic genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, v. 79, p. 6465-6469.

HAMRICK, J.L. (1983), The distribution of genetic variation within and among natural plant populations. In: SCHONEWALD-COX, C.M.; CHAMBERS, S.M.; MACBRYDE, B.; THOMAS, W.L. (Ed.) *Genetic and Conservation*. MenloPark: Benjamin Cummings, p.335-348.

HAMRICK, J.L.; LOVELLES, M.D. (1986), Isozymes variation in tropical trees: Procedures and preliminary results. *Biotropica*, v.18, n.3, p.201-207.

HAMRICK, J.L. (1982), Plant population genetics and evolution. *American Journal of Botany*, v.39, n.10, p.1685-1693.

HOYT, E. (1992), Conservação dos parentes silvestres das plantas cultivadas. *Wilmington: Addison-Wesley Iberoamericana*, 52p.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Produção agrícola municipal: cereais, leguminosas e oleaginosas 2005. Rio de Janeiro: IBGE, 2005.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE) Sinopse preliminar do censo demográfico 2000. Rio de Janeiro, 2000. v.7

JOLY, A. B. (1991), Botânica: Introdução à Taxonomia Vegetal. 10 ed.

São Paulo; Nacional, p.698 – 704.

KAGEYAMA, P.; GANDARA, F.B.; VENCovsky, R. (2001), Conservação *in situ* de espécies arbóreas tropicais. In: NASS, L.L; VALOIS, A.C.C.; MELO, I.C.; VALADARES-INGLIS, M.C. (Ed.) *Recursos Genéticos & Melhoramento: Plantas*. Rondonópolis: Fundação MT, 2001, p. 149-158.

KOONJUL, P. K.; BRANDT, W.F.; FARRANT, J. M.; LINDSEY, G.G. (1999), Inclusion of polyvinylpyrrolidone in the polymerase chain reaction reverse the inhibitory effects of polyphenolic contamination of RNA. *Nucleic Acids Research*, V. 27, N. 3, p.915-916.

LACAPE, J. M.; DESSAUW, D.; RAJAB, M.; NOYER, J.L.; HAU, B. (2006), Microsatellite diversity in tetraploid *Gossypium* germoplasm: assembling a highly informative genotyping set of cotton SSRs. *Mol. Breeding* DOI:10.1007/s11032-006-9042-1.

LEWIS, P.; ZAYKIN, D. (2000), *Genetic data analysis: computer program for the analyses of allelic data* (Software). Version 1.0(d12), 2000 <http://alleyn.eeg.uconn.edu/gda/> (16 Nov de 2006).

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

LIU, D.; GUO, X.P.; LIN, Z.; NIE, Y.C.; ZHANG, X., (2005), Genetic diversity of Asian cotton (*Gossypium arboreum* L.) in China evaluated by microsatellite analysis. *Genet. Res. Crop Evol* DOI: 10.1007/s10722-005-1304-y.

LIU, S.; SAHA, S.; STELLY, D.; BURR, B.; CANTRELL, R. G.(2000)Chromosomal Assignment of Microsatellite Loci in Cottonsomal Assignment of Microsatellite Loci in Cotton. The American Genetic Association, 91: 326-332.

LOVELLES, M.D.; HAMRICK, J.L. (1984), Ecological determinantes of genetic structure in plant population. *Annual Review of Ecology and Systematics* v.15, p.65-95.

MITTERMEIER, R.A.; AYRES, J.M.; WERNER, T.; FONSECA, G.A.B.(1992), O país da megadiversidade. *Ciência hoje*, v.14, n.81, p.20-27.

MORESCO, E. R. (2003), Progresso Genético no Melhoramento do Algodoeiro no Estado de Mato Grosso. Tese (Doutorado) – Escola Superior de

Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 91p.

MOTA, J.H. (2003), Diversidade genética e características morfológicas, físico-químicas e produtivas de cultivares de *Allium sativum* L. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Lavras – UFLA. 77p.

MULLIS, K.; FALLONA, F. (1987), Specific syntheses of DNA *in vitro* via a polymerase catalysed chain reaction. *Methods Enzymology*, v.55, p. 335-350.

NASS, L.L. (2001), Utilização de recursos genéticos vegetais no melhoramento. In: NASS, L.L; VALOIS, A.C.C.; MELO, I.C.; VALADARES-INGLIS, M.C. (Ed.) *Recursos Genéticos & Melhoramento: Plantas*. Rondonópolis: Fundação MT, 2001, p. 29-55.

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

NEI, M. (1977), F-statistics and analyses of gene diversity in subdivided population. *Annals of Human Genetics*, v.41, p.225-233.

NEI, M. (1973a) Analysis of gene diversity in subdivided populations. Proceeding of National Academy of Science of USA, v.70, p.3321-3323.

NEI, M. (1973), Genetics distance between populations. *American Naturalist*, v.106, p.283-293.

NGUYEN, T. B.; GINBAND, M.; BROTTIER, P.; RISTERUCCI, A. M. LACAPE, J. M. (2004), Wide coverage of the tetraploid cotton genome using newly developed microsatellite markers. *Theoretical and Applied Genetics*, n. 109, p. 167-175.

QUEROL, D. (1993), *Recursos genéticos: Nosso tesouro esquecido: abordagem sócio-econômica*. Rio de Janeiro: AS-PTA. 206p.

REIS, S.R.(1996), Distribuição e dinâmica da variabilidade genética em populações naturais de palmito (*Euterpe Edulis* Martius). Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 210p.

ROBINSON I.P. (1998), Aloenzimas na genética de populações de plantas. In: ACELINO, A.C. (Ed.) *Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos*. Viçosa:UFV, p.329-380.

SOUZA, A.P. (2001), Biologia molecular aplicada ao melhoramento. In: NASS, L.L; VALOIS, A.C.C.; MELO, I.C.; VALADARES-INGLIS, M.C. (Ed.)

Recursos Genéticos & Melhoramento: Plantas. Rondonópolis: Fundação MT, 2001, p. 939-966.

THUILLET, A.C.; BATAILLON, T.; SOURDILLE, P.; DAVID, J.L. (2004), Factors affecting polymorphism at microsatellite loci in bread wheat [*Triticum aestivum* (L.) Thell]: effects of mutation processes and physical distance from the centromere. *Theor Appl Genet* 108 (2). P. 368-377.

VALOIS, A.C.C.; NASS, L.L.; GOES, M. De (2001), Conservação *ex situ* de recursos genéticos vegetais. In: NASS, L.L.; VALOIS, A.C.C.; MELO, I.C.; VALADARES-INGLIS, M.C. (Ed.) *Recursos Genéticos & Melhoramento: Plantas*. Rondonópolis: Fundação MT, 2001, p. 123-147.

VENCOVSKY, R. (1992), Análise da variância de freqüências alélicas. *Genetics and Molecular Biology*, v.15, p. 53-60.

VILELA-MORALES, E.A. (1988), Documentação e informática de recursos genéticos. In: Encontro sobre recursos genéticos, 1., Jaboticabal, 1988. *Anais*. Jaboticabal:FCAV/UNESP. p.135-147.

ULLOA, M.; STEWART, J. McD.; GARCIA-C, E.A.; GODOY-A, S.; GAYTAN-M, A.; ACOSTA, S. (2006), Cotton genetic resources in the western states of Mexico: *in situ* conservation status and germplasm collection for *ex situ* preservation. *Genetic Resources and Crop Evolution*, v.53, p.653-668.

WEIR, B.S. (1996), *Genetics data analysis II: methods of discrete population genetic data*. Sunderland: Sinauer Associates, 455p.

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

WENDEL, J.F.; CRONN, R.C. (2003), Polyploidy and the evolutionary history of cotton. *Adv Agronomy*. V.78, p.140-186.

WRIGHT, J.M.; BENTZEN, P. (1994), Microsatellites: genetic markers of the future. *Review in Fish Biology and Fisheries*. V.4, p.384-388.

WRIGHT, S. (1965), The interpretation of population structure by F-statistic with special regard to systems of mating. *Evolution*, v.19, p.395-420.

ZUCCHI, M.I. (2002), Análise da estrutura genética de *Eugenia dysenterica* DC utilizando marcadores RAPD e SSR. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 130p.

Anexo I

Questionário usado nas expedições *in situ*

1) Dados geográficos e do proprietário/mantenedor

a) Município _____ b) Estado _____

c) Lat. _____ d) Long. _____ e) Altit. _____

f) Proprietário _____

g) Propriedade _____

h) Atividade do mantenedor

 Agricultor familiar Agricultor empresarial Dona de casa Outra atividade _____

2) Dados da população

Espécie _____

Tipo de População Selvagem Feral Fundo de quintal Variedade local Espontânea Outra _____

Uso _____

Número de indivíduos adultos _____

Número de indivíduos jovens _____

Área aproximada _____

Origem _____

g) Excicata Não Sim Identificação _____h) Riscos possíveis Pastejo de animais Depredação do ambiente Fluxo gênico Expansão de lavouras Abandono Obras civis Outros _____

Dados culturaisa) **Plantio** _____b) **Controle de doenças/pragas** _____c) **Adubação** _____d) **Colheita** _____e) **Armazenamento e beneficiamento** _____f) **Comercialização** _____i) **Doenças** Ramulária Ramulose Mosaico comum Doença azul Bacteriose Outra _____j) **Pragas** Bicudo Lagartas que atacam maçãs Lagartas desfolhadoras Pulgões Outros _____k) **Polinizadores** Não coletados Coletados (amostra n° _____)**3) Dados do ambiente e fenológicos**• **Vegetação predominante** _____• **Espécies associadas** _____• **Época de florescimento** _____• **Época de frutificação** _____• **Altura média** <0,5m 0,5 a 1m 1 a 2m 2 a 3m acima de 3m• **Ocorre perda de folhas durante período seco** Sim Não• **Idade média aproximada das plantas** 1 ano 2 a 3 anos 4 a 5 anos acima de 5 anos**4) Outras observações**_____
