



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

**CARACTERIZAÇÃO *in situ* E ESTRUTURA GENÉTICA DE
POPULAÇÕES DE *Gossypium mustelinum* Miers ex Watt**

MILENA FERREIRA ALVES

NATAL-RN

2009



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

**CARACTERIZAÇÃO *in situ* E ESTRUTURA GENÉTICA DE
POPULAÇÕES DE *Gossypium mustelinum* Miers ex Watt**

MILENA FERREIRA ALVES

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular do Centro de Biociências 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: Dr. Paulo Augusto Vianna Barroso

Co-orientadores: Dra. Ana Yamaguishi Ciampi

Dra. Lúcia Vieira Hoffmann

NATAL-RN

2009

**A Maria José Ferreira Alves (em memória),
minha mãe, minha professora,
minha melhor amiga,
exemplo da minha família,
e de longe a melhor pessoa que conheci.**

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pela fidelidade, pois sem Ele nada disso seria possível.

A minha mãe Maria José Ferreira Alves (em memória), ao meu pai Francisco Alberto Alves, meus irmãos Junior e Poliana, pelo apoio incondicional, amizade e carinho. E a toda minha família, avó, tios e primos que mesmo distantes torcem por mim. Em especial agradeço a tia Marluce por todos os momentos de felicidade e tristeza, pela inestimável ajuda, tenho certeza que nem mesmo ela sabe o quanto foi importante nessa fase da minha vida.

E a Cleonice e Sara por estarem sempre presentes em todos os momentos.

* * *

A Universidade Federal do Rio Grande do Norte, pela oportunidade de realizar o curso de mestrado.

Ao Dr. Paulo Augusto Vianna Barroso, pela confiança, orientação, ajuda, paciência e incentivo nos momentos mais difíceis.

A Dra. Lúcia Vieira Hoffmann pela inestimável ajuda, força e apoio nesta longa jornada.

A Dra. Ana Yamaguishi Ciampi pela receptividade e oportunidade de ampliar meus horizontes.

A Dra. Vânia Cristina Rennó Azevedo pelo auxílio, paciência e ensinamentos.

A Embrapa Algodão pela oportunidade concedida do estágio, e pelo apoio prestado ao desenvolvimento da carreira científica.

A Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia pela oportunidade de execução de parte do trabalho em suas instalações.

Aos docentes do departamento de Genética e Biologia Molecular, pelos ensinamentos e contribuição para minha formação científica.

Aos colegas do curso, em especial a Ivandilson e Jair pela amizade e companheirismo.

Aos meus companheiros do laboratório de Biotecnologia da Embrapa Algodão: Carolzinha, Ivan, Jair, Vanessa, Valeska, Uiara, Fábio, Guilherme, Michelle, Ana Luíza, Rodolfo, Monaliza, Raissa, Cida, Morgana, Liliane e Thiago pelo compartilhamento de conhecimentos, amizade e farras.

Aos membros da banca de qualificação Dra. Márcia Barreto e Dr. Eleusio Curveiro Freire, pelas discussões que foram de grande importância para a conclusão deste trabalho.

Aos colegas da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia: Patrícia, Natália, Guilherme, Camila e Douglas pela receptividade e grande auxílio durante o desenvolvimento dos trabalhos.

Aos funcionários da Embrapa Algodão, em especial, Fábria, Francisco Alves, Zé Carlos, Zé Menezes, Eliane, Diva, e em especial a José Nilton (Xuxa), pelo profissionalismo e por proporcionarem um ambiente agradável e adequado ao aprendizado.

A CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – pela concessão de bolsa de estudos.

E a todas as pessoas que não foram citadas, mas que contribuíram de alguma forma para meu crescimento profissional e pessoal.

A todos, agradeço de coração!

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** História evolucionaria dos grupos genômicos diplóides e tetraplóides do gênero *Gossypium*, determinado por dados nucleares e cloroplastiais. Adaptado a partir de Wendel e Cronn (2003).....6
- Figura 2.** Características morfológicas da espécie *Gossypium mustelinum*. **(A)** Espécie em seu ambiente natural. **(B)** Folha. **(C)** Maçã. **(D)** Capulho. **(E)** Semente. **(F)** Flor10
- Figura 3.** Municípios do estado da Bahia em que as populações de *Gossypium mustelinum* foram coletados.....24
- Figura 4.** **(A)** Localização dos pontos de coleta do rio Tocó. Nos seis pontos foram coletadas amostras, desde aproximadamente 12 km da nascente do rio (Tocó 6) até aproximadamente a 1,5 km da foz do rio (Tocó 3). **(B)** Pontos de coletas no rio Capivara. Nos seis pontos foram coletadas amostras desde aproximadamente 13 km da nascente do rio (Capivara 4) até aproximadamente a 1,3 km da formação do açude Juracy Magalhães (Capivara 1). Além disso, foram coletadas duas populações no Ribeirão do Brejo (afluente do rio Capivara pela margem direita), denominadas Capivara 5 e Capivara 6. Fonte: Google Earth™, 2008 e GPS TracMaker.....27
- Figura 5.** **(A)** Número de acessos coletados em cada sub-população. TC, sub-populações do rio Tocó; CP, sub-populações do rio Capivara; Outras espécies, representa o número de exemplares de algodoeiros *G. barbadense* e *G. hirsutum* encontrados nas proximidades dos locais de coleta. **(B)** Porcentagem das espécies do gênero *Gossypium* encontradas no rio Capivara.....28
- Figura 6.** **(A)** Algodão de corrente. **(B)** Dispersão das sementes de *G. mustelinum* através da correnteza do rio.....29
- Figura 7.** **(A)** Número estimado de plantas presentes em cada ponto de coleta do rio Tocó. Observa-se que a sub-população Tocó3 apresentou o menor número de plantas, e a Tocó2 o maior número. **(B)** Número estimado de plantas presentes em cada ponto de coleta do rio Capivara. A sub-população Capivara6 e Capivara2 apresentaram o menor e o maior número de plantas, respectivamente.....30
- Figura 8.** Danos às plantas devido à pecuária **(A)** Planta que havia sido podada, apresentando algumas folhas de ramos novos que ainda não haviam sido depredados. Pela espessura do seu caule, podemos supor que esta planta é podada frequentemente. **(C)** Plântula extremamente depredada pelo pastejo de caprinos ou bovinos. Seta amarela demonstra local onde a casca do caule foi arrancada, o que provavelmente causará a morte desta planta.....30

- Figura 9.** Local onde as matas ciliares estavam protegidas da ação antrópica. **(A)** Plantas possuíam caule longo, relativamente fino, e extremamente ramificado que se curvava em direção ao leito do rio. **(B)** Planta crescendo escorada em outras espécies arbóreas na busca por luz solar.....31
- Figura 10.** Sintomas típicos de ataque de lagarta rosada (*Pectinophora gossypiella*) no algodoeiro.....32
- Figura 11.** Associação de plantas de *G. mustelinum* com Mandacaru, cacto de porte arbóreo típico da caatinga, próximo ao leito do rio.....34
- Figura 12.** Aspectos da sub-população Capivara2. **(A)** Plantas de *G. hirsutum* presentes na beira da BR 242. **(B)** Caminhões transitando na rodovia BR 242 em frente a sub-população.....36
- Figura 13.** **(A)** Visão dos pontos onde foram observadas as barreiras de aguapé no rio Piranhas, após o Açude Juraci Magalhães na cidade de Itaberaba. Fonte: Google Earth™, 2008. **(B)** Barreira de aguapé formada ao decorrer do rio Piranhas39
- Figura 14.** **(A)** Plantas de *G. barbadense* próximas a indivíduos de *G. mustelinum*. Estas plantas eram pequenas, contudo apresentavam entre 5 e 10 anos. **(B)** Local próximo a sub-população Capivara5 onde foi observado os restos do alicerce da casa relatada pelos moradores locais.....40
- Figura 15.** Eletroferograma representando os padrões observados em *G. mustelinum*, *G. barbadense* e no híbrido F1 interespecífico, com um dos 14 pares de marcadores SSR utilizados.....41
- Figura 16.** Análise bayesiana mostrando a estrutura das populações dos rios Tocó e Capivara, utilizando K=3 em ambas. Demonstra-se a influencia que cada sub-população sofre e exerce sobre as outras. **(A)** Rio Tocó. **(B)** Rio Capivara.....65
- Figura 17.** **(A)** Mapa municipal estatístico de Itaberaba, Bahia mostrando a localização do rio Capivara e do Ribeirão do Brejo. Fonte: IBGE. **(B)** Sobreposição de mapas do IBGE e do Google Earth mostrando a localização dos rios no município de Itaberaba. Circulo amarelo indica ligação entre o Ribeirão do Brejo e o rio Capivara que possivelmente diminui a distância geográfica entre ambos...66
- Figura 18.** Correlação entre as distâncias genéticas e as distâncias geográficas ao longo do rio entre as sub-populações. **(A)** Rio Tocó **(B)** Rio Capivara.....67
- Figura 19.** Padrão da divergência genética entre as sub-populações de cada rio, baseado no agrupamento Neighbor-Joining utilizando distâncias genéticas de Nei (1973).....68

Figura 20. Padrão de estruturação genética das duas populações nos rios Tocó e Capivara, determinado pelo agrupamento Neighbor-Joining. Círculos representam os indivíduos do rio Capivara e quadrados os do rio Tocó.....69

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Identificação das sub-populações na Albrana*, explanando a denominação dos acessos neste banco de dados e a designação recebida no presente estudo.....26
- Tabela 2.** Sub-populações, rio e número de genótipos analisados em cada sub-população coletada.....51
- Tabela 3.** Primers utilizados para amplificação dos locos microsatélites em populações de *Gossypium mustelinum*, sua distribuição dentro do genoma e o conjunto de primers que constituíram os *multiplex*. A: número total de alelos por loco. Ta (°C): Temperatura de anelamento.....56
- Tabela 4.** Total e média de alelos por loco, segundo as populações de *Gossypium mustelinum*.....59
- Tabela 5.** Frequência dos alelos exclusivos encontrados nas populações de *G. mustelinum*. Em destaque encontram-se os alelos raros observados em cada população.....60
- Tabela 6.** Estimativas obtidas para heterozigosidade observada (H_o), heterozigosidade esperada (H_e) e índice de fixação (f) nas populações e suas respectivas sub-populações.....62
- Tabela 7.** Distâncias genéticas entre pares de sub-populações.....63
- Tabela 8.** Teste de Mantel para comparação entre o log das distâncias geográficas com as distâncias genéticas.....68

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	v
LISTA DE TABELAS.....	viii
RESUMO.....	1
ABSTRACT.....	2
1. INTRODUÇÃO.....	3
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
2.1. O Gênero <i>Gossypium</i>	5
2.2. <i>Gossypium mustelinum</i> Miers ex Watt.....	8
2.3. Conservação do Germoplasma.....	10
2.4. Marcadores Genéticos.....	11
2.5. Diversidade e Estrutura Genética de Populações.....	15
3. OBJETIVOS.....	18
3.1. Objetivo Geral.....	18
3.2. Objetivos Específicos.....	18
4. CARACTERIZAÇÃO <i>IN SITU</i> DE POPULAÇÕES DE <i>Gossypium mustelinum</i> EM AFLUENTES DA BACIA DO RIO PARAGUAÇU NO ESTADO DA BAHIA.....	19
RESUMO.....	20
ABSTRACT.....	21
4.1. INTRODUÇÃO.....	22
4.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	23
4.2.1. Material vegetal.....	23
4.2.2. Ataque de <i>Pectinophora gossypiella</i> em <i>Gossypium Mustelinum</i>	24

4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25
4.3.1. Dados Geográficos.....	25
4.3.2. Dados das Populações.....	26
4.3.3. Índice de Ataque de <i>Pectinophora gossypiella</i>	32
4.3.4. Descrição das condições <i>in situ</i> da população do rio Tocó.....	32
4.3.5. Descrição das condições <i>in situ</i> da população do rio Capivara....	34
4.4. CONCLUSÕES.....	45
5. ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE <i>Gossypium mustelinum</i> EM AFLUENTES DA BACIA DO RIO PARAGUAÇU NO ESTADO DA BAHIA.....	46
RESUMO.....	47
ABSTRACT.....	48
5.1. INTRODUÇÃO.....	49
5.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	50
5.2.1. Amostragem e Material Vegetal.....	50
5.2.2. Extração e Quantificação de DNA.....	51
5.2.3. Seleção de Primers SSR.....	52
5.2.4. Obtenção dos Marcadores.....	53
5.2.5. Avaliação dos Dados.....	54
5.2.5.1. Análise da Diversidade Genética e Índice de Fixação.....	54
5.2.5.2. Estrutura Genética Espacial.....	55
5.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	56
5.3.1. Seleção de Primers.....	56
5.3.2. Avaliação do polimorfismo dos Microssatélites.....	57
5.3.3. Freqüências Alélicas.....	57
5.3.4. Diversidade Genética.....	61

5.3.5. Estrutura das Populações.....	63
5.4. CONCLUSÕES.....	72
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73
7. ANEXOS.....	80

RESUMO

Gossypium mustelinum Miers ex Watt é a única espécie de algodão nativa do Brasil. É uma espécie endêmica do semi-árido nordestino do país, ocorrendo próximo a fontes de água mais duradouras. Os riscos para conservação *in situ* das populações estão associados a interferência humana em seu *habitat*, principalmente devido ao excessivo pastejo por bovinos e caprinos, além do desmatamento em matas ciliares. Estabelecer estratégias eficazes de conservação *in situ* depende da realização de um diagnóstico da espécie em seu ambiente natural, e do conhecimento acerca da estrutura genética das populações. Os objetivos deste trabalho foram: i) determinar as condições *in situ* de duas populações presentes em rios da bacia do Rio Paraguaçu no estado da Bahia, ii) avaliar a estrutura e variabilidade genética presente em ambas as populações, iii) e estabelecer estratégias de conservação *in situ* e *ex situ*. Foram realizadas coletas em novembro de 2007, quando foi realizada a caracterização *in situ* de *G. mustelinum*. Marcadores SSR foram usados para analisar 218 genótipos de duas populações, localizadas nos rios Tocó e Capivara. As frequências alélicas, a heterozigotidade e as estatísticas F foram estimadas. Todas as plantas foram classificadas como selvagens e nativas, e nenhuma evidência de exploração antrópica foi observada. As populações apresentavam diferentes condições de conservação *in situ*. Poucas plantas foram encontradas em locais onde havia prática de pecuária extensiva, um indício de que os danos causados a plantas jovens sejam maiores, comprometendo a renovação das populações. Em contraste, populações foram encontradas em adequadas condições de preservação quando os danos causados pela ação antrópica eram pequenos ou inexistentes. Os 14 pares de primers SSR amplificaram 17 locos com número médio de 5 alelos por loco (85 alelos no total). O alto índice de endogamia estimado ($F_{IS}=0,808$) e a baixa quantidade de heterozigotos ($H_o=0,093$) indicam que as populações propagam-se preferencialmente por autofecundação, geitonogamia e cruzamentos entre indivíduos aparentados. A diversidade genética total foi alta ($H_E=0,482$) e a diferenciação entre as populações foi muito elevada ($F_{ST}=0,328$). No mínimo duas sub-populações devem ser preservadas em cada rio para uma adequada conservação *in situ*. Ações de preservação das matas ciliares e que impeçam o acesso do gado às populações devem ser implementadas, erguendo cercas próximas as plantas. Não é possível prever se as sugestões propostas para preservação *in situ* serão implementadas. Coletas devem ser intensificadas e ações para preservação *ex situ* devem ser realizadas para conservação da diversidade genética presente nesta espécie nativa do Brasil.

ABSTRACT

Gossypium mustelinum Miers ex Watt is the only cotton species native from Brazil. It is endemic of the semi-arid region from North-east of the country, where it occur near from resilient water sources. The threats to the *in situ* conservation of the populations are caused by human interference in its habitat, mainly by excessive cattle graze and deforestation. Establish efficient strategies of *in situ* conservation depend on the accomplishment of a diagnosis of how the specie is found in its natural environment, and the knowledge about the genetic structure of the populations. The objectives of this work were *i*) to determine the *in situ* conditions of two populations present in rivers from basin of Rio Paraguaçu at the Bahia State, *ii*) to evaluate the structure and genetic variability presented in both populations, *iii*) to establish *in situ* and *ex situ* conservation strategies. It were realized collection in november 2007, when was realized *in situ* characterization of *G. mustelinum*. SSR markers were used for analyze 218 genotypes deriving from two populations of the *G. mustelinum*, localized at Tocó river and the Capivara river. The allelic frequencies, the heterozigosity and the F statics were estimated. All the plants were classified as wild and natives, and there was no evidence of the use the plants or its parts. The populations showed different conservation conditions *in situ*. Few plantlets were found in sites with excessive cattle feed, an indication that the damages in young plants should be high enough to compromise the renovation of the populations. On the other hand, populations were well preserved when the anthropic damages was low or inexistent. The 14 SSR primer pairs amplified 17 loci with a medium number of 5 alleles per locus (a total of 85 alleles). The high level of endogamy estimated ($F_{IS}=0,808$) and the low observed heterozygosity ($H_0=0,093$) were indicatives that the populations reproduce mainly by selfing, geitonogamy and crosses between related individuals. The genetic diversity was high ($H_E=0,482$) and the differentiation between the populations was very high ($F_{ST}=0,328$). At least two sites from both populations of *G. mustelinum* must be preserved to achieve suitable *in situ* conservation. Actions that preserve the gallery forest and keep the cattle away should implemented, and could be as simple as erecting a fence. It is not possible anticipated if the *in situ* preservation will be possible. Therefore collections and *ex situ* preservation of representative specimens are essential to conserve the genetic diversity of native *G. mustelinum*.

1. INTRODUÇÃO

Apesar do avanço tecnológico contemporâneo, algumas barreiras persistem no que diz respeito aos progressos genéticos dentro de programas de melhoramento. A maioria dos cultivares obtidos a partir desses programas resulta de seleção em populações sintetizadas usando variedades que já apresentavam características agrônômicas superiores. No caso do algodão, estudos de diversidade genética com espécies cultivadas mostram que as mesmas apresentam limitada diversidade. Isso ocorre por que a maioria das variedades de algodão *Gossypium hirsutum* L., espécie que contribui com a maioria das fibras produzidas mundialmente, foram desenvolvidas a partir de cruzamentos entre ancestrais próximos, o que acarreta menor ganho genético dentro dos programas de melhoramento.

A pressão exercida pelo mercado para se obter alta produtividade no cultivo do algodão tem estimulado pesquisas no sentido de reduzir a vulnerabilidade genética de cultivares, introduzindo germoplasma mais diversificado para aumentar a variabilidade genética. Nesse sentido *Gossypium mustelinum* Miers ex Watt pode representar uma valiosa fonte de alelos que poderiam conferir resistência a insetos, patógenos, adversidades ambientais, entre outras.

Até o início de 2006, apenas quatro populações naturais de *G. mustelinum* eram conhecidas. Elas estão localizadas nos municípios de Caicó no Rio Grande do Norte, e Macururê e Jaguarari no estado da Bahia. Apenas no final de 2006 novos sítios de ocorrência foram encontrados em bacias de alguns rios do Estado da Bahia.

Esta espécie ocorre próximo a fonte de água mais duradouras, sendo encontrada, principalmente, na mata ciliar de lagos e rios temporários. O principal problema para sua manutenção *in situ*, além do desmatamento, é a pecuária extensiva, particularmente de caprinos. Os animais se alimentam de brotos, folhas, frutos, sementes e da casca do caule, prejudicando o desenvolvimento e, em casos extremos, eliminando as plantas adultas. Desse modo, a renovação das populações também é comprometida, pois o pastejo em indivíduos jovens pode ocasionar sua completa destruição. Além disso, pouco se conhece a cerca da variabilidade genética das populações existentes.

É necessário estabelecer estratégias para conservar adequadamente as populações de *G. mustelinum* *in situ* e *ex situ*. Para elaborar tais estratégias é imprescindível conhecer a estrutura genética das populações.

Genomas eucariotos são densamente povoados por pequenas seqüências com um a seis nucleotídeos de comprimento, repetidas uma após a outra, denominadas de microssatélites. Estas regiões de DNA repetitivo apresentam alta mutabilidade, desempenhando um papel significativo na evolução do genoma, criando e mantendo variações genéticas quantitativas. Tomando por base esse conhecimento, um marcador molecular baseado em PCR foi desenvolvido visando à amplificação destas seqüências. Ele foi denominado microssatélite ou simplesmente SSR (*Simple Sequence Repeats*). Estes marcadores, por possibilitarem a análise de vários alelos e a distinção entre indivíduos homocigotos e heterocigotos, são os marcadores mais utilizados em estudos de diversidade genética atualmente. Para os algodoeiros, mais de 1500 locos microssatélites já foram isolados de bibliotecas de DNA.

Conhecimentos gerados acerca das condições *in situ*, da diversidade e estrutura genética de populações de *G. mustelinum* poderão fornecer subsídios que permitam a implementação racional de medidas para a conservação *in situ* e *ex situ* deste importante recurso genético.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. O Gênero *Gossypium*

Pertencente à ordem Malvales, à família Malvaceae e à tribo Gossypieae, o gênero *Gossypium* (algodoeiros) apresenta uma grande variação morfológica, sendo descrito desde arbustos perenes a pequenas árvores. Sua distribuição ocorre nos trópicos e subtropicais onde é caracteristicamente encontrado em regiões áridas ou semi-áridas (FRYXELL, 1965). O algodão é considerado a mais importante das fibras têxteis, naturais ou artificiais, sendo a planta de aproveitamento mais completo e que oferece os mais variados produtos. Sua utilização concentra-se na indústria de fiação e tecelagem e na indústria de alimentação animal (farelo) e humano (óleo), além de amplo número de produtos secundários, apresentando grande importância socioeconômica (RIGON et al., 2008).

De acordo com Fryxell (1965), a origem e diferenciação do gênero *Gossypium* ocorreu no período Mesozóico, entre 5 e 15 milhões de anos, tendo como centro de origem a África Central (VALICEK, 1978). Desde então evoluiu em oito grupos de espécies diplóides ($n=13$), denominados grupos genômicos diplóides (A, B, C, D, E, F, G e K) e um grupo de espécies alotetraplóides (Figura 1). Este último grupo emergiu da hibridização entre duas espécies diplóides, uma espécie cultivada no Velho Mundo pertencente ao genoma A, com uma espécie selvagem do genoma D, nativo da América (VALICEK, 1978). O evento que deu origem ao genoma AD ocorreu a aproximadamente 1,5 milhões de anos, provavelmente no México (WENDEL e CRONN, 2003; LIU et al, 2001). As espécies diplóides que realizaram essa hibridização estão extintas (ADAMS e WENDEL, 2004). Entre as espécies atuais, *G. raimondii* é considerado o ancestral mais próximo do doador do genoma D, e *G. herbaceum* e *G. arboreum* os descendentes mais próximos do genoma A (ADAMS e WENDEL, 2004) (Figura 1).

Atualmente estão identificadas quarenta e nove espécies no gênero *Gossypium*, dentre as quais apenas cinco são tetraplóides ($2n=52$). Destas espécies três são selvagens, *G. darwinii* nativa da ilha de Galápagos, *G. tomentosum* de ilhas do Havaí e *G. mustelinum* que têm como centro de origem o Nordeste do Brasil. As

outras duas espécies tetraplóides são as mais importantes cultivadas, *G. hirsutum* e *G. barbadense* (ADAMS e WENDEL, 2004). Todas essas espécies são sexualmente compatíveis (FREIRE et al. 2002).

As espécies tetraplóides cultivadas tiveram origens em centros de domesticação independentes. *G. hirsutum* é originária da região que compreende a Guatemala e o México, na América Central, e *G. barbadense* entre o Peru e o Equador, na América do Sul (STEPHENS, 1967). Um dos primeiros relatos de cultivo de algodoeiros data de 3500 A.C., período a que pertencem os fragmentos macrobotânicos encontrados em uma floresta tropical durante escavações no Vale de Ñanchoc próximos ao Andes, no norte do Peru (DILLEHAY et al., 2007).

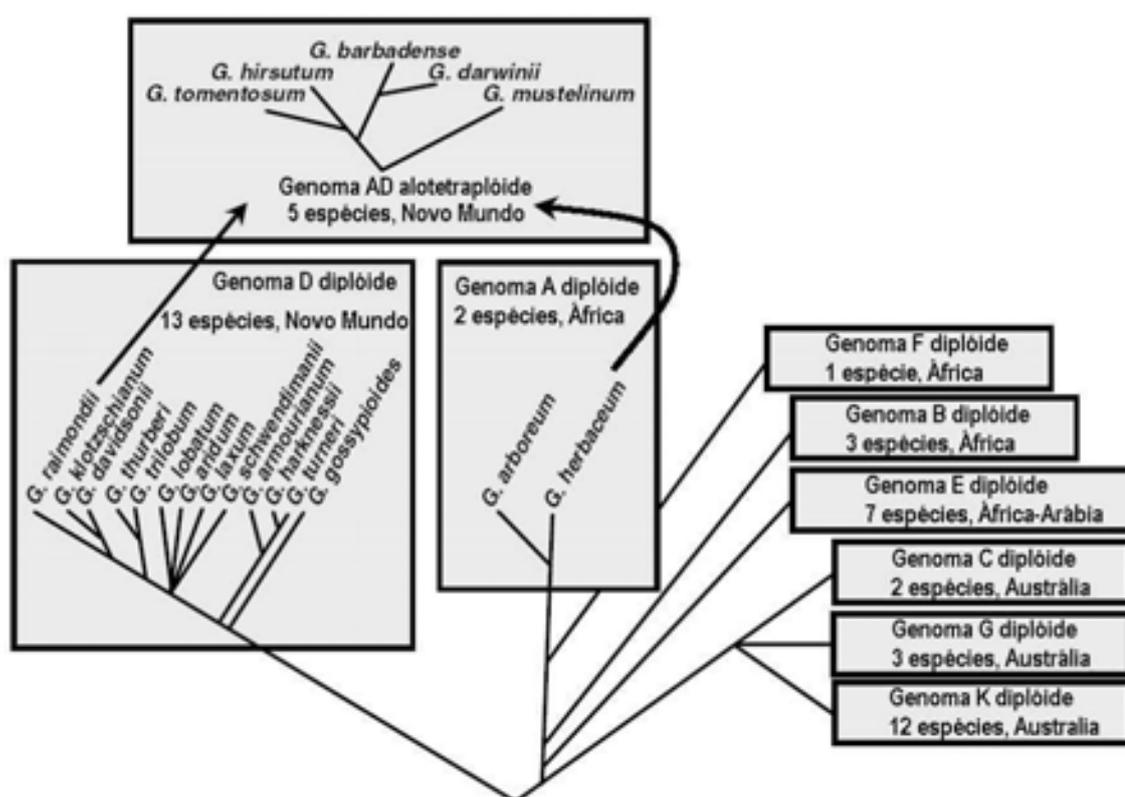


Figura 1. História evolucionária dos grupos genômicos diploides e tetraploides do gênero *Gossypium*, determinado por dados nucleares e cloroplastiais. Adaptado a partir de Wendel e Cronn (2003).

A espécie *G. hirsutum* r. *latifolium* Hutch, denominada algodoeiro herbáceo, é encontrada quase que exclusivamente na forma de cultivares, sendo responsável por mais de 90% da produção mundial de algodão (WENDEL e CRONN, 2003). De acordo com o ICAC (International Cotton Advisory Committee) a área cultivada no mundo vem aumentando progressivamente, crescendo 32% em pouco mais de 50

anos, nos mais de 100 países onde é cultivado. Na safra de 2007/2008 foram produzidos 26,6 milhões de toneladas de algodão, sendo que China, Índia, Estados Unidos e Paquistão somam 72,7% da produção mundial (COSTA et al., 2008).

Ao decorrer de 10 anos, entre 1998 e 2008, o Brasil passou de importador para exportador, consumindo 3,6% da produção mundial e ocupando a quinta colocação dentre os países que mais produzem algodão no mundo, respondendo por 5,7% da produção (COSTA et al., 2008). Mato Grosso e Bahia são os principais produtores, sendo responsáveis por 81,1% da produção nacional (RIGON et al., 2008). O 12º levantamento de grãos da Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB) aponta que na safra 2007/2008 a produção nacional de algodão foi a maior de todos os tempos, com 2,5 milhões de toneladas de algodão em caroço e 1,6 milhão de toneladas de algodão em pluma.

Com a expansão da cultura alastraram-se também as pragas e doenças. De acordo com Paiva (2007), o cultivo convencional de algodão depende fortemente da utilização de defensivos químicos para controlar pragas e doenças, consumindo cerca de 20% dos defensivos utilizados em todo o mundo. Dentre as pragas que apresentam importância econômica, uma das principais é a lagarta rosada (*Pectinophora gossypiella*). A mariposa põe seus ovos entre as brácteas e a maçã, local onde as lagartas penetram após a eclosão dos ovos. Estas lagartas apresentam coloração branco-leitosa quando pequenas e rosadas quando crescidas (MIRANDA e SUASSUNA, 2004). Segundo os mesmos autores, as plantas danificadas por esta praga apresentam flores em aspecto de roseta, murcha e queda dos botões florais, maçãs destruídas total ou parcialmente, e fibras e sementes danificadas.

O desenvolvimento de cultivares visa atender as demandas de cadeia produtiva das culturas. Segundo Rigon et al. (2008), uma importante base da cotonicultura brasileira é a pesquisa, pois é o conhecimento, traduzido em tecnologias, que impulsionam a lavoura e toda a cadeia produtiva. Para que os ganhos genéticos permaneçam elevados, é essencial introduzir novas variedades a cada ciclo. A exploração de espécies selvagens tetraplóides de algodão, como *G. tomentosum*, *G. darwini* e *G. mustelinum*, podem constituir adição de alelos associados a diversas características de interesse agrônomo (HASENKAMPF e MENZEL, 1980; JIANG et al., 1998; SARANGA et al., 2001).

2.2. *Gossypium mustelinum* Miers ex Watt

A única espécie de *Gossypium* endêmica do Brasil foi originalmente descrita por Watt em 1907, baseado em material vegetal coletado por Gardner em 1838. *Gossypium mustelinum* Miers ex Watt é uma espécie selvagem, ou seja, ocorre espontaneamente no semi-árido, em pequenas populações próximas a fontes de água mais duradouras como margem de rios e lagoas temporárias (FREIRE et al., 1990; PICKERSGILL et al., 1975). Uma ambigüidade na denominação da espécie ocorreu quando Aranha e Leitão (1969) descreveram uma espécie de algodoeiro encontrado na serra da Formiga no município de Caicó, que apresentava frutos pequenos, fibras escassas, curtas e coloridas, classificando-a com *Gossypium caicoense*. Relatos de que esta classificação não seria adequada foi evidenciada por Pickersgill et al. (1975), demonstrando que ela poderia ser a mesma forma descrita por Pearse em 1921. De fato, *G. caicoense* e *G. mustelinum* eram a mesma espécie, conforme foi verificado após coletas realizadas na mesma região, estudos de comparações morfológicas e análise de modelos de bandejamento cromossômico (VALICEK 1977; FRYXELL, 1984; FREIRE et al., 1990).

As primeiras plantas da espécie foram localizadas no município do Crato no Ceará. Contudo nenhum outro material semelhante foi encontrado na região pelas expedições realizadas por Neves et al. (1965), Freire et al. (1990) e Vidal Neto et al. (2005). Estes autores relatam que a devastação e a exploração agrícola da região (cariri cearense) não possibilitaram a preservação desta espécie de algodão. Assim até o início de 2006, apenas quatro populações naturais de *G. mustelinum* eram conhecidas nos municípios de Caicó no Rio Grande do Norte, e Macururé e Jaguarari na Bahia. Apenas no final de 2006 novos sítios de ocorrência foram localizados (P. A. V. Barroso, Comunicação pessoal). Novas populações também foram identificadas na Bahia, em bacias de alguns rios nos municípios de Nova Fátima, Iaçú, Milagres, Jequié, Boa Nova e Manoel Vitorino (ALVES et al., 2008a e 2008b).

Freire et al. (2003) ressaltam que no passado *G. mustelinum* aparentemente foi uma importante espécie das matas ciliares em algumas localidades do semi-árido Nordeste. São plantas arbóreas, com folhas pequenas e bastante pubescentes, flores amarelas com mancha, pólen amarelo-claro, capulho pequeno, e cônico bem

espaçado e sementes com línter curto e marrom (PICKERSGILL et al., 1975) (Figura 2). Aranha e Leitão (1969) demonstram ainda que a espécie apresenta pubescência nas linhas de sutura dos lóbulos dos capulhos, fibras bastante aderentes à semente e pouco torcidas.

Foi, até recentemente, a espécie alotetraplóide menos conhecida do gênero (WENDEL, et al., 1994), por não apresentar, ou não ter sido avaliada, quanto a características de interesse agrônomo, nunca foi melhorada ou explorada comercialmente (FREIRE et al., 2003).

Esta espécie selvagem apresenta diferenças tanto morfológicas (SANTOS, 1985) quanto cromossômicas (HASENKAMPF e MENZEL, 1980) de *G. hirsutum*. As distinções são evidenciadas pela posição filogenética da espécie dentro do grupo tetraplóide, descrita por Wendel e Cronn (2003). Nesta classificação há formação de dois ramos, um conduzindo a *G. mustelinum*, e outro contendo as outras quatro espécies com *G. hirsutum* e *G. tomentosum* formando um grupo irmão de *G. barbadense* e *G. darwinii* (Figura 1).

G. mustelinum pode representar uma fonte de variabilidade genética que pode ser utilizada em programas de melhoramento (HASENKAMPF e MENZEL, 1980). Do mesmo modo, Santos (1985) descreveu que cruzamentos entre *Gossypium mustelinum* e algodoeiro herbáceo podem contribuir para a melhoria das características da fibra dos cultivares.

O principal problema para a manutenção *in situ* desta espécie, além do desmatamento, é a pecuária extensiva, particularmente de caprinos. Os animais se alimentam de brotos, folhas, frutos, sementes e da casca do caule, prejudicando o desenvolvimento e, em casos extremos, eliminando as plantas adultas. A renovação das populações também é comprometida, pois o pastejo em indivíduos jovens pode ocasionar sua completa destruição, reduzindo o número de indivíduos das populações (BARROSO et al., 2005b). Além disso, pouco se conhece a cerca da variabilidade genética das populações existentes. Batista (2005) demonstra que nas populações de *G. mustelinum* dos municípios de Macururé, Jaguarari e Caicó verifica-se significativo número de alelos exclusivos e elevada diferença entre as populações.

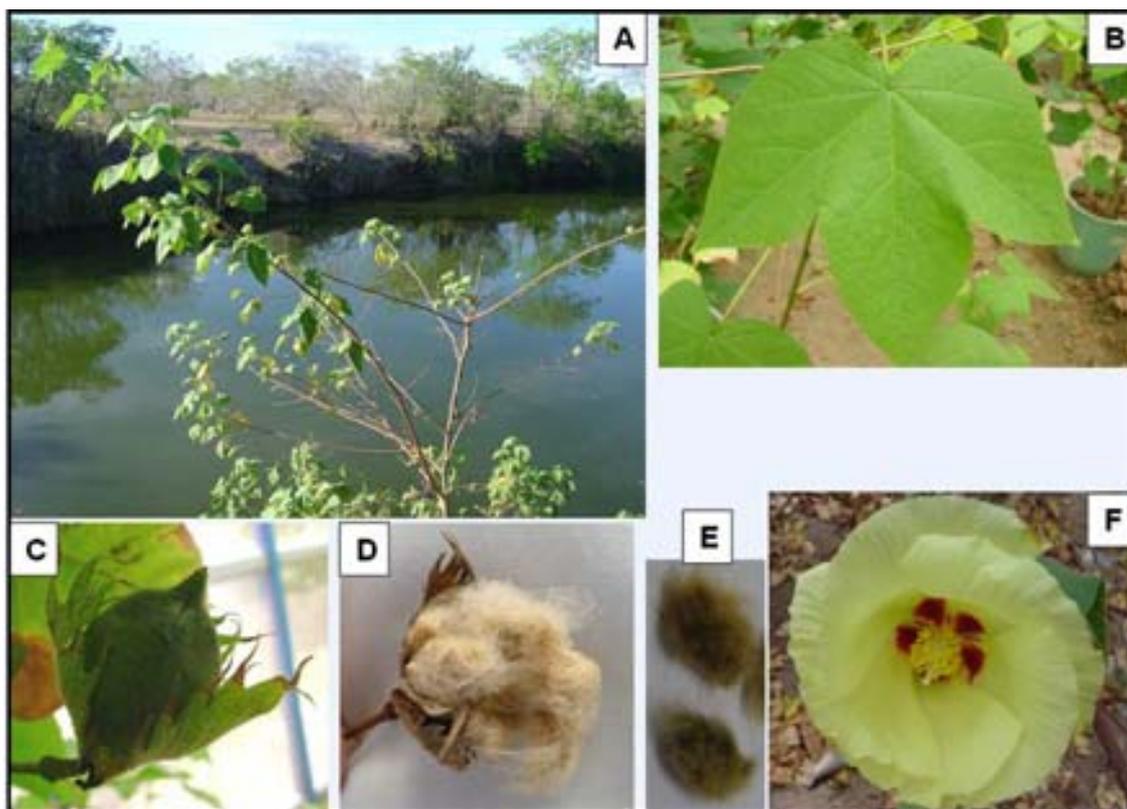


Figura 2. Características morfológicas da espécie *Gossypium mustelinum*. **(A)** Espécie em seu ambiente natural. **(B)** Folha. **(C)** Maçã. **(D)** Capulho. **(E)** Semente. **(F)** Flor.

2.3. Conservação do Germoplasma

A preocupação com as conseqüências da degradação dos ecossistemas vem sendo objeto de discussão e estudos nos últimos anos (AZEVEDO, 2007). Segundo Medeiros (2003), a América Latina é a região com a maior diversidade biológica e com o maior número de espécies endêmicas do planeta, sendo o Brasil o quarto na lista dos países com o maior número de espécies.

A vulnerabilidade de ecossistemas a mudanças bruscas, causadas, sobretudo, pela aceleração na modernização da agricultura, especialmente manifesta após a metade do século passado, tem por conseqüência a redução do tamanho de populações naturais ou mesmo o seu desaparecimento (ZUCCHI, 2002). Além disso, a substituição das espécies selvagens por variedades que apresentam características adaptativas mais favoráveis às condições ambientais pode conduzir a perda de biodiversidade das populações selvagens, antes mesmo que o seu potencial seja conhecido. Desse modo, a conservação é um aspecto de

fundamental importância, devido ao potencial que espécies ainda não exploradas apresentam.

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

Uma vez disponível o germoplasma, torna-se necessário o desenvolvimento de procedimentos de caracterização e avaliação do mesmo, para definição de estratégias que permitam sua adequada utilização e conservação. Essa avaliação pode ser feita através de marcadores genéticos.

2.4. Marcadores Genéticos

De acordo com Borém (2001), marcadores genéticos são quaisquer características, processos bioquímicos ou fragmentos de DNA que permitem a distinção de indivíduos geneticamente diferentes. Para Freitas e Bered (2003) estes, ainda, são caracteres qualitativos que se expressam através de herança mendeliana simples. Várias classes de marcadores genéticos têm sido utilizados em plantas:

Marcadores morfológicos são fenótipos de fácil identificação, normalmente identificados por um único loco e geralmente apresenta herdabilidade igual a 1,0 (RAMALHO et al., 2008). Representam os primeiros marcadores a serem utilizados nos estudos de genética e melhoramento de plantas, por estarem ligados a características morfológicas de fácil identificação visual. Entretanto, esses marcadores apresentam uma série de limitações, pois nem sempre possuem herdabilidade igual a 1 e estão sujeitos a variações ambientais. Alguns apenas são

observáveis nas plantas adultas, são, frequentemente, controlados por genes dominantes (FREITAS e BERED, 2003), e principalmente ocorrem em número reduzido não sendo possível observar alelos de interesse para vários genes (RAMALHO et al., 2008). Em alguns casos, uma simples avaliação fenotípica não permite encontrar associações entre estes marcadores e caracteres de importância econômica.

Os marcadores bioquímicos mais utilizados em análises genéticas e no melhoramento vegetal são as isoenzimas (FREITAS e BERED, 2003). De acordo com Ferreira e Grattapaglia (1998) isoenzimas é um grupo de múltiplas formas da mesma enzima que ocorrem em uma espécie. Como estes marcadores possibilitam a análise da variação do produto dos genes, basta identifica-los para selecionar o indivíduo com o fenótipo desejado (RAMALHO et al., 2008). Entretanto, como o número de isoenzimas é relativamente pequeno e possuem reduzida variabilidade, a probabilidade de encontrar uma delas ligada a um gene de importância é reduzida (BORÉM, 2001).

Fragmentos de DNA que permitem a distinção de indivíduos diferentes são tidos como marcadores moleculares (BORÉM e SANTOS, 2004). Começaram a ser utilizados na década de 80 e sua maior vantagem reside na grande variabilidade que se observa entre indivíduos de uma espécie (RAMALHO et al, 2008). Baseiam-se em polimorfismos de regiões expressas ou não do genoma, não refletindo a diversidade de genes, sendo que a estimativa é, na verdade, uma diversidade genética molecular (AZEVEDO, 2007). Pelo fato destes marcadores revelarem informações a nível de DNA, sua expressão não é influenciada pelo ambiente. Essa ferramenta da biotecnologia permite a obtenção de um grande número de marcas moleculares com herança dominante ou codominante, que apresentam ampla cobertura genômica.

Várias técnicas foram desenvolvidas para estas análises, baseadas na variabilidade genética existente entre e dentro das espécies de interesse (BORÉM e SANTOS, 2004). Elas oferecem diversos subsídios que auxiliam nos procedimentos de análise de diversidade genética (RIBEIRO, 2008; BERTINI et al, 2006; RANA et al., 2005; LACAPE et al., 2007), estrutura de populações (WESTENGEN et al, 2005; AZEVEDO, 2007; ZUCCHI, 2002), manutenção e enriquecimento de coleções de germoplasma (ALMEIDA, 2007; ULLOA et al., 2006), estudos de filogenia (KHAN et

al., 2000) desenvolvimento de mapa genéticos (GUO et al., 2007; SHAPPLEY et. al., 1998; ZHANG et. al., 2002; RONG et. al., 2004), entre outros.

O RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), que significa polimorfismo de fragmentos de restrição, foi a primeira técnica desenvolvida. Como o nome sugere, é baseado na digestão do DNA genômico com enzimas de restrição. Contudo, atualmente as técnicas mais difundidas e utilizadas são baseadas na reação da polimerase em cadeia (PCR – *Polymerase Chain Reaction*). Esta técnica foi concebida em meados da década de 80 por Kary Mullis (MULLIS e FALOONA, 1987), e revolucionou a biologia. Possibilita realizar estudos genético-moleculares envolvendo grande número de indivíduos em qualquer fase do seu desenvolvimento, desde que haja quantidade suficiente de DNA para análise. Ela envolve a síntese *in vitro* de milhões de cópias de um fragmento sintético de DNA de tamanho definido a partir do DNA de amostras biológicas, também chamado DNA molde (BORÉM e SANTOS, 2004). Os fragmentos amplificados são delimitados por um par de pequenas moléculas de DNA de fita simples, denominadas de oligonucleotídeos (*primers*). Os primers são complementares à seqüências do DNA molde e servem de iniciadores para extensão enzimática.

A PCR serviu de embasamento para o desenvolvimento de novas classes de marcadores. A primeira delas foi denominada RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), DNA polimórfico amplificado randomicamente. Nesta técnica, regiões codificadoras ou não do genoma são avaliadas por meio da presença ou ausência do fragmento amplificado por um iniciador curto (10 pares de bases) e aleatório. O polimorfismo é detectado pela mutação, inserções e deleções no sítio de anelamento do iniciador, que por apresentar pequeno comprimento, possibilita a amplificação de diversos fragmentos ao mesmo tempo. Desse modo, muita informação é gerada em pouco tempo, além de possibilitar a utilização em diferentes espécies. A principal característica desses marcadores é a dominância, ou seja, não é possível distinguir indivíduos homozigotos de heterozigotos. Assim a ausência da banda no gel é atribuída a genótipo homozigoto, enquanto genótipos em que a banda está presente podem ser homozigotos ou heterozigotos.

A técnica baseada em PCR mais usada atualmente, é fundamentada em seqüências repetitivas de nucleotídeos existentes em grande quantidade em genomas eucariotos (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998). Pequenas seqüências com um a seis nucleotídeos de comprimento, repetidas em *tandem* (uma após a

outra) foram denominadas microssatélites (FREITAS E BERED, 2003). Devido a sua alta mutabilidade, os microssatélites desempenham um papel significativo na evolução do genoma, criando e mantendo variações genéticas (TÓTH et al., 2000). Tomando por base esse conhecimento, um novo tipo de marcador molecular baseado em PCR foi desenvolvido visando à amplificação destas seqüências, e foi denominado microssatélite ou SSR (*Simple Sequence Repeats*).

Cada loco microssatélite é analisado individualmente, sendo obtido pela utilização de um par de iniciadores específicos (com vinte a trinta pares de bases) complementares às seqüências únicas que flanqueiam o microssatélite. Estas seqüências são conservadas, permitindo que *primers* específicos a elas sejam sintetizados e utilizados para amplificar especificamente esta região. O polimorfismo é baseado na variação do número de seqüências simples amplificadas em um determinado loco. Segmentos amplificados são distintos com base em diferentes números de unidades repetitivas, que se refletem em diferenças de tamanho, medidas em pares de bases (pb) (HARDY, 2003).

A detecção dos locos SSR é feita em gel de eletroforese utilizando-se poliacrilamida desnaturante ou agarose especial de alta resolução. A visualização das bandas no gel pode ser feita diretamente por coloração com brometo de etídio ou nitrato de prata. Em espécies diplóides, cada loco microssatélite analisado pode apresentar até duas bandas, caso haja dois alelos diferentes por indivíduo (um materno e um paterno) (BORÉM e SANTOS, 2004).

Locos SSR possuem expressão codominante, ou seja, ambos os alelos de um indivíduo heterozigoto são visualizados, e são altamente multialélicos. Desse modo, marcadores microssatélites possuem elevado conteúdo de informação de polimorfismo. Entretanto a maior limitação desta técnica é a grande quantidade de trabalho necessário para o desenvolvimento de iniciadores, já que requer seqüenciamento prévio de partes específicas do DNA em estudo, além do alto custo financeiro (ZANE et al., 2002).

O uso de marcadores microssatélites em estudos populacionais, onde centenas de indivíduos são genotipados, evoluiu consideravelmente após o desenvolvimento de sistemas automatizados, que buscam a informação de sistemas *multiplex* e metodologias que possam diminuir a marcação fluorescente, cujo custo é elevado, sem perder a qualidade e precisão da genotipagem (AZEVEDO, 2007). Sistemas automáticos capilares de eletroforese separam o DNA por tamanho,

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

No caso do algodão, numerosos marcadores moleculares do tipo SSR foram desenvolvidos (NGUYEN et al., 2004; LACAPE et al., 2003; LIU et al., 2000a e 2000b). Além disso um banco de dados desses marcadores foi organizado por Blenda et al. (2006), tornando possível, através do endereço eletrônico <http://www.cottonmarker.org> - "Cotton Microsatellite Database", o acesso aos marcadores SSR desenvolvidos para algodão, sendo utilizados para analisar as diferentes espécies cultivadas e exóticas do gênero.

2.5. Diversidade e Estrutura Genética de Populações

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 (ELLSTRAND e ELAM, 1993).

A variação genética aparece devido às diferenças nas constituições genéticas, que geralmente surgem por mutações (RAMALHO et al., 2008). Assim, a diversidade tem sido associada ao nível de variabilidade gênica existente dentro de cada população (NEI, 1973). A diversidade genética pode contribuir para a preservação das espécies, sendo que sua mensuração auxilia a priorização de populações onde existe maior variação (ELLSTRAND e NEEL, 2003). A magnitude da diversidade é influenciada por vários fatores, como o número de locos em segregação, o número de alelos em cada loco, o efeito dos alelos no fenótipo, a distribuição dos locos nos cromossomos e a interação entre alelos de diferentes locos (BARROSO e HOFFMANN, 2003).

A caracterização genética permite a identificação e o conhecimento detalhado do germoplasma (ELLSTRAND e NEEL, 2003). A alta diversidade genética, a

riqueza alélica e a presença de alelos raros e exclusivos são fundamentais para uso adequado dos recursos genéticos e para que estratégias eficazes de conservação sejam tomadas a fim de assegurar a manutenção da variabilidade genética das espécies (NAZARENO et al., 2008).

De acordo com o princípio de Hardy-Weinberg, em uma população de tamanho finito que prática cruzamentos ao acaso, as freqüências gênicas e genótípicas permanecem constantes de geração para geração na ausência de migração, seleção, mutação e deriva. Este princípio permite o cálculo teórico da freqüência de um determinado genótipo independente do número de alelos existentes. A deriva genética é a mudança aleatória nas freqüências alélicas que ocorrem quando a transferência de gametas de uma geração para outra leva apenas uma parte dos alelos presentes na geração parental. Ellstrand e Elam (1993) mostram que a deriva genética muda a distribuição da variação genética. Primeiramente pela diminuição da variação genética dentro das populações, com a perda de heterozigosidade. Também pode ocasionar a fixação de alelos, aumentando a diferenciação entre as populações. Assim, o tamanho das populações representa um fator crucial uma vez que, segundo Frankham e Reed (2003), populações pequenas que se reproduzem por autofecundação ou por cruzamento entre parentes, apresentam maior tendência de aumentar a homozigosidade dentro das populações.

A mensuração da diversidade genética é refletida principalmente pela heterozigosidade, a freqüência dos alelos e sua fixação na população. A heterozigosidade esperada (H_e) diz respeito à probabilidade de dois gametas, tomados ao acaso de uma população, apresentarem alelos diferentes em um determinado loco, sendo definida como diversidade genética de Nei (1973), e a heterozigosidade observada (H_o) representa a taxa real de indivíduos heterozigotos na população estudada. A relação entre esses parâmetros define o índice de fixação (f) cuja média é o desvio da proporção dos indivíduos heterozigotos observados do esperado segundo o equilíbrio de Hardy-Weinberg. Este índice, que é o mesmo valor F_{IS} das estatísticas F de Wright (Wright, 1965), é o valor médio do índice de fixação dos alelos dentro de populações, e caracteriza o nível médio de endogamia intrapopulacional.

$$\hat{f} = 1 - \frac{\hat{H}_0}{\hat{H}_e} \text{ (ao nível de loco)} \quad \hat{f} = 1 - \frac{\sum \hat{H}_0}{\sum \hat{H}_e} \text{ (média entre locos)}$$

As estatísticas de Wright e Nei correspondem entre si, sendo a estatística de Nei utilizada quando o interesse se concentra especificamente nas populações examinadas, e a estatística de Wright visa fazer inferências sobre a distribuição teórica da variabilidade genética.

As estatísticas F permitem ainda, a caracterização da distribuição da diversidade genética entre as populações (F_{ST}), que corresponde ao G_{ST} da estatística de Nei, e dos níveis de endogamia para o total de populações (F_{IT}). As estatísticas F se relacionam, pois:

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

Onde:

F_{IS} = Índice de fixação ou coeficiente de endogamia intrapopulacional;

F_{IT} = Índice de fixação ou coeficiente de endogamia para o conjunto de populações;

F_{ST} = Índice de fixação ou divergência genética entre populações.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral:

- Caracterizar *in situ* e avaliar a estrutura genética das populações de *Gossypium mustelinum* de rios da bacia do rio Paraguaçu no estado na Bahia.

3.2. Objetivos Específicos:

- Identificar a distribuição de *G. mustelinum* em dois afluentes da bacia do rio Paraguaçu;
- Realizar o diagnóstico sobre as condições de preservação das populações *in situ*;
- Propor estratégias de conservação *in situ*;
- Coletar espécimens para conservação em bancos de germoplasma;
- Analisar a variabilidade genética dentro e entre as populações de *G. mustelinum* e suas respectivas sub-populações;
- Verificar se a diversidade genética está estruturada ao longo dos rios.

Capítulo 1

***C*aracterização *in situ* de populações de
Gossypium mustelinum em afluentes da bacia
do rio Paraguaçu no estado da Bahia**

RESUMO

Gossypium mustelinum Miers ex Watt é uma espécie tetraplóide nativa do Brasil, endêmica do semi-árido da região Nordeste. Na literatura estão descritas poucas populações da espécie nos estados da Bahia e do Rio Grande do Norte. Para determinar estratégias adequadas de conservação *in situ* é necessário avaliar as condições atuais da espécie em seu ambiente natural. Os objetivos deste trabalho foram: *i*) determinar as condições *in situ* das populações de *G. mustelinum* presentes em dois rios da bacia do Rio Paraguaçu (estado da Bahia) e *ii*) definir estratégias de conservação para preservar a espécie em seu habitat. Em Novembro de 2007 expedições aos rios Capivara e Tocó foram realizadas onde foi feita a caracterização das populações de *G. mustelinum* e do ambiente onde a espécie é encontrada. Nos diferentes locais de ocorrência foram encontrados desde 13 até centenas de plantas adultas. Todas as plantas foram classificadas como nativas e selvagens e não foi observada nenhuma evidência de sua utilização. As plantas, geralmente, ocorriam em matas ciliares de rios intermitentes e nas várzeas. As populações mostraram diferentes condições *in situ*. Poucas plantas foram encontradas em locais onde havia prática de pecuária extensiva, um indício de que os danos causados a plantas jovens sejam maiores, comprometendo a renovação das populações. Em contraste, populações foram encontradas em adequadas condições de preservação quando os danos causados pela ação antrópica eram pequenos ou inexistentes. Os problemas para conservação *in situ* das populações são a destruição das matas ciliares e o pastejo das plantas por caprinos e bovinos. O fluxo gênico não parece ser um risco real para conservação da espécie. Ações de preservação das matas ciliares e que impeçam o acesso do gado às populações devem ser implementadas, erguendo cercas próximas as plantas. A conservação *in situ* pode ser realizada se a Lei 7.803 (18/07/1989), que estabelece a extensão das áreas de preservação de cursos d'água, seja cumprida. Coletas devem ser intensificadas para a manutenção satisfatória *ex situ* em bancos de germoplasma.

ABSTRACT

Gossypium mustelinum Miers is a tetraploid species native from Brazil, and endemic of semi-arid of the North-east region. In literature are described few populations of this specie at Bahia and Rio Grande do Norte States. To delineate efficient strategies of *in situ* conservation it is necessary determining the actual conditions of the species in its natural environment. The objectives of this work were *i*) to determine the *in situ* conditions of populations of *G. mustelinum* present in two rivers from basin of Rio Paraguaçu (Bahia state) and *ii*) to define conservation strategies to preserve the species in its habitat. Expeditions to Tocó and Capivara rivers were realized in November 2007 and characterizations of the conditions of *G. mustelinum* populations and of the environment were performed. In different sites of occurrence were found from 13 to hundreds adult plants. All the plants were classified as wild and natives, and there was no evidence of use of the plants or of its parts. The plants, generally, occurred in the gallery forest of intermittent rivers and in wetlands. The populations showed different conservation conditions *in situ*. Few plantlets were found in sites with excessive cattle feed, an indication that the damages in young plants should be high enough to compromise the renovation of the populations. On the other hand, populations were well preserved when the anthropic damages was low or inexistent. The main problems for the *in situ* conservation of the populations were the destruction of its habitat and the cattle (caprine and bovine) pasture in plantlets. The gene flow does not seem to be a real risk for the specie conservation. Actions that preserve the gallery forest and keep the cattle away should be implemented, and could be as simple as erecting a fence. The *in situ* maintenance can be realized by if the Law 7.803 (18/07/1989), that establishes the extension of the preservation in water courses, was respected. Collections should be intensified for the suitable maintenance of the *ex situ* collections in germplasms banks.

4.1. INTRODUÇÃO

O algodoeiro é uma planta ereta, anual ou perene, pertencente à ordem Malvales, a família Malvaceae e ao gênero *Gossypium*. Atualmente estão identificadas quarenta e nove espécies do gênero, distribuídas nos continentes: Ásia, África, Austrália e América. Das espécies descritas, apenas cinco são alotetraplóides ($2n=52$), originárias da hibridização entre espécies diplóides dos genomas A e D representando, assim, o grupo genômico AD. Seus representantes são: *G. darwinii*, *G. tomentosum*, *G. hirsutum*, *G. barbadense* e *G. mustelinum*. Esta última apresenta como centro de origem o Nordeste do Brasil, sendo descritas até 2006 apenas quatro populações em municípios do estado da Bahia e do Rio Grande do Norte. É típica de regiões semi-áridas, do bioma da caatinga, ocorrendo próximo a fontes de água mais duradouras. É uma espécie selvagem, não havendo relatos acerca da sua utilização. O principal risco ao qual a espécie está submetida é a destruição do seu *habitat*, pois matas ciliares de rios, local onde estas plantas são encontradas, têm sido devastadas para retirada de madeira ou para a exploração agropecuária. Neste último caso, animais como ovinos, bovinos e principalmente caprinos alimentam-se de sementes, folhas e ramos de *G. mustelinum*, prejudicando a renovação das populações. Assim, a substituição das plantas adultas mortas devido a ações antrópicas ou de causa natural é muito lenta e contribui para o declínio das populações.

A preocupação com as consequências da degradação dos ecossistemas vem sendo objetivo de discussão e estudos nos últimos anos. A vulnerabilidade de ecossistemas a mudanças bruscas, causadas, sobretudo, pela aceleração na modernização da agricultura tem por consequência a redução do tamanho de populações naturais ou mesmo o seu desaparecimento. Desse modo, a conservação é um aspecto de fundamental importância, devido à diversidade que espécies ainda não exploradas economicamente podem apresentar.

Este trabalho teve por objetivos identificar sub-populações de *G. mustelinum* presentes em afluentes da bacia do rio Paraguaçu no estado da Bahia, realizar o diagnóstico sobre o estado de preservação da espécie *in situ*, propor estratégias de conservação, além de coletar espécimes para conservação em bancos de germoplasma.

4.2 MATERIAIS E MÉTODOS

4.2.1. Material Vegetal

A expedição de prospecção e coleta (Autorização do IBAMA número 13.973) foi conduzida entre os dias 7 e 17 de novembro de 2007, e abrangeu os municípios de Riachão do Jacuípe, Candeal, Ichu, Conceição do Coité e Itaberaba (Figura 3). Todas as cidades visitadas são banhadas por afluentes da bacia do rio Paraguaçu. Esta bacia localiza-se entre as coordenadas 11° 17' a 13° 36' de latitude sul, e 38° 50' a 42° 01' de longitude oeste, no estado da Bahia, e havia sido mencionada por Pickersgill et al. (1975). O rio Tocó flui de norte para sul, constituindo o limite oeste do Município de Riachão do Jacuípe. Trata-se de um rio inicialmente intermitente, em sua porção norte, que após a confluência com o riacho da Areia deságua no rio Jacuípe, no extremo sudoeste do município (VIEIRA et al., 2005a). O rio Capivara é um rio intermitente até as proximidades da confluência com o Ribeirão do Brejo, um dos seus afluentes pela margem direita, a partir de então, passa a ter caráter perene, dando origem ao açude Juracy Magalhães (VIEIRA et al., 2005b).

Dentro desta bacia, foram eleitas duas grandes populações naturais, uma no Rio Tocó e outra no Rio Capivara. Elas foram caracterizadas através da observação das condições do ambiente e, quando possível, foi feita entrevista com habitantes do local. As coordenadas (latitude, longitude e altitude) foram estabelecidas utilizando-se o Sistema de Posicionamento Global (GPS). Os dados coletados foram tabulados e sistematizados em gráficos, seguindo as informações presentes no Anexo 1.

Foram consideradas como sub-populações propícias para a caracterização e coleta aquelas que possuíam no mínimo 10 plantas, adultas ou ainda jovens. Folhas, sementes e estacas de *G. mustelinum* foram coletadas no rio Tocó e no rio Capivara, sendo que cada uma destas populações foi dividida em seis sub-populações que se estendiam desde a cabeceira dos rios até sua foz (Figura 4). Estes locais foram selecionados a partir de viagens de prospecção previamente realizadas em novembro e dezembro de 2006.

O material coletado foi enviado para Embrapa Algodão. As sementes foram armazenadas em câmara fria e as estacas foram acondicionadas em caixa de isopor

e transportadas para Embrapa, onde foram tratadas com solução de ácido indolacético 1%, plantadas em sacos plásticos. Parte das plantas obtidas foi usada para compor uma coleção de germoplasma *in vivo* de *G. mustelinum*

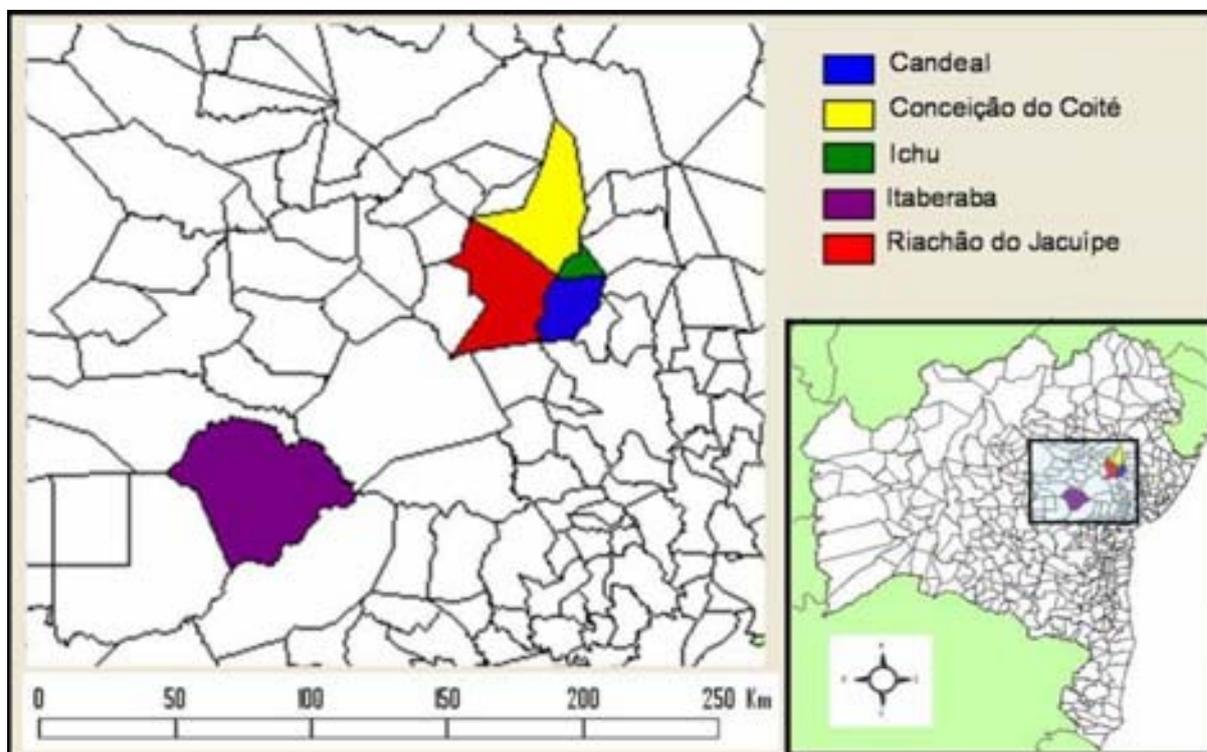


Figura 3. Municípios do estado da Bahia em que as populações de *Gossypium mustelinum* foram coletadas.

4.2.2. Ataque de *Pectinophora gossypiella* em *Gossypium mustelinum*

Para mensuração do nível de ataque de *Pectinophora gossypiella* Saunders, lagarta rosada, capulhos foram coletados nas duas populações. Estes foram cortados longitudinalmente e, com auxílio de uma lupa, foram minuciosamente examinados, considerando danificados os capulhos que não abriram, e os que apresentaram pelo menos uma das lojas com sinais de qualquer tipo de dano à semente. Foi calculada a média de capulhos atacados e a porcentagem de capulhos atacados por população, considerando o intervalo de confiança.

4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1. Dados Geográficos

Foram coletadas 265 plantas de *Gossypium* nos dois rios selecionados da bacia do rio Paraguaçu. No rio Tocó, sub-populações foram encontradas nos municípios de Riachão do Jacuípe, Candéal, Ichu e Conceição do Coité, e o rio Capivara, no município de Itaberaba, todos no estado da Bahia (Figura 3). Estes municípios estão inseridos no bioma Caatinga, sujeitos a atravessar longos períodos de estiagem, com temperaturas atingindo uma média anual de 30 graus (VIEIRA et al, 2005a e 2005b). A vegetação está catalogada nos tipos caatingas arbóreas densas e áreas de florestas estacionais e decíduais. As características edafoclimáticas destes municípios são similares às descritas por Neves et al. (1965), e por Pickersgill et al. (1975) que realizaram coletas desta espécie selvagem de algodão na Bahia e no Rio Grande do Norte, ratificando as características dos locais onde preferivelmente esta espécie é encontrada.

Em cada um dos rios, os acessos foram coletados em seis diferentes pontos, mantendo distancias que variaram desde 3 a 12 quilômetros entre si. Percorrendo no mínimo um quilômetro, quando possível, os pontos de coleta foram denominados: Tocó1 a Tocó6 no rio Tocó (Figura 4A) e Capivara1 a Capivara6 no rio Capivara (Figura 4B), que representaram sub-populações dentro das populações delimitadas nestes rios. Estes mesmos locais foram cadastrados na base de dados Albrana – Algodões Brasileiros Nativos e Naturalizados (www.cnpa.embrapa.br/albrana) – cuja localização pode ser consultada e estão identificados como os acessos descritos na Tabela 1.

A amostragem parece ter sido capaz de representar grande parte da variabilidade existente dentro dos rios, pois abrangeu praticamente toda a extensão dos mesmos. No rio Capivara, que possui cerca de 35 quilômetros de extensão, foram coletadas amostras desde 13 km após a nascente do rio (Capivara 6), até 1,3 km da formação do açude Juracy Magalhães (Capivara 1). Além disso, foram coletadas duas populações no Ribeirão do Brejo, afluente do rio Capivara pela margem direita, denominadas Capivara 5 e Capivara 6 (Figura 4B). As plantas foram

coletados no rio Tocó, que possui 64 quilômetros, desde 12 km após a nascente (Tocó 6) até aproximadamente a 1,5 km da foz do rio (Tocó 3) (Figura 4A).

Tabela 1. Identificação das sub-populações na base de dados Albrana*, explanando a denominação dos acessos neste banco de dados e a designação recebida no presente estudo.

Identificação dos acessos no Albrana*	Sub-população	Rio
BA 07 4	TC1	Tocó
BA 07 5	TC2	Tocó
BA 07 6	TC3	Tocó
BA 07 8	TC4	Tocó
BA 07 9	TC5	Tocó
BA 07 10	TC6	Tocó
BA 07 15	CP1	Capivara
BA 07 16	CP2	Capivara
BA 07 17	CP3	Capivara
BA 07 18	CP4	Capivara
BA 07 20	CP5	Capivara
BA 07 34	CP6	Capivara

* Algodões Brasileiros Nativos e Naturalizados

4.3.2. Dados das Populações

Conforme a Figura 5A, o maior número de acessos foi coletado no rio Capivara um total de 163 plantas, no rio Tocó foram amostradas 108 indivíduos. As plantas coletadas nas proximidades deste rio eram todas da espécie *G. mustelinum*. Além da espécie nativa, uma pequena quantidade de plantas de *G. hirsutum* e *G. barbadense* foram encontradas no rio Capivara (Figura 5B).

Em termos gerais, *G. mustelinum* ocorre de modo espontâneo principalmente na mata ciliar de rios, podendo ainda ser observado em várzeas e em locais onde existe uma fonte de água perene. Todas estas plantas foram classificadas como nativas, dispostas em populações selvagens. Nenhum indicio ou relato de cultivo ou utilização foi observado. Algumas destas plantas cresciam na faixa de rodagem de rodovias, próximas a pontes, locais onde geralmente são encontradas cercas que protegem as plantas da depredação causada pelo pastejo de caprinos e bovinos.

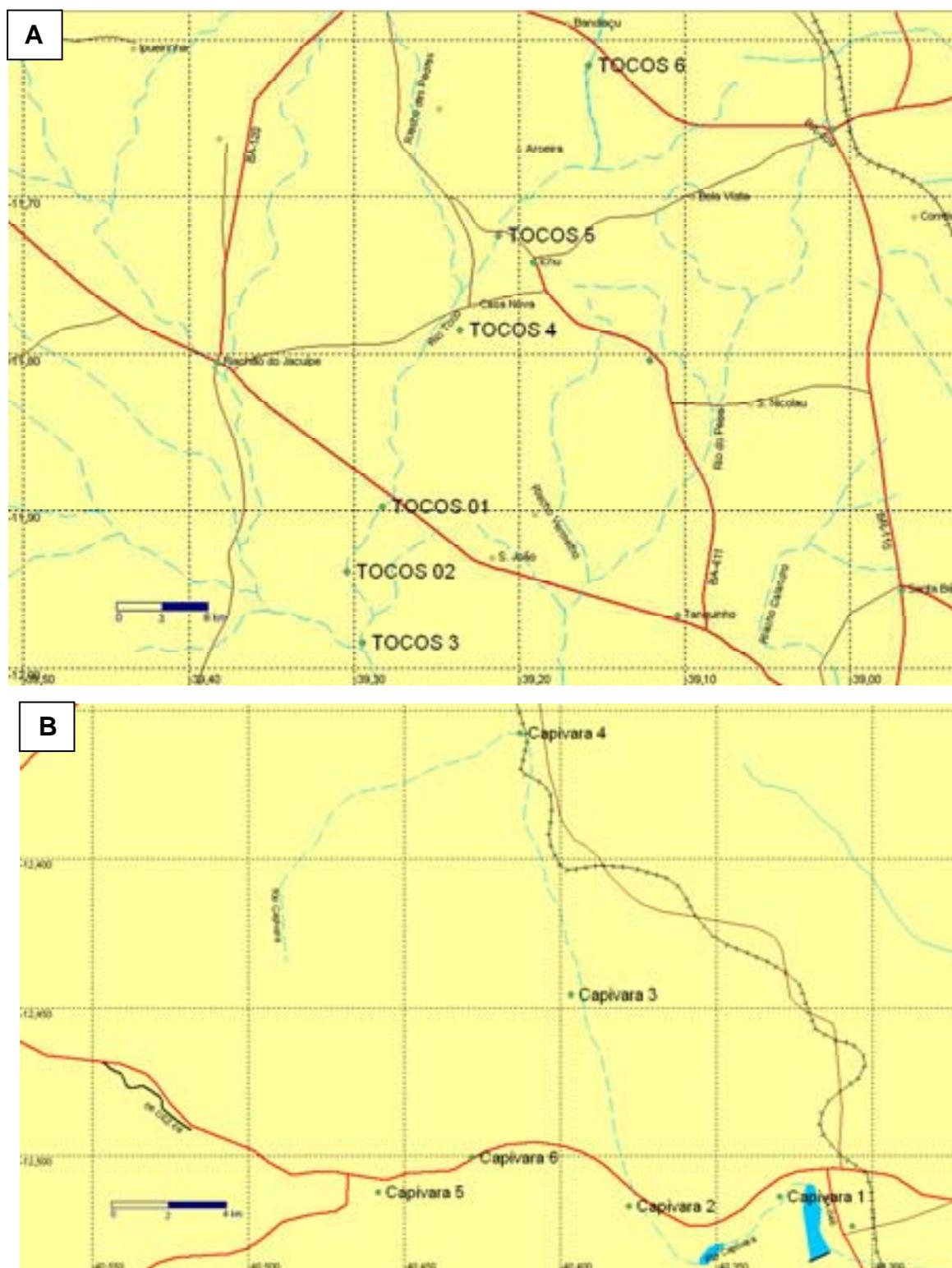


Figura 4. (A) Localização dos pontos de coleta do rio Tocó. Nos seis pontos foram coletadas amostras, desde aproximadamente 12 km da nascente do rio (Tocó 6) até aproximadamente a 1,5 km da foz do rio (Tocó 3). **(B)** Pontos de coletas no rio Capivara. Nos seis pontos foram coletadas amostras desde aproximadamente 13 km da nascente do rio (Capivara 4) até aproximadamente a 1,3 km da formação do açude Juracy Magalhães (Capivara 1). Além disso, foram coletadas duas populações no Ribeirão do Brejo (afluente do rio Capivara pela margem direita), denominadas Capivara 5 e Capivara 6. Fonte: Google Earth™, 2008 e GPS TracMaker.

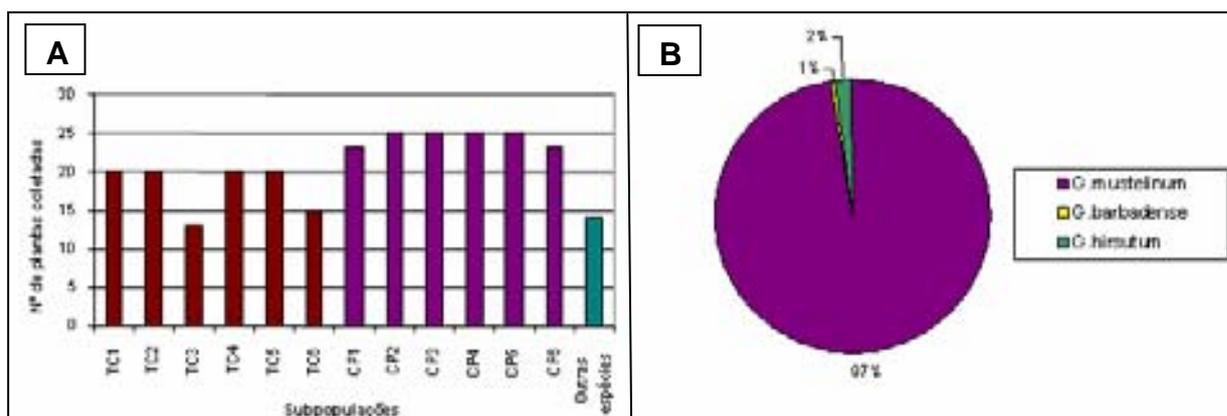


Figura 5. (A) Número de acessos coletados em cada sub-população. TC, sub-populações do rio Tocó; CP, sub-populações do rio Capivara; Outras espécies, representa o número de exemplares de algodoeiros *G. barbadense* e *G. hirsutum* encontrados nas proximidades dos locais de coleta. **(B)** Porcentagem das espécies do gênero *Gossypium* encontradas no rio Capivara.

Em locais muito secos as plantas estavam mais depauperadas, apresentando poucas folhas e quase nenhuma flor. Em contrapartida possuíam muitas sementes. Plantas vigorosas, com várias folhas e flores foram observadas em locais onde os rios apresentavam poças com água ou estavam cheios.

Uma característica observada nas plantas que apresentavam capulhos abertos é que suas sementes não ficavam contidas nos capulhos, as mesmas eram dispersas. Essa característica havia sido observada em expedições anteriores, onde foi constatado que alguns moradores chamavam *G. mustelinum* de “algodão de corrente”, uma vez que as sementes ficam ‘penduradas’ umas às outras formando uma estrutura similar a uma corrente (Figura 6A). Esta característica está associada à necessidade de espécies selvagens realizarem a dispersão das sementes. Freire et al. (1990), já havia teorizado que as sementes da espécie eram dispersas pela água. Esta hipótese foi corroborada pelas observações realizadas. Foram observadas sementes boiando na superfície de poços em que as plantas estavam localizadas (Figura 6B). Durante o período chuvoso a correnteza certamente distribuirá as sementes ao longo do rio.

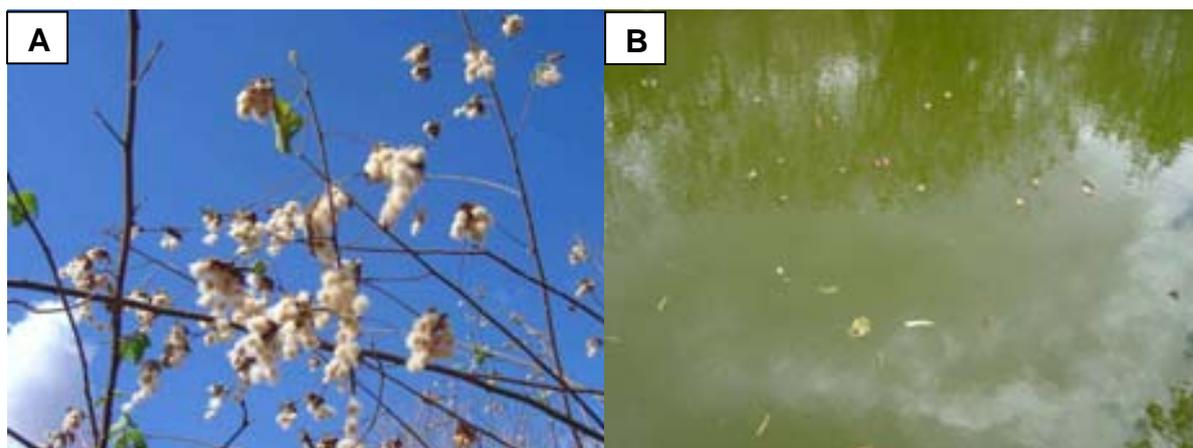


Figura 6. (A) Algodão de corrente. **(B)** Dispersão das sementes de *G. mustelinum* através da correnteza do rio.

O número de plantas em cada sub-população variou muito. A menor quantidade foi observada na Tocó3 e a maior na Capivara2 (Figura 7). As populações apresentavam diferentes condições de conservação *in situ*. Em locais em que havia pecuária extensiva, as plantas adultas apresentavam poucas folhas, eram mais baixas e possuíam poucas sementes, fruto do pastejo de caprinos, ovinos e bovinos. Entretanto, a intensidade dos danos causados pelo gado não parece ser capaz de matar estas plantas. Nesses locais, foi encontrada uma pequena quantidade de plântulas, um indicativo de que os danos em indivíduos jovens devem ser mais severos e podem estar dificultando a renovação das populações. Em alguns casos, o pastejo acarreta a retirada da casca do caule, resultando em interrupção parcial ou total da comunicação entre o sistema radicular e a parte aérea da planta. Este tipo de dano é mais severo do que a herbivoria em folhas e pontas dos ramos, podendo causar a morte das plantas (Figura 8B). Em alguns locais as plantas também eram podadas pelos proprietários para permitir o melhor desenvolvimento das gramíneas para alimentação do gado (Figura 8A). Em contraste, plantas que estavam nas matas ciliares protegidas da ação antrópica possuíam caule longo, relativamente fino, e extremamente ramificado que se curvava em direção ao leito do rio ou crescia escorado em outras espécies arbóreas na busca por luz solar (Figuras 9A e B).

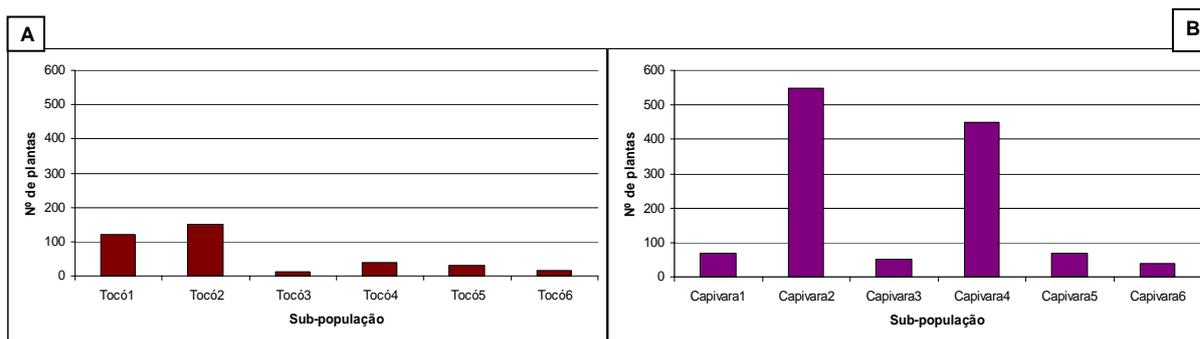


Figura 7. (A) Número estimado de plantas presentes em cada ponto de coleta do rio Tocó. Observa-se que a sub-população Tocó3 apresentou o menor número de plantas, e a Tocó2 o maior número. **(B)** Número estimado de plantas presentes em cada ponto de coleta do rio Capivara. A sub-população Capivara6 e Capivara2 apresentaram o menor e o maior número de plantas, respectivamente.

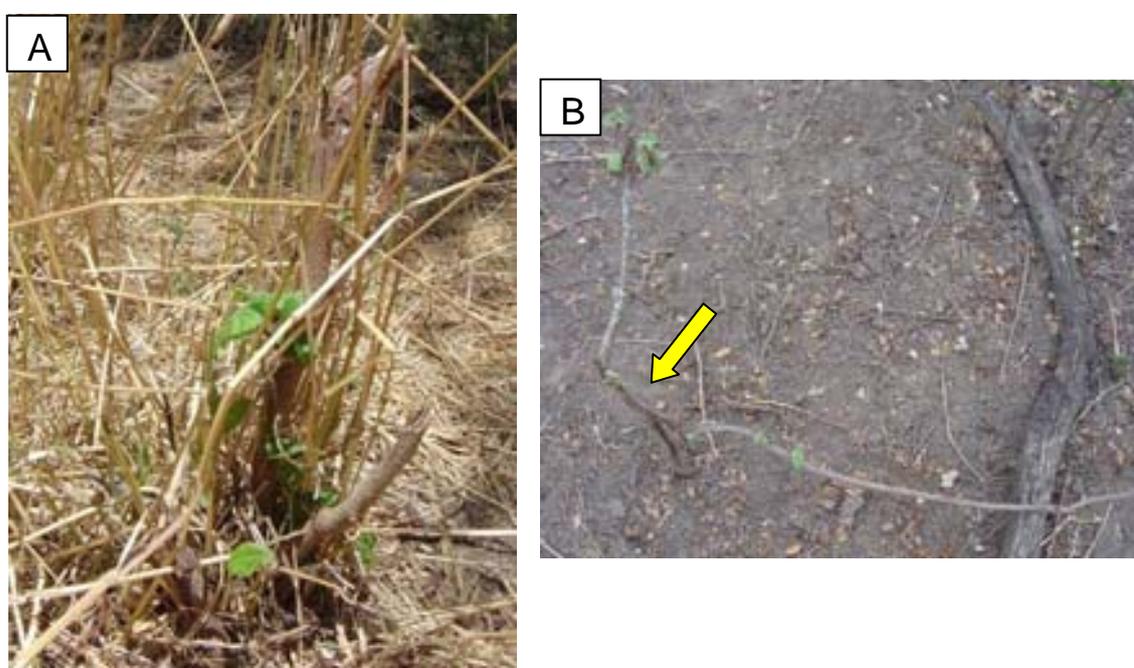


Figura 8. Danos às plantas devido à pecuária **(A)** Planta que havia sido podada, apresentando algumas folhas de ramos novos que ainda não haviam sido depredados. Pela espessura do seu caule, podemos supor que esta planta é podada frequentemente. **(B)** Plântula extremamente depredada pelo pastejo de caprinos ou bovinos. Seta amarela demonstra local onde a casca do caule foi arrancada, o que provavelmente causará a morte desta planta.

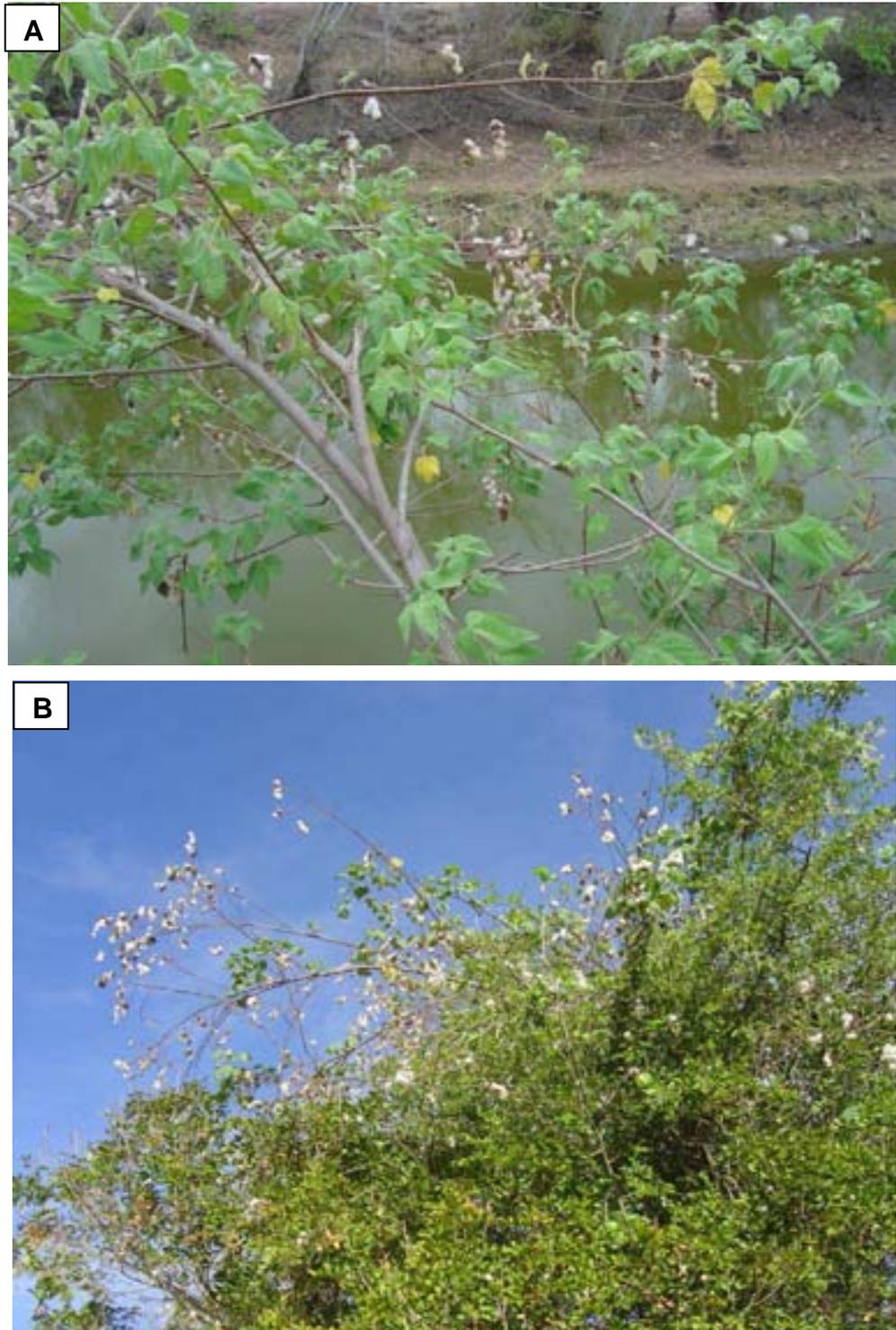


Figura 9. Local onde as matas ciliares estavam protegidas da ação antrópica. **(A)** Plantas possuem caule longo, relativamente fino, e extremamente ramificado que se curvava em direção ao leito do rio. **(B)** Planta crescendo escorada em outras espécies arbóreas na busca por luz solar.

4.3.3. Índice de Ataque de *Pectinophora gossypiella*

A principal praga desses algodoeiros no momento da coleta era a lagarta rosada (*Pectinophora gossypiella*). Foi observado um moderado índice de ataque nestas plantas, que apresentavam flores em aspecto de roseta, maçãs destruídas total ou parcialmente e sementes danificadas (Figura 10). A freqüência de capulhos atacados na população do rio Tocó foi de 29% ($\pm 2,4$), enquanto na população do rio Capivara, este índice foi menor, 18% ($\pm 5,4$). Apesar de *G. mustelinum* ser uma espécie selvagem de algodoeiro e não estar próxima a nenhuma lavoura de algodão, a percentagem de capulhos atacados foi similar a encontrada em plantas comerciais por Michelloto et al. (2003), que relatou índices que variaram entre 16,7% e 50%.



Figura 10. Sintomas típicos de ataque de lagarta rosada (*Pectinophora gossypiella*) no algodoeiro.

4.3.4. Descrição das condições *in situ* da população do rio Tocó

Nos locais visitados ao longo deste rio, foram observadas cerca de 350 plantas de *G. mustelinum* (Figura 6A), das quais foram coletados 108 exemplares em seis pontos. Estes pontos de coleta apresentaram altitude média de 215 metros, e estão localizados entre as coordenadas 11° 60' e 11° 98' de latitude sul e 39° 16' e

39° 50' de longitude oeste. Devido às diferentes condições observadas em cada um desses pontos, será percorrido sobre as sub-população separadamente.

Sob uma ponte na BR 324, a sub-população Tocó1 apresentou mais de 100 indivíduos adultos, além de várias plantas jovens que estavam comidas por gado bovino. Numa das margens do rio havia maior número de plantas, provavelmente devido à presença de uma cerca protegendo-as. Este seguimento do rio apresentava a mata ciliar bastante conservada e diversos poços, condições favoráveis às plantas. Os indivíduos apresentavam porte alto e caules grossos, sendo observados alguns que estavam florescendo. A maioria das plantas apresentava grande quantidade de sementes.

A segunda sub-população, Tocó2, apresentava condições similares às descritas para a sub-população Tocó1. Porém este trecho do rio apresentava um poço maior ao invés de diversos pequenos poços. Neste local foram encontradas em torno de 150 plantas.

Próximo à foz, o encontro do rio Tocó com o rio Jacuípe (Tocó3). Das 13 plantas encontradas, 12 eram adultas, e estavam bastante dispersas umas das outras. Apesar de o rio adquirir caráter perene neste local, oferecendo boas condições ao desenvolvimento deste algodoeiro, a forte prática de pecuária certamente está impedindo a renovação desta sub-população.

Na sub-população Tocó4 foram encontrados menos de 50 indivíduos. Em uma das margens, a prática da agricultura ocasionou o desmatamento da mata ciliar, de modo que apenas quatro plantas foram observadas. Na outra margem, os indivíduos adultos encontrados estavam em locais onde caprinos e bovinos não tinham acesso, devido à presença de uma cerca. Algumas plantas jovens foram encontradas após a cerca, no meio do pasto. Elas apresentavam galhos quebrados e estavam intensamente comidas pelos animais.

Apesar da boa conservação da mata ciliar, menos de 40 plantas foram encontradas na sub-população Tocó5. Semelhante a outras populações, as plantas encontradas neste local estavam protegidas por cerca, havendo plantas bastante altas, crescendo escoradas em outras espécies arbóreas na busca por luz solar (Figura 9B). Neste local também foram observadas plantas associadas a mandacarus (*Cereus jamacaru* DC) (Figura 11). Esta associação de *G. mustelinum* com espécies típicas da caatinga já havia sido descrita na literatura por Pickersgill et al. (1975), Freire et al. (1990) e Wendel et al. (1994) que relataram associação com

espécies do gênero *Pilosocereus* ssp. (facheiro e xiquexique) e macambira (*Bromelia laciniosa* Mart ex Schultez).



Figura 11. Associação de plantas de *G. mustelinum* com Mandacaru, cacto de porte arbóreo típico da caatinga, próximo ao leito do rio.

O local mais próximo à cabeceira do rio Tocó é representado pela sub-população Tocó6. Menos de 20 indivíduos foram encontrados, novamente devido à depredação pela ação antrópica. As plantas estavam próximas à rodovia BA 116, protegidas por cerca e em local inacessível a caprinos e bovinos, bastante comuns nas proximidades desta sub-população. A mata ciliar estava bem conservada até 300 metros após a BR, a partir de onde a vegetação foi retirada para pastagem do gado. Neste local outrora deveriam existir várias plantas, contudo nos próximos 600 metros foram encontradas apenas duas plantas, sendo uma delas ainda jovem e comida pelo gado.

4.3.5. Descrição das condições *in situ* da população do rio Capivara

Ao longo do rio Capivara foram observadas mais de 1250 plantas do gênero *Gossypium* (Figura 5B e 6B), das quais 10 pertenciam à espécie *G. barbadense*, em torno de 50 à *G. hirsutum* r. *latifolium* e as demais eram da espécie *G. mustelinum*. Nesta população foram coletados 150 exemplares em seis pontos de coleta. Estes pontos apresentaram altitude média de 285 metros, e estão localizados entre as

coordenadas 12° 35' e 12° 51' de latitude sul e 40° 30' e 40° 45' de longitude oeste. As diferentes condições observadas em cada um destes pontos são descritas a seguir.

O primeiro ponto de prospecção no rio Capivara, sub-população Capivara1, situa-se próximo à primeira ponte da BR 242 após o município de Itaberaba (sentido leste-oeste). O local dista aproximadamente um quilômetro do início do açude Juracy Magalhães. Tanto na mata ciliar, bem conservada, como na ilha formada dentro do rio, foram observadas mais de 60 plantas. Vinte e cinco amostras foram coletadas neste local, cujo barranco alto dificultava o acesso de gado e permitia que as plantas estivessem relativamente bem conservadas. Na vegetação esparsa, as plantas apresentavam altura mediana (dois a três metros) sendo bastante ramificadas, e encurvadas para dentro do rio.

Rio acima, numa segunda ponte na BR 242 (sentido leste-oeste), foi localizada a sub-população Capivara2. No local, foi observada a presença de plantas de algodão herbáceo na beira da estrada, em torno de 50, além de vários caroços de algodão. Estes algodoeiros eram pequenos (menos de 30cm) e já haviam florescido e produzido sementes (Figura 12A). Todo o trecho da rodovia percorrido durante a expedição estava bem conservado. Porém, especificamente nesta ponte, a cabeceira havia cedido. Como a BR 242 é uma das principais rotas dos caminhões que transportam caroços de algodão do Oeste baiano para o restante da região Nordeste, o baque provocado nesses caminhões ao passar pela falha na ponte, resultou na dispersão dos caroços na beira da estrada (Figura 12B). Estes ocasionalmente nascem dando origem às plantas observadas.

Logo abaixo, numa várzea a cerca de 20 metros das plantas de algodoeiro herbáceo iniciava-se a sub-população Capivara2. De todos os pontos visitados durante a expedição, esta sub-população foi a que apresentou maior número de algodoeiros selvagens, havendo mais de 500 plantas no local. Elas formavam emaranhados bastante ramificados, característica permitida pela vegetação natural que era bastante esparsa e composta por espécies arbustivas. Estas plantas apresentavam poucas folhas, e quase nenhuma flor, entretanto todas estavam carregadas de sementes. Ao contrário dos outros locais visitados, a criação de caprinos e bovinos não foi observada, fato que deve ter contribuído para a expansão das plantas nesse seguimento do rio.



Figura 12. Aspectos da sub-população Capivara2. **(A)** Plantas de *G. hirsutum* presentes na beira da BR 242. **(B)** Caminhões transitando na rodovia BR 242 em frente a sub-população.

A sub-população Capivara2 foi a única sub-população em que a possibilidade de fluxo gênico de algodoeiro herbáceo para *G. mustelinum* foi observada. Porém, as várias plantas jovens observadas neste local apresentavam características

morfológicas de *G. mustelinum*. Teste de paternidade realizado na Embrapa Algodão (dados não publicados), ratificou que os indivíduos jovens não possuíam alelos de *G. hirsutum*. Devido a BR 242 ser a principal rota para o escoamento da produção do Oeste da Bahia (Figura 12B), a dispersão continuada de caroços pelos caminhões pode resultar em hibridações e introgressões. As conseqüências do eventual contato genético entre ambas as espécies dependerá do efeito adaptativo dos genes presentes nos algodoeiros herbáceos. Sugere-se que estudos de adaptabilidade sejam realizados.

A sub-população Capivara3 foi localizada às margens de uma estrada sem pavimentação próxima a BR 242. No local foram encontradas mais de 40 plantas, algumas das quais estavam ao lado da estrada. A forte presença de gado contribuiu para que a grande maioria das plantas fosse encontrada em locais inacessíveis a esses animais, além de não ser observada nenhuma planta jovem. Este local estava bastante seco e as plantas não tinham muitas folhas e sementes. Mantido o nível verificado de exploração pecuária, a manutenção desta sub-população pode ser comprometida.

A sub-população Capivara4 foi encontrada a aproximadamente 13 quilômetros da nascente do rio Capivara, próximo ao município de Rui Barbosa. Ela apresentou a segunda maior quantidade de plantas encontradas nesta expedição, mais de 450. A mata ciliar estava bastante conservada, e os algodoeiros tinham baixa estatura, não apresentavam flores e possuíam poucas sementes.

A expedição seguiu até cinco quilômetros da cabeceira do rio Capivara, entretanto não foram encontradas plantas provavelmente devido às más condições de conservação da vegetação natural.

O rio Capivara deságua no açude Juracy Magalhães, a partir de onde passa a ser chamado rio Piranhas. Seguindo a estratégia de coleta, a expedição percorreu cerca de quinze quilômetros após o açude. Entretanto, apesar da ótima conservação da mata ciliar, nenhuma planta de *G. mustelinum* foi encontrada. De acordo com E. C. Freire (Comunicação pessoal), a ausência de plantas pode estar associada à presença do açude, que se constituiu em barreira física à dispersão das sementes pela correnteza. Fato similar já havia sido observado no município de Caicó. Sementes produzidas à montante devem chegar ao açude e a ausência de plantas deve decorrer de dois fatores. O primeiro está relacionado ao volume de água do açude e a sua extensão, que contribuem para que as sementes permaneçam mais

tempo na superfície da água, aumentando a chance de apodrecerem ou serem comidas por peixes antes de atingirem o sangradouro. Adicionalmente, é possível que plantas de *G. mustelinum* existissem no trecho do rio hoje ocupado pelo açude. Tais plantas poderiam ter morrido após o enchimento do reservatório, que perenizou o rio Piranhas. Nesses locais, as plântulas eventualmente formadas são mortas devido à falta ou excesso de água, além de competirem com a mata ciliar mais exuberante por luz solar. Contudo, à presença de uma grande barreira de aguapé, observada nos quinze quilômetros percorridos (Figura 13B), representa um fator adicional para a ausência de plantas neste seguimento do rio. As sementes que ocasionalmente poderiam atingir o sangradouro do açude, não seriam transportadas ao longo do rio impedindo o estabelecimento da espécie.

Para uma amostragem mais ampla da população, as sub-populações Capivara5 e Capivara6 foram coletadas no Ribeirão do Brejo, um afluente do rio Capivara pela margem direita. O Ribeirão do Brejo deságua no rio Capivara entre as sub-populações Capivara 2 e 3.

Na sub-população Capivara5 foram observadas mais de 50 plantas. A mata ciliar estava bem conservada e apresentava espécies arbóreas, entretanto poucos algodoeiros cresciam neste local. A maior parte das plantas de *G. mustelinum* estava na várzea do rio, um local muito antropizado e usado como pastagem. Os animais movimentam-se entre as plantas e se alimentam de suas folhas e ramos novos. Plântulas foram observadas em número bastante reduzido.

Na periferia desta população, a menos de 10 metros das últimas plantas de *G. mustelinum*, estavam presentes dez indivíduos de *G. barbadense* com idades estimadas entre 5 e 10 anos (Figura 14A). Segundo relatos de moradores, nas proximidades dessa população havia uma casa, que foi demolida no ano de 2003 (Figura 14B). As plantas de *G. barbadense* derivam de plantas de fundo de quintal cultivadas pela antiga moradora. Estas plantas eram bastante antigas, com baixa estatura devido a podas sucessivas, possuíam poucas folhas e nenhuma flor. Elas haviam produzido poucas sementes, do tipo rim-de-boi, que estavam extremamente danificadas pelo ataque de lagarta rosada (*Pectinophora gossypiella*), de modo que nenhuma dessas sementes era viável. Este nível de infestação pode estar associado a ausência de plântulas de *G. barbadense* no local.

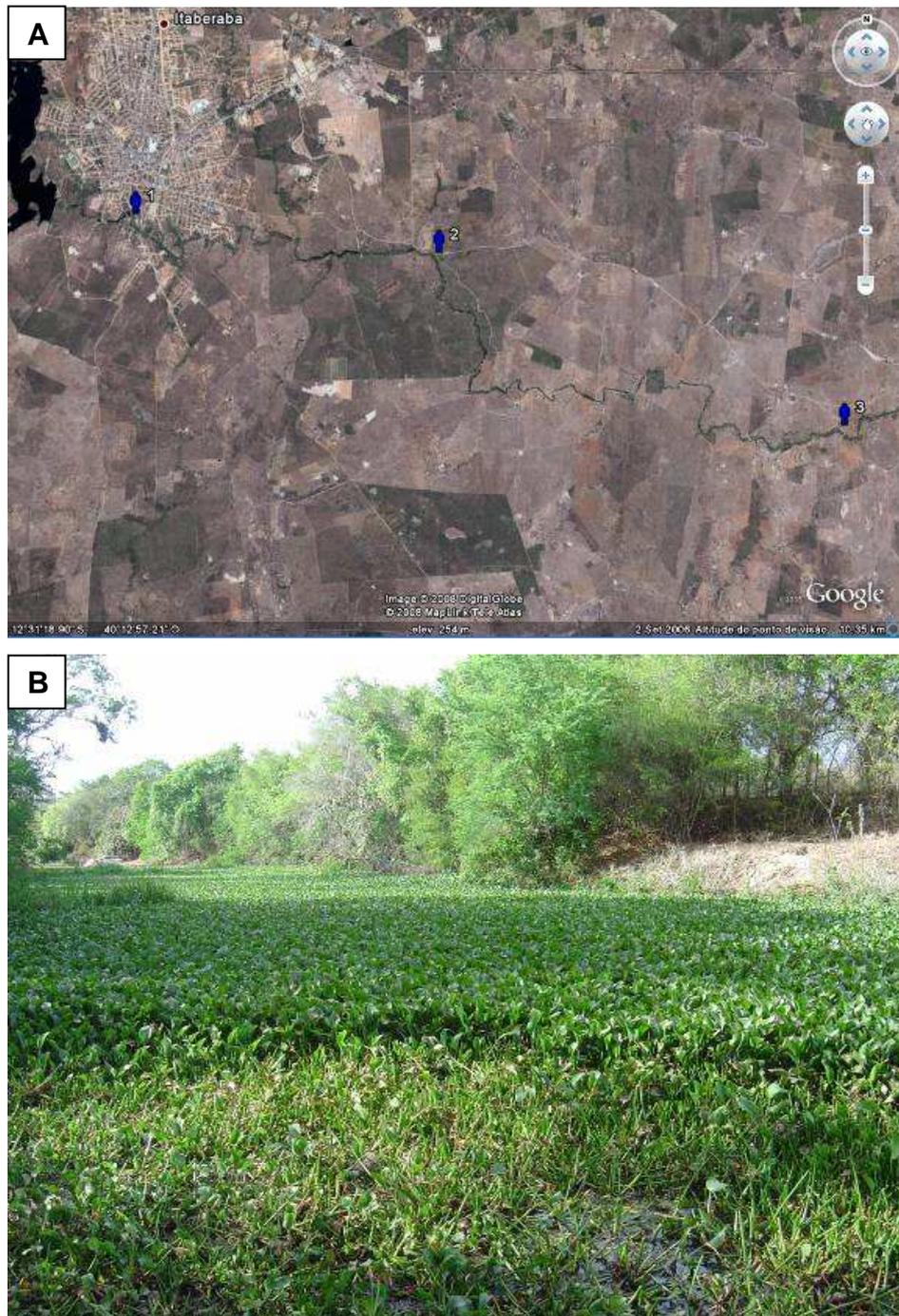


Figura 13. (A) Visão dos pontos onde foram observadas as barreiras de aguapé no rio Piranhas, após o Açude Juraci Magalhães na cidade de Itaberaba. Fonte: Google Earth™, 2008. (B) Barreira de aguapé formada ao decorrer do rio Piranhas.



Figura 14. (A) Plantas de *G. barbadense* próximas a indivíduos de *G. mustelinum*. Estas plantas eram pequenas, contudo apresentavam entre 5 e 10 anos. **(B)** Local próximo a sub-população Capivara5 onde foi observado os restos do alicerce da casa relatada pelos moradores locais.

Entre um grupo de cinco plantas de *G. mustelinum* de diferentes idades, havia um indivíduo com cerca de dois anos que se diferenciava morfológicamente dos demais, na sub-população Capivara5. Comparado a *G. mustelinum*, ele possuía capulhos maiores, sementes com fibra branca e mais longa e folhas menos pilosas e mais recortadas. A campo, a planta foi considerada um eventual híbrido interespecífico. Folhas e fragmentos do caule desta planta e dos indivíduos de *G. barbadense* típicos do local foram acondicionados em sílica gel e encaminhados para o Laboratório de Marcadores Moleculares da Embrapa Algodão. Análises com marcadores do tipo SSR empregando 14 pares de primers confirmaram que a planta era um híbrido F_1 entre as duas espécies (Figura 15). As demais plantas de *G. barbadense* e de *G. mustelinum* não apresentavam características morfológicas híbridas similares, e a análise de DNA não verificou mais nenhuma planta com introgressões de *G. barbadense*.

Desta maneira, é muito provável que a hibridação natural entre as espécies seja rara, principalmente considerando o tempo relativamente elevado em que a simpatria ocorre. Análises de DNA extracromossomal não foram realizadas até o momento, portanto não é possível afirmar qual espécie cedeu o pólen. Porém, como a planta estava em meio a um conjunto de indivíduos de *G. mustelinum*, provavelmente o genitor feminino foi *G. mustelinum*. Outra observação importante, associada à ausência de outras hibridizações ou mesmo introgressões nesse local, reside no índice de ataque de lagarta rosada nas plantas de *G. barbadense*. Como

todas as sementes destas plantas apresentavam-se danificadas por esta praga, as flores também poderiam estar submetidas a danos similares. Desse modo, pouco ou nenhum pólen estaria disponível para os polinizadores realizarem fecundação cruzada com *G. mustelinum*.

A sub-população Capivara6 estava localizada no Ribeirão do Brejo, a 5 km do seu encontro com o rio Capivara. No local, a quantidade de plantas era pequena e a sub-população se estendia por não mais que 100 metros. Os 40 indivíduos presentes estavam na faixa de rodagem da BR 242, protegidos da herbivoria de bovinos por uma cerca. Na propriedade, após a cerca, toda a vegetação natural havia sido destruída e a área era usada como pastagem.

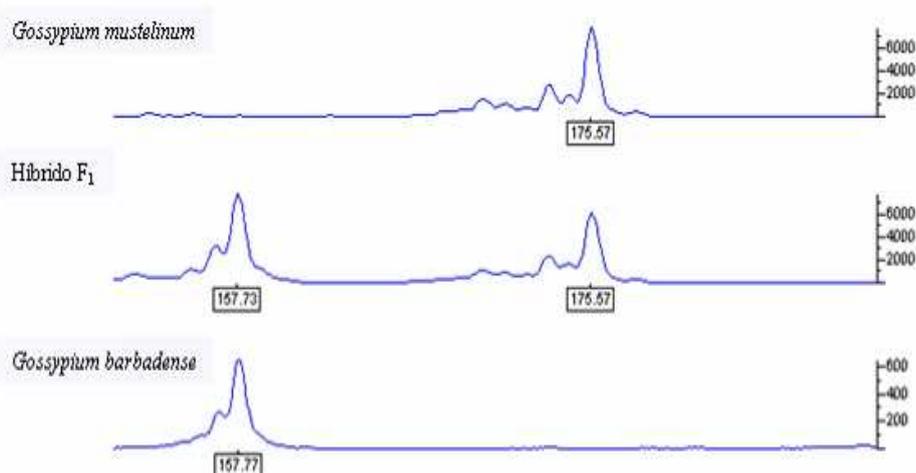


Figura 15. Eletroferograma representando os padrões observados em *G. mustelinum*, *G. barbadense* e no híbrido F₁ interespecífico, com um dos 14 pares de marcadores SSR utilizados.

Parte das sub-populações estudadas apresentavam-se degradadas enquanto outras estavam adequadamente conservadas e com nítidos sinais de que eram capazes de renovar-se e continuar estabelecidas em seu local de origem. Dois grandes problemas foram verificados para a conservação *in situ* das populações de *G. mustelinum* nas bacias dos rios Capivara e Tocó. O primeiro é a destruição de seu *habitat*, as matas ciliares de rios e várzeas, que são retiradas para exploração de madeira e para práticas agrícolas e pecuárias. Neste último caso, caprinos, ovinos e bovinos se alimentam de sementes, folhas e ramos de *G. mustelinum*. Adicionalmente, caprinos alimentam-se também da casca do caule dessas plantas, que é digerida facilmente por esses animais. Em casos mais extremos, a retirada da

casca promove a interrupção da comunicação entre o sistema radicular e a parte aérea da planta, sendo a causa mais provável da morte das plantas adultas. O pastejo em plântulas, também prejudica a renovação das sub-populações, e reflete-se na pequena quantidade de indivíduos com menos de um ano observados. Assim, a substituição das plantas adultas mortas devido a ações antrópicas ou de causa natural é muito lenta e contribui para o declínio observado em algumas sub-populações.

Apesar do índice de ataque de lagarta rosada em *G. mustelinum* ser equivalente aos observados em espécies cultivares, na sub-população onde ocorria simpatria entre *G. mustelinum* e *G. barbadense*, os níveis de ataque nas duas espécies foi significativamente diferente. De modo que, apesar do ataque desta praga, *G. mustelinum* produzia sementes viáveis, produzindo as plântulas observadas no local. Assim, o índice de ataque da lagarta nesta espécie de algodoeiro selvagem pode ser um indicativo de que ela seja mais resistente que *G. barbadense* à lagarta rosada. Sugere-se que estudos de resistência sejam realizados para verificar esta hipótese.

O fluxo gênico interespecífico não parece ser um risco para a adequada conservação das populações. Este fato deve-se à maioria das sub-populações estarem muito afastadas de outros tipos de algodoeiro, em distâncias maiores do que os insetos polinizadores são capazes de transpor. Nos dois casos em que *G. mustelinum* crescia simpatricamente, a taxa de fecundação cruzada foi muito baixa com *G. barbadense* e, aparentemente, nula com algodoeiros herbáceos. Como *G. mustelinum* é sexualmente compatível com ambos os algodoeiros (FREIRE et al. 2002), é possível que barreiras pré-zigóticas parciais existam, conforme já verificado entre *G. barbadense* e algodoeiros herbáceos (PEREIRA, 2008). Uma outra possibilidade para a ausência de hibridizações entre *G. mustelinum* e algodoeiro convencional nesse local, seria a ausência de sincronia entre a abertura das flores nas duas espécies (E. C. Freire, comunicação pessoal). *G. hirsutum* r. *latifolium* floresce durante o período chuvoso. As expedições e a coleção de germoplasma *in vivo* mantida pela Embrapa Algodão permitiram identificar que *G. mustelinum* floresce pouco durante o período chuvoso e que o índice de aborto de estruturas reprodutivas formadas nesta época é elevado (P. A. V. Barroso, comunicação pessoal). A principal época de florescimento da espécie selvagem ocorre no final do período chuvoso e após o seu término. Como a planta sobrevive próxima de locais

em que a água permanece por mais tempo, a umidade necessária para suportar a produção deve provir do solo.

No entanto, é necessário considerar que a simpatria não é desejada, pois o fluxo gênico pode causar danos caso seja intenso ou resulte em alteração da adaptabilidade dos híbridos e seus descendentes. Um exemplo típico de aumento da adaptabilidade provavelmente ocorreria com a introgressão de transgenes que conferem resistência a lagartas, dada a quantidade relativamente grande de lagarta rosada presente nas plantas. Seria conveniente que medidas para reduzir a dispersão não intencional de caroços fossem adotadas, como o transporte em caminhões com carroceria fechada. Para a adequada compreensão da real possibilidade de ocorrência de fluxo gênico e suas conseqüências, sugere-se que sejam realizados estudos de adaptabilidade e para investigar a existência de barreiras pré-zigóticas entre *G. mustelinum* e algodoeiro herbáceo. Assim, na população do rio Capivara a possibilidade de fluxo gênico com algodoeiro herbáceo é mais elevada, visto que sub-populações estão presentes ao lado da principal rota de escoamento da produção de caroços de algodão do Oeste da Bahia.

Dada a fragilidade das populações, torna-se necessário a implementação de medidas para preservar esta espécie nativa do Nordeste brasileiro. Uma das estratégias atualmente desenvolvidas é a adoção de zonas de exclusão de algodoeiros geneticamente modificados propostas por Barroso et al. (2005b). Os novos conhecimentos gerados acerca da distribuição de *G. mustelinum* na bacia do rio Paraguaçu tornam a atualização deste zoneamento necessária. Salienta-se que a proibição de cultivo de algodoeiros geneticamente modificados nas proximidades das populações é uma solução apenas parcial, pois não restringe o cultivo de algodoeiros convencionais que podem causar danos similares.

São duas as estratégias mais adequadas para a preservação *in situ* do algodoeiro selvagem. A primeira seria o cumprimento da Lei 7.803 (18/07/1989), que determina a largura de áreas de preservação permanente ao longo de cursos d'água. Como a maioria dos indivíduos de *G. mustelinum* ocorre dentro da faixa estabelecida pela Lei, a sua implementação de fato permitiria conservar as populações de modo muito satisfatório. Porém, o que se observa é o descaso da maioria dos proprietários e a ausência de ações das autoridades competentes.

A segunda estratégia seria a adoção da espécie como uma das usadas na reconstituição de matas ciliares em estados de clima semi-árido. Projetos que

envolvem a recuperação das bacias de vários rios estão sendo desenvolvidos. Uma das ações mais importantes é a recuperação de nascentes e de matas ciliares. *G. mustelinum* poderia ser incluída na lista de espécies utilizadas nesse reflorestamento, principalmente no estado da Bahia, auxiliando na recuperação destas matas, e aumentando a ocorrência dessa espécie rara e endêmica do Brasil.

De modo não excludente em relação à preservação *in situ*, deve-se intensificar as coletas para que as populações estejam adequadamente representadas em coleções *ex situ* destas plantas. Mesmo com as coletas realizadas, a coleção presente em bancos de germoplasma ainda não abrange adequadamente a diversidade existente. Esta é a melhor garantia de preservação a longo prazo desse importante recurso genético.

4.4. CONCLUSÕES

- *Gossypium mustelinum* apresenta-se disperso ao longo dos dois afluentes da bacia do rio Paraguaçu, o rio Tocó e o rio Capivara;
- A grande maioria das plantas encontra-se em locais com níveis de degradação, particularmente devido à pecuária extensiva, e poucas estão inseridas em locais que permitem a renovação da população local;
- Os principais problemas para a conservação *in situ* das populações é a destruição de seu *habitat* e o pastejo em plântulas por caprinos e bovinos;
- O fluxo gênico não parece ser um risco atual para a conservação da espécie, contudo a população do rio Capivara apresenta maior possibilidade de fluxo gênico com algodoeiro herbáceo;
- A manutenção *in situ* pode ser realizada pelo cumprimento da Lei 7.803 (18/07/1989), e pela inclusão de *G. mustelinum* na lista de espécies utilizadas em reflorestamento de matas ciliares em regiões de clima semi-árido;
- Coletas devem ser intensificadas para adequada manutenção de coleções *ex situ* em bancos de germoplasma.

Capítulo 2

Estrutura genética de populações de
Gossypium mustelinum em afluentes da bacia
do rio Paraguaçu no estado da Bahia

RESUMO

Gossypium mustelinum Miers ex Watt é uma espécie tetraplóide nativa do Brasil, endêmica do semi-árido da região Nordeste. As populações são encontradas próximas a fontes de água perenes ou semi-perenes como rios ou lagos intermitentes. Os problemas para conservação *in situ* estão associados às ações antrópicas, principalmente devido ao pastejo das plantas por gado e ao desmatamento da mata ciliar. Estabelecer estratégias eficientes de conservação *in situ* depende de conhecimentos a cerca da estrutura genética dessas populações. O objetivo deste trabalho foi avaliar a estrutura e variabilidade genética de populações de *G. mustelinum* presentes nos rios Tocó e Capivara (estado da Bahia). Um total de 218 plantas de *G. mustelinum* foram analisadas utilizando marcadores SSR. Os dados moleculares foram usados para estimar as frequências alélicas, a heterozigosidade, as estatísticas F e a distância genética entre populações e entre indivíduos. Os 14 pares de primers SSR amplificaram 17 locos com número médio de 5 alelos por loco (85 alelos no total). O alto índice de endogamia estimado ($F_{IS}=0,808$) e a baixa quantidade de heterozigotos ($H_o=0,093$) indicam que as populações propagam-se preferencialmente por autofecundação, geitonogamia e cruzamentos entre indivíduos aparentados. A diversidade genética total foi alta ($H_E=0,482$) e a diferenciação entre as populações foi muito elevada ($F_{ST}=0,328$). Os índices de fixação (F_{ST}) dentro de cada população também foram significativos e fortemente relacionados com a distância física. O dendograma e a análise bayesina mostraram dois grupos distintos, um contendo os acessos do rio Capivara e outro incluindo os genótipos do rio Tocó. Estratégias de preservação *in situ* devem incluir no mínimo duas sub-populações de *G. mustelinum* de cada população. Para conservação *ex situ*, coletas devem incluir o maior número de locais possíveis.

ABSTRACT

Gossypium mustelinum ex Watt is the only cotton species native from Brazil and it is endemic of the semi-arid region from North-east of the country. The populations are found near perennial and semi-perennial sources of water such as ponds or pools in intermittent streams. The problems to the *in situ* conservation derived from human interferences in its habitat, mainly by excessive cattle grazing and deforestation. Establish efficient strategies for *in situ* conservation depend on the knowledge of the genetic structure of the populations. The objective of the present work was to evaluate the structure and genetic variability of populations of *G. mustelinum* present in the Tocó and Capivara rivers (Bahia State). A set of 218 adult plants of *G. mustelinum* were genotyped with SSR markers. The molecular data was used to estimate the allelic frequencies, the heterozygosity, the F_{IS} statics and the genetic distance among the populations and among the individuals. The 14 SSR primer pairs amplified 17 loci with an average number of 5 alleles per locus (a total of 85 alleles). The high level of endogamy estimated ($F_{IS}=0,808$) and the low observed heterozygosity ($H_0=0,093$) were indicatives that the populations reproduce mainly by selfing, geitonogamy and crosses between related individuals. The genetic diversity was high ($H_E=0,482$) and the differentiation between the populations was very high ($F_{ST}=0,328$). The F_{ST} indexes inside each population were also high and strongly correlated with physical distance. The dendogram and the bayesian analysis showed two distinct groups, one containing the accesses of the river Capivara and other including the genotypes from the Tocó river. Strategy to *in situ* preservation must include at least two occurrence sites of *G. mustelinum* from each population. To *ex situ* conservation, the collects must include as many sites as possible.

5.1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, o interesse acerca do estudo e da preservação da biodiversidade tem aumentado. Uma das razões é a necessidade de novas fontes de variabilidade genética. A domesticação das espécies cultivares selecionou genótipos com caracteres importantes economicamente, mas reduziu progressivamente a variabilidade. O caso do algodão não é diferente. Práticas culturais adequadas associados a elevados ganhos genéticos permitiram que o Brasil obtivesse os mais elevados índices de produtividade em regime de sequeiro no mundo. Porém, a base genética dos programas é estreita e pode acabar por estabelecer patamares de produtividade e tornar a cultura vulnerável a mudanças ambientais e a ação de patógenos. Esses riscos podem ser minimizados ampliando a variabilidade dos programas de melhoramento genético.

Gossypium mustelinum Miers ex Watt, espécie endêmica do Brasil, poderia representar uma valiosa fonte de variabilidade. Este algodoeiro, uma das cinco espécies tetraplóides do gênero, é encontrada em populações selvagens presentes nos estados da Bahia e Rio Grande do Norte. Devido ao fato de nunca terem sofrido nenhum tipo de seleção ou exploração comercial, a espécie ainda é pouco conhecida. O primeiro passo para usar a diversidade é conserva-la adequadamente. Pra isso é necessário desenvolver estudos para conhecer a estrutura genética das populações, estimando a diversidade presente nas mesmas.

Com os grandes avanços das técnicas de biologia molecular, os estudos genéticos adquiriram grandes aliados no que diz respeito à utilização de marcadores moleculares. Os marcadores SSR são baseados em PCR e são, atualmente, os marcadores moleculares mais utilizados, oferecendo subsídios para a caracterização da estrutura genética de *G. mustelinum*.

O presente trabalho teve como objetivo estimar a diversidade e a estrutura genética presente dentro e entre populações de *G. mustelinum* em dois rios da bacia do rio Paraguaçu (BA), visando fornecer subsídios para a adoção de estratégias de conservação *in situ* e *ex situ*.

5.2. MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo constituiu-se de 2 etapas. Uma delas, que foi constituída da extração, quantificação e diluição do DNA, realizada na Embrapa Algodão em Campina Grande - Paraíba, e a segunda etapa, onde foram desenvolvidas as reações microssatélites, na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia no Distrito Federal.

5.2.1. Amostragem e Material Vegetal

Os tecidos vegetais utilizados para extração de DNA derivaram de folhas e pétalas de exemplares do gênero *Gossypium*, coletados em expedição realizada em afluentes da bacia do Rio Paraguaçu, no estado da Bahia, em novembro de 2007. Dentro desta bacia, foram eleitas duas grandes populações naturais, uma no Rio Tocó e outra no Rio Capivara, sendo que cada uma destas foi dividida em seis sub-populações que se estendem desde a cabeceira dos rios até sua foz. Foram consideradas como áreas propícias para as coletas aquelas que possuíam no mínimo 10 plantas, adultas ou jovens.

O tamanho das amostras variou entre as populações. Do rio Tocó foram analisados 96 exemplares e do rio Capivara 122 genótipos. Na Tabela 2 podem ser observadas as sub-populações, a quantidade de genótipos analisados e o rio onde a coleta foi realizada.

As amostras de tecidos foliares e pétalas foram desidratadas em sílica gel e enviadas para o Laboratório, onde foram mantidas em câmara fria (15° C) até a extração de DNA genômico.

Tabela 2. Sub-populações, rio e número de genótipos analisados em cada sub-população coletada.

Sub-população	Rio	Número de genótipos analisados
TC1	Tocó	18
TC2	Tocó	18
TC3	Tocó	12
TC4	Tocó	16
TC5	Tocó	20
TC6	Tocó	12
CP1	Capivara	20
CP2	Capivara	21
CP3	Capivara	20
CP4	Capivara	22
CP5	Capivara	22
CP6	Capivara	17
Total		218

5.2.2. Extração e Quantificação de DNA

A extração de DNA dos tecidos coletados foi realizada através do método CTAB descrito por Doyle e Doyle (1990), com modificações propostas por Vidal et al. (2003) e Barroso et al. (2006). Fragmentos de tecidos foliares com cerca de 50 a 100mg foram selecionados, e colocados em microtubos de 2ml dentro dos quais foi adicionada uma esfera de aço inoxidável. Estes tubos foram postos dentro de um suporte para tubos com tampa, que foi agitado manualmente durante 30 segundos para macerar as amostras. Após a maceração, as esferas metálicas foram retiradas dos microtubos, e às amostras foram adicionados 600 μ L de tampão de extração (2% CTAB; 1,4 M NaCl; 0,2 M EDTA; 0,1 M Tris HCl pH 8,0; 2,0% PVP e 0,2% de β -mercaptoetanol). Os microtubos foram agitados em vórtex, para homogeneizar até que o tecido macerado entrasse em contato com o tampão de extração. Os tubos foram incubados em banho-maria por 30 minutos a 65°C, sendo agitados cada 5 minutos. Retirados do banho-maria, os microtubos foram deixados esfriar até atingirem a temperatura ambiente. Em capela de exaustão, foram adicionados 600 μ L de clorofórmio-álcool isoamílico na proporção de 24:1(v/v). Por inversão, os tubos foram agitados até a obtenção de uma emulsão homogênea.

Os tubos foram centrifugados a 11700g por 10 minutos. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo, onde 600µL de isopropanol frio (-20°C) foram adicionados. Por inversão, o material foi misturado para que ocorresse a precipitação do ácido nucléico. Os tubos foram incubados por 30 minutos a -20°C. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 11700g por 10 minutos a 4° C. O *pellet* coletado foi lavado duas vezes com 500µL de etanol 70% gelado, e 300µL de etanol absoluto também gelado, e deixado secar por 10 a 30 minutos a temperatura ambiente. O DNA foi ressuspensão em 100 µL de tampão T.E. (100mM Tris; 1mM EDTA).

A quantificação do DNA purificado foi realizada utilizando alíquotas de cada genótipo, que foram comparadas com uma série de concentrações conhecidas de DNA do fago Lamda (λ) (50 a 300 ng), através da intensidade de fluorescência observada em géis de agarose 0,8% (p/v) submetidos à eletroforese. Os géis foram visualizados em transluminador sob luz UV, após coloração com Sybr Green. O DNA foi diluído em água *milliq* para concentração de 1ng/µL, para utilização nas reações SSR.

5.2.3. Seleção de Primers SSR

Inicialmente foi realizada a seleção dos primers SSR que seriam utilizados no estudo. Foram testados 141 marcadores de locos microsatélites desenvolvidos e otimizados para algodão por Liu et al. (2000a e 2000b) e Nguyen et al. (2004). Para verificar o perfil de amplificação de cada primer foram utilizados dois indivíduos de cada uma das populações de *G. mustelinum* de Caicó no Rio Grande do Norte, e da Bahia nos municípios de Jaguarari, Macurure, Riachão do Jacuípe e Candeal. Do banco de germoplasma da Embrapa Algodão, foram selecionados aleatoriamente dois indivíduos das demais espécies de algodão presentes no Brasil.

5.2.4. Obtenção dos Marcadores

Para análise da diversidade genética presente nas populações de *G. mustelinum* coletadas, condições de PCR *multiplex* foram utilizadas para desenvolver ensaios para detecção de locos microssatélites. Os oligonucleotídeos fluorescentes foram obtidos da Integrated DNA Technologies/IDT, apresentando a posição 5' do primer forward marcada com um dos fluorocromos: 6-FAM (6-carboxyfluorescein) ou HEX (4,7,2',4',5'7'-hexachloro-6-carboxyfluorescein).

Os fragmentos de DNA foram amplificados em reações PCR utilizando o Multiplex PCR Kit (Qiagen, Inc., Valencia, CA). Este kit apresenta todos os componentes requeridos para reações de PCR, apresentando a HotStarTaq DNA Polimerase, que minimiza a probabilidade de formação de produtos inespecíficos durante o processo de amplificação. Em cada *multiplex* foram utilizados de 2 a 3 diferentes pares de primers, marcados com diferentes fluorocromos, ou com o mesmo fluorocromo quando possuíam amplitudes alélicas distintas. As reações foram realizadas para um volume total de 5,0 µL contendo: 1,0ng de DNA genômico, 0,2µM de cada par de primers, 2,5 µL de 2x QIAGEN Multiplex PCR Master Mix (HotStar Taq DNA Polymerase, PCR amplification buffer, 3mM de MgCl₂), 0,5 µL de Q-solution 5x e 0,7 µL H₂O.

As condições físicas da PCR foram as seguintes: 15 minutos de desnaturação a 95°C, seguida por 30 ciclos de 60 segundos de desnaturação inicial a 94°C, 60 segundos de anelamento a 51°C-57°C (dependendo da especificidade dos pares de primers utilizados), e 90 segundos de extensão a 72°C. Para evitar a adição incompleta da cauda poli-A, minimizar a formação de picos inespecíficos e permitir o *multiplex* de vários locos na mesma reação PCR, foram acrescentados 30 minutos de extensão final a 60°C.

A qualidade dos produtos da amplificação foi observada em gel de agarose 3,5%, corado com brometo de etídeo (10mg/ml), selecionando-se 10 genótipos aleatoriamente.

Nos sistemas *multiplex* os produtos de cada loco foram analisados conjuntamente nos capilares para detecção de alelos por fluorescência, em analisador automático de fragmentos ABI Prism modelo 3700 (Applied Biosystems, Foster City, CA). As amostras foram diluídas 2 vezes com água ultrapura, e 1,0 µL

desta diluição foi transferido para uma nova placa para PCR. Às amostras, as quais foi adicionado 10 μ L do marcador de referencia (2,5% ROX [carboxy-x-rhodamine], 90% HI-DI formamida), foram aquecidas por 5 minutos a 94°C e colocadas imediatamente em gelo.

A detecção e a estimativa do tamanho de alelos em pares de bases foram realizadas com a utilização do software GeneScan (Applied Biosystems 3.7). Em seguida os valores foram importados para o software Genotyper (Applied Biosystems 3.7) para filtragem de picos, interpretação e compilação final dos dados, definindo o genótipo de cada indivíduo.

5.2.5. Avaliação dos Dados

5.2.5.1. Análise da Diversidade Genética e Índice de Fixação

Foram obtidas as estimativas do número médio de alelos por loco (A), as frequências alélicas, a média da heterozigosidade observada (H_o) e esperada (H_e) e o índice de fixação (f ou F_{IS}) utilizando os Software GDA (LEWIS e ZAYKIN, 2001) e Fstat (GOUDET, 2001). A heterozigosidade esperada (H_e), uma estimativa da magnitude da diversidade genética, foi estimada de acordo com Nei (1973). Estes mesmos programas foram utilizados para estimar a estatística F de Wright (Weir e Cockerham, 1984), em que o F_{ST} (θ) mede o nível de diferenciação entre as populações e sub-populações, f (F_{IS}) corresponde ao nível médio de endogamia intrapopulacional e F a endogamia total. A significância das estatísticas foi testada por *bootstrap*, utilizando 1000 reamostragens, com intervalo de confiança de 95%.

A distância entre os pares de genótipos foi calculada com base na proporção de alelos comuns (BOWCOCK et al., 1994), usando o programa MICROSAT (MINCH, 1998) e os genótipos foram agrupados a partir do método de Neighbor-Joining.

A estrutura genética das populações também foi estudada com uma abordagem bayesiana analisando os genótipos SSR com o programa STRUCTURE (PRITCHARD e STEPHEENS, 2007). O número de agrupamentos foi determinado usando procedimento ΔK , conforme descrito por Evanno et al. (2005). A alocação

dos genótipos dentro dos grupos foi realizado de acordo com a probabilidade de cada indivíduo pertencer a cada um dos grupos.

5.2.5.2. Estrutura Genética Espacial

Para determinar se a diversidade de cada uma das duas populações estudadas possuía estruturação espacial, a matriz de distâncias genéticas foi comparado com o *log* da matriz de distância física usando o teste de Mantel (1967).

5.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.3.1. Seleção de Primers

O teste de primers realizado com 141 marcadores de locos microsatélites, amplificou 145 locos dos quais: 94% foram polimórficos entre pelo menos duas espécies do gênero *Gossypium*, 46% (67 pares de primers) foram polimórficos dentro de *G. mustelinum*, havendo 14 pares de primers cujo padrão permitiu distinção entre as quatro espécies de algodão presentes no Brasil (SILVA et al., 2008). A partir da avaliação dos marcadores SSR, selecionou-se 14 pares de primers atendendo os seguintes critérios: apresentar alto conteúdo de informação de polimorfismo (PIC) dentro da espécie *G. mustelinum*, proporcionar distinção entre as diferentes espécies de algodão presentes no Brasil e apresentar boa distribuição dentro do genoma. Estes foram utilizados para analisar a estrutura genética populacional de *G. mustelinum* em cinco *multiplex* distintos (Tabela 3).

Tabela 3. Primers utilizados para amplificação dos locos microsatélites em populações de *Gossypium mustelinum*, sua distribuição dentro do genoma e o conjunto de primers que constituíram os *multiplex*. A: número total de alelos por loco. Ta (°C): Temperatura de anelamento.

<i>Multiplex</i>	Primer	Ta (°C)	A	Marcação	Amplitude	
					Alélica (pb)	Cromossomo
1	BNL252	57	6	6-FAM	175-192	8
	BNL1421		8	HEX	193-235	18
2	CIR311	51	4	6-FAM	178-187	15
	CIR381(2)*		4	HEX	246-254	2
			2		261-265	14
	CIR383		6	HEX	124-142	23
3	BNL1551	55	7	6-FAM	175-192	16
	CIR148		5	6-FAM	143-147	12
	CIR203		3	HEX	240-254	6
4	BNL169(2)*	57	3	HEX	194-198	20
			8		207-218	-
	BNL840		3	HEX	149-157	26
	BNL3599		3	6-FAM	189-193	12
	5		BNL686(2)*	56	5	6-FAM
5		155-181			23	
BNL1350		9	6-FAM		214-237	1
BNL3649		4	HEX		191-207	A03

* Número entre parênteses denota que este par de primer amplificou dois locos.

5.3.2. Avaliação do Polimorfismo dos Microsatélites

Foram analisados 218 acessos de algodão, sendo representados por 96 indivíduos das seis sub-populações do rio Tocó e 122 indivíduos das sub-populações do rio Capivara (Tabela 2). A amplificação com os quatorze pares de primers possibilitou a análise de dezessete locos polimórficos. Os primers que amplificaram dois locos foram o BNL169, BNL686 e CIR381 (Tabela 3).

O marcador SSR mais polimórfico entre as duas populações foi o BNL1350 que apresentou 9 alelos (Tabela 3). Dentro das sub-populações do rio Tocó o marcador mais informativo foi o BNL 1421, que amplificou 7 alelos. Nas sub-populações do rio Capivara o marcador mais polimórfico foi o BNL1350 que também apresentou 7 alelos (Tabela 4).

Quatro pares de primers utilizados por Batista (2005) na análise de três populações de *G. mustelinum* dos municípios de Macururé, Jaguarari e Caicó foram empregados na presente análise (BNL3649, BNL1350, BNL840 E BNL3599). Excluindo o primer BNL840, que apresentou o mesmo número de alelos por loco, o autor encontrou apenas 3 alelos para o BNL3649, 3 para o BNL1350 e dois locos com 2 e 5 alelos para o primer BNL3599. Contudo, comparações de quais alelos foram exclusivos nas populações estudadas não são possíveis, uma vez que não foi divulgado o tamanho dos alelos, em pares de bases, encontrados pelo autor. Além disso, o maior número de alelos encontrados no presente estudo pode ser justificado pelo maior número de plantas e sub-populações utilizadas.

5.3.3. Freqüências Alélicas

Os dezessete locos produziram um total de 85 alelos, uma média de 5 alelos por loco, e amplitude de variação (A) de 2 a 9 alelos (Tabela 4). Sessenta destes alelos estavam presentes na população do rio Tocó e sessenta e um na população do rio Capivara (Tabela 4). O número médio de alelos por loco observados por população foi de 3,53 (entre 2,0 – 7,0) e 3,59 (entre 1,0 – 7,0), para os rios Tocó e Capivara, respectivamente (Tabela 4). Resultados inferiores foram encontrados por Cavalcante (2007), que estudando a diversidade genética presente em populações

de *G. barbadense* nos estados do Pará e do Amapá, obteve uma média de 2,77 alelos em 12 locos. Do mesmo modo, Ribeiro (2008), caracterizando a variabilidade de acessos de *G. hirsutum* e *G. barbadense* provenientes do estado de Pernambuco, analisou 15 locos e obteve uma média de 2,5 alelos por loco. Mesmo dentro da espécie *G. mustelinum*, os resultados diferiram dos obtidos por Batista (2005) que estudando três populações naturais obteve uma média de 2,56 alelos em 21 locos. A maior quantidade de acessos utilizados no presente trabalho, a menor diversidade nas populações estudadas anteriormente e a melhor seleção de primers foram, provavelmente, os fatores que contribuíram para diferenciação observada entre os diferentes estudos.

Excluindo um dos locos amplificados a partir do primer CIR 381, todos os marcadores SSR utilizados na avaliação da estrutura genética, apresentaram alelos exclusivos em pelo menos uma das populações (Tabela 5). As populações apresentaram número equivalente de alelos exclusivos, 25 na população do rio Capivara e 24 no rio Tocó. Estes alelos representaram 57,64% dos alelos encontrados, valor bastante elevado e indicativo de que as populações apresentam grandes diferenças alélicas. As freqüências destes alelos estão apresentadas na Tabela 5. Essa estimativa é quase duas vezes maior que a observada por Batista (2005), que encontrou 26 alelos exclusivos em populações de *G. mustelinum* dos municípios de Macururé, Jaguarari e Caicó, fato que pode estar associado a maior quantidade de plantas analisadas neste trabalho. As freqüências dos alelos exclusivos apresentaram grande amplitude de variação nas duas populações. No rio Capivara foram observadas freqüências máxima e mínima de 68,48% e 1,04%, respectivamente, enquanto na população do rio Tocó a freqüência máxima foi 81,76% e a mínima de 1,07%. A grande quantidade de alelos exclusivos é um forte indicativo de que o isolamento geográfico ocasionou uma separação genética entre as populações dos rios, fixando-os nas mesmas. Estas estimativas estão representadas na Tabela 5.

Tabela 4. Total e média de alelos por loco nas populações de *Gossypium mustelinum* dos rios Tocó e Capivara.

LOCO	TOCÓ						Total Tocó	CAPIVARA						Total Capiv.	TOTAL geral
	TC1	TC2	TC3	TC4	TC5	TC6		CP1	CP2	CP3	CP4	CP5	CP6		
BNL169-1	3	1	2	2	2	2	3	1	2	1	2	1	2	2	3
BNL169-2	3	3	3	2	3	1	4	1	3	2	4	2	4	5	8
BNL252	2	2	2	2	3	2	3	1	2	2	2	1	2	3	6
BNL686-1	3	2	2	2	2	1	4	2	2	1	1	1	1	3	5
BNL686-2	2	1	1	1	1	1	2	3	2	2	1	2	2	4	5
BNL840	3	2	2	2	2	1	3	2	2	1	1	1	2	2	3
BNL1350	2	1	1	2	4	2	4	1	4	2	1	2	5	7	9
BNL1421	2	2	3	1	3	2	7	2	2	3	3	1	4	6	8
BNL1551	2	2	2	2	2	3	4	1	3	3	2	1	3	5	7
BNL3599	3	2	2	2	2	1	3	1	2	1	1	2	2	2	3
BNL3649	1	1	2	1	2	2	4	1	2	2	2	2	2	3	4
CIR148	2	3	2	2	2	3	4	3	3	4	3	1	2	5	5
CIR203	2	2	2	1	2	2	2	1	1	2	2	2	3	3	3
CIR311	1	2	3	2	2	1	3	1	1	1	1	1	3	3	4
CIR381-1	2	3	2	1	1	1	4	1	1	1	1	1	1	1	4
CIR381-2	1	2	2	1	2	2	2	1	1	1	1	1	2	2	2
CIR383	3	1	2	3	3	2	4	1	2	3	2	1	3	5	6
Número de Alelos	37	32	35	29	38	29	60	24	35	32	30	23	43	61	85
Média de Alelos							3,5294							3,5882	5

Quando comparados com alelos em outras espécies de algodoeiros, os alelos exclusivos podem auxiliar na discriminação das diferentes espécies. Neste sentido, foi observado que o loco BNL169-1 foi exclusivo da espécie *G. mustelinum*, não sendo amplificado nas demais espécies tetraplóides encontradas no Brasil. Este loco pode auxiliar em estudos de fluxo gênico, por ser de fácil detecção e, quando presente, confirmar a presença de *G. mustelinum* na genealogia do indivíduo analisado.

Alguns alelos ocorrem em frequência bastante baixa, enquanto outros estão fixados nas populações, com frequências acima de 95% (Anexo 2).

Se considerarmos que alelo raro é todo alelo cuja frequência é inferior a 5% (AZEVEDO, 2007), foram observados 8 alelos raros na população do rio Capivara e 7 na população do rio Tocó (Tabela 5). Novos estudos são necessários para detectar se estes alelos são de fato característicos da espécie *G. mustelinum*. Eles podem provir da introgressão de alelos de outras espécies de algodão, uma vez que as quatro espécies de algodoeiro presentes no Brasil são sexualmente compatíveis

(FREIRE et al., 2002). Um dos alelos amplificados pelo primer BNL1421, com 193 pb, apresentou uma freqüência de 2%, sendo observada em *G. hirsutum* var. latifolium numa freqüência de 71% (Dados não publicados). Apenas um indivíduo possuía este alelo na sub-população Tocó2, que estava em homozigose (Anexo 2). Este resultado parece uma evidência de introgressão antiga, visto que os alelos dos demais locos eram típicos de *G. mustelinum*. Contudo, não se pode descartar a possibilidade de se tratar de um alelo compartilhado pelas duas espécies e que estaria presente em baixa freqüência nas populações de *G. mustelinum* estudados. Para dirimir dúvidas desta natureza um banco de dados contendo as freqüências alélicas de cada espécie do gênero *Gossypium* vem sendo desenvolvido pela Embrapa Algodão (P. A. V. Barroso, comunicação pessoal).

Tabela 5. Freqüência dos alelos exclusivos encontrados nas populações de *G. mustelinum*. Em destaque encontram-se os alelos raros observados em cada população.

CAPIVARA			TOCÓ		
Loco	Alelo (pb)	Freqüência	Loco	Alelo (pb)	Freqüência
BNL252	185	0.634783	BNL252	175	0.684783
BNL252	187	0.130435	BNL252	181	0.190217
BNL252	192	0.234783	BNL252	200	0.125000
BNL1421	221	0.252174	BNL1421	193	0.022222
CIR311	187	0.019417	BNL1421	235	0.011111
CIR383	130	0.324324	CIR311	181	0.817647
CIR383	140	0.013514	CIR381-1	248	0.010753
CIR148	143	0.263393	CIR381-1	250	0.215054
CIR203	244	0.178571	CIR381-1	254	0.016129
BNL1551	175	0.469027	CIR383	124	0.037634
BNL1551	177	0.070796	BNL1551	182	0.644444
BNL1551	190	0.247788	BNL1551	184	0.216667
BNL169-2	207	0.159292	BNL169-1	198	0.337079
BNL169-2	209	0.128319	BNL169-2	214	0.162921
BNL169-2	211	0.486726	BNL169-2	216	0.151685
BNL169-2	213	0.035398	BNL169-2	218	0.674157
BNL1350	222	0.021739	BNL840	149	0.719101
BNL1350	224	0.130435	BNL3599	189	0.633333
BNL1350	233	0.265217	BNL1350	214	0.403409
BNL1350	235	0.01043	BNL1350	230	0.017045
BNL1350	237	0.01869	BNL3649	203	0.113636
BNL686-1	149	0.211207	BNL686-1	141	0.204545
BNL686-2	155	0.581897	BNL686-1	143	0.363636
BNL686-2	157	0.017241	BNL686-2	177	0.011364
BNL686-2	181	0.01862			

5.3.4. Diversidade Genética

Considerando as duas populações, foram obtidas as seguintes estimativas: a heterozigosidade observada (H_o) foi de 0,093, que refletiu no índice de fixação ou endogamia (f) de 0,807 (Tabela 6), que é considerado bastante elevado. Valor similar foi observado por Batista (2005) que encontrou um f igual a 0,74 em três populações de *G. mustelinum*. Wendel et al. (1994) não observaram heterozigotos utilizando marcadores isoenzimáticos em 11 indivíduos de *G. mustelinum*. Este excesso de homozigotos indica que, como os algodoeiros possuem sistema misto de reprodução, eles devem praticar autofecundações, geitonogamia e cruzamentos entre indivíduos aparentados em elevada quantidade. Este comportamento reprodutivo possivelmente pode ser explicado pela estruturação das populações de *G. mustelinum*, que são formadas, em sua maioria, por algumas dezenas de indivíduos distribuídos em vários fragmentos da mata ciliar.

A heterozigosidade esperada (H_e) foi de 0,482, mostrando que as populações apresentam uma diversidade bastante elevada. Este resultado concorda com a grande quantidade de alelos exclusivos observados dentro das populações. Resultado similar foi encontrado por Freitas et al. (2008) em algumas populações de *G. mustelinum*, nos municípios de Macururé, Jaguarari e Caicó. Contudo Alves et al. (2008a) que estudaram populações dos municípios de Riachão do Jacuípe, Nova Fátima, Iaçú e Milagres do estado da Bahia, obtiveram resultados inferiores dentro da mesma espécie de algodão. As diferenças observadas entre as estimativas encontradas por cada autor talvez estejam associadas à diferenças na estruturação de cada população.

Considerando as sub-populações de cada rio, foi observada grande amplitude de variação (Tabela 6). A maior estimativa da H_e obtida no rio Capivara foi de 0,442 na Capivara6, e a menor foi de 0,019 na Capivara5. A partir desses resultados pode-se inferir que algumas sub-populações deste rio apresentaram baixa diversidade, possivelmente devido a um processo de gargalo genético. No rio Tocó, a sub-população Tocó6 apresentou a menor diversidade (0,108) e a Tocó2 a maior (0,320). Em ambas as populações, as sub-populações de menor diversidade também apresentaram o menor número de indivíduos.

Tabela 6. Estimativas obtidas para heterozigosidade observada (H_o), heterozigosidade esperada (H_e), índice de fixação (f) e endogamia interpopulacional (F_{ST}) nas populações e suas respectivas sub-populações.

População	Sub-população	H_e	H_o	f	F_{ST}
Capivara	CP1	0,091	0,033	0,642	
	CP2	0,302	0,121	0,602	
	CP3	0,166	0,043	0,741	
	CP4	0,231	0,159	0,316	
	CP5	0,019	0,014	0,274	
	CP6	0,442	0,166	0,630	
		0,208	0,09	0,576	0,634
				(ICB=0,491 – 0,637)	(ICB=0,581 – 0,683)
Tocó	TC1	0,263	0,119	0,553	
	TC2	0,320	0,175	0,460	
	TC3	0,274	0,076	0,730	
	TC4	0,145	0,069	0,530	
	TC5	0,217	0,081	0,632	
	TC6	0,108	0,032	0,714	
		0,221	0,092	0,590	0,547
				(ICB=0,510 – 0,665)	(ICB=0,467 – 0,620)
Entre Populações		0,482	0,093	0,807	0,328
				(IC=0,790 – 0,829)	(IC=0,234 – 0,422)

5.3.5. Estruturas das Populações

Como o trabalho consistiu de doze sub-populações, distribuídas dentro de duas populações distintas, foi estimada a diferenciação presente entre (F_{ST} ou θ) as populações, e entre as sub-populações das duas populações. O F_{ST} entre as populações foi de 0,328, com intervalo de confiança *bootstrap* (ICB) entre 0,234 e 0,422. Este valor é considerado bastante elevado e indica que 32,8% de toda a variabilidade está presente entre as duas populações. O elevado valor é um indicativo de que a migração entre as populações, caso exista, é muito pequena. A baixa frequência de migração pode ser explicada pela baixa capacidade de dispersão das sementes quando não mediada por água, e pelo isolamento geográfico que os 127 km que separam ambas as populações representam.

Contudo, este resultado é menor do que o encontrado por Alves et al. (2008a), Freitas et al. (2008) e Batista (2005). Portanto, estas populações são menos diferentes entre si do que outros conjuntos de populações de *G. mustelinum* previamente estudadas.

Os valores F_{ST} também foram estimados para cada uma das populações individualmente. As estimativas de F_{ST} para a população do rio Tocó foi 0,547 (ICB 0,467 – 0,620), indicando que 54,7% da variabilidade presente nesta população está contida entre as sub-populações. Para a população do rio Capivara, o F_{ST} estimado foi de 0,634 (ICB 0,581 – 0,683). Estes valores são extremamente altos e indicam elevada heterogeneidade dentro das populações.

A distância genética de Nei (1973), calculadas entre pares de sub-populações, variou de 0,02 a 0,806 (Tabela 7) na população do rio Tocó e de 0,13 a 0,948 no rio Capivara. A maior distância genética foi verificada entre as sub-populações 3 e 6 no rio Tocó, a primeira localizada junto à foz do rio e a segunda próxima à sua nascente, e a menor distância foi observada entre as sub-populações 2 e 3, por estarem fisicamente próximas. No rio Capivara, a menor distância genética foi observada entre as sub-populações 5 e 6, que são geograficamente próximas, e a maior entre as sub-populações 1 e 5.

Tabela 7. Distâncias genéticas entre pares de sub-populações.

	TC1	TC2	TC3	TC4	TC5	TC6	CP1	CP2	CP3	CP4	CP5
TC1											
TC2	0,204										
TC3	0,424	0,0296									
TC4	0,34	0,6111	0,781								
TC5	0,328	0,5676	0,73	0,047							
TC6	0,796	0,7465	0,806	0,773	0,676						
CP1	0,917	0,8876	0,942	1,197	1,141	1,39					
CP2	0,843	1,0243	1,13	1,334	1,244	1,54	0,458				
CP3	0,947	1,1963	1,408	0,996	0,797	1,02	0,948	0,815			
CP4	0,876	0,9729	1,113	1,285	1,005	1,25	0,602	0,633	0,292		
CP5	0,846	1,0364	1,194	1,197	0,971	1,17	1,023	0,568	0,832	0,622	
CP6	0,641	0,7935	0,955	1,025	0,778	0,97	0,653	0,503	0,434	0,307	0,13

Quando observada a estrutura existente dentro das sub-populações do rio Tocó (Figura 16A), verifica-se que existe uma estruturação ao longo do rio com a sub-população 4 exercendo forte influência na sub-população 1, que são vizinhas. De modo semelhante, na estrutura existente dentro das sub-populações do rio Capivara (Figura 16B) observou-se que sub-populações vizinhas exercem maior

influência entre si, do que com sub-populações mais distantes fisicamente. Contudo um resultado inesperado foi observado na sub-população Capivara6, que sofre bastante influência das sub-populações 3 e 4. Essas sub-populações não apresentam ligação física aparente, e por estarem em rios diferentes, uma no rio Capivara e outra no Ribeirão do Brejo (Figura 17), não apresentam dispersão de sementes mediada por água.

A aparente estrutura espacial da diversidade foi confirmada pelo teste de Mantel (Figura 18). A distância genética entre as sub-populações do rio Tocó apresentou elevada correlação, tanto com a distância em linha reta quanto com a distância pelo leito do rio (Tabela 7 e Figura 18). A correlação foi mais baixa, embora ainda significativa, no rio Capivara. Este resultado deve-se a alta similaridade observada entre as sub-populações 3 e 4 com a 6, que apesar de não estarem fisicamente ligadas foram geneticamente semelhantes (Tabela 7 e Figura 16B). Como foi confirmado pela análise bayesiana (Figura 16), a dispersão de sementes ocorre pela correnteza dos rios, o que não explica a similaridade entre essas sub-populações. Do mesmo modo, a distância entre as sub-populações não permite que a ação de polinizadores explique esta similaridade. Assim o teste de Mantel foi realizado considerando a inexistência de ligação entre as sub-populações do rio Capivara com as do Ribeirão do Brejo, observando-se um aumento considerável nas correlações (Tabela 8).

Uma vez que as sub-populações 3 e 4 são bastante parecidas entre si (Tabela 7 e Figura 16B), uma justificativa para este resultado é a provavelmente existência de uma sub-população de *G. mustelinum* não localizada no momento da coleta, entre a sub-população 3 e 6. Estas plantas seriam bastante relacionadas com a sub-população 3, e esta exerceria forte influencia na sub-população 6, atenuando a distância geográfica entre essas sub-populações. Do mesmo modo, uma várzea entre essas sub-populações, que ficaria alagada durante períodos chuvosos (Figura 17B), mediaría a dispersão de sementes através dessa comunicação provisória, e diminuiría a distância entre as sub-populações do Ribeirão do Brejo e do rio Capivara. Contudo, seria necessário uma análise mais detalhada das condições *in situ* destas sub-populações em períodos chuvosos para esclarecer as dúvidas quanto a influência de uma sub-população sobre a outra.

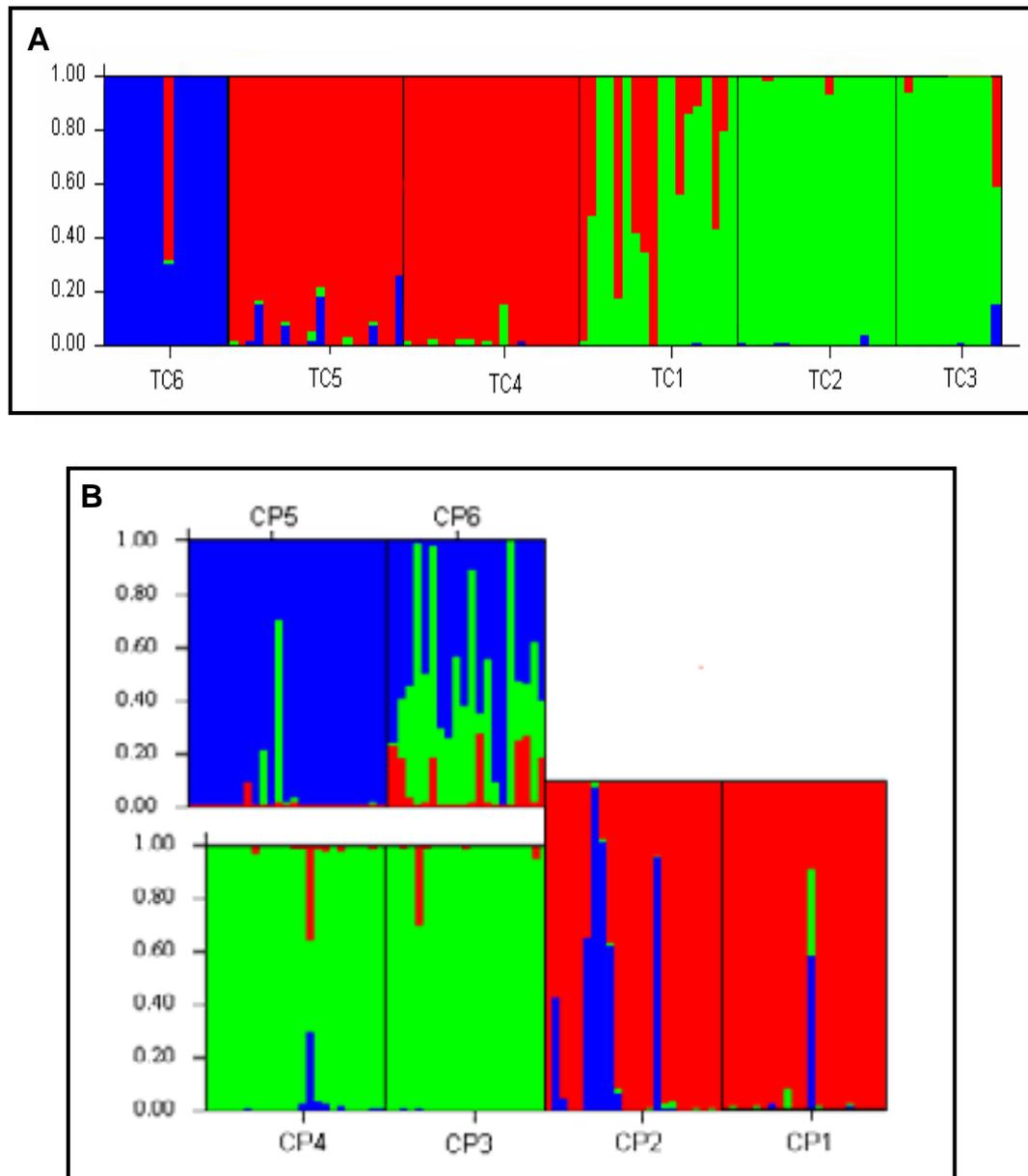


Figura 16. Análise bayesiana mostrando a estrutura das populações dos rios Tocó e Capivara, utilizando $K=3$ em ambas. Demonstra-se a influencia que cada sub-população sofre e exerce sobre as outras. **(A)** Rio Tocó. **(B)** Rio Capivara.

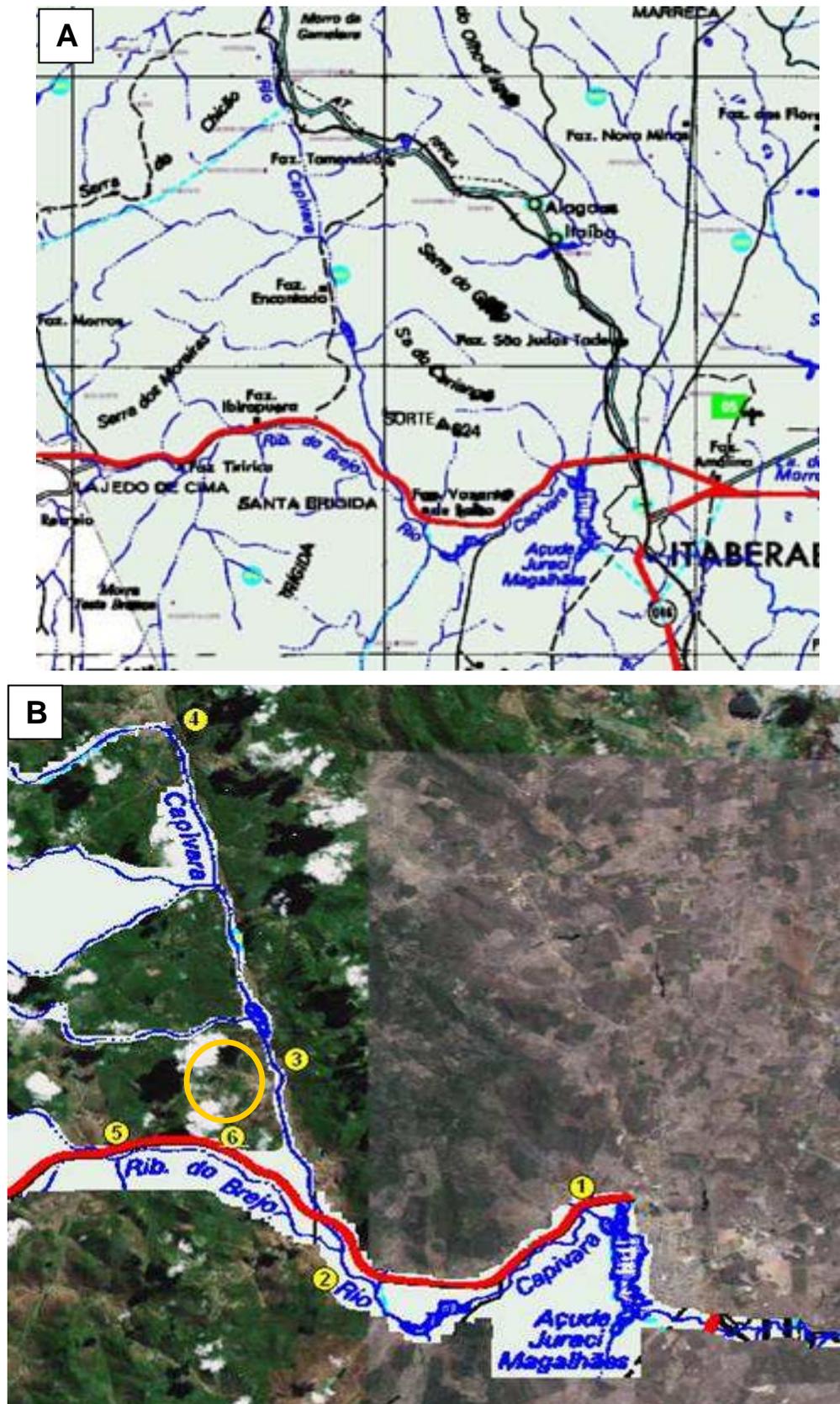


Figura 17. (A) Mapa municipal estatístico de Itaberaba, Bahia mostrando a localização do rio Capivara e do Ribeirão do Brejo. Fonte: IBGE. (B) Sobreposição de mapas do IBGE e do Google Earth mostrando a localização dos rios no município de Itaberaba. Circulo amarelo indica ligação entre o Ribeirão do Brejo e o rio Capivara que possivelmente diminui a distancia geográfica entre ambos os rios.

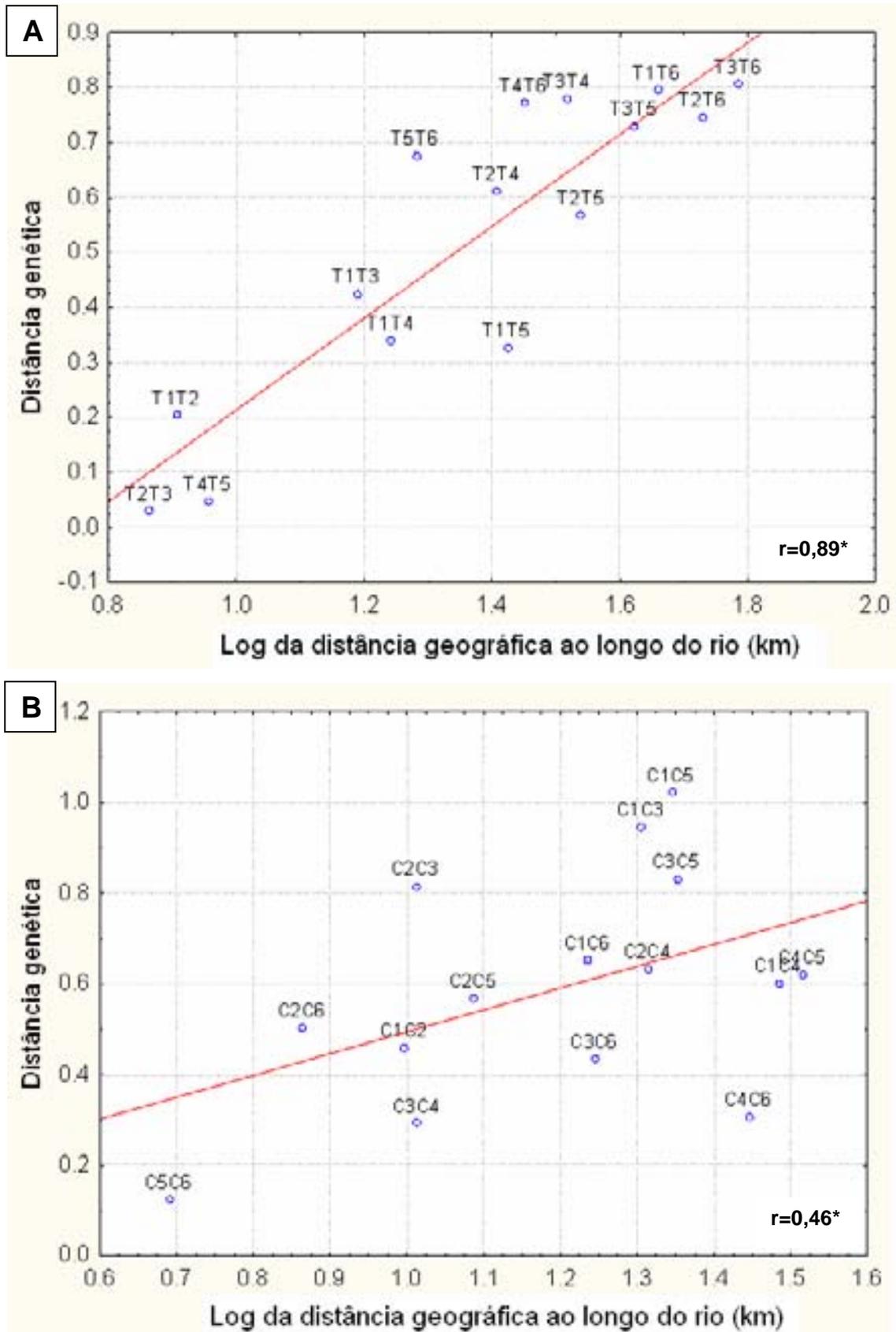


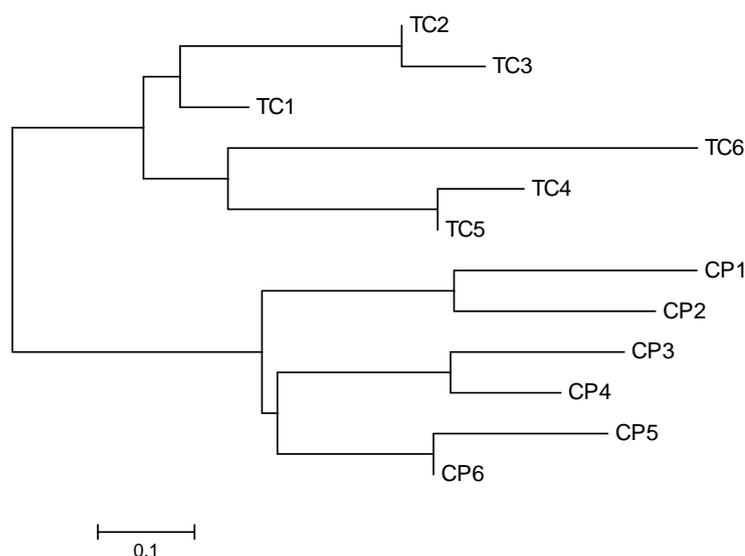
Figura 18. Correlação entre as distâncias genéticas e o Log das distâncias geográficas ao longo do rio entre as sub-populações. **(A)** Rio Tocó. **(B)** Rio Capivara.

Tabela 8. Teste de Mantel para comparação entre o log das distâncias geográficas com as distâncias genéticas.

	Rio Tocó	Rio Capivara	
	Distância genética	Distância genética	Distância genética sem ligação entre os rios
Distância ao longo rio (km)	0,89	0,46	0,69
Distância em linha reta (km)	0,86	0,39	0,54

Na análise de agrupamento (Figura 19) observa-se que as sub-populações coletadas em cada rio formaram dois grupos distintos. Este agrupamento evidencia que a distância genética entre sub-populações mais próximas geograficamente é menor que a observada entre sub-populações separadas por distâncias geográficas muito elevadas.

No agrupamento dos indivíduos de todas as sub-populações (Figura 20), também verificou-se dois grupos distintos formados pelos indivíduos constituintes de cada um dos rios. No rio Tocó, os indivíduos das sub-populações 2 e 3 agruparam-se de modo intermediário, não podendo ser observado isolamento entre os mesmos. Os acessos da sub-população 6 foram os mais divergentes entre todos os indivíduos analisados. Esta população está próxima à cabeceira do rio Tocó, um local extremamente degradado onde foram encontradas poucas plantas. Esta diferenciação provavelmente decorre de um gargalo genético a que a sub-população deve ter sido submetida, uma vez que os alelos encontrados nesta sub-população quando não são fixos, apresentam frequências bastante elevadas (Anexo 2).

**Figura 19.** Padrão da divergência genética entre as sub-populações de cada rio, baseado no agrupamento Neighbor-Joining utilizando distâncias genéticas de Nei (1973).

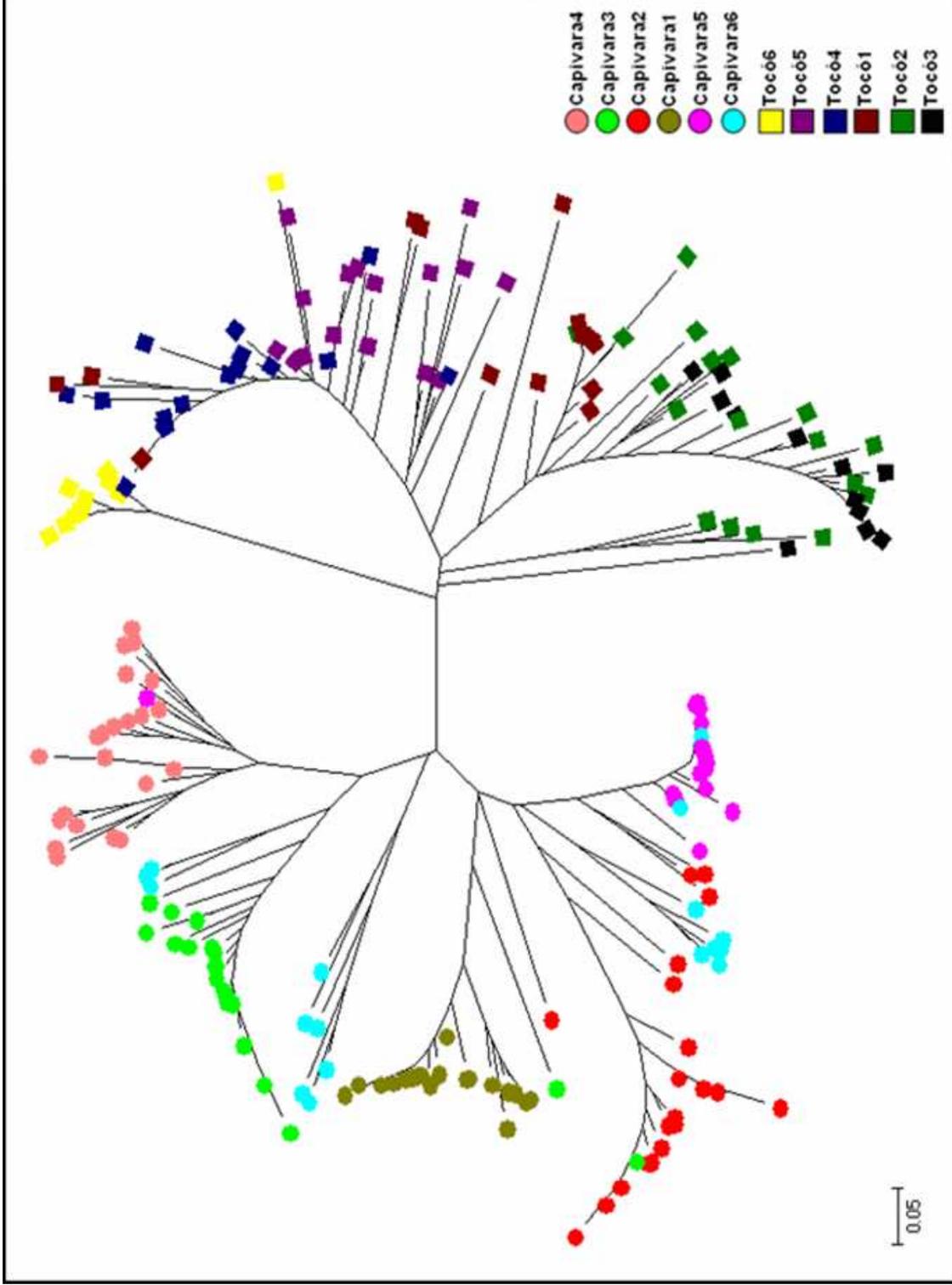


Figura 20. Padrão de estruturação genética das duas populações nos rios Tocó e Capivara, determinado pelo agrupamento Neighbor-Joining. Círculos representam os indivíduos do rio Capivara e quadrados os do rio Tocó.

Embora possa existir migração dentro das populações, conforme evidenciado pela análise bayesiana (Figura 18), ela não ocorre de modo homogêneo entre as sub-populações, conforme demonstrado pelas correlações entre as distâncias genéticas e físicas. O modelo com que a migração ocorre nessa espécie é do tipo zona de contato (*Stepping-stone*). Neste modelo assume-se uma estruturação populacional onde o fluxo gênico ocorre apenas entre sub-populações adjacentes. Conseqüentemente, a distância genética entre as sub-populações aumenta com o aumento da distancia geográfica entre elas (KIMURA e WEISS, 1964). A migração ocorre preferencialmente entre sub-populações vizinhas, em sentido quase unidirecional, da população à montante para a população à jusante. Desta forma, é formado um gradiente de diversidade ao longo da nascente dos rios até sua foz. O padrão unidirecional verificado indica que o fluxo gênico entre as sub-populações ocorre via sementes. Caso fosse realizado predominantemente via pólen, populações próximas se influenciariam mutuamente, não havendo a forte inidirecionalidade verificada. Dado que o fluxo ocorre basicamente por sementes, a hipótese formulada por Freire et al. (1990), de que as sementes são transportadas pela água, explica o sentido montante-juzante.

Em *G. mustelinum*, o pólen é grande, coberto de espículas e viscoso, o estigma é maior que as anteras, as pétalas possuem fortes manchas vermelhas e os nectários florais produzem grandes quantidades de néctar. Todas estas características favorecem a ocorrência de cruzamentos mediados por insetos polinizadores, particularmente abelhas. Apesar disso foram observados elevados coeficientes de endogamia. Embora os polinizadores possam realizar autofecundações, é mais provável que o excesso de homozigotos se deva ao cruzamento entre indivíduos aparentados e à geitogamia (a fecundação de uma flor com pólen de outra flor da mesma planta). A presença de correlação entre o número de indivíduos e a endogamia foi negativa e bastante elevada na população do rio Tocó (coeficiente de spearman igual a -0,94; $p < 0,005$) e mais baixa na população do rio Capivara (coeficiente de spearman igual a -0,58; $p > 0,22$). A forte associação observada no rio Tocó é um indício de que cruzamentos entre indivíduos aparentados é a principal maneira com que esta população se reproduz. Estudos especificamente delineados para estabelecer o sistema reprodutivo da espécie são necessários para confirmar estas evidências.

A elevada diferença genética entre as populações obriga que os procedimentos de conservação considerem ambas as populações. Os altos valores de F_{ST} dentro das populações não permite que apenas uma sub-população de cada rio seja conservada. Contudo, seria difícil implantar estratégias de conservação que incluíssem todas as sub-populações. Desse modo, uma estratégia adequada para conservação destas populações *in situ*, seria selecionar uma ou duas sub-populações por rio, que apresentasse os maiores índices de diversidade genética, além de condições adequadas de conservação. Nesses locais, o acréscimo de sementes das demais sub-populações do rio, enriqueceria a diversidade genética local. Estas localidades poderiam ser preservadas através de incentivos governamentais, oferecendo compensações para os proprietários das fazendas.

Uma vez que a correta distribuição da espécie não é conhecida, a amostragem em novas coletas deve incluir além das sub-populações, outras populações que certamente devem ocorrer em diferentes afluentes da bacia do rio Paraguaçu. Deve-se ressaltar ainda que amostras de todas as populações devem ser mantidas em bancos de germoplasma, uma vez que as condições para a manutenção *in situ* são inadequadas e há elevada diversidade entre as populações.

5.4. CONCLUSÕES

- A variabilidade genética dentro e entre das populações de *Gossypium mustelinum* foram bastante elevadas;
- O modelo com que à migração ocorre nessa espécie é do tipo Stepping-stone, sendo o fluxo gênico unidirecional, no sentido da correnteza do rio e principalmente por sementes, confirmando hipótese formulada por Freire et al. (1990);
- As estratégias para preservação *in situ* e *ex situ* somente serão adequadas caso as sub-populações sejam resguardadas em seu ambiente e as coletas de sementes englobem grande parte das sub-populações.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adams, K.L.; Wendel, J.F. (2004). Exploring the genomic mysteries of polyploidy in cotton. *Biological Journal of the Linnean Society*. 82:573-581.

Almeida, V.C. (2007). Caracterização genética e *in situ* de *Gossypium barbadense* na região norte do Brasil, Dissertação de Mestrado, UFRN (Universidade Federal do Rio Grande do Norte), Natal, Rio Grande do Norte, Brasil.

Alves, M. F.; Silva, U. C.; Freitas, R. B.; Ciampi, A. Y.; Hoffmann, L.; Barroso, P. A. V. (2008a). Estrutura e variabilidade genética de populações de *Gossypium mustelinum* no estado da Bahia visando a conservação. In: II Simpósio brasileiro de recursos genéticos. Brasília, Distrito Federal, p. 214.

Alves, M. F.; Dantas, A. C. A.; Silva, U. C.; Barroso, P. A. V.; Hoffmann, L. V. (2008b). Caracterização genética de acessos de *Gossypium mustelinum* em municípios do estado da Bahia visando a conservação. In: II Simpósio brasileiro de recursos genéticos. Brasília, Distrito Federal, p. 147.

Aranha, C.; Leitão, H. F. (1969). Uma Nova Espécie para o Gênero *Gossypium* L. *Bragantia*, v. 28, 23: 273-290.

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

Barroso, P.A.V.; Hoffmann, L. V.; Batista, C.E.A.; Araújo, R.L.; Moresco, E.R., (2006), Uso de esferas de inox na maceração de tecidos foliares de algodoeiro destinados à extração de DNA, Embrapa Algodão (Comunicado Técnico: 297), Campina Grande.

Barroso, P. A. V.; Hoffmann, L. V. (2003). Métodos de predição do comportamento de populações de melhoramento. Embrapa – CNPA. (Documentos, 108), Campina Grande.

Barroso, P.A.V.; Freire, E.C.; Amaral, J.A.B.; Silva, M.T., (2005b), Zonas de exclusão de algodoeiros transgênicos para preservação de espécies nativas ou naturalizadas, Embrapa Algodão (Comunicado Técnico, 242), Campina Grande.

Batista, C. E. A.; Ciampi, A. Y.; Hoffmann, L. V.; Barroso, P. A. V. (2005). Conservação, diversidade e estrutura genética de populações naturais de *Gossypium mustelinum* presente no semi-árido nordestino. In: V Congresso Brasileiro do Algodão. Salvador, Bahia.

Bertini, C.H.C.M.; Schuster, I.; Sedyama, T.; Barros, E.G.; Moreira, M.A., (2006), Characterization and genetic diversity analysis of cotton using microsatellites, *Genetics and Molecular Biology*, 29:321-329.

Blenda, A.; Scheffler, J.; Scheffler, B.; Palmer, M.; Lacape, J. M.; Yu, J. Z.; Jesudurai, C.; Jung, S.; Muthukumar, S.; Yellambalase, P.; Ficklin, S.; Staton, M.; Eshelman, R.; Ulloa, M.; Saha, S.; Burr, B.; Liu, S.; Zhang, T.; Fang, D.; Pepper, A.; Kumpatla, S.; Jacobs, J.; Tomkins, J.; Cantrell, R.; Main, D. (2006). CMD: A Cotton Microsatellite database resource for *Gossypium* genomics. *BMC Genomics*. 7: 132.

Borém, A., (2001). *Melhoramento de plantas*. Editora UFV, Viçosa.

Borém, A; Santos, F.R., (2004). *Biotecnologia Simplificada*. Editora UFV, Viçosa.

Bowcock, A. M.; Linares, A. R.; Tomfohrde, J.; Minch, E.; Kidd, J. R.; Sforza, L. L. C. (1994). High resolution of human evolution with polymorphic microsatellites. *Nature*, 368: 455-457.

CONAB, (2008), Décimo segundo levantamento de avaliação da safra 2008/2009 de dezembro 2008, disponível na internet em: <http://www.conab.gov.br/>, acesso dia 20 de dezembro de 2008.

Costa, A.C.P., Macedo, F.S., Honczar, G. (2008). Algodão, In: *Agronegócio brasileiro*, Sonopress Gráfica, São Paulo, pp. 24-29.

Cronn, R.C., Small, R.L., Haselkorn, T., and Wendel, J.F. (2002). Rapid diversification of the cotton genus (*Gossypium*: Malvaceae) revealed by analysis of sixteen nuclear and chloroplast genes. *Am. J. Botany*. 89: 707–725.

Dillehay, T. D.; Rossen, J.; Andres, T. C.; Williams, D. E. (2007). Preceramic Adoption of Peanut, Squash, and Cotton in Northern Peru. *Science* 316: 1890-1893.

Doyle J.J.; Doyle, J. L. (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12, 13–15.

Ellstrand, N. C.; Elan, D. R. (1993). Population genetic consequences of small population size: Implications for plant conservation. *Annu. Rev. Ecol.* 24: 217-242.

Ellstrand, N.C.; Neel, M.C. (2003) Conservation of genetic diversity in the endangered plant *Eriogonum ovalifolium* var. *vineum* (Polygonaceae). *Conservation Genetics*. 4:337-352.

Evanno, G.; Regnaut, S.; Goudet, J. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*. 14: 2611–2620.

Ferreira, M.E.; Grattapaglia, D., (1998), *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética*, Embrapa, Brasília.

Flores, M.; Morales, L.; Avila, A.; González, V.; Bustos, P.; García, D.; Mora, Y.; Guo, X.; Vides, J.C.; Peñero, D.; Dávila, G.; Palácios, R. (2005).

Diversification of DNA Sequences in the Symbiotic Genome of *Rhizobium etli*. Journal of Bacteriology. 187: 7185-7192.

Frankham, R.; Reed, D.H., (2003) Correlation between fitness and genetic diversity, Conservation biology, 17:230-237.

Freire, E. C., (2002), Fluxo gênico entre algodoeiros convencionais e transgênicos. Revista de Oleaginosas e Fibras, 6:471-482.

Freire, E. C.; Moreira, J. A. N.; Miranda, A. R.; Percival, A. E.; Stewart, J. M. (1990). Identificação de novos sítios de ocorrência de *Gossypium mustelinum* no Brasil. Embrapa, Campina Grande, pp.7.

Freire, E.C.; Barroso, P.A.V.; Penna, J.C.V.; Borém, A., (2003), Fluxo gênico: Análise do caso do algodão no Brasil, Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento, 29: 104-113.

Freitas, L. B.; Bered, F.B., (2003). *Genética & evolução vegetal*. Editora da UFRGS, Porto Alegre.

Freitas, R. B.; Silva, U. C.; Alves, M. F.; Ciampi, A. Y.; Hoffmann, L.; Barroso, P. A. V. (2008). Diversidade genética de populações de *Gossypium mustelinum* MIERS e estratégia para a conservação *in situ*. In: II Simpósio brasileiro de recursos genéticos. Brasília, Distrito Federal, p. 196.

Fryxell, P. A. (1984). Taxonomy and germoplasm resources. American Soc. Of Agronomy. p. 27-58.

Fryxell, P.A., (1965), Stages in the evolution of *Gossypium*, Advancing Frontiers of Plant Sciences, 10: 31-56.

Goudet, J., (2001), *FSTAT*: a program to estimate and test gene diversities and fixation índices (Software). Version 2.9.3, 2001 <http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm> (27 de julho de 2007).

Grover, C.E.; Kim, H.; Wing, R. A.; Paterson, A. H.; Wendel, J. F. (2004). Incongruent Patterns of Local and Global Genome Size Evolution in Cotton. Genome Research, 14: 1474-1482.

Guo, W.; Cai, C.; Wang, C.; Han, Z.; Song, X.; Wang, K.; Niu, X.; Lu, K.; Shi, B.; Zhang, T. (2007). A Microsatellite-Based, Gene-Rich Linkage Map Reveals Genome Structure, Function and Evolution in *Gossypium*. Genetics 176: 527–541.

Hardy, O.J.; Charbonnel, N.; Fréville, H.; Heuertz, M. (2003). Microsatellite allele sizes: a simple test to assess their significance on genetic differentiation. Genetics 163: 1467–1482.

Hasenkampf, C.A.; Menzel, M. Y., (1980), Incipient genome differentiation in *Gossypium*. II. Comparison of 12 chromosomes in *G. hirsutum*, *G. mustelinum* and *G. tomentosum* using heterozygous translocations, Genetics 95: 971-983.

Jiang, C.; Wright, R.; El-Zik, K.; Paterson, A. H. (1998). Polyploid formation created unique avenues for response to selection in *Gossypium* (cotton). *PNSA*, 95: 4419-4424.

Khan, S.A.; Hussain, D.; Askari, E.; Stewart, J.McD.; Malik, K.A.; Zafar, Y. (2000). Molecular phylogeny of *Gossypium* species by DNA fingerprinting. *Theor Appl Genet*, 101:931–938.

Kimura, M.; Weiss, G.H. (1964). The stepping stone model of population structure and the decrease of genetic correlation with distance. *Genetics*, 49: 561-576.

Koumi, P.; Green, H.E.; Hartley, S.; Jordan, D.; Lahec, S.; Livett, R.J.; Tsang, J.W.; Ward, D.M. (2004). Evaluation and validation of the ABI 3700, ABI 3100, and the MegaBACE 1000 capillary array electrophoresis instruments for use with short tandem repeat microsatellite typing in a forensic environment. *Electrophoresis*, 25: 2227–2241.

Lacape, J. M.; Nguyen, T. B.; Thibivilliers, S.; Bojinov, B.; Courtois, B.; Cantrell, R. G.; Burr, B.; Hau, B. (2003). A combined RFLP-SSR-AFLP map of tetraploid cotton based on a *Gossypium hirsutum* x *Gossypium barbadense* backcross population. *Genome* 46(4): 612-26

Lacape, J.M.; Dessauw, D.; Rajab, M.; Noyer, J.L.; Hau, B. (2007). Microsatellite diversity in tetraploid *Gossypium* germplasm: assembling a highly informative genotyping set of cotton SSRs. *Mol. Breeding*, 19:45–58

Lewis P.O.; Zaykin, D. (2001). Genetic Data Analysis: Computer program for the analysis of allelic data. Version 1.0 (d16c). Disponível na internet em: <http://lewis.eeb.uconn.edu/lewishome/software.html>. Acesso dia 17 de junho de 2008.

Liu, Q.; Brubaker, C.L.; Green, A.G.; Marshall, D.R.; Sharp, P.J.; Singh, S.P., (2001), Evolution of the FAD-2 fatty acid desaturase 5' UTR intron and the molecular systematics of *Gossypium* (Malvaceae), *Am J Bot*, 88:92-102.

Liu, S.; Cantrelly, R.G.; Maccarty, J.C.; Stewart, J. M., (2000a), Simple sequence repeat-based assessment of genetic diversity in cotton race stock accessions, *Crop Science*, 40:1459-1469.

Liu, S.; Saha, S.; Stelly, D.; Burr, B.; Cantrell, R.G., (2000b), Chromosomal assignment of microsatellite loci in cotton, *Journal of Heredity*, 9:326-332.

Mantel, N. A. (1967). The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Res.*, 27:209-220.

Medeiros, J.D., (2003) A biotecnologia e a extinção das espécies. *Revista Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento*, 30:109–113.

Michelotto, M. D.; Silva, R. A.; Chagas, N. R.; Busoli, A. C. (2003). Ocorrência simultânea de *Anthonomus grandis* Boheman, 1983 (Coleoptera: Curculionidae) e *Pectinophora gossypiella* (Saunders, 1984) (Lepdoptera: Gelechidae) em maçãs de seis cultivares de algodoeiro. In: 4º Congresso brasileiro do Algodão.

Minch, E. (1998). MICROSAT. Version 1.5. University of Standford, 1998.

Miranda, J. E.; Suassuna, N.D. (2004). Guia de identificação e controle das principais pragas e doenças do algodoeiro. Documentos Embrapa.

Mullis, K.; Fallona, F. (1987). Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase catalysed chain reaction. *Methods Enzymol*, 55:335-3350.

Nazareno, A.G.; Marin, A.L.A.; Mastriner, M.A.; Pereira, R.A.S., (2008). Conservação genética de populações naturais de *Ficus spp.* (Moraceae) em paisagens fragmentadas no estado de São Paulo. In: II Simpósio Brasileiro de Recursos Genéticos. Brasília, Distrito Federal, p. 317.

Nei, M. (1973). Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America*. v. 70. 12: 3321-3323.

Neves, O. S.; Cavaleri, P. A.; Gridi-Papp, I. L.; Fuzzato, M. G. (1965). Algodoeiro selvagem no Nordeste do Brasil. *Bragantia*. 24:19-25.

Nguyen, T.B.; Giband, 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*, 109:167-175.

Paiva, E. (2007). Perspectivas do algodão transgênicos no Brasil. In: *Cotton Business* (Roppa, A.). ed. Esphera. Campinas, São Paulo. pp. 22-24.

Pereira, G. S. (2008). Competição intra e interespecífica entre polens de algodoeiros. Monografia, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, Paraíba, Brasil.

Pickergill, B.; Barrett, S. C. H.; Andrade, D., (1975), Wild Cotton in Northeast Brasil, *Biotrópica*, 7: 42-54.

Pritchard, J.K.; Stephens, P. D. P. (2007) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*. 155: 945–959.

Ramalho, M.A.P.; Santos, J.B.; Pinto, C.A.B.P., (2008), *Genética na Agropecuária*, UFLA ed, Lavras.

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

Ribeiro, C. S. N. (2008). Caracterização *in situ*, molecular e morfológica de acessos de *Gossypium* do estado de Pernambuco. Dissertação de Mestrado. UFRPE (Universidade Federal Rural de Pernambuco). Recife, Pernambuco. Brasil.

Rigon, L., Corrêa, S., Beling, R.R., Reetz, E. R., Vencato, A., Santos, C. (2008). *Anuário brasileiro do Algodão 2008*. Gazeta Santa Cruz, Santa Cruz do Sul, 138p.

Rong, J., Abbey, C., Bowers, J.E., Brubaker, C.L., Chang, C., Chee, P.W., Delmonte, T.A., Ding, X., Garza, J.J., Marler, B.S., Park, C.-H., Pierce, G.J., Rainey, K., M., Rastogi, V.K., Schulze, S.R., Trolinder, N.L., Wendel, J.F., Wilkins, T.A., Williams-coplin, T.D., Wing, R.A., Wright, R.J., Zhao, X., Zhu, L., e Paterson, A.H. (2004). A 3347-locus genetic recombination map of sequence-tagged sites reveals features of genome organization, transmission and evolution of cotton (*Gossypium*). *Genetics*, 166: 389-417.

Santos, E. B. (1985), Caracterização botânica de híbridos interespecíficos em *Gossypium*, Dissertação de Mestrado, Universidade Federal da Paraíba, Areia, Paraíba, Brasil.

Saranga, Y.; Menz, M.; Jiang, C.; Wright, R. J.; Yakir, D.; Paterson. A. H. (2001). Genomic Dissection of Genotype × Environment Interactions Conferring Adaptation of Cotton to Arid Conditions. *Genome Research*, 11: 1988-1995.

Shappley, Z. W.; Jenkins, J. Zhu, J. C. Mccarty Jr. (1998). Quantitative trait loci associated with agronomic and fiber traits of unland cotton. *Cotton Sci.* 2: 153-163.

Silva, U. C.; Alves, M. F.; Freitas, R. B.; Barroso, P. A. V.; Hoffmann, L. V. (2008). Uso de marcadores SSR na tomada de decisões em prograas de pré-melhoramento do algodoeiro (*Gossypium hirsutum*). In: 54^o Congresso Brasileiro de Genética. Bahia. p. 79.

Sthephens, S. G., (1967). Evolution under domestication of the new world cottons (*Gossypium spp.*). *Ciência e Cultura*, 19: 118-134.

Tóth, G.; Gáspári, Z.; Jurka, J. (2000). Microsatellites in Different Eukaryotic Genomes: Survey and Analysis. *Genome Res.* 10: 967-981

Ulloa, M.; Stewart, J.McD.; Garcia, E.A.C; Godoy, S.A.; Gaytan, A.M.; Acosta, S.N., (2006), Cotton genetic resources in the western status of Mexico: *in situ* conservation status and germplasm collection for *ex situ* preservation, *Genetic Resources and Crop Evolution*, 53:653-668.

Valicek, P. (1977). Some notes on the taxonomy of the new specie *Gossypium caicoense* Aran. *Agricultura trópica e subtropical*. 10: 119-123.

Valicek, P. (1978). Wild and Cultivated cottons. *Cotton Fiber Trop.*, 33: 363-385.

Vidal, M.S.; Coutinho, T.C. Hoffmann, L.V., (2003), Comparação entre protocolos de extração de DNA de algodão para emprego em ensaios com marcadores moleculares, Embrapa Algodão (Circular técnica, 74), Campina Grande.

Vidal Neto, F. das C.; Barroso, P. A. V.; Santos, J. W dos.; Araújo, G. P.. (2005). Perfil do algodão arbóreo no estado do Ceará. In: V congresso brasileiro do algodão. Salvador, Bahia.

Vieira, Â. T.; Melo, F.; Lopes, H. B. V.; Campos, J. C. V.; Guimarães, J. T.; Costa, J. M.; Bomfim, L. F. C.; Couto, P. A.A.; Benvenuti, S. M. P.. (2005a). Projeto Cadastro de Fontes de Abastecimento por Água Subterrânea. Diagnóstico do Município de Riachão do Jacuípe, Salvador: Bahia. 13p. CPRM/PRODEEM.

Vieira, Â. T.; Melo, F.; Lopes, H. B. V.; Campos, J. C. V.; Guimarães, J. T.; Costa, J. M.; Bomfim, L. F. C.; Couto, P. A. A.; Benvenuti, S. M. P.. (2005b). Projeto Cadastro de Fontes de Abastecimento por Água Subterrânea. Diagnóstico do Município de Itaberaba, Salvador: Bahia. 14p. CPRM/PRODEEM.

Weir, B. S.; Cockerham, C. C.. (1984) Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 38:1358-1370.

Wendel, J. F.; Cronn, R.C. (2003). Polyploidy and the evolutionary Dispersed repetitive DNA has spread to new genomes since polyhistory of cotton. *Adv. Agron.* 78: 139–186.

Wendel, J.F.; Rowley, R.; Stewart, J.McD., (1994), Genetic diversity in phylogenetic relationships of the Brazilian endemic cotton, *Gossypium mustelinum* (Malvaceae), *Plant systematics and evolution*, 192: 49-59.

Westengen, O. T.; Huamán, Z.; Heun, M.. (2005). Genetic diversity and geographic pattern in early South American cotton domestication. *Theor Appl Genet.*, 110: 392–402.

Wright, S.. (1965). The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. *Evolution*, 19:395-420.

Zane, L.; Bargelloni, L.; Patarnello, T.. (2002). Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology* , 11: 1-16.

Zhang, T.; Yuan, Y.; Yu, J.; Guo, W. Kohel, R. J. (2002). Molecular tagging of a major QTL for fibre strength in upland cotton and its marker-assisted selection. *Theor. Appl. Genet.* 106: 262-268.

Zucchi, M. I.. (2002). Análise da estrutura genética de *Eugenia dysenterica* DC utilizando marcadores RAPD e SSR. Piracicaba, 148p. Tese de Doutorado. EsaIQ (Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz), Universidade de São Paulo.

Alexos

ANEXO 1**Questionário de preenchimento para expedições *in situ***

Data: ___/___/___ Identificação do material: _____

1) Dados geográficos e do proprietário/mantenedor

- a) Município _____ b) Estado _____
c) Lat. _____ d) Long. _____ e) Altit. _____
f) Proprietário _____
g) Propriedade ou endereço _____
h) Propriedade
() Residência urbana () Residência rural () Pequena propriedade
() Média/grande propriedade () Outros _____
i) Material coletado
() Sementes () Folhas/flores () Insetos nas flores
() Excicata () Outro _____

2) Dados da população

- a) Espécie
() *G. barbadense* () *G. mustelinum* () Mocó () Herbáceo () ñ.
identificado
b) Tipo de População
() Selvagem () Feral () Fundo de quintal
() Variedade local () Espontânea () Beira de estrada
() Outra _____
c) Usos
() Medicinal () Fiação () Lamparina () Ornamental
() Algodão de farmácia () Nenhum () Desconhecido
() Outro _____
d) Número de indivíduos: Adultos _____ Jovens _____

- e) Área aproximada _____
- f) Origem
() Familiar () Vizinho/amigo () Outro _____
- g) Riscos possíveis
() Pastejo de animais () Depredação do ambiente () Fluxo gênico
() Mudança de hábitos culturais/abandono () Expansão de lavouras
() Outros _____
- h) Mancha na flor:
() Ausente () Forte () Média () Fraca () Sem flor
- i) Sementes
() Rim firme () Rim fraco () Semente separadas () Sem sementes
- j) Linter
() Presente e branco () Presente e colorido () Parcialmente presente
() Ausente
- k) Fibra
() Branca () Marrom escuro () Marrom claro () Bege () Verde
- l) Cor da folha
() Verde () Colorida

3) Dados culturais

- a) Plantio _____
- b) Controle de doenças/pragas _____
- c) Adubação _____
- d) Realiza colheita () Sim () Não
- e) Armazena sementes () Não () Sim, como: _____
- f) Beneficiamento () Não () Sim, Como: _____
- g) Comercialização _____
- h) Doenças
() Ramulária () Ramulose () Mosaico comum () Doença azul
() Bacteriose () Outra _____
- i) Pragas
() Bicudo () Lagartas que atacam maçãs () Lagartas desfolhadoras
() Pulgões () Outros _____

4) Dados do ambiente e fenológicos

a) Vegetação predominante _____

b) Época de florescimento _____

c) Época de frutificação _____

d) Altura média

() <0,5m () 0,5 a 1m () 1 a 2m () 2 a 3m () acima de 3m

e) Idade média aproximada das plantas

5) Observações (descrição origem, outras características, etc)

ANEXO 2

Freqüência dos alelos encontrados nas populações de *Gossypium mustelinum* nos rios Tocó e Capivara. Em destaque alelos exclusivos em cada população.

Loco	Alelo	CP1	CP2	CP3	CP4	CP5	CP6	TC1	TC2	TC3	TC4	TC5	TC6
BNL169-1	194	1,00	0,81	0,00	0,20	0,00	0,37	0,06	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	196	0,00	0,19	1,00	0,80	1,00	0,63	0,70	1,00	0,92	0,15	0,33	0,95
	198	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,24	0,00	0,08	0,85	0,68	0,05
BNL169-2	207	0,00	0,00	0,94	0,05	0,00	0,13	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	209	0,00	0,19	0,00	0,23	0,02	0,37	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	211	0,00	0,79	0,06	0,53	0,98	0,37	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	212	1,00	0,02	0,00	0,00	0,00	0,13	0,06	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	213	0,00	0,00	0,00	0,20	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	214	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,34	0,71	0,00	0,03	0,00
	216	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,06	0,25	0,08	0,12	0,30	0,00
	218	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,88	0,41	0,21	0,88	0,67	1,00
BNL252	175	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,84	0,81	0,83	0,47	0,89	0,05
	181	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,19	0,17	0,00	0,08	0,95
	185	1,00	0,25	0,13	0,71	1,00	0,70	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	187	0,00	0,75	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	192	0,00	0,00	0,87	0,29	0,00	0,30	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	200	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,16	0,00	0,00	0,53	0,03	0,00
BNL686-1	141	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,53	0,82	0,00	0,00	0,00
	143	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,77	0,47	0,18	0,60	0,08	0,00
	145	0,00	0,17	1,00	1,00	1,00	1,00	0,17	0,00	0,00	0,40	0,92	1,00
	149	0,37	0,83	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	151	0,63	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,07	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
BNL686-2	155	0,26	0,79	0,89	1,00	0,02	0,53	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	157	0,00	0,00	0,11	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	177	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,07	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	179	0,68	0,21	0,00	0,00	0,98	0,47	0,93	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
	181	0,05	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
BNL840	149	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,21	0,63	0,75	0,96	0,90	1,00
	151	0,05	0,24	0,00	0,00	1,00	0,80	0,74	0,38	0,25	0,00	0,00	0,00
	157	0,95	0,76	1,00	1,00	0,00	0,20	0,05	0,00	0,00	0,04	0,10	0,00

Loco	Alelo	CP1	CP2	CP3	CP4	CP5	CP6	TC1	TC2	TC3	TC4	TC5	TC6
CIR383	124	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,03	0,00	0,00	0,14	0,04	0,00
	130	0,00	0,26	0,00	0,00	1,00	0,71	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	132	0,00	0,74	0,00	0,00	0,00	0,06	0,71	1,00	0,91	0,00	0,00	0,00
	134	0,00	0,00	0,78	0,34	0,00	0,00	0,26	0,00	0,00	0,83	0,88	0,08
	140	0,00	0,00	0,08	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	142	1,00	0,00	0,14	0,66	0,00	0,23	0,00	0,00	0,09	0,03	0,08	0,92
Cir 381-1	246	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,94	0,34	0,14	1,00	1,00	1,00
	248	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,06	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	250	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,58	0,86	0,00	0,00	0,00
	254	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,08	0,00	0,00	0,00	0,00
CIR381-2	261	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,25	0,00	0,44	0,64	0,00	0,05	0,96
	265	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,75	1,00	0,56	0,36	1,00	0,95	0,04