

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

**CARACTERIZAÇÃO E ANÁLISE DE DIVERSIDADE
GENÉTICA EM ALGODOEIRO HERBÁCEO POR
MARCADORES MICROSSATÉLITES E GENEALOGIA**

CÂNDIDA HERMÍNIA CAMPOS DE MAGALHÃES BERTINI
Doctor Scientiae

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2004

CÂNDIDA HERMÍNIA CAMPOS DE MAGALHÃES BERTINI

**CARACTERIZAÇÃO E ANÁLISE DE DIVERSIDADE GENÉTICA EM
ALGODOEIRO HERBÁCEO POR MARCADORES MICROSSATÉLITES E
GENEALOGIA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, para obtenção do título “Doctor Scientiae”.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2004**

CÂNDIDA HERMÍNIA CAMPOS DE MAGALHÃES BERTINI

**CARACTERIZAÇÃO E ANÁLISE DE DIVERSIDADE GENÉTICA EM
ALGODOEIRO HERBÁCEO POR MARCADORES MICROSSATÉLITES E
GENEALOGIA**

Tese apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Fitotecnia, para obtenção do título
“Doctor Scientiae”.

APROVADA: 10 de agosto de 2004.

Prof. Tocio Sedyama
(Conselheiro)

Prof. Everaldo Gonçalves de Barros
(Conselheiro)

Prof. Derly José Henrique da Silva

Dr. Ivan Schuster

Prof. Maurílio Alves Moreira
(Orientador)

Às pessoas que sempre me deram apoio e se mostraram companheiras de todos os momentos, permitindo que essa etapa da vida fosse vencida por meio de muito amor e compreensão, apesar das saudades:

Meu marido, *Leopoldo*.

Minha Filha, *Kaile*.

Meus pais, *Braulio e Ângela*.

Meu irmão, *Antônio Newton*.

Meu Avô: *Isaac Newton Campos (in memoriam)*.

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela presença e força nessa luta em busca do conhecimento e por amenizar as saudades pela ausência da minha família.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV) e ao departamento de Fitotecnia, pela oportunidade de realizar o curso.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

À Cooperativa Central de Pesquisa Agrícola (COODETEC) pelo apoio e envio de materiais para a realização da pesquisa.

Às instituições: EMBRAPA, EPAMIG, IAC e IAPAR, pelo envio das sementes das cultivares analisadas nesse trabalho.

A toda a minha família, pelo apoio em todas as etapas dessa longa caminhada.

Ao meu orientador prof. Maurílio Alves Moreira, pelo apoio e confiança, pela orientação e por fornecer todos os meios necessários ao desenvolvimento do trabalho.

Aos meus conselheiros:

Prof. Everaldo Gonçalves de Barros, por sua ajuda e apoio durante o desenvolvimento do trabalho e por suas sugestões para o aperfeiçoamento da tese.

Prof. Tocio Sedyama, pela acolhida calorosa no departamento de Fitotecnia, demonstração de amizade, pelo grande apoio dado durante o desenvolvimento do trabalho e pelas sugestões para o aperfeiçoamento da tese.

Ao Ivan Schuster, pela orientação, amizade, paciência e importante contribuição em todas as etapas do trabalho.

Ao prof. Derly José Henriques da Silva, pelas sugestões para o aperfeiçoamento da tese.

Aos professores da UFC que sempre torceram por mim, prof. Fanuel Pereira da Silva, prof. João Licínio Nunes de Pinho e José Higino Ribeiro dos Santos.

Ao amigo Diolino Henriques Neto, pelo apoio e grande ajuda nos momentos mais difíceis.

À secretária do Programa de Pós-graduação em Fitotecnia, Mara Rodrigues, pela amizade, apoio e atenção nos momentos em que precisamos de sua ajuda.

Aos amigos, companheiros de todas as horas, Andréa Borges, Luzineide, Dagoberto, Magno, Liv, Pahlevi, Georgiana, Evaldo, Graziele, Belmino, Cláudia, Janina, Luís Personni, Claudomiro, Sônia, Gualter e Ermelinda.

Aos amigos Andréia Márcia e Dorismar, pela amizade e apoio.

Aos amigos do laboratório, pela ajuda, amizade e por tornarem o trabalho mais prazeroso: Andreia Barcellos, Chico, Francismar, Rita, Márcia Flores, Simone, Telma, Márcia Costa, Cíntia, Mariana, Viviane, Márcio Mendes, Newton, Abelmon, Jay Wallace, William, Taís, Fernanda, Márcio Antônio, Thaís (estagiária), James, Ricardo e Sandra.

Aos colegas do Biomol: Luciano, Wagner, Vilmar, Pedro Ivo, Klever, Arlindo, Edgard, Gustavo, Fábio, Demerson e Thiago.

Ao Naldo e João Paulo, pela ajuda em vários momentos da realização do trabalho.

Aos funcionários do BIOAGRO: Aloísio, Alessandra, Gláucia e Exedito.

A todos que, de alguma forma, contribuíram positivamente para a realização desse trabalho, meus sinceros agradecimentos.

BIOGRAFIA

CÂNDIDA HERMÍNIA CAMPOS DE MAGALHÃES BERTINI, filha de Bráulio de Sá Magalhães e Ângela Franczy Campos de Magalhães, nasceu em Fortaleza, Ceará, onde cursou o ensino fundamental e médio.

Em agosto de 1991, ingressou no Curso de Agronomia da Universidade Federal do Ceará (UFC), em Fortaleza-CE, diplomando-se em agosto de 1996. Durante o período de março de 1993 a dezembro de 1996 foi bolsista do programa especial de treinamento (PET) do curso de Agronomia.

Iniciou o curso de Mestrado em Fitotecnia em março de 1997 na UFC tendo adquirido o grau de *Master of Scientiae* em julho de 1999.

Em agosto de 2000, iniciou o curso de Doutorado em Fitotecnia na Universidade Federal de Viçosa (UFV), defendendo tese em 10 de agosto de 2004.

CONTEÚDO

<i>RESUMO</i>	viii
<i>ABSTRACT</i>	x
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. OBJETIVOS	4
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
3.1. Taxonomia e evolução do gênero <i>Gossypium</i>	5
3.2. Origem e evolução dos algodoeiros alotetraplóides	6
3.3. Diversidade genética em <i>Gossypium hirsutum</i> L.	9
3.4. Melhoramento genético do <i>G. hirsutum</i> no Brasil.....	13
3.5. Marcadores moleculares no melhoramento genético do algodoeiro.	18
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	23
<i>CAPÍTULO 1</i>	29
UTILIZAÇÃO DE DIFERENTES SISTEMAS ELETROFORÉTICOS PARA A DETECÇÃO DE POLIMORFISMOS DE MICROSSATÉLITES EM ALGODOEIRO HERBÁCEO	29
RESUMO	30
INTRODUÇÃO	32
MATERIAL E MÉTODOS	34
RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
CONCLUSÕES	44
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45
<i>CAPÍTULO 2</i>	47
AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA E CARACTERIZAÇÃO DE CULTIVARES E LINHAGENS DE ALGODOEIRO POR MICROSSATÉLITES	47
RESUMO	48
INTRODUÇÃO	49
MATERIAL E MÉTODOS	51
RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
CONCLUSÕES	70
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71
ANEXO	74

<i>CAPÍTULO 3</i>	78
DIVERSIDADE GENÉTICA DE CULTIVARES E LINHAGENS DE ALGODOEIRO ESTIMADA COM BASE NO COEFICIENTE DE PARENTESCO E MARCADORES MICROSSATÉLITES	78
RESUMO	79
INTRODUÇÃO	81
MATERIAL E MÉTODOS	84
CONCLUSÕES	105
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	106

RESUMO

BERTINI, Cândida Hermínia Campos de Magalhães, D.S., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2004. **Caracterização e análise de diversidade genética em algodoeiro herbáceo por marcadores microssatélites e genealogia.** Orientador: Maurílio Alves Moreira. Conselheiros: Everaldo Gonçalves de Barros e Tocio Sedyama.

A vulnerabilidade genética tornou-se preocupação constante no melhoramento de qualquer espécie vegetal. A manutenção da diversidade genética entre genótipos em uma cultura torna-se medida de proteção contra potenciais perdas devido ao ataque de pragas e doenças. A diversidade genética entre genótipos também facilita a criação de populações segregantes a partir das quais plantas contendo combinações de genes superiores podem ser selecionadas. Com a aprovação da Lei de Proteção de Cultivares no Brasil (1997), a caracterização genética de cultivares tornou-se importante na proteção do direito intelectual do melhorista, bem como para auxiliar os programas de melhoramento dessas cultivares. Os objetivos gerais desse trabalho foram caracterizar e avaliar a diversidade genética de algumas cultivares de importância tanto comercial quanto para os programas de melhoramento do Brasil, bem como de linhagens, por meio de marcadores microssatélites (SSR). Dessa forma, neste trabalho foram utilizadas cultivares de algodoeiro herbáceo indicadas para plantio em diferentes regiões do Brasil, bem como cultivares provenientes da Argentina e Paraguai. Linhagens de algodoeiro, provenientes do programa de melhoramento da COODETEC, também foram utilizadas. Os resultados evidenciaram que o sistema eletroforético com gel desnaturante de poli(acrilamida) 7% foi o recomendado para realização de caracterização e análise de diversidade genética de cultivares de algodoeiro herbáceo, por apresentar maior poder de resolução. Ademais, constatou-se o potencial dos marcadores microssatélites em estudos de diversidade genética entre indivíduos da espécie *Gossypium hirsutum* L., uma base genética estreita entre as cultivares e entre as linhagens de

algodoeiro e, como consequência a necessidade de se introduzir novos alelos no *pool* gênico dos algodoeiros melhorados. O conjunto de *primers* SSR selecionados para as cultivares (11 pares de *primers* SSR) e linhagens (14 pares de *primers*) poderão ser úteis nos processos de proteção de cultivares, nas análises de pureza genética e nos programas de melhoramento. A correlação entre as distâncias genéticas obtidas pelos coeficientes de parentesco e marcadores microssatélites tanto para as cultivares quanto para as linhagens foi positiva e significativa ($P < 0,001$). Entretanto, a magnitude das correlações não foi elevada, com valores iguais a 0,25 entre as cultivares e a 0,29 entre as linhagens. A estimativa da diversidade genética com base em marcadores microssatélites forneceu mais informações sobre as relações genéticas entre os indivíduos. A constatação de que poucos ancestrais contribuem para a constituição genética das cultivares de algodoeiro usadas no Brasil, sugere maior preocupação em introgridir novos alelos no *pool* gênico dessas cultivares e, assim, aumentar sua base genética.

ABSTRACT

BERTINI, Cândida Hermínia Campos de Magalhães, D.S., Universidade Federal de Viçosa, august, 2004. **Characterization and analysis of cotton genetic diversity determined by microsatellites and genealogy.** Advisor: Maurílio Alves Moreira. Committe members: Everaldo Gonçalves de Barros e Tocio Sedyama.

The genetic vulnerability is a constant concern breeding of any vegetal species. Maintaining genetic diversity among crop genotypes offers a measure of protection against potential widespread losses from crop pests and facilitates the creation of segregating populations from which plants with superior gene combinations can be selected. Along with the development of new cultivars, there has been a growing interest in the genetic characterization, for commercial protection provided by the Brazilian Cultivar Protection Law and regulations (1997). The general purpose of this work were to characterize and to evaluate the genetic diversity of some important cultivars used in breeding program in Brazil through microsatellites (SSR) markers and genealogy. In this work we used cotton cultivars developed and released by Brazilian public and private institutions and cotton cultivars developed in Argentina and Paraguay. Cotton lines from breeding program developed by COODETEC also were used at present work. In conclusion, was evidenced that the eletrophoretic system with denaturing gel of 7% was recommended for characterization and analyze of genetic diversity of cotton cultivars because they present higher resolution. The results revealed the potential of the markers for genetic diversity studies among *Gossypium hirsutum* L. genotypes, a narrow genetic base among cultivars and among lines and the necessity to introduce new alleles in improved cotton germplasm. The selected SSR primers for the cultivars (11 primers pairs) and lines (14 primers pairs) will be useful for cultivars protection process, analyzes of genetic purity and in breeding program. The correlation evidenced between the estimation used to calculate the genetic distance among

cultivars and among lines was positive and significant. However, the correlations are not so high, with values equal to 0,25 among cultivars and 0,29 among lines. The genetic diversity estimation based in molecular markers provided more information about the genetic relationships among individuals. The evidence that few ancestral contribute to genetic constitution of the cotton cultivars used in Brazil suggest a need of introducing new alleles into the gene pool of these cultivars and in this way to increase the cotton genetic base.

1. INTRODUÇÃO GERAL

Gossypium hirsutum L. é uma das quatro espécies cultivadas no mundo para a produção da fibra de algodão, sendo explorada economicamente numa ampla faixa tropical e em algumas regiões subtropicais. Essa espécie contribui com 90% da produção mundial de algodão e seu cultivo apresenta grande importância social e econômica para o Brasil. Sua utilização concentra-se na indústria de fiação e tecelagem e na indústria de alimentação animal (farelo) e humana (óleo), além de grande número de produtos secundários.

Nos últimos anos pôde-se observar a recuperação da cotonicultura no Brasil, em termos de produção e até mesmo de inserção nos mercados internacionais. Apesar da redução da área plantada, verificou-se ganho elevado de produtividade na safra de 2002/03. A elevada produtividade é devida a grandes investimentos em tecnologia de ponta adotada pelos cotonicultores, principalmente da região Centro-Oeste do País. Inserida a essas tecnologias está a utilização de sementes melhoradas que proporcionam elevada produtividade e adaptabilidade às diversas regiões do País. Apesar do grande número de variedades comerciais de algodão existentes no Brasil, há pouca variabilidade genética entre elas.

O conhecimento da diversidade genética e a relação entre cultivares melhorados são de grande importância para o melhoramento das culturas. A diversidade genética assegura medidas de proteção contra problemas futuros com doenças ou pragas e fornecem uma base para ganhos genéticos futuros. A uniformidade genética dentro de uma cultura pode ser causada pelo uso extensivo de uma ou mais cultivares estreitamente relacionadas. A hibridação entre esses tipos de cultivares resulta em base genética estreita para as novas variedades, podendo levar a desastres naturais, tais como a susceptibilidade a doenças.

Muitas variedades de algodoeiro têm sido desenvolvidas a partir de cruzamentos entre pais proximamente relacionados, mas o ganho de produção limitado tem levado à procura do uso mais extensivo de germoplasma exótico. Apesar dos métodos de melhoramento terem aumentado a eficiência na transferência de alelos de fontes de germoplasma exótico para o *pool* gênico dos algodoeiros melhorados, essas fontes ainda permanecem subutilizadas. O

conhecimento das relações genéticas e diversidade genética tanto dos materiais não adaptados quanto daqueles usados nos plantios comerciais é de grande importância para os melhoristas. Por meio desses conhecimentos eles poderão utilizar materiais exóticos mais divergentes evitando-se assim maior vulnerabilidade genética dos futuros cultivares lançados no mercado.

Os marcadores moleculares possibilitam várias aplicações e análises genéticas com grandes oportunidades de utilização no melhoramento genético. Esses marcadores apresentam diversas vantagens sobre os marcadores morfológicos, dentre elas, destacam-se o alto grau de polimorfismo, a independência entre os efeitos ambientais e o estágio fisiológico da planta. Marcador potencial é qualquer seqüência de DNA capaz de detectar polimorfismo. Considerando-se sua natureza polimórfica, sua disponibilidade e abundância ao longo do genoma do algodoeiro, e por serem baseados na reação em cadeia da polimerase (PCR), os marcadores microssatélites, também denominados seqüências simples repetidas (SSR), são úteis em estudos de diversidade genética. Mais de 1.000 pares de *primers* microssatélites já foram isolados a partir de bibliotecas de DNA genômico do algodão, tornando esses marcadores bastante úteis em análises genéticas no algodão.

Os métodos usados para estimar a similaridade genética com base em marcadores moleculares e coeficiente de parentesco têm abordagens bem diferentes. Eles se baseiam em diferentes tipos de informações e, como conseqüência, estão sujeitos a diferentes fontes de erros. É de grande interesse investigar a relação entre os dois métodos de análise de divergência e comparar suas vantagens e desvantagens. Somente por meio dessas informações é possível escolher os métodos que fornecem estimativas mais precisas de similaridade genética.

Os recentes avanços na área da genética molecular têm permitido a avaliação genética do germoplasma existente de diferentes espécies de interesse econômico. A tecnologia de marcadores moleculares viabiliza a caracterização genética de grande número de genótipos por meio de procedimentos relativamente simples e rápidos. A caracterização de variedades, linhagens ou híbridos por meio de marcadores de DNA tem sido de grande importância na proteção do direito intelectual do melhorista. A aprovação, no Brasil, da Lei de Proteção de Cultivares levou à necessidade de

caracterização detalhada do material resultante dos programas de melhoramento. Atualmente, esta caracterização é feita considerando-se principalmente as características morfológicas da cultivar. Entretanto, quando são consideradas espécies que possuem uma base genética estreita, em que as variedades são obtidas a partir da hibridação entre um grupo de cultivares elite, geneticamente semelhantes, as novas variedades tendem a ser muito semelhantes e, muitas vezes, indistinguíveis com base nessas características. Dessa forma, um sistema com base em marcadores de DNA e que possa identificar um padrão único de combinação desses marcadores para cada variedade, torna-se necessário para facilitar a proteção de novas variedades.

2. OBJETIVOS

Os principais objetivos desse trabalho foram:

- 2.1. Definir qual sistema eletroforético a ser utilizado para caracterizar e analisar a diversidade genética de cultivares de algodoeiro realizada por meio de marcadores microssatélites;
- 2.2. Estimar a informatividade dos locos SSR de algodão e a distância genética entre 53 cultivares e 130 linhagens de algodoeiro herbáceo;
- 2.3. Selecionar um conjunto de *primers* SSR capazes de diferenciar as 53 cultivares e as 130 linhagens;
- 2.4. Verificar a associação entre as estimativas dos coeficientes de parentesco e de técnicas multivariadas calculadas com base em marcadores microssatélites usadas como medidas de diversidade genética de cultivares e linhagens de algodoeiro;
- 2.5. Avaliar a contribuição genética de cultivares ancestrais para algumas cultivares de algodoeiro em uso no Brasil.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Taxonomia e evolução do gênero *Gossypium*

O gênero *Gossypium* foi primeiro denominado por Linnaeus na metade do século XVIII. MAUER (1954) classificou o *Gossypium* spp. na família *Malvaceae*. Argumentos taxonômicos de classificação foram utilizados para remover o gênero *Gossypium* da tribo *Hibisceae*, estabelecendo a classificação do *Gossypium* como segue: Família – *Malvaceae*; Tribo – *Gossypieae*; Gênero – *Gossypium*.

Quatro dos oito gêneros pertencentes à tribo *Gossypieae* constituem grupos pequenos com distribuição geográfica restrita (FRYXELL, 1979). O maior e o mais amplamente distribuído gênero dessa tribo é o *Gossypium*, que contém cerca de 50 espécies e onde novas espécies continuam sendo descobertas (FRYXELL, 1992). Incluindo-se a essas espécies estão as quatro espécies domesticadas, sendo duas alotetraplóides ($2n=4x=52$), *G. hirsutum* e *G. barbadense* e duas diplóides ($2n=2x=26$), *G. arboreum* e *G. herbaceum*. A segregação dos alotetraplóides é correspondente à dos diplóides, seguindo proporções mendelianas previsíveis para os caracteres de herança simples.

A espécie *G. hirsutum* é a de maior importância pela grande área mundial em que é cultivada e pelo seu volume de produção, contribuindo com cerca de 90% da fibra produzida no mundo. A espécie *G. barbadense* tem importância na produção de fibras especiais de alta qualidade e contribui com apenas 8% da produção mundial de fibra (CARVALHO, 1999b). As outras duas espécies, *G. arboreum* L., cultivada no Paquistão e na Índia, e *G. herbaceum* L., cultivada na África são exploradas em pequena escala. Outras espécies de *Gossypium* ocorrem em regiões amplamente separadas do globo terrestre, principalmente em zonas áridas dos trópicos e subtropicais.

Estudos citogenéticos do gênero demonstraram a existência de grupos genômicos que reúnem espécies que apresentam alto grau de homologia no pareamento de cromossomos de híbridos entre si, mas baixo grau de pareamento com espécies de grupos diferentes (PENNA, 1999). Tais grupos foram definidos por letras maiúsculas. Segundo WENDEL e CRONN (2003) a taxonomia do gênero *Gossypium* mais recente e amplamente seguida é aquela proposta por FRYXELL (1979, 1992) em que as espécies são agrupadas em quatro subgêneros e onze seções (Tabela 1).

Tabela 1. Subgêneros, número de seções, grupos genômicos, número de espécies e distribuição geográfica do gênero *Gossypium* *.

SUBGÊNERO	Nº DE SEÇÕES	GRUPO GENÔMICO	Nº DE ESPÉCIES	DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA
<i>Sturtia</i>	3	C	2	Austrália
		G	3	Austrália
		K	12	Noroeste da Austrália
<i>Gossypium</i>	4	A	2	África
		B	3	África e Ilhas do cabo Verde
		E	7	Península arábica, nordeste da África e sudoeste da Ásia.
		F	1	Leste da África
<i>Houzingenia</i>	2	D	13	México; Peru; Ilhas Galápagos; Arizona.
-	2	AD	5	Espécies dos trópicos e subtropicais do Novo Mundo incluindo Hawaí.

* Tabela adaptada a partir das informações obtidas de Wendel e Cronn (2003).

SAUNDERS (1961) propõe que o centro de origem do gênero *Gossypium* é a África Central, pois quatro dos oito grupos genômicos diplóides ocorrem neste continente. Os grupos genômicos sofreram isolamento por longo período, sendo que a divergência desses genomas ocorreu antes ou durante a separação dos continentes, no período Cretáceo (CARVALHO, 1999b). Segundo WENDEL e CRONN (2003), o parente mais próximo do *Gossypium* é uma linhagem pertencente ao gênero *Gossypoides* originário da África-Madagascar e ao gênero *Kokia* endêmico do Hawaí. Seguindo sua origem, aproximadamente no Mioceno, o *Gossypium* dividiu-se em três principais linhagens: os diplóides do Novo Mundo (Genoma D); os grupos Africanos-Asiáticos (Genomas A, B, E e F) e os grupos Australianos (Genomas C, G e K). Essa dispersão global foi mediada por vários eventos de dispersões transoceânicas e foi acompanhada por diferenciações morfológicas, ecológicas e citogenéticas consideráveis. Os algodões alotetraplóides formados seguiram a dispersão transoceânica de um diplóide com genoma A para a América, o qual atuando como fêmea hibridizou com um diplóide nativo com genoma D. Os algodões poliplóides provavelmente originaram-se durante o Pleistoceno, com as cinco espécies modernas representando os descendentes de uma colonização precoce e rápida dos trópicos e subtropicais do Novo Mundo.

3.2. Origem e evolução dos algodoeiros alotetraplóides

PHILLIPS (1963) sugeriu que os algodoeiros alotetraplóides tiveram origem monofilética e que o evento ocorreu durante o Pleistoceno.

Experimentos mais recentes dão suporte a essa hipótese, de que os alotetraplóides originaram-se antes da evolução do homem moderno, mas que a hibridação seguida de poliploidização ocorreu em um período geológico curto. Resultados obtidos a partir de dados moleculares também indicam origem no Pleistoceno a aproximadamente dois milhões de anos (WENDEL e CRONN, 2003).

Desde a descoberta de que as espécies de algodoeiros alotetraplóides contêm dois genomas cujos progenitores ocorrem em diferentes hemisférios, os trabalhos de pesquisa voltaram-se para identificar quais seriam essas espécies progenitoras. Na década de 30 os trabalhos de SKOVESTED (1937) já mostravam que as espécies alotetraplóides eram constituídas de 26 cromossomos grandes e 26 pequenos. As espécies cultivadas do Velho Mundo, todas diplóides, continham 26 cromossomos grandes, enquanto as espécies silvestres do Novo Mundo continham 26 cromossomos pequenos. BEASLEY (1940) e HARLAND (1940) confirmaram a hipótese de Skovested através de um híbrido anfidiplóide sintetizado a partir de diplóides com genomas A e D. Várias ferramentas foram usadas para elucidar a questão de quais espécies diplóides com genoma A e D serviam melhor como modelos de genomas doadores dos alotetraplóides. Dentre essas ferramentas estão os estudos de morfologia comparada e análise de segregação por meio da citogenética e, mais recentemente, os estudos eletroforéticos de proteínas e análises filogenéticas usando o sequenciamento do DNA de genes homólogos (WENDEL e CRONN, 2003).

Resultados relatados em alguns trabalhos cuja metodologia usada foi a análise da segregação de genes por meio da citogenética sugeriram que a espécie *G. herbaceum* (genoma A) é a mais relacionada ao algodão alotetraplóide do Novo Mundo (BROWN e MENZEL, 1952), enquanto que relações de pareamento e razões genéticas observadas nas análises de híbridos hexaplóides envolvendo espécies com genoma D mostraram que aquelas envolvendo o *G. raimondii* (genoma D) são as que mais se aproximaram do comportamento autotetraplóide, o que confirma ser essa espécie a mais relacionada ao subgenoma D dos alotetraplóides (GERSTEL e PHILLIPS, 1958; PHILLIPS, 1963, 1964). Assim, os alotetraplóides do Novo Mundo (AD) são mais relacionados com o *G. herbaceum* (A) e *G. raimondii* (D). Entretanto, o grupo do genoma D não é tão relacionado quanto é o grupo do

genoma A. Dados obtidos de várias fontes têm confirmado essa observação. Por exemplo, em um estudo recente com AFLPs (Amplified Fragment Length Polymorphism) em algodões diplóides e poliplóides, 368 fragmentos polimórficos foram observados em uma coleção de cultivares de *G. barbadense* e *G. hirsutum* (ABDALLA *et al.*, 2001). Desses fragmentos, 143 foram similares entre pelo menos alguns dos tetraplóides e os diplóides com genoma A, enquanto somente 84 foram similares com o *G. raimondii*. CRONN *et al.* (1999) quantificaram essas relações usando 14.705 pares de base obtidos do sequenciamento de 16 locos nucleares isolados do diplóide *G. raimondii* com genoma D, do diplóide *G. arboreum* (ou *G. herbaceum*) com genoma A e do tetraplóide *G. hirsutum* com genoma AD. A divergência nas seqüências dos diplóides e seus genomas correspondentes nos alotetraplóides foram de 0,68% e 1,05% para os genomas A e D, respectivamente.

Em duas análises filogenéticas diferentes (SMALL *et al.*, 1998; LIU *et al.*, 2001) observou-se que a seqüência do genoma D no alotetraplóide tinha ramificações mais extensas (isto é, taxas evolucionárias mais rápidas) do que a seqüência do seu homeólogo com genoma A. Ademais, inferências da localização de locos que controlam características quantitativas sugerem uma taxa evolucionária maior no genoma D em relação ao genoma A. Isso foi mostrado para características relacionadas com a fibra, em que 10 dos 14 QTLs foram localizados no genoma D (JIANG *et al.*, 1998); com resistência a doenças, onde 5 dos 6 genes de resistência foram localizados no genoma D (WRIGHT *et al.*, 1998) e com morfologia foliar, em que 14 dos 21 QTLs foram mapeados no genoma D (JIANG *et al.*, 2000). Tais fatos podem indicar que a estrutura do cromossomo do *G. raimondii* provavelmente evoluiu mais rapidamente do que tem ocorrido em *G. hirsutum* e *G. herbaceum*. PHILLIPS (1963) sugeriu outra alternativa para essa tese, a de que exista uma espécie remanescente do genoma D que não tenha sido encontrada ou que foi extinta. Se encontrada, essa espécie poderia então provavelmente ser tão relacionada quanto é a espécie com genoma A para os alotetraplóides AD. Por outro lado, essas observações sugerem que exista uma aceleração na taxa evolucionária do genoma D em relação ao genoma A dos alotetraplóides. Segundo CRONN *et al.* (1999), embora o aumento nessa taxa nem sempre seja observado, as forças evolucionárias operantes nos dois genomas devem ser fundamentalmente diferentes. Atualmente não se conhecem quais as forças

responsáveis e quais mecanismos moleculares as governam, mas uma sugestão é a de que elas estão relacionadas às diferenças nos tamanhos dos genomas A e D.

3.3. Diversidade genética em *Gossypium hirsutum* L.

Após a poliploidização e o surgimento do tetraplóide dissômico AD ($2n=4x=52$), surgiram cinco espécies tetraplóides, incluindo as espécies *G. barbadense* e *G. hirsutum*, sendo que esta última domina a produção de fibra e sementes de algodão no mundo. Restos arqueológicos da espécie *G. hirsutum* foram encontrados no México, no vale Tehuacan, entre 4.000 e 5.000 anos atrás (WENDEL *et al.* 1992). Esses resquícios pertencem a formas domesticadas, já que não há indícios do crescimento de formas silvestres neste vale. *G. hirsutum* distribuiu-se em sua forma silvestre, pelas áreas secas da América Central, Norte da América do Sul, Antilhas, Sul da Flórida e Polinésia e por meio de introduções na África e Sul da Ásia. As populações silvestres são raras e amplamente distribuídas, crescendo próximo a litorais e pequenas ilhas (CARVALHO, 1999b). Provavelmente essa espécie foi primeiro domesticada por povos pré-colombianos da península de Yucatán (BRUBAKER e WENDEL, 1994). *G. hirsutum* diferenciou-se em sete raças geográficas, a maioria delas encontradas na América Central e no México: *punctatum*, *marie-galante*, *palmeri*, *richmondi*, *morrelli*, *yucatanense* e *latifolium*. Nesta última, enquadra-se o algodoeiro anual normalmente cultivado. Tais variedades botânicas podem ser hibridizadas sem problemas com o algodoeiro anual (PENNA, 1999).

A única variedade verdadeiramente silvestre de *G. hirsutum* é a *yucatanense*, um arbusto perene pertencente as comunidades vegetais litorâneas. O sistema reprodutivo dessa espécie está sob estrito controle fotoperiódico, florescendo somente em dias curtos. A raça domesticada mais primitiva é a *punctatum* e que provavelmente surgiu a partir da *yucatanense*. Essas formas domesticadas de *G. hirsutum* dispersaram-se a partir do Yucatán para o resto da Mesoamérica, assim como para o norte da América do Sul e para o Caribe. Evidências etnobotânicas sugerem que a raça *latifolium* surgiu desse germoplasma a qual foi mais tarde domesticada no sul do México e Guatemala (IQBAL *et al.*, 2001). Segundo IQBAL *et al.* (2001), alguns acessos classificados como *latifolium* mostram florescimento controlado pelo fotoperíodo, enquanto outros são independentes do fotoperíodo. De acordo

com IQBAL *et al.* (2001), os índios Kekchi da Guatemala consorciavam o algodão com o pimentão (*Capsicum* spp.) e removiam as plantas de algodão tão logo os capulhos começassem a abrir para prevenir a competição com os pimentões em desenvolvimento. Essa prática pode ter eliminado genótipos de maturação tardia e o regime de seleção rigoroso para maturação precoce pode ter selecionado aqueles com dormência reduzida na semente, hábito de crescimento compacto e anual e, possivelmente, florescimento independente do fotoperíodo, criando assim genótipos disponíveis para o cultivo em latitudes maiores, com comprimento de dias maiores. Os genótipos de *latifolium*, de maturação precoce, difundiram-se para a parte central do sul do México antes da chegada dos europeus e os cultivares resultantes foram denominados de variedades das terras altas Mexicanas (“Mexican Highlands”).

Os algodões da América do Norte colonial consistiam de uma complexa mistura de táxons, incluindo *G. herbaceum*, *G. barbadense* e variedades de *G. hirsutum*. Com a invenção da máquina descaroçadora de algodão, em 1793, houve um aumento na demanda por cultivares mais produtivos, o que levou à introdução de muitas variedades provenientes das terras altas do México (SMITH *et al.*, 1999). Essas variedades foram sujeitas a forte pressão de seleção para criar variedades adaptadas às condições locais. Ao longo desse período, tanto cruzamentos intencionais quanto não intencionais ocorreram entre as cultivares (ENDRIZZI *et al.*, 1985). Coletivamente denominadas de algodões “upland” americanos com elevada produtividade e adaptabilidade, essas cultivares dispersaram-se pela Europa, África e Ásia. Entretanto, no início dos anos de 1900 começaram a ser desenvolvidos os chamados “upland” modernos, em resposta à devastação trazida pelo bicudo (*Anthonomus grandis* Boh.). Os melhoristas coletaram germoplasma do sul do México (Acala e Tuxtla em 1906), Guatemala (Kekchi em 1904) e dos povos do Arizona (Hopi Moencopi). Dessa forma, uma série de introduções foi feita nessa época, e embora esses “cultigens” não fossem resistentes ao bicudo, eles foram incorporados ao germoplasma já existente, pois a maturidade precoce era prioridade nas cultivares, assim como cultivares adaptadas às condições ecológicas específicas de cada região produtora de algodão nos Estados Unidos (WENDEL *et al.*, 1992, IQBAL *et al.*, 2001).

Os algodoeiros “upland” modernos são cultivados em mais de 40 países em ambos hemisférios, regiões dos trópicos e regiões temperadas, desde 47°

N na Ucrânia e 37° N nos Estados Unidos até 32° S na América do Sul e Austrália (WENDEL *et al.*, 1992). De acordo com IQBAL *et al.* (2001), o *G. hirsutum* cultivado ao redor do mundo é proveniente de importações de algodões “upland” americanos do século 19 e início do século 20. Esses autores observaram tal fato com alguns cultivares do Paquistão. No Brasil, de acordo com PENNA (1999), os materiais genéticos de algodoeiro herbáceo disponíveis no início do melhoramento dessa cultura eram, em sua maioria, introduções de variedades americanas. Segundo CARVALHO (1999a), existe pouca diversidade genética nas cultivares plantadas no Brasil, as quais descendem de apenas três origens diferentes. A falta de diversidade caracteriza-se pelo uso contínuo, nos cruzamentos, de materiais originários dos Estados Unidos. Atualmente, já há a preocupação de se incluir novos materiais como, por exemplo, materiais originários da Austrália.

Acredita-se que o processo de domesticação dos algodões “upland” americanos modernos tenham sido acompanhados por uma redução na sua diversidade genética (ENDRIZZI *et al.*, 1985). Essa diversidade genética limitada nos algodões “upland” tem sido observada por vários autores (WENDEL *et al.*, 1992; TATINENI *et al.*, 1996; IQBAL *et al.*, 1997). Uma das várias hipóteses para explicar essa aparente falta de diversidade é que o afunilamento genético ocorreu por meio de pequenas importações de sementes do México introduzidas no século 19. Uma outra hipótese é a de que o número limitado de importações (amostragens) trouxe somente uma fração da diversidade genética dos “cultigens” Mexicanos. Entretanto, observou-se que a realização de introduções secundárias de germoplasma do México (Acala e Tuxtla) e Guatemala (Kekchi) não revelou uma diversidade genética maior nos cultivares “upland” modernos. Um ou mais afunilamentos genéticos podem ter ocorrido durante o último estágio de desenvolvimento do *G. hirsutum latifolium*, possivelmente como um resultado de rigorosa seleção para maturidade precoce. Dessa forma, muito da diversidade genética original do *G. hirsutum*, incluindo alelos valiosos que conferem resistência a insetos, patógenos e adversidades ambientais, pode ter sido perdida durante essa fase da domesticação (IQBAL *et al.*, 2001).

A diversidade genética assegura medidas de proteção contra problemas futuros como doenças ou pragas e fornece a base para ganhos genéticos (VAN ESBROECK e BOWMAN, 1998). A uniformidade genética dentro de uma

cultura pode ser causada pelo uso extensivo de uma ou mais cultivares estreitamente relacionadas. A hibridação entre esses tipos de cultivares resulta em base genética estreita para as novas variedades, podendo levar a desastres naturais, tais como a susceptibilidade a doenças (IQBAL *et al.*, 1997). Esforços devem ser feitos para reduzir a vulnerabilidade genética do *G. hirsutum*. Para tanto, é necessário o uso de germoplasma mais diverso, tais como as variedades domesticadas primitivas (*marie-galante*, *morrilli*, *palmeri*, *punctatum*, e *richmondii*) e a silvestre *G. hirsutum yucatanense*. Também é importante a adição de fontes de germoplasma, incluindo as outras espécies alotetraplóides como *G. barbadense*, *G. drawinii* ., *G. tomentosum* e *G. mustelinum*. Entretanto, de acordo com PERCIVAL *et al.* (1999) a maioria dessas fontes mostra controle do florescimento por fotoperíodo, sendo o principal obstáculo para a eficiente introgressão de alelos nas cultivares modernas. Portanto, o entendimento das bases moleculares e genéticas do florescimento controlado por fotoperíodo em *Gossypium* é importante para a utilização dessas fontes de germoplasma.

O conhecimento das relações genéticas e diversidade genética dos materiais tanto de banco de germoplasma quanto daqueles usados nos plantios comerciais é de grande importância para o melhorista. Por meio desse conhecimento ele poderá utilizar aqueles materiais que são mais divergentes evitando-se, assim, maior vulnerabilidade genética dos futuros cultivares lançados no mercado. De acordo com NASS (2001) existe uma lacuna entre as atividades de Recursos Genéticos Vegetais (RGV) e os programas de melhoramento. Enquanto os pesquisadores envolvidos com RGV coletam e conservam a variabilidade, no outro extremo os melhoristas não têm explorado a diversidade disponível, utilizando apenas sua própria coleção de trabalho.

GOODMAN (1990) comenta que a maioria dos trabalhos de melhoramento envolve cruzamentos entre materiais elite, uma vez que estas populações apresentam elevado potencial genético para os caracteres de interesse. Dessa forma, os genes potencialmente úteis mantidos nas coleções de germoplasma serão utilizados caso sejam incorporados nos materiais considerados elite. A busca por genótipos superiores em produtividade, resistentes a pragas e doenças, tolerantes aos estresses ambientais e de melhor qualidade nutricional, é bastante árdua e de custo elevado. Assim, muitos melhoristas evitam trabalhar com genótipos silvestres, raças locais e

materiais exóticos disponíveis nas coleções, alegando falta de tempo, recursos e muitas vezes dificuldades para identificar genes potencialmente úteis para o melhoramento. Duas alternativas promissoras para elevar o nível de utilização dos acessos mantidos nos bancos de germoplasma têm merecido a atenção tanto de pesquisadores que trabalham diretamente com RGV quanto de melhoristas; os programas de pré-melhoramento e as coleções nucleares (NASS, 2001). NASS e PATERNIANI (2000) conceituaram pré-melhoramento como o conjunto de atividades que visam à identificação de caracteres ou genes de interesse, presentes em materiais não adaptados (exóticos ou semi-exóticos) ou que não foram submetidos a qualquer processo de melhoramento, e sua posterior incorporação nos materiais adaptados de elevado potencial produtivo (elite).

A biotecnologia pode contribuir para acelerar os programas de pré-melhoramento. O uso de mapas genéticos baseados em marcadores moleculares ligados a genes de interesse proporciona seleção mais rápida dos caracteres no germoplasma, agilizando sua incorporação nos materiais elites do programa de melhoramento (NASS, 2001). Nesse contexto, a seleção assistida por marcadores moleculares terá papel relevante na eficiência dos programas de melhoramento no futuro.

3.4. Melhoramento genético do *G. hirsutum* no Brasil

O desenvolvimento da cultura do algodão no Brasil está relacionado com os trabalhos de melhoramento genético desenvolvidos pelo IAC - Instituto Agrônomo de Campinas, decisivos no início do século XX e importantes até os dias de hoje. Outras instituições estaduais de pesquisa também têm trabalhado com o algodoeiro e contribuído com a criação de cultivares para plantio nos respectivos estados, como a EPAMIG e o IAPAR. A região Nordeste, após a criação da Embrapa - Algodão, passou a ser assistida pelos trabalhos de melhoramento desenvolvidos naquela instituição (CARVALHO, 1999a), que passou, mais recentemente, a desenvolver cultivares para o Centro-Oeste do País. A Cooperativa Central de Pesquisa Agrícola (COODETEC), do Paraná, desenvolveu um programa de melhoramento de algodoeiro, em Cascavel – PR, em convênio com o Centro de Cooperação Internacional em Pesquisa Agrônômica para o Desenvolvimento (CIRAD), da França, cujo principal objetivo é o desenvolver cultivares adaptadas à região do

Brasil-Central (PENNA, 1999). A partir da criação da Lei de Proteção de Cultivares em 1997, empresas privadas tais como a MDM – Maeda Deltapine Monsanto, Stoneville International, Bayer Seeds, Syngenta entre outras, também passaram a contribuir com o desenvolvimento de cultivares de algodoeiro para o Brasil, antes limitado às instituições governamentais de pesquisa.

Segundo CARVALHO (1999a), os objetivos dos programas de melhoramento do algodão no Brasil apresentam, em comum com os demais programas desenvolvidos na América Latina e no mundo, a necessidade de melhoria da produtividade, do rendimento no descaroçamento e da obtenção de fibras mais finas, resistentes e uniformes. Porém, em cada país são almejados objetivos específicos que, muitas vezes, são divergentes entre si. As cultivares modernas de algodão precisam atender às demandas de basicamente três setores da sua cadeia produtiva: o produtor, as empresas de beneficiamento e a indústria de fiação e tecelagem (PENNA, 1999). A maioria das características consideradas no melhoramento do algodoeiro, mesmo as que se referem a problemas específicos ou circunstanciais, constitui alvo dos programas desenvolvidos no Brasil. Evidentemente, há, com respeito a elas, uma relação de prioridades em função dos problemas e das necessidades mais imediatas em cada região de cultivo (FUZATTO, 1999).

Em um programa de melhoramento genético, o esquema de seleção ou método de melhoramento genético a ser empregado depende, principalmente, do sistema reprodutivo da espécie a ser melhorada. Assim, sua mensuração deve preceder as demais providências a serem adotadas pelos melhoristas. O algodoeiro possui flores hermafroditas e, ainda assim, apenas parte das suas sementes provém da autofecundação de algumas flores, sendo o restante oriundo de cruzamento (FREIRE e COSTA, 1999). Esta proporção depende da presença de insetos vetores de pólen, o que torna a planta do algodoeiro parcialmente autógama. Entre as principais espécies polinizadoras destacam-se as espécies *Bombus* spp. (Mamangava) e a *Aphis mellifera* L. (abelha) (CRISÓSTOMO, 1989). A ausência de um sistema reprodutivo genuinamente autógamo ou alógamo no algodoeiro fez com que os métodos de melhoramento usados nessa cultura não fossem tão bem definidos quanto os métodos de melhoramento usados em outras culturas autógamas (soja) ou alógamas (milho). Dessa forma, os métodos de melhoramento utilizados com

sucesso em uma região apresentam pouca eficiência em outras regiões, em função de taxas diferentes de alogamia, o que explica a diversidade de métodos usados com sucesso nessa cultura (FREIRE e COSTA, 1999).

A quase totalidade dos programas de melhoramento do algodoeiro no Brasil, a exemplo de outras regiões do mundo, tem priorizado a seleção direta em cultivares introduzidos dos Estados Unidos, ou a realização de cruzamentos intraespecíficos no germoplasma de *G. hirsutum* r. *latifolium*, de onde se originou a maioria das espécies cultivadas no mundo (FREIRE, 2001). De acordo com PENNA (1999), os materiais genéticos disponíveis no início dos programas de melhoramento no Brasil eram, em sua maioria, introduções de variedades americanas, como Texas Big Boll, Express e Stoneville. Mais tarde foi desenvolvido o conceito de “variedade paulista de algodão”, que preconizou um modelo de cultivar mais adaptada às condições do Estado de São Paulo. Algumas dessas cultivares lançadas pelo IAC foram: IAC RM₃ (seleção de Auburn 56), IAC 17 (seleção de IAC RM₃), IAC 19 (originado do cruzamento entre IAC RM₃, Yucatanense e Tn1-Hoa), IAC 20 (seleção de IAC 17), IAC 21 (seleção de IAC 19) e IAC 22 (originado do cruzamento entre IAC 20 e GH 11-9-75). Em Minas Gerais, foram introduzidas variedades do IAC e dos Estados Unidos, tendo sido as primeiras linhagens selecionadas, principalmente, a partir de Sun-Bean, Russel Big Boll, Express, Cleveland, Mead e Webber. Por meio da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais – EPAMIG, foram desenvolvidas várias cultivares adaptadas às regiões do estado de Minas, com altos índices de produção e qualidade de fibra, como: Minas Dona Beja (seleção de IPEACO-SL-7), Minas Sertaneja (seleção de DPL), EPAMIG 3 (seleção de Minas Dona Beja), EPAMIG 4 ou REDENÇÃO (seleção de IAC 17) e EPAMIG 5-Precoce 1 (seleção na linhagem introduzida C-25-180). A Embrapa – Algodão tem desenvolvido várias cultivares para plantio nas regiões Norte e Nordeste e, atualmente, vem desenvolvendo cultivares para o Centro-oeste do País. Dentre seus principais lançamentos encontram-se as seguintes cultivares: CNPA 7H (originada do cruzamento entre Tamcot SP 37 e IAC 17), CNPA Precoce 1 (seleção da linhagem GH 11-9-75), CNPA Precoce 2 (originada do cruzamento entre PNH₃ e C 100-7-81), CNPA ITA 90 (seleção em Deltapine Acala 90) e CNPA ITA 96 (seleção em EPAMIG 3). O Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR) é outra instituição de pesquisa que pratica o melhoramento do algodoeiro. Dentre as cultivares lançadas por aquela

instituição nos últimos anos encontram-se: IAPAR 71 (seleção de IAC 20), IPR 94 (originada do cruzamento entre IAPAR 71 e Deltapine Acala 90), IPR 95 e IPR 96 (originadas do cruzamento entre IAPAR 71 e CNPA ITA 96).

A seleção genealógica é o principal esquema empregado na maioria dos programas de melhoramento do algodoeiro e consiste na seleção individual de plantas, baseando-se nas características fenotípicas, com estudo posterior das progênies, predominantemente autofecundadas (CRISÓSTOMO, 1989). As cultivares melhoradas podem ser originadas de uma única planta, ou da mistura de linhagens ou progênies superiores, denominada “bulk”. Segundo FREIRE e COSTA (1999) a maioria das cultivares latino-americanas foi obtida por esse método, destacando-se as cultivares paulistas de algodão, tais como IAC 17 e IAC 22. Este é, também, o principal método empregado nos algodoeiros arbóreo e herbáceo, no Nordeste brasileiro, sendo a cultivar CNPA 7H exemplo de cultivar obtida por tal método. Apesar do progresso obtido pela seleção genealógica, vários autores apontavam, já nas décadas de trinta e quarenta, restrições a essa metodologia, sendo uma das restrições as limitações da linhagem pura e os efeitos da depressão endogâmica (MEREDITH, 1979). De acordo com PENNA (1999) o conceito de “linha pura” normalmente não necessita ser aplicado para a obtenção de cultivares de algodão. Dispensa-se a absoluta uniformidade genética entre as plantas desde que: as características obtidas nas linhagens sejam, em média, superiores ou estejam nos patamares das cultivares normalmente plantadas; a variabilidade esteja abaixo de certos limites estabelecidos pelo melhorista; e ainda ofereçam alguma vantagem comparativa.

A seleção sobre cultivares também é um método de melhoramento predominante nos centros de pesquisa do Brasil. A seleção sobre cultivares já existentes pressupõe que haja ainda suficiente variabilidade genética nas populações em questão, e assim são selecionadas plantas individualmente, que geram progênies a serem avaliadas (PENNA, 1999). Alguns autores sugeriram o intercruzamento artificial dentro de populações, visando a quebra de ligações genéticas indesejáveis, para reduzir as correlações desfavoráveis entre os caracteres econômicos, como produtividade e qualidade de fibra. Tal procedimento aumentou a eficiência da reSeleção dentro de cultivares (MEREDITH & BRIDGE, 1971; MEREDITH, 1979). Entretanto, a taxa de cruzamento natural predominante no algodoeiro cultivado em algumas regiões

tem resultado em sensível variabilidade e facilitado a quebra de ligações indesejáveis. Esta situação tem viabilizado a prática da reSeleção em cultivares comerciais de algodoeiro, explicando o sucesso em vários programas (MEREDITH, 1979). No Brasil, várias cultivares foram desenvolvidas por esse método ou uma modificação deste, dentre essas cultivares encontram-se: IAC 20, IAC 21, IAC 23, REDENÇÃO, EPAMIG 5, BRS IPÊ e CNPA ITA 96.

A tendência atual aponta para a execução de programas de seleção recorrente, objetivando a formação de populações-base para a seleção genealógica (FREIRE e COSTA, 1999). A hibridação interespecífica e intraespecífica tem sido utilizada no algodoeiro como forma de combinação de características existentes em dois paternais e para a criação de uma nova variabilidade. Essas hibridações são realizadas de várias formas, incluindo a hibridação biparental, os cruzamentos triplos dirigidos, os cruzamentos múltiplos intraespecíficos e o uso de cruzamentos interespecíficos, sempre seguidos de autofecundação. Em todos os sistemas nas fases de F_2 a F_5 é aplicado o método genealógico. A EMBRAPA tem lançado mão do método combinado de melhoramento, ou seja, realização de cruzamentos múltiplos, seguidos de três ciclos de seleção recorrente e pela seleção genealógica, para a criação de uma população de base ampla (CNPA SRI5) que está sendo utilizada para o melhoramento do algodoeiro nas condições do cerrado, em Mato Grosso (FREIRE e COSTA, 1999). Dentre as cultivares obtidas por esse método estão: BRS Antares, BRS Aroeira, FMT Fetagri e FMT Saturno.

Como pôde ser visto, grande parte das cultivares lançadas no Brasil são provenientes de introduções de cultivares ou linhagens dos Estados Unidos ou de reSeleção feitas de outras cultivares já existentes. Apesar do progresso genético obtido através dessas cultivares há que se lembrar que a utilização de parentais muito próximos pode levar a um estreitamento da base genética dessas cultivares e a uma redução da diversidade genética. Tal fato foi constatado por CARVALHO (1999a) o qual comenta que a pouca diversidade genética das cultivares plantadas no Brasil caracteriza-se pelo uso contínuo, nos cruzamentos, de materiais descendentes de Auburn 56 e Tamcot SP 37, ambas originárias dos Estados Unidos. Portanto, embora atualmente já se tenha uma preocupação de incluir novos materiais nos programas de melhoramento, deve-se estar atento à importância do uso de germoplasma diferente para a incorporação de novos alelos nas populações aumentando

assim, a divergência genética entre as cultivares, principalmente, em se tratando de uma cultura em que se tem alta variabilidade intraespecífica e interespecífica.

3.5. Marcadores moleculares no melhoramento genético do algodoeiro

Até meados da década de 60, os marcadores utilizados em estudos de genética e melhoramento eram controlados por genes associados a caracteres morfológicos, em geral fenotípicos de fácil identificação visual (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1996). No entanto, o número reduzido de marcadores fenotípicos disponíveis, a ausência de ligação destes com caracteres de importância econômica e os efeitos deletérios das mutações limitaram sua utilização (GUIMARÃES e MOREIRA, 1999).

Muitos genes, e também seqüências de DNA não codificadoras, estão representados em uma espécie por duas ou mais formas alélicas diferentes entre si, porém correspondentes ao mesmo loco cromossômico; a este fenômeno dá-se o nome de polimorfismo genético. Teoricamente qualquer fragmento de DNA pode ser utilizado como um marcador molecular, desde que ele revele polimorfismo entre indivíduos (SOUZA, 2001). Os marcadores moleculares detectam o polimorfismo diretamente em nível de DNA, não sofrendo qualquer tipo de influência ambiental ou gênica. Seu número é ilimitado e são desprovidos de efeitos epistático ou pleiotrópico. Quando comparados aos marcadores fenotípicos, apresentam um número maior de alelos por loco (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1996). Seguindo-se critérios genéticos, eles podem ser classificados em dois tipos principais: a) marcadores moleculares loco-específicos co-dominantes (RFLP - Restriction Fragment Length Polymorphism; SSR - Simple Sequence Repeats; SNP - Simple Nucleotide Polymorphism) e b) marcadores loco não específicos dominantes (RAPD - Random Amplified Polymorphic DNA; AFLP - Amplified Fragment Length Polymorphism; ISSR - Inter Simple Sequence Repeat) (SOUZA, 2001). Esses marcadores também podem ser classificados de acordo com a metodologia usada para identificá-los, sendo classificados em duas categorias: 1) Hibridização (RFLP) e 2) Amplificação do DNA via PCR (Reação da polimerase em cadeia) (RAPD, SSR, ISSR, AFLP e SNP).

Um marcador potencial é qualquer seqüência de DNA capaz de detectar polimorfismo, e em geral, quanto mais polimórfico, mais informações ele

contém, tornando mais fácil detectar diferenças entre indivíduos. DNA não codificante é, sobre este ponto de vista, mais interessante que DNA codificante, pois acumula mais mutações e não está sujeito à pressão seletiva. DNA não codificante é representado principalmente por DNA repetitivo, denominado microssatélite, minissatélites ou DNA satélite, dependendo do comprimento da seqüência (TESTOLIN *et al.*, 2000). Os microssatélites correspondem a seqüências de DNA com poucos pares de base (1-6 nucleotídeos) de comprimento repetidas, em *tandem*, e representam regiões instáveis do genoma que estão sob alterações mutacionais a taxas muito maiores do que as observadas nas seqüências de cópia única (PINTO *et al.*, 2001). Os microssatélites são muito freqüentes e distribuídos aleatoriamente por todo o genoma, facilmente encontrados em bancos de dados de DNA (MORGANTE & OLIVIERI, 1993) ou através de isolamento de clones positivos de uma biblioteca genômica após hibridização com sonda específica (THOMAS e SCOTT, 1993). A maioria dos microssatélites é baseado em repetições de dinucleotídeos [(AC)_n, (AG)_n e (AT)_n], as quais podem ser amplificadas via PCR usando *primers* complementares às regiões que flanqueiam estas repetições, o que resulta em polimorfismo devido a diferenças nos comprimentos dos fragmentos após a eletroforese (STAUB *et al.*, 1996). Estas diferenças derivam de variações no número de repetições, e são provenientes de escorregamento ('slippage') da DNA polimerase durante a replicação do DNA ou de 'crossing-over' desigual entre cromátides irmãs (VALDES *et al.*, 1993). Fragmentos microssatélites são melhor resolvidos em géis de poliacrilamida desnaturante, sendo possível detectar diferenças de apenas dois pares de bases (LITT *et al.*, 1993).

Os SSRs têm sido identificados em grande número de espécies vegetais, e são os marcadores ideais para a construção de mapas genéticos de alta resolução e identificação de locos controladores de características de interesse (DEVEY *et al.*, 1996), assim como em estudos genéticos de conservação e de populações (SOUZA, 2002). Segundo NGUYEN *et al.* (2004), na cultura do algodão, os primeiros marcadores microssatélites (216) a serem disponibilizados para os pesquisadores foram desenvolvidos pelo "Brookhaven National Laboratory" (BNL). Posteriormente, outros *primers* microssatélites foram isolados a partir de bibliotecas de DNA genômico do algodão, incluindo 500 microssatélites CM mencionados por CONNELL *et al.* (1998) e 307

microsatélites JESPR, mencionados por REDDY *et al.* (2001). Mais recentemente, novos microsatélites num total de 466 foram desenvolvidos por pesquisadores do CIRAD na França (NGUYEN *et al.*, 2004). Como consequência disso, a utilização de marcadores microsatélites no mapeamento de genes de interesse, bem como em outras análises genéticas no algodão, se tornará cada vez mais crescente.

Segundo BARBOSA-NETO e BERED (1998) os elevados custos e o longo tempo necessário para que o melhorista detecte a existência de genes de importância no desenvolvimento de uma espécie, assim como a necessidade da realização de um grande número de cruzamentos para estabelecer a capacidade de um genótipo contribuir para o progresso genético, dificulta o planejamento racional de um programa de melhoramento. Os recentes avanços na área da genética molecular têm permitido a avaliação genética do germoplasma existente em diferentes espécies de interesse econômico. A tecnologia de marcadores moleculares viabiliza a caracterização genética de grande número de genótipos através de procedimentos relativamente simples e rápidos.

A caracterização de variedades, linhagens ou híbridos por meio de marcadores de DNA tem sido de grande importância na proteção do direito intelectual do melhorista. A aprovação, no Brasil, da Lei de Proteção de Cultivares levou à necessidade de caracterização detalhada do material resultante dos programas de melhoramento. Atualmente, esta caracterização é feita considerando-se principalmente as características morfológicas da cultivar. Entretanto, quando se considera espécies que possuem uma base genética estreita, em que as variedades são obtidas a partir da hibridação entre um grupo elite de parentais geneticamente semelhantes, as novas variedades tendem a ser muito semelhantes e muitas vezes indistinguíveis com base nessas características. Dessa forma, um sistema com base em marcadores de DNA e que possa identificar um padrão único de combinação desses marcadores para cada variedade, torna-se necessário para facilitar a proteção de novas variedades (LANZA *et al.*, 2000). Ainda nesta linha de caracterização varietal, os marcadores moleculares têm grande aplicação na verificação da pureza varietal de lotes de sementes. Por meio do emprego de marcadores moleculares que produzem um perfil de bandas característico a cada genótipo, é possível identificar facilmente contaminações em lotes de sementes de

cultivares constituídas por linhas puras ou híbridos a partir de linhagens conhecidas (SOUZA, 2001).

Como os marcadores moleculares possibilitam a quantificação da similaridade genética entre genótipos e, conseqüentemente, a estruturação da divergência genética, através do seu emprego é possível organizar grupos de indivíduos de acordo com a similaridade entre eles. Assim, eles são utilizados na análise de bancos de germoplasma, onde são empregados na avaliação da diversidade existente entre os acessos e na construção de coleções nucleares (SOUZA, 2001). Os genótipos são avaliados por meio de marcadores e as bandas comuns a todos os indivíduos são interpretadas como semelhanças genéticas, e as não-comuns, como diferenças genéticas. Os resultados são codificados de forma que gere uma matriz de similaridade (ou dissimilaridade), que pode ser graficamente interpretada por meio de análise de agrupamento ou multivariada (LANZA *et al.*, 2000). De acordo com SOUZA (2001) o conhecimento da diversidade entre os indivíduos é útil no melhoramento genético para o gerenciamento da variabilidade genética disponível, através da escolha dos genitores a serem utilizados nos cruzamentos, podendo-se assim maximizar a diversidade entre eles. Neste sentido, os marcadores moleculares podem ser utilizados para conferência da genealogia histórica do conjunto de genitores, validando-a ou corrigindo falhas existentes. Além disso, o estudo da diversidade entre linhagens possibilita o arranjo delas em grupos que, quando inter cruzados dão melhores resultados.

Diversos marcadores moleculares têm sido usados em estudos de caracterização, diversidade genética e relações genéticas entre espécies cultivadas e seus parentes silvestres. Desses marcadores, o RAPD é o que está sendo mais usado em estudos com algodão (MULTANI e LYON, 1995; TATINENI *et al.*, 1996; IQBAL *et al.*, 1997; LU e MYERS, 2002). Estudos usando aloenzimas (WENDEL *et al.*, 1992) e RFLPs (WENDEL e BRUBAKER, 1993) têm sido limitados pelo baixo nível de polimorfismo detectado ao nível intra e interespecífico. O marcador AFLP também tem sido usado com sucesso em análises de diversidade genética em várias espécies, entre estas, o algodão (PILLAY e MYERS, 1999; ABDALLA *et al.*, 2001). Apesar do sucesso desses métodos (AFLP, RFLP e RAPD), o nível de polimorfismo detectado ainda é baixo, sobretudo quando se usa as técnicas de RFLP e RAPD. Esses tipos de marcadores não possibilitam a realização de uma genotipagem em

grandes coleções de germoplasma de uma maneira eficiente. O sistema de marcadores de DNA para a genotipagem de germoplasma deve ser acurado, altamente informativo, adequado à automação e de custo relativamente baixo (LIU *et al.*, 2000). Marcadores microssatélites têm como vantagem a expressão co-dominante e o multialelismo, sendo, portanto, um dos marcadores que possuem o mais elevado conteúdo de informação de polimorfismo (MITCHELL *et al.*, 1997).

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDALLA, A.M.; REDDY, O.U.K.; EL-ZIK, K.M. e PEPPER, A.E. Genetic diversity and relationships of diploid and tetraploid cottons revealed using AFLP. **Theor. Appl. Genet.**, v. 102, p. 222-229, 2001.
- BARBOSA NETO, J.; BERED, F. Marcadores moleculares e diversidade genética no melhoramento de plantas. In: MILACH, S. (Ed.). **Marcadores moleculares em plantas**. Porto Alegre, 1998. p. 29-40.
- BEASLEY, M.S.; J.O. The production of polyploids in *Gossypium*. **Journal of Heredity**, v. 31, p. 39-48, 1940.
- BEZAWADA, C.; SAHA, S.; JENKINS, J.N.; CREECH, R.G.; McCARTY, J.C. SSR marker(s) associated with root knot nematode resistance gene(s) in cotton. **Journal of Cotton Science**, v. 7, p. 179-184, 2003.
- BROWN, M.S.; MENZEL, M.Y. Polygenomic hybrids in *Gossypium*. I. Cytology of hexaploids, pentaploids and combinations. **Genetic**, v. 37, p. 242-263, 1952.
- BRUBAKER, C.L.; WENDEL, J.F. Reevaluating the origin of domesticated cotton (*Gossypim hirsutum*; Malvaceae) using nuclear restriction fragment length polymorphism (RFLPs). **Am. J. Bot.**, v. 81, p. 1309-1326, 1994.
- CARVALHO, L.P. Contribuição do melhoramento ao cultivo do algodão no Brasil. In: BELTRÃO, N.E. DE M. **O Agronegócio do algodão no Brasil**. Brasília: EMBRAPA, 1999a. p.253-269.
- CARVALHO, L.P. O gênero *Gossypium* e suas espécies cultivadas e silvestres. In: BELTRÃO, N.E. DE M. **O Agronegócio do algodão no Brasil**. Brasília: EMBRAPA, 1999b. p.231-251.
- CONNELL, J.P.; PAMMI, S.; IGBAL, M.J.; HUIZINGA, T., REDDY, A.S. A high throughput procedure for capturing microsatellites from complex plant genomes. **Plant Mol. Biol. Rep.**, v. 16, p. :341-349, 1998.
- CRISÓSTOMO, J.R. **Avaliação da estrutura e do potencial genético de uma população do algodoeiro (*G. hirsutum* L.) parcialmente autógama**. Piracicaba: ESALQ, 1989. 191p.
- CRONN, R.C.; SMALL, R.L.; WENDEL, J.F. Duplicated genes evolve independently following polyploid formation in cotton. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 96, p. 14406-14411, 1999.

- DEVEY, M.E.; BELL, J.C.; SMITH, D.N.; NEALE, D.B.; MORAN, G.F. A genetic linkage map for *Pinus Radiata* based on RFLP, RAPD and microsatellite markers. **Theor. Appl. Genet.**, v.92, p. 673-679, 1996.
- ENDRIZZI, J.E.; TURCOTT, EL; KOHEL, R.J. Genetics, cytology and evolution of *Gossypium*. **Adv. Genet.**, v. 23, p. 271-375, 1985.
- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética.** 2 ed. Brasília: MA/EMBRAPA/CENARGEN. 1996. 220p.
- FREIRE, E.C. Genética e melhoramento do algodoeiro no Brasil. In: **Congresso Brasileiro de Algodão**, III. Produzir sempre, o grande desafio: resumos das palestras. Campo grande, MS. 2001. p.123-129.
- FREIRE, E.C.; COSTA, J.N. DA Objetivos e métodos utilizados nos programas de melhoramento do algodão no Brasil. In: In: BELTRÃO, N.E. DE M. **O Agronegócio do algodão no Brasil**. Brasília: EMBRAPA, 1999. p.271-293.
- FRYXELL, P. A. **"The Natural History of the Cotton Tribe"** Texas A & M Univ. Press., College Station. 1979
- FRYXELL, P. A.; CRAVEN, L.A.; STEWART, J.M. A revision of *Gossypium* sect. *Grandicalyx* (Malvaceae), including the description of six new species. **Syst. Bot.**, v. 17, p. 91-114, 1992.
- FUZATTO, M.G. Melhoramento genético do algodoeiro. In: CIA, E.; FREIRE, E.C.; SANTS, W.J. (Eds.) **Cultura do algodoeiro**. Piracicaba: Potafós, 1999. p. 15-34.
- GERSTEL, D.U.; PHILLIPS, L.L. Segregation of synthetic amphiploids in *Gossypium* and *Nicotiana*. *Cold Spring Harbor Symp.* **Quant. Biol.**, v. 23, p. 225-237, 1958.
- GOODMAN, M.M. Genetic and germplasm stocks worth conserving. **Journal of Heredity**, v. 81, p. 11-16, 1990.
- GUIMARÃES, C.T.; MOREIRA, M.A. Genética molecular aplicada ao melhoramento de plantas. In: BORÉM, A. (Ed). **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa: UFV, 1999. p. 715-740.
- HARLAND, S.C. New allopolyploids in cotton by use of colchicine. **Trop. Agric.** v. 17, p. 53-55, 1940.
- IQBAL, M.J., AZIZ, N., SAEED, N.A. AND ZAFAR, Y. Genetic diversity evaluation of some elite cotton varieties by RAPD analysis. **Theor. Appl. Genet.**, v. 94, p. 139-144, 1997.

- IQBAL, M.J.; REDDY, O.U.K.; EL-ZIK, K.M., PEPPER, A.E. A genetic bottleneck in the 'evolution under domestication' of upland cotton *Gossypium hirsutum* L. examined using DNA fingerprinting. **Theor. Appl. Genet.**, v. 103, p. 547-554, 2001.
- JIANG, C.; WRIGHT, R.J.; EL-ZIK, K.M.; PATERSON, A.H. Polyploid formation created unique avenues for response to selection in *Gossypium* (cotton). **Proc. Natl. Acad. Sci.**, USA 95, 4419-4424, 1998.
- JIANG, C.; WRIGHT, R.J.; WOO, S.S.; DeLMONTE, T.A.; PATERSON, A.H. QTL analysis of leaf morphology in tetraploide *Gossypium* (cotton). **Theor. Appl. Genet.**, v. 100, p. 409-418, 2000.
- LANZA, M.A.; SCHUSTER, I.; GUIMARÃES, C.T.; Aplicação de marcadores moleculares no melhoramento genético. **Informe Agropecuário**, v.21, n. 204, p. 97-108. 2000.
- LITT, M; HAUGE, X; SHARMA, V. Shadows bands seen when typing polymorphic dinucleotide repeats: some causes and cures. **Biotechniques**, v. 15, p. 280-284, 1993.
- LIU, S.; CANTRELL, S.L.; McCARTY, J.C.Jr; STEWART. J.McD. Simple sequence repeat-based assessment of genetic diversity in cotton race stock accessions. **Crop Sci**, v. 40, p. 1459-1469, 2000.
- LIU, S.; SAHA, S.; STELLY, D.; BURR, B.; CANTRELL, R.G. Chromosomal assignment of microsatellite loci in cotton. **Journal of Heredity**, v. 91, n. 4, p. 326-332, 2000.
- LIU, S.; BRUBAKER, C.L.; MERGEAI, G.; CRONN, R.C.; WENDEL, J.F. Polyploid formation in cotton is not accompanied by rapid genomic changes. **Genome**, v. 43, p. 874-880, 2001.
- LU, H.J.; MYERS, G.O. Genetic relationships and discrimination of ten influential upland cotton varieties using RAPD markers. **Theor. Appl. Genet.**, v. 105, p. 325-331, 2002.
- MAUER, F. M. **Origin and Systematics of Cotton**. Akad Nauk Uzbek S. S. R., Tashkent. 1954.
- MEREDITH, W.R. Imbreeding depression of selected F₃ cotton progenies. **Crop Sci.**, v. 19, p. 86-88, 1979.
- MEREDITH, W.R.; BRIDGE, R.R. Natural crossing in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) in Delta of Mississippi. **Crop Sci.**, v. 11, p. 695-698, 1971.

- MITCHELL, S.E.; KRESOVICH, S.; JESTER, C.A.; HERNANDEZ, C.J.; SZEWC-MCFADDEN. Application of multiplex PCR and fluorescence-based, semi-automated allele sizing technology for genotyping plant genetic resources. **Crop Sci**, v. 37, p. 617-624, 1997.
- MOREIRA, J.DE A.; NÓBREGA, M.B.M.; FARIAS, F.J.C. Marcadores moleculares no melhoramento genético do algodoeiro. In: BELTRÃO, N.E. DE M. **O Agronegócio do algodão no Brasil**. Brasília: EMBRAPA, 1999. p.371-387.
- MORGANTE, M.; OLIVIERI, A.M. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. **The Plant Journal**, v. 3, p. 175-182, 1993.
- MULTANI, D.S.; LYON, B.R. Genetic fingerprinting of Australian cotton cultivars with RAPD markers. **Genome**, v. 38, p. 1005-1008, 1995.
- NASS, L.L. Utilização dos recursos genéticos vegetais no melhoramento. In: NASS, L.L.; VALOIS, A.C.C.; MELO, I.S.; VALADARES-INGLIS, M.C. **Recursos Genéticos e Melhoramento – Plantas**. Rondonópolis: Fundação MT. 2001. p.29-55.
- NASS, L.L.; PATERNIANI, E. Pre-breeding: a link between genetic resources and maize breeding. **Scientia Agricola**, v. 57, p. 581-587, 2000.
- NGUYEN, T.B.; GIBAND, M.; BROTTIER, P.; RISTERUCCI, A.M.; LACAPE, J.M. Wide coverage of the tetraploide cotton genome using newly developed microsatellite markers. **Theor. Appl. Genet.**, v. 109, n.1, p. 167-175, 2004.
- PATERSON, A.H.; LANDER, E.S.; HEWETT, I.D.; PATERSON, S.; LINCOLN, S.E.; TANKSLEY, S.D.; Resolution of quantitative traits into mendelian factors using a complete linkage map of restriction fragment length polymorphisms. **Nature**, v. 335, p. 721-726, 1988.
- PENNA, J.C.V. Melhoramento do algodão. In: BORÉM, A. **Melhoramento de espécies cultivadas**. 1999. p.1-50.
- PERCIVAL, A.E.; WENDEL, J.F.; STEWART, J.M. Taxonomy and germplasm resources. In: Smith, W.C., Cothorn, T. (eds) **Cotton: origin, history, technology and production**. John Wiley and Sons, New York, pp. 33-64.
- PHILLIPS, L.L. The cytogenetics of *Gossypium* and the origin of New World cottons. **Evolution**, v. 17, p. 460-469, 1963.
- PHILLIPS, L.L. Segregation in new allopolyploids of *Gossypium*. V. Multivalent formation in New World x Asiatic and New World x wild American hexaploids. **Am. J. Bot.**, v. 51, p. 324-329, 1964.

- PILLAY, M.; MYERS, G.O. Genetic diversity assessed by variation in ribosomal RNA genes and AFLP markers. **Crop Sci.**, v. 39, p. 1881-1886, 1999.
- PINTO, L.R.; VIEIRA, M.L.C.; SOUZA, A.P. e SOUZA-JÚNIOR, C.L. Isoenzimas e microssatélites em plantas. **Biotecnologia. Ciência & Desenvolvimento**. Nº 20. 2001.p. 16-19.
- REDDY, O.U.; PEPPER, A.E.; ABDURAKHMONOV, I.; SAHA, S.; JENKINS, J.N.; BROOKS, T.; BOLEK, Y.; EL-ZIK, K.M. New dinucleotide and trinucleotide microsatellite marker resources for cotton genome research. **Crop Sci.**, v. 5, p. 103-113, 2001.
- SAUNDERS, J. H. “**The world species of Gossypium – and their evolutionary history**”. Oxford Univ. Press, London and New York. 1961.
- SKOVESTED, R.H. Cytological studies in cotton. IV. Chromosome conjugation in interspecific hybrids. **Journal Genetic**, v. 34, p. 97-134, 1937.
- SMALL, R.L.; RYBURN, J.A.; CRONN, R.C.; SEELAN, T.; WENDEL, J.F. The tortoise and the hare: Choosing between noncoding plastome and nuclear *Adh* sequences for phylogeny reconstruction in a recently diverged plant group. **Am. J. Bot.**, v. 85, p. 1301-1315, 1998.
- SOUZA, A.P. DE. Biologia molecular aplicada ao melhoramento. In: NASS, L.L.; VALOIS, A.C.C.; MELO, I.S. de; VALADARES-INGLIS, M.C. (Eds) **Recursos Genéticos e Melhoramento – Plantas**. Rondonópolis: Fundação MT. 2001. p. 938-965.
- SOUZA, S.A.C.D. DE **Avaliação da variabilidade em *Musa spp.* utilizando marcadores microssatélites**. Piracicaba, 2002. 86p. Tese (doutorado).
- SMITH, N.G.C.; KNIGHT, R.; HURST, L.D. Vertebrate genome evolution: A slow shuffle or a bang? **Bioassays**. v. 21, p.697-703, 1999.
- STAUB, J.E.; SERQUEN, F.C.; GUPTA, M. Genetic markers, map construction, and their application in plant breeding. **HortScience**, v. 31, p. 729-740, 1996.
- TATINENI, V.; CANTRELL, R.G.; DAVIS, D.D. Genetic diversity in elite cotton germplasm determined by morphological characteristics and RAPDs. **Crop Sci.**, v. 36, p. 186-192, 1996.
- TESTOLIN, R.; MARRAZZO, T.; CIPRIANI, G.; QUARTA, R.; VERDE, I.; DETTORI, M.T.; PANCALDI, M.; SANSAVINI, S. Microsatellite DNA in peach (*Prunus persica* L. Batsch) and its use in fingerprinting and testing the genetic origin of cultivars. **Genome**, v. 43, p. 512-520, 2000.

- THOMAS, M.R.; SCOTT, N.S. Microsatellites repeats in grapevines reveal DNA polymorphisms when analyzed as sequence-tagged sites (STS). **Theor. Appl. Genet.**, v. 86, p. 985-990, 1993.
- VALDES, A.M.; SLATKIN, M.; FREIMER, N.B. Allele frequencies at microsatellite loci: the stepwise mutation model revisited. **Genetics**, v. 133, 737-749, 1993.
- VAN ESBROECK, G.A.; BOWMAN, D.T. Cotton germplasm diversity and its importance to cultivar development. **Journal of Cotton Science**, v. 2, p. 121-129, 1998.
- WANG, G.L.; DONG, J.M.; PATERSON, A.H. The distribution of *Gossypium hirsutum* chromatin in *G. barbadense* germplasm: molecular analysis of introgressive plant breeding. **Theor. Appl. Genet.**, v. 91, p. 1153-1161, 1995.
- WENDEL, J.F. e BRUBAKER, C.L. RFLP diversity in *Gossypium hirsutum* L. and new insights into the domestication of cotton. **Am. J. Bot.**, v.80:(SUPPL 6):71. 1993.
- WENDEL, J.F.; BRUBAKER, C.L.; PERCIVAL, A.E. Genetic diversity in *Gossypium hirsutum* and the origin of upland cotton. **Am. J. Bot.**, v. 79, p. 1291-1310, 1992.
- WENDEL, J.F.; CRONN, R.C. Polyploid and the evolutionary history of cotton. **Advances in Agronomy**, v. 78, p. 139-186, 2003.
- WRIGHT, R.J.; THAXTON, P.M.; EL-ZIK, K.M.; PATERSON, A. D-subgenome bias of Xcm resistance genes in tetraploide *Gossypium* (cotton) suggests that polyploid formation has created novel avenues for evolution. **Genetics**, v. 149, p. 1987-1996, 1998.
- ZHANG, J.; GUO, W; ZHANG, T. Molecular linkage map of allotetraploide cotton (*Gossypium hirsutum* L. x *Gossypium barbadense* L.) with a haploid population. **Theor. Appl. Genet.**, v. 105, p. 1166-1174, 2002.

CAPÍTULO 1

UTILIZAÇÃO DE DIFERENTES SISTEMAS ELETROFORÉTICOS PARA A DETECÇÃO DE POLIMORFISMOS DE MICROSSATÉLITES EM ALGODOEIRO HERBÁCEO

RESUMO

Os marcadores microssatélites tornaram-se importante ferramenta em análises de genética molecular devido à sua relativa facilidade de detecção, co-dominância e elevada diversidade alélica, podendo ser empregados em análises de diversidade genética. O conhecimento dos sistemas eletroforéticos e a otimização dos protocolos para a separação dos fragmentos de microssatélites podem levar a menores erros de genotipagem. Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo definir o melhor sistema eletroforético para caracterizar e analisar a diversidade genética de cultivares de algodoeiro realizada por meio de marcadores microssatélites. Foram utilizadas dezoito cultivares de algodoeiro herbáceo, sendo o DNA dessas cultivares extraído a partir de um *bulk* de 8 a 10 sementes, e quatro locos SSR (BNL 1053, BNL 2921, BNL 3257, CNL 101). A reação de PCR foi realizada em termociclador com programa do tipo *touch down*. Três sistemas eletroforéticos foram comparados, sendo estes, gel nativo de poliacrilamida 10%, gel nativo de poliacrilamida 6% com resina spreadex e gel desnaturante de poliacrilamida 7%. Também foi avaliado o custo para a utilização dos três tipos de sistemas de géis eletroforéticos. A separação de alelos cujos tamanhos diferiram em apenas 1 e 2 nucleotídeos foi mais visível no gel desnaturante por apresentar maior poder de resolução. Os resultados obtidos por meio do gel nativo de poliacrilamida 6% com resina spreadex foram os que mais se aproximaram dos obtidos pelo gel desnaturante. O poder de separação dos alelos foi menor quando foi utilizado o gel nativo de poliacrilamida 10%. Apesar do gel desnaturante ter apresentado maior poder de separação do que os géis nativos, estes géis podem separar fragmentos que tenham maiores diferenças em tamanho. O custo mais baixo para a obtenção do gel foi observado para o gel nativo de poliacrilamida, seguido do gel desnaturante, enquanto que o mais caro foi para o gel nativo de poliacrilamida adicionado de spreadex. Os resultados obtidos no presente trabalho indicam o uso de sistemas de maior resolução quando se tem fragmentos de tamanho pequeno e cujas diferenças entre alelos seja de apenas 2 e 1 nucleotídeos. A utilização de placas de tamanho maior (38 cm x 32 cm) juntamente com o corante brometo de etídio pode reduzir o tempo de análise bem como baratear seu custo. O sistema eletroforético com gel desnaturante de poliacrilamida 7% foi o recomendado

para realização de caracterização e análise de diversidade genética de cultivares de algodoeiro herbáceo.

Palavras chaves: marcadores moleculares, diversidade genética, polimorfismo, custo.

INTRODUÇÃO

Desde a sua descoberta, a tecnologia da reação em cadeia da polimerase (PCR) tem sido amplamente usada na biologia molecular para muitas aplicações. Várias classes de marcadores moleculares com base na PCR encontram-se disponíveis, dentre elas o polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (RAPD), marcadores baseados na amplificação de microssatélites ou seqüências simples repetidas (SSR) e o polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados (AFLP). Os microssatélites tornaram-se importante ferramenta em análises de genética molecular devido a sua relativa facilidade de detecção, co-dominância e elevada diversidade alélica (RAHMAN *et al.*, 2000), sendo empregados na construção de mapas de ligação, mapeamento de QTLs (*Quantitative Trait Loci*) e análises de diversidade genética. Microssatélites são seqüências de 1 a 6 nucleotídeos repetidos lado a lado ao longo do genoma de plantas e animais e representam regiões instáveis do genoma. Essa instabilidade dos SSRs faz com que o número de repetições em *tandem* nos SSRs seja variável entre indivíduos numa mesma espécie, resultando em marcadores altamente polimórficos e multialélicos (PINTO *et al.*, 2001).

O polimorfismo dos marcadores microssatélites é revelado por PCR através da amplificação do DNA genômico total, utilizando-se dois *primers* únicos, compostos de seqüências curtas de nucleotídeos, que flanqueiam e definem o loco microssatélite (PINTO *et al.*, 2001). O produto da amplificação é detectado por eletroforese. A escolha do sistema de gel eletroforético e dos componentes do sistema a ser usado, dependerá do tamanho esperado do produto da amplificação assim como da resolução requerida para distinguir claramente as diferenças no tamanho dos produtos amplificados. A detecção e separação dos fragmentos de SSRs pode ser feita em géis de agarose de alta resolução (SENIOR *et al.*, 1998; REDDY *et al.*, 2001) e, principalmente, em géis de poliacrilamida, podendo estes serem nativo (NETO, 2001; WANG *et al.*, 2003) ou desnaturante (LIU *et al.*, 2000; GUTIÉRREZ *et al.*, 2002; MOTA, 2003). A formulação do gel exerce influência sobre o número de alelos detectados. Géis de poliacrilamida desnaturante permitem a separação de fragmentos que diferem em apenas um par de bases, enquanto géis de agarose apresentam limite de resolução acima de quatro pares de base

(PINTO *et al.*, 2001). A adição de polímeros como o NAB Spreadex (Elchrom Scientific, Suíça) permite o aumento no poder de resolução dos géis de poliacrilamida nativos.

Os produtos da amplificação dos SSRs em géis de poliacrilamida podem ser visualizados por meio de *primers* marcados com radioatividade ou fluorescência, onde os alelos são representados por picos em eletroferogramas, ou por meio de corantes como nitrato de prata ou brometo de etídio, nos quais os alelos são visualizados no gel como bandas. A detecção dos polimorfismos, em SSR, para a avaliação da diversidade genética (LIU, *et al.*, 2000) e distâncias genéticas (Gutiérrez *et al.*, 2002) entre genótipos de algodoeiro, tem sido realizada utilizando-se, principalmente, seqüenciadores e *primers* marcados por radioatividade ou fluorescência. Os dois primeiros métodos (radioatividade e fluorescência) exigem equipamentos altamente sofisticados e caros, além de envolver reagente químico perigoso, no caso da radioatividade. Na literatura, é escassa as informações a respeito de metodologias de detecção de polimorfismos, em SSRs, por meio de géis desnaturantes usando o brometo de etídio como corante. O corante mais utilizado para tais fins é o nitrato de prata. Entretanto, o uso do nitrato de prata apresenta como principal desvantagem o grande tempo dispensado, enquanto o brometo de etídio, seu elevado nível de toxicidade. Todavia, com o manuseio correto e a redução de sua concentração na solução pode-se diminuir sua periculosidade. O conhecimento dos sistemas eletroforéticos e a otimização dos protocolos para separação dos fragmentos de microssatélites podem levar a menores erros de genotipagem e com isso pode-se reduzir o gasto com as análises. Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivos: (1) avaliar os sistemas eletroforéticos utilizados para caracterizar e analisar a diversidade genética de cultivares de algodoeiro realizada por meio de marcadores microssatélites e, (2) avaliar os custos para a utilização dos sistemas de géis eletroforéticos.

MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL VEGETAL E EXTRAÇÃO DE DNA

Foram utilizadas 18 cultivares de algodoeiro herbáceo comumente indicadas para plantio em diferentes regiões do Brasil (Tabela 1). O DNA dessas cultivares foi extraído a partir de um *bulk* de 8 a 10 sementes de cada cultivar. A extração de DNA das sementes foi feita com base no protocolo descrito por McDONALD *et al.* (1994), com algumas modificações.

Em tubo eppendorff de 1,5 mL, contendo cerca de 50-60 mg de sementes, foram adicionados 700 µL de tampão de extração contendo Tris-HCl 0,2 M, NaCl 0,28 M, EDTA 25 mM e SDS 10%. As amostras foram extraídas em politron e, em seguida, centrifugadas por 10 min a 14.000 RPM em microcentrífuga eppendorf 1405. Os sobrenadantes foram transferidos para novos tubos e centrifugados por mais 5 min a 14.000 RPM. Novamente, os sobrenadantes foram transferidos para novos tubos, sendo, em seguida, acrescentados 10 µL de proteinase K 10 mg/mL e 10 µL de CaCl₂ 1 mM, e colocado em banho-maria a 55 °C por 1,5 horas. Foram, então, adicionados às amostras 900 µL de isopropanol e deixadas em repouso por 2 min. Após este tempo as amostras foram centrifugadas por 10 min a 14.000 RPM. Os sobrenadantes foram descartados e os precipitados foram lavados duas vezes, uma vez com álcool 70% e, a segunda vez, com álcool 90%. Após as lavagens os precipitados foram secos por 15 min à temperatura ambiente sendo, a seguir, ressuspensos em solução de Tris-EDTA (TE) 10 mM e 1 mM contendo RNase 60 µg/mL e colocados em banho-maria por 1 hora. As amostras foram precipitadas novamente pela adição de 900 µL de isopropanol e deixadas em precipitação por 2 min. Logo após, as amostras foram novamente centrifugadas por 10 min a 14.000 RPM e os sobrenadantes descartados. Os precipitados foram ressuspensos ao final em TE_{0,1} (Tris-HCl 10 mM, EDTA 0,1 mM, pH 7,5).

A concentração do DNA foi estimada espectrofotometricamente por leitura da absorbância em 260 nm, sendo cada unidade de absorbância correspondente a 50 µg/mL de DNA fita dupla (SAMBROOK *et al.*, 1989). A integridade do DNA foi determinada em gel de agarose 0,8% e depois fotografado sob luz ultravioleta.

Tabela 1. Cultivares de algodoeiro herbáceo, instituição de origem, ciclo em dias e região indicada para plantio.

NUMERAÇÃO	CULTIVARES	INSTITUIÇÃO DE ORIGEM	CICLO (DIAS)	REGIÃO DE PLANTIO
1	CNPA ITA 96	Fundação MT/ EMBRAPA	170/180	CERRADO
2	BRS FACUAL	EMBRAPA	170/180	CERRADO
3	BRS ANTARES	Fundação MT/ EMBRAPA	160/170	CERRADO
4	FMT SATURNO	Fundação MT	160/170	CERRADO
5	DELTA OPAL	DELTA PINE	145	Todo o Brasil
6	Fiber Max 966	BAYER SEEDS	156	Nordeste de SP e GO, MS, MT, TO
7	Fiber Max 986	BAYER SEEDS	160	Nordeste de SP e GO, MS, MT, TO
8	IAC 17	IAC	140	SP
9	IAC 19	IAC	150	SP
10	IAC 20	IAC	140	SP
11	IAC 21	IAC	150	SP
12	IAC 22	IAC	140	SP
13	Guazuncho II	-	-	Argentina/Paraguai
14	Oro Blanco	-	-	Argentina
15	Makina	Syngenta	160	MT, MS, GO, SP, BA
16	CNPA 7H	EMBRAPA	120/130	NE/Centro-Sul
17	ALVA	EPAMIG	120	Minas Gerais
18	REDENÇÃO	EPAMIG	120-150	Minas Gerais

MARCADORES MICROSSATÉLITES E REAÇÃO DA PCR

No presente trabalho foram utilizados quatro pares de *primers* SSRs, sendo três BNL (BNL 1053, BNL 2921 e BNL 3257) e um JESPR, o qual foi sintetizado pela *Invitrogen Life Technologies*, sendo denominado CNL 101. Os tamanhos dos alelos amplificados por cada um dos *primers* foram estimados por meio de análise visual e pelo programa ONE-Dscan (versão 1.0). A análise visual foi realizada comparando-se os tamanhos dos fragmentos correspondentes aos alelos, com os tamanhos dos fragmentos correspondentes ao padrão de peso molecular de 10 pb *DNA ladder* (Life Technologies, Cat. Nº 10821-015). O padrão de peso molecular consiste de 33 fragmentos de dsDNA, variando de 10 a 330 pb em múltiplos de 10 pb. As estruturas repetidas dos microssatélites amplificados pelos *primers* usados neste trabalho eram constituídas principalmente de repetições de dinucleotídeos.

As reações de amplificação foram realizadas em microtubos de 0,2 mL, sendo o volume total da reação de 15 µL, contendo tampão da PCR (Tris-HCl 10 mM e 50 mM, pH 8,0), 0,2 mM de cada desoxirribonucleotídeo, 2,5 - 3,0 mM de MgCl₂, 0,2 µM de cada *primer*, uma unidade da enzima *Taq* DNA polimerase e 30 ng de DNA molde. Também realizou-se reação *multiplex*

utilizando-se os locos SSR, BNL 946 e BNL 1694. A reação *multiplex* foi realizada em microtubos de 0,2 mL, sendo o volume total da reação de 15 µL, contendo tampão da PCR (Tris-HCl 10 mM e 50 mM, pH 8,0), 0,2 mM de cada desoxirribonucleotídeo, 2,5 mM de MgCl₂, 0,15 µM de cada *primer*, uma unidade da enzima *Taq* DNA polimerase e 30 ng de DNA molde. As amplificações foram feitas em termociclador *Perkin Elmer* (GeneAmp PCR System 9600) usando um programa *touch down*. Esse programa consistiu de um ciclo de desnaturação a 94 °C por 4 min, uma etapa de pareamento a 65 °C por 40s, seguidos de 10 ciclos *touch down* decrescendo 1 °C por ciclo até 55 °C, a partir da qual se seguiram 30 ciclos a 55 °C por 40s cada. Em cada ciclo foram mantidas as respectivas temperaturas de desnaturação (94° C/ 40s) e polimerização (72° C/ 1min). O final do programa consistiu de um ciclo de polimerização a 72 °C por 7 min.

AVALIAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE SEPARAÇÃO DOS FRAGMENTOS DE MICROSSATÉLITES

Foram comparados três sistemas eletroforéticos, sendo estes, gel nativo de poliacrilamida 10%, gel nativo de poliacrilamida 6% com resina spreadex (Elchrom Scientific, Suíça) e gel desnaturante de poliacrilamida 7%. Essa comparação foi realizada com o objetivo de avaliar a eficiência de separação dos fragmentos de SSRs amplificados em cada sistema.

A separação dos fragmentos de SSRs através de géis nativo de poliacrilamida foi realizada em um sistema de gel vertical cujas placas mediam 18cm de largura por 16cm de altura, tendo uma capacidade para 32 amostras. Foram preparados dois géis nativo de poliacrilamida 10% e dois géis nativo de poliacrilamida 6% com resina spreadex. Esses géis continham 30% de acrilamida/bis-acrilamida numa proporção de 29:1. A corrida consistiu de 130 Volts por 3 horas e a separação dos fragmentos ocorreu em TAE 1X. A eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida foi realizada em cuba vertical de eletroforese com placas de gel medindo 38cm de largura por 32cm de altura com capacidade para 80 amostras.

O gel desnaturante continha poliacrilamida 7% (p/v) com acrilamida/bis-acrilamida na proporção de 19:1, 32% de formamida e 5,6 M de uréia, conforme protocolo proposto por LITT *et al.* (1993). A separação dos fragmentos em gel desnaturante ocorreu em TBE 1X. Antes da aplicação das

amostras o gel era submetido a uma pré-corrída de 30 minutos a uma potência constante (50W). As amostras analisadas eram misturadas com igual volume (5 μ L) do tampão de carregamento STR 2X (formamida 95%, NaOH 2M e xleno cianol 0,09%) e, pouco antes do carregamento, as misturas eram desnaturadas a 94° C por 4-5 min e logo depois eram colocadas em gelo. Após o término da eletroforese os géis de poliacrilamida nativo (com e sem spreadex) e desnaturante, foram mergulhados em solução de brometo de etídio em concentrações de 0,2 μ g/mL por 15 min e 1 μ g/mL por 30 min, respectivamente. Posteriormente à coloração os géis foram fotodocumentados sob luz ultravioleta no sistema *Eagle Eye II* (Stratagene). Todas as cubas verticais foram adquiridas da empresa Técnica PERMATRON (Joinville-SC).

AVALIAÇÃO DOS CUSTOS

Foi avaliado o custo necessário para a utilização dos três tipos de sistemas de géis eletroforéticos. Levou-se em consideração a análise de diversidade genética para 60 indivíduos. Considerou-se na avaliação os custos dos seguintes itens: (a) reagentes utilizados na constituição de cada gel e (b) reagentes para preparo dos tampões usados no gel desnaturante de poliacrilamida (TBE) e, gel nativo de poliacrilamida sem e com spreadex (TAE).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A faixa de tamanho dos alelos, em pares de bases, estimada por meio da análise visual, indicou uma variação de 170-190pb, 150-160pb, 200-220pb e 120-130pb nos tamanhos dos alelos amplificados pelo loco SSR BNL 1053, BNL 2921, BNL 3257 e CNL 101, respectivamente. Em trabalhos de caracterização e análise de diversidade genética onde não se tem conhecimento prévio do tamanho dos fragmentos de DNA e onde a posição correta dos alelos é requerida, a avaliação do tamanho dos fragmentos deve ser feita tanto através da análise visual quanto através do uso de programas de computador como o ONE-Dscan, pois o uso exclusivo desses programas pode levar a erros (NETO, 2001). A partir da análise dos tamanhos dos alelos de cada *primer*, estimados por meio do programa ONE-Dscan, pode-se verificar a amplificação de 2 alelos para o loco SSR, CNL 101, BNL 1053 e BNL 2921 e, a amplificação de 3 alelos para o loco SSR, BNL 3257. O tamanho aproximado dos alelos, obtidos por meio do programa ONE-Dscan, foi de 128pb e 121pb para os alelos do loco CNL 101, 181pb e 171pb para os alelos do loco BNL 1053, 160pb e 158pb para os alelos do loco BNL 2921 e 209pb, 208pb e 206pb para os alelos do loco BNL 3257.

A separação de alelos cujos tamanhos diferiram em apenas um ou dois nucleotídeos foi mais visível no gel desnaturante. Na Figura 1 observa-se a separação de três alelos amplificados pelo *primer* BNL 3257, após eletroforese de 3 horas a uma potência constante de 50W. Dos três alelos amplificados dois diferiram em apenas um nucleotídeo (209pb e 208pb). Nas Figuras 2 e 3 observa-se a separação de dois alelos os quais foram amplificados pelos *primers* BNL 2921 e CNL 101, respectivamente, após eletroforese de 3 horas a uma potência constante de 50W. Os dois alelos amplificados por ambos os *primers* (BNL 2921 e CNL 101) diferiram em dois nucleotídeos, tendo tamanhos de 160pb e 158pb e de, 128pb e 126pb.

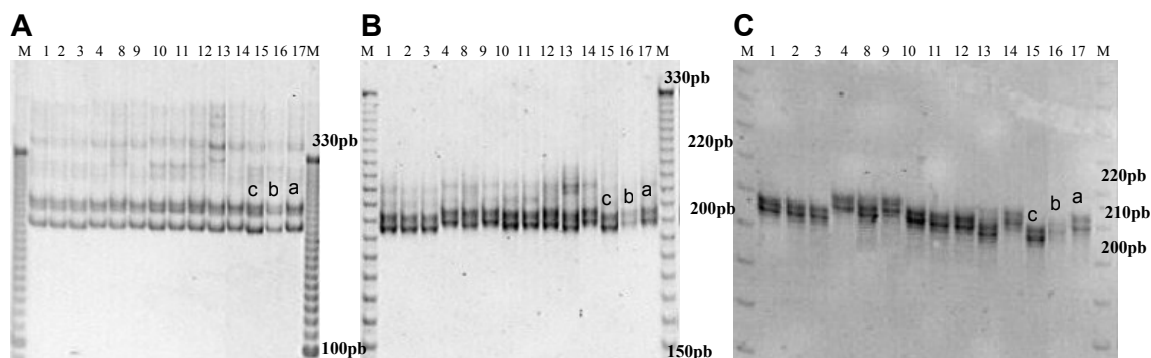


Figura 1- Análise dos três alelos (a, b, c) amplificados pelo *primer* BNL 3257 utilizando diferentes géis de eletroforese. A – Gel nativo de poliacrilamida 10%; B – Gel nativo de poliacrilamida 6% com spreadex; C – Gel desnaturante de poliacrilamida 7%. M – padrão de peso molecular DNA *ladder* de 10pb. A numeração acima corresponde às cultivares apresentadas na Tabela 1. Os alelos a, b e c têm tamanhos de 209pb, 208pb e 206pb, respectivamente, de acordo com os resultados obtidos por meio da análise do programa ONE-Dscan.

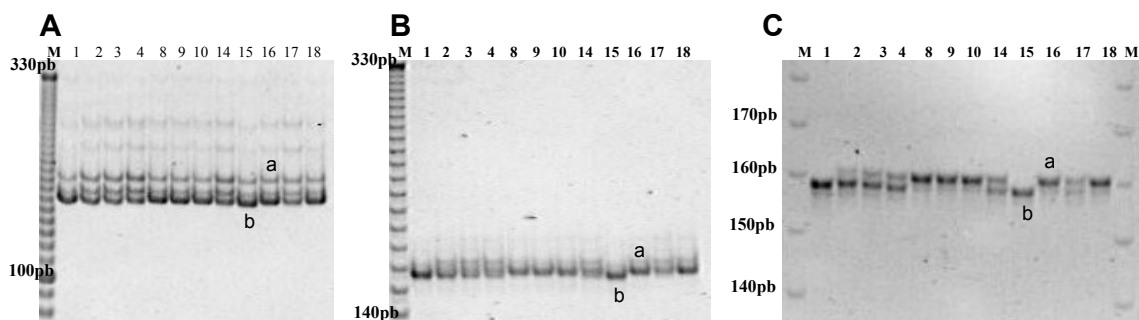


Figura 2- Análise dos alelos (a, b) amplificados pelo *primer* BNL 2921 utilizando diferentes géis de eletroforese. A – Gel nativo de poliacrilamida 10%; B – Gel nativo de poliacrilamida 6% com spreadex; C – Gel desnaturante de poliacrilamida 7%. M – padrão de peso molecular DNA *ladder* de 10pb. A numeração acima corresponde às cultivares apresentadas na Tabela 1. Os alelos a e b têm tamanhos de 160pb e 158pb, respectivamente, de acordo com os resultados obtidos por meio da análise do programa ONE-Dscan.

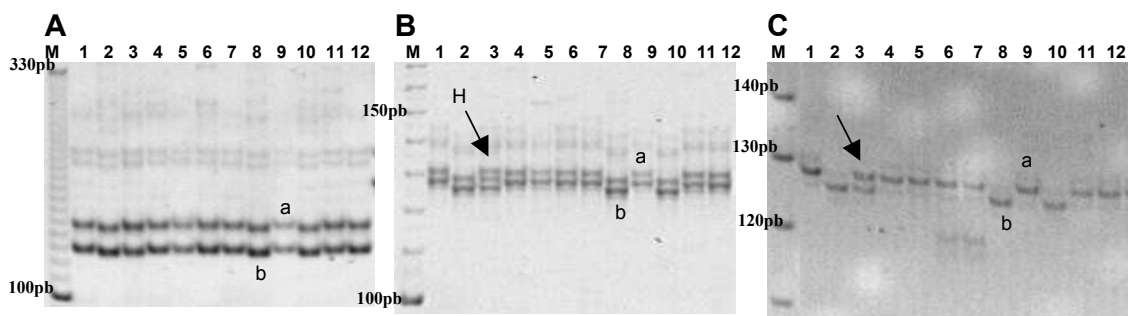


Figura 3- Análise dos alelos (a e b) amplificados pelo *primer* CNL 101 utilizando diferentes géis de eletroforese. A – Gel nativo de poliacrilamida 10%; B – Gel nativo de poliacrilamida 6% com spreadex e C - Gel desnaturante de poliacrilamida 7%. M – padrão de peso molecular DNA *ladder* de 10pb. A numeração acima corresponde às cultivares apresentadas na Tabela 1. Os alelos a e b têm tamanhos de 128pb e 126pb, respectivamente, de acordo com os resultados obtidos por meio da análise do programa ONE-Dscan.

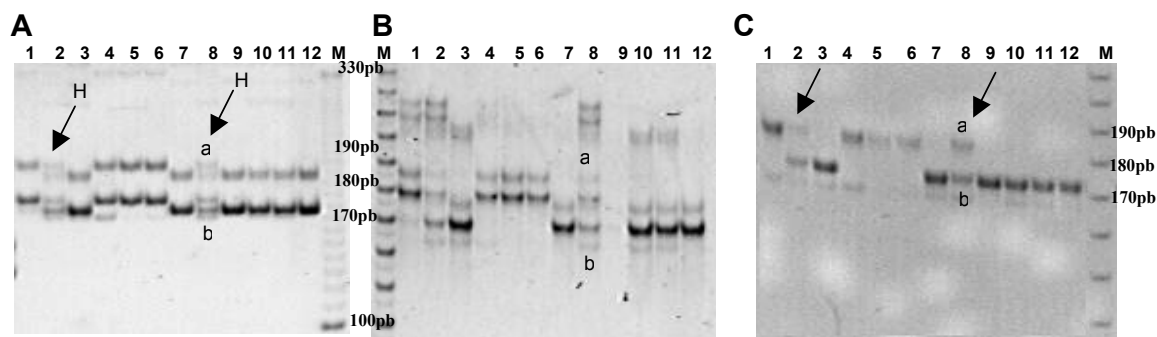


Figura 4- Análise dos alelos (a e b) amplificados pelo *primer* BNL 1053 utilizando diferentes géis de eletroforese. A – Gel nativo de poliacrilamida 10%; B – Gel nativo de poliacrilamida 6% com spreadex e C - Gel desnaturante de poliacrilamida 7%. M – padrão de peso molecular DNA *ladder* de 10pb. A numeração acima corresponde às cultivares apresentadas na Tabela 1. Os alelos a e b têm tamanhos de 181pb e 171pb, respectivamente, de acordo com os resultados obtidos por meio da análise do programa ONE-Dscan.

Quando utilizou-se o gel nativo de poliacrilamida 10%, não foi possível verificar a separação dos alelos amplificados pelos primers BNL 3257, BNL 2921 e CNL 101. Por outro lado, os resultados obtidos com o gel nativo de poliacrilamida 6% com spreadex aproximaram-se dos obtidos pelo gel desnaturante. Isso ocorreu porque a utilização conjunta desses dois polímeros, acrilamida e spreadex, aumenta a capacidade de separação de fragmentos de pequeno tamanho. Segundo NETO (2001), géis nativos de poliacrilamida na concentração de 8%, utilizando spreadex são eficientes na separação de fragmentos com tamanho até 250pb. No entanto, é possível utilizar géis de poliacrilamida na concentração de 6% para separar fragmentos com até 250pb, desde que se adeque o tempo de corrida ao tamanho do fragmento que se deseja visualizar.

Apesar do gel desnaturante ter apresentado maior poder de separação do que os géis nativos, estes géis podem separar fragmentos que tenham maiores diferenças em tamanho. Na Figura 4 verifica-se resultado semelhante quando se utilizou o gel desnaturante de poliacrilamida 7% ou o gel nativo de poliacrilamida 6% com spreadex. O poder de separação dos alelos foi menor quando se utilizou o gel nativo de poliacrilamida 10%.

Em todos os produtos obtidos pela amplificação dos 4 *primers* usados no trabalho observou-se o aparecimento de “bandas fantasmas”. Entretanto, quando os diferentes géis foram comparados observou-se que no gel desnaturante houve redução significativa dessas bandas. A ocorrência de

bandas “menores”, tais como “bandas fantasmas” e heteroduplex, geralmente está associada a repetições em *tandem* de dinucleotídeos. Uma variedade de erros durante a PCR pode levar a falha parcial ou total na amplificação dos alelos e isso pode dificultar a interpretação e análise dos géis. “Bandas fantasmas” podem ocorrer devido a leitura errônea da enzima *Taq* DNA polimerase ou a alterações na estrutura secundária do DNA, enquanto bandas heteroduplex podem resultar do reanelamento de fitas não complementares durante os últimos ciclos da PCR (RODRIGUEZ *et al.*, 2001). Assim, acredita-se que as bandas fantasmas sejam artefatos da PCR e são observadas em indivíduos homocigotos, enquanto bandas heteroduplex (setas mostradas na Figura 3C, linha 3 e, na Figura 4A, linhas 2 e 8) somente ocorrem em indivíduos heterocigotos. A presença dessas bandas nos géis é influenciada pelas condições da eletroforese. Géis desnaturantes reduzem a ocorrência de bandas “menores” em relação a géis nativos (RODRIGUEZ *et al.*, 2001).

O tipo de repetição dos locos microssatélites amplificados pelos quatro primers é de dinucleotídeos, o que se observa para a grande maioria dos microssatélites encontrados em algodão. LITT *et al.* (1993) comentaram que apesar de serem altamente informativos, os microssatélites com repetições de dinucleotídeos mostram que cada alelo consiste não somente de um fragmento, mas de uma série de fragmentos. Dessa forma, essas “bandas fantasmas” podem obscurecer a verdadeira posição do alelo, dificultando a genotipagem. Esses mesmos autores conseguiram otimizar as condições eletroforéticas em géis de poliacrilamida adicionando formamida e uréia ao gel, eliminando o aparecimento de “bandas fantasmas”.

Em relação aos tamanhos das placas usadas na confecção dos géis de poliacrilamida, observou-se que placas de tamanhos maiores (38cm de largura por 32 cm de altura) podem reduzir o tempo total de análise. As placas usadas na confecção do gel desnaturante podem carregar até 80 amostras, mas como a utilização de padrão de peso molecular é requerida, o número de amostras deve ser reduzido de acordo com o número de padrões usados. Na Figura 1C verifica-se que o padrão de peso molecular, localizado a esquerda, está mais acima do que o padrão de peso molecular localizado a direita. Isso se deve em parte a imperfeições (“sorrisos”) verificadas no gel desnaturante. Visando minimizar tais imperfeições é recomendável que os padrões de peso molecular sejam distribuídos em intervalos entre as amostras (MOTA, 2003). Se forem

usados 4 padrões, por exemplo, 76 amostras podem ser carregadas no gel desnaturante e, dessa forma, se for usado dois géis, 152 amostras podem ser avaliadas por dia. Por outro lado, para o carregamento de 150 amostras em géis nativos cujas placas medem 18 cm de largura por 16 cm de altura, é necessário a confecção de 5 géis. Assim, a utilização de gel desnaturante com placas de tamanhos maiores pode reduzir o tempo total de análise e conseqüentemente reduzir o custo. Reações do tipo *multiplex* também podem ser feitas para aumentar a rapidez nas análises e redução de custos. Essa reação é uma variante da PCR onde dois ou mais locos são amplificados simultaneamente na mesma reação (HENEGARIU *et al.*, 1997). Um exemplo da amplificação de locos microssatélites em gel desnaturante utilizando-se essa reação é mostrado na Figura 6.

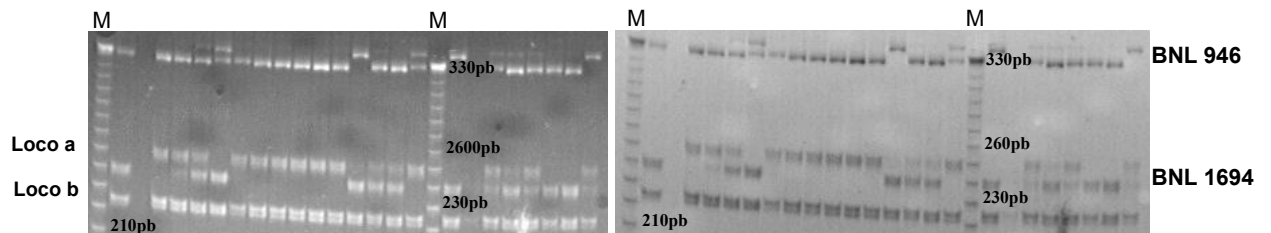


Figura 6- Exemplo de reação *multiplex* realizada com os *primers* BNL 946 (parte superior) e BNL 1694 (parte inferior) em fotografia original (esquerda) e negativo (direita). O *primer* BNL 1694 amplificou dois locos SSR (Loco a e b). M – padrão de peso molecular DNA *ladder* de 10pb.

Entretanto, a utilização de reações *multiplex* só é possível desde que se conheça o tamanho dos fragmentos, pois para se combinar dois ou mais *primers* em uma mesma reação é necessário que estes produzam alelos de tamanhos tais que não se sobreponham, de modo que possam migrar em uma mesma canaleta do gel. Os *primers* observados na Figura 6 amplificaram alelos cujos tamanhos estavam entre 350pb e 330pb (BNL 946) e 260pb e 230pb (BNL 1694), permitindo assim a separação correta dos alelos presentes nos dois locos.

A comparação do custo dos sistemas eletroforéticos é tão importante quanto a comparação do poder de resolução desses sistemas em trabalhos de caracterização e diversidade genética. Na Tabela 3 foram apresentados os diferentes custos obtidos para os sistemas eletroforéticos comparados considerando-se uma análise de diversidade genética de 60 indivíduos. O

custo mais baixo para a obtenção do gel foi detectado para o gel nativo de poliacrilamida seguido do gel desnaturante, de R\$ 2,08 e R\$ 16,00, respectivamente, enquanto o mais caro foi para o gel nativo de poliacrilamida adicionado de spreadex (R\$ 23,45). O custo de 2 litros de solução de brometo de etídio usado em gel desnaturante foi de R\$ 0,21. Além disso, essa solução pode ser utilizada mais de uma vez. Portanto, a opção de se utilizar o brometo de etídio como corante pode reduzir os custos em relação ao uso de nitrato de prata, geralmente usado em géis desnaturantes de poliacrilamida. Além de ser mais caro, com um custo em torno de R\$ 20,00, o processo de revelação por nitrato de prata é muito demorado, demandando cerca de 2 horas. A resolução obtida através de brometo de etídio demonstrou ser eficiente na distinção entre alelos amplificados pelos marcadores microssatélites em cultivares de algodão. MOTA (2003), utilizando também géis desnaturantes de poliacrilamida corados com brometo de etídio, constatou que esse tipo de sistema foi eficiente na separação de alelos amplificados por primers microssatélites usados em análise de diversidade genética de cacauero (*Theobroma cacao* L.).

Tabela 3. Custos obtidos na confecção dos diferentes géis eletroforéticos para 60 amostras.

DESCRIÇÃO DOS MATERIAIS	CUSTO DOS SISTEMAS ELETROFORÉTICOS (R\$)*		
	<i>Gel nativo de poliacrilamida 10%</i>	<i>Gel nativo de poliacrilamida 6% com spreadex</i>	<i>Gel desnaturante de poliacrilamida 7%</i>
Reagentes para obtenção do gel	1,30	23,45	9,00
Tampão	0,78	0,78	7,00
TOTAL	R\$2,08	R\$ 24,23	R\$ 16,00

* Valores obtidos considerando-se US\$ 1,00 igual a R\$ 2,90.

CONCLUSÕES

(1) Os resultados obtidos no presente trabalho indicam o uso de sistemas de maior resolução quando se tem fragmentos de tamanho pequeno e cujas diferenças entre alelos seja de apenas 2 e 1 nucleotídeos. Em trabalhos de caracterização onde não se tem conhecimento prévio do tamanho dos fragmentos de DNA e onde a posição correta dos alelos é requerida, um sistema de gel desnaturante de poliacrilamida é o mais recomendado.

(2) A utilização de placas de tamanho maior (38 cm x 32 cm) reduz o tempo de análise. O uso do corante brometo de etídio pode baratear o custo do gel desnaturante. O gel desnaturante de poliacrilamida, apesar de ter um custo maior do que o gel nativo de poliacrilamida apresenta um maior poder de resolução. Portanto, o sistema eletroforético recomendado para realização de caracterização e análise de diversidade genética de cultivares de algodoeiro herbáceo é o de gel desnaturante de poliacrilamida 7%.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALCÂNTARA NETO, F. **Marcadores microssatélites na identificação de cultivares de soja**. Dissertação: mestrado. Viçosa: UFV, 2001. 46p.
- GUTIÉRREZ, O.A.; BASU, S.; SAHA, S.; JENKINS, J.N.; SHOEMAKER, D.B.; CHEATHAM, C.L.A.; MCCARTY JR., J.C. Genetic distance among selected cotton genotypes and its relationships with F2 performance. **Crop Sci.**, v. 42, p. 1841-1847, 2002.
- HENEGARIU, O.; HEEREMA, S.R.; VANCE, G.H.; VOGT, P.H. Multiplex PCR: critical parameters and step-by-step protocol. **Biotechniques**, v. 23, p. 504-511, 1997.
- LITT, M.; HAUGE, X & SHARMA, V. Shadows bands seen when typing polymorphic dinucleotide repeats: some causes and cures. **Biotechniques**, v. 15, p. 280-284, 1993.
- LIU, S.; CANTRELL, S.L.; McCARTY, J.C.Jr; STEWART. J.McD. Simple sequence repeat-based assessment of genetic diversity in cotton race stock accessions. **Crop Sci.**, v. 40, p. 1459-1469, 2000.
- McDONALD, M.B.; ELLIOT, L.J.; BURR, B.; CANTRELL, R.G. DNA extraction from dry seeds for RAPD analyses in varietal identification studies. **Seed Science & Technology**, v. 22, p. 171-176, 1994.
- MOTA, J. W. S. **Análise da diversidade genética de germoplasma de *Theobroma cacao* L. da Amazônia Brasileira por microssatélites**. Tese: doutorado. Viçosa: UFV, 2003. 97p.
- ONE-Dscan**. One-Dimensional Gel Analysis., versão. 1.0, Copyright 1994/1995, Scanalytic, a dimensional CST Inc.
- PINTO, L.R.; VIEIRA, M.L.; SOUZA, A.P. DE; SOUZA JR., C.L. Isoenzimas e microssatélites em plantas. **Biociência**, v. 11, p. 10-14, 2001.
- RAHMAN, M.H.; JAQUISH, B.; KHASA, P.D. Optimization of PCR protocol in microsatellite analysis with silver and SYBR stains. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 18, p. 339-348, 2000.
- REDDY, O.U.; PEPPER, A.E.; ABDURAKHMONOV, I.; SAHA, S.; JENKINS, J.N.; BROOKS, T.; BOLEK, Y.; EL-ZIK, K.M. New dinucleotide and trinucleotide microsatellite marker resources for cotton genome research. **Journal of Cotton Science**, v. 5, p. 103-113, 2001.

RODRÍGUEZ, S.; VISEDO, G.; ZAPATA, C. Detection of errors in dinucleotides repeat typing by nondenaturing electrophoresis. **Electrophoresis**, v. 22, p. 2656-2664, 2001.

SAMBROOK, J; FRITSCH, EF & MANIATIS, T. 1989. **Molecular cloning: laboratory manual**, 2nd edition CSHL, Cold Spring Harbor, NY.

SENIOR, M.L.; MURPHY, J.P.; GOODMAN, M.M.; STUBER, C.W. Utility of SSRs for determining similarities and relationships in maize using agarose gel system. **Crop Sci.**, v. 38, n. 4, p. 1088-1097, 1998.

WANG, D.; SHI, J.; CARLSON, P.B.; CREGAN, R.W.; DIERS, B.W. A low-cost, high-throughput polyacrylamide gel electrophoresis system for genotyping with microsatellite DNA markers. **Crop Science**, v. 43, p. 1828-1832, 2003.

CAPÍTULO 2

AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA E CARACTERIZAÇÃO DE CULTIVARES E LINHAGENS DE ALGODOEIRO POR MICROSSATÉLITES

RESUMO

O conhecimento da diversidade genética e a relação entre os materiais melhorados são de grande importância para o melhoramento do algodoeiro. A caracterização desses materiais também é importante na proteção do direito intelectual do melhorista. Para obter tais informações, o presente trabalho teve como objetivos: (1) estimar a informatividade dos locos SSR de algodão; (2) estimar a distância genética entre 53 cultivares e 130 linhagens de algodoeiro herbáceo e; (3) selecionar um conjunto de *primers* SSR capazes de diferenciar as 53 cultivares e as 130 linhagens. A extração de DNA desses materiais foi realizada para posterior caracterização genética por meio de marcadores SSR. Foram usados 31 pares de *primers* SSR na avaliação das cultivares e 20 pares de *primers* SSR na avaliação das linhagens. Um total de 66 alelos com uma média de 2,13 alelos por loco foi obtidos para as cultivares, enquanto para as linhagens foram encontrados 41 alelos com uma média de 2,05 alelos por loco. A informação do conteúdo de polimorfismo (PIC) variou de 0,18 a 0,62 para as cultivares e, de 0,25 a 0,51 para as linhagens. O coeficiente de dissimilaridade variou de 0,00 a 0,71, para as cultivares e, de 0,00 a 0,87 para as linhagens. Por meio do método UPGMA observou-se no dendrograma das cultivares a formação de 7 grupos e 26 subgrupos, enquanto para as 130 linhagens foram observados 14 grupos. Esses resultados foram consistentes com as informações da genealogia obtidas para alguns cultivares e linhagens. Por meio do perfil genético dos SSR obtido para cada uma das variedades caracterizadas, foi possível discriminar 52 das 53 cultivares (98%). Utilizando apenas 11 pares de *primers* SSR dos 31 testados, foi possível diferenciar as 52 cultivares de algodoeiro. Na caracterização das 130 linhagens os 20 pares de *primers* SSR usados foram capazes de discriminar 123 das 130 linhagens (95%). Entretanto, apenas 14 pares de *primers* poderiam ser usados na diferenciação das 123 linhagens. Constatou-se o potencial dos marcadores microssatélites em estudos de diversidade genética com cultivares e linhagens de algodoeiro e, também, a necessidade de se introduzir novos alelos no *pool* gênico dos algodoeiros melhorados. O conjunto de *primers* SSR selecionados poderá ser útil nos processos de proteção de cultivares, nas análises de pureza genética e nos programas de melhoramento.

Palavras chaves: fingerprinting, *Gossypium hirsutum* L., marcadores moleculares, genealogia.

INTRODUÇÃO

O algodoeiro (*Gossypium* spp.) constitui-se na principal cultura produtora de fibras no mundo e é considerada a segunda oleaginosa mais importante (WANG *et al.*, 1995). O *G. hirsutum* L. contribui com 90% da produção mundial de algodão e seu cultivo apresenta grande importância social e econômica para o Brasil. Nos últimos anos pôde-se observar a recuperação da cotonicultura no Brasil em termos de produção e até mesmo de inserção nos mercados internacionais (FREIRE *et al.*, 2003). O aumento da produtividade dessa cultura no Brasil, principalmente na região Centro-Oeste, se deve à implementação de tecnologia de alto nível e, inserida a essas tecnologias, está a utilização de sementes melhoradas que proporcionam elevada produtividade e adaptabilidade às diversas regiões do País.

Muitas variedades de algodoeiro têm sido desenvolvidas a partir de cruzamentos entre pais proximamente relacionados, mas o ganho de produção limitado tem levado à procura do uso mais extensivo de germoplasma exótico (VAN ESBROECK e BOWMAN, 1998). Apesar dos métodos de melhoramento terem aumentado a eficiência na transferência da variação alélica das fontes de germoplasma para o *pool* gênico dos algodoeiros melhorados, as fontes de germoplasma ainda permanecem subutilizadas. A diversidade genética assegura medidas de proteção contra problemas com doenças ou pragas e fornece uma base para ganhos genéticos futuros (VAN ESBROECK e BOWMAN, 1998).

Os marcadores moleculares possibilitam várias aplicações e análises genéticas com grandes oportunidades de utilização no melhoramento genético. Esses marcadores apresentam diversas vantagens sobre os marcadores morfológicos, dentre elas, destacam-se o alto grau de polimorfismo, a independência entre os efeitos ambientais e o estágio fisiológico da planta.

Diversos marcadores moleculares têm sido usados em estudos de caracterização, diversidade genética e relações genéticas entre espécies cultivadas e seus parentes silvestres. Desses marcadores, o RAPD foi o mais usado em estudos com algodão (MULTANI e LYON, 1995; TATINENI *et al.*, 1996; IQBAL *et al.*, 1997; LU e MYERS, 2002). Estudos usando aloenzimas (WENDEL *et al.*, 1992) e RFLPs (WENDEL e BRUBAKER, 1993) têm sido limitados pelo baixo nível de polimorfismo detectado ao nível intra e

interespecífico. O marcador AFLP tem sido usado com sucesso em análises de diversidade genética em várias espécies, entre estas, o algodão (PILLAY e MYERS, 1999; ABDALLA *et al.*, 2001). Marcadores microssatélites também têm sido usados em trabalhos de diversidade genética (LIU *et al.*, 2000; GUTIÉRREZ *et al.*, 2002). Apesar do sucesso dos métodos AFLP, RFLP e RAPD, o nível de polimorfismo detectado ainda é baixo, sobretudo quando se usam as técnicas de RFLP e RAPD. Esses tipos de marcadores não possibilitam a realização de uma genotipagem em grandes coleções de germoplasma de uma maneira eficiente (LIU *et al.*, 2000).

Os microssatélites, também denominados SSR (*Simple Sequence Repeat*), possibilitam ampla utilização nos programas de melhoramento, uma vez que são co-dominantes, multialélicos e capazes de fornecer um elevado nível de informação genética por loco (LANZA *et al.*, 2000). A disponibilidade e abundância desses marcadores ao longo do genoma do algodoeiro, sua natureza polimórfica, co-dominância e por serem baseados na reação da polimerase em cadeia (PCR), os fazem úteis em estudos de diversidade genética (REDDY *et al.*, 2001). Mais de 1.000 *primers* microssatélites já foram isolados a partir de bibliotecas de DNA genômico do algodão (NGUYEN *et al.*, 2004). Estudos realizados em nível de DNA para investigar a diversidade genética de algodoeiros cultivados (BRUBAKER e WENDEL, 1994; TATINENI *et al.*, 1996; IQBAL *et al.*, 1997), em geral, revelam que os algodoeiros cultivados têm baixa diversidade genética. Segundo Carvalho (1999) as cultivares plantadas no Brasil descendem de apenas três ancestrais diferentes.

Com o propósito de investigar a diversidade genética de algodoeiros cultivados em várias regiões do Brasil, Argentina e Paraguai e, de linhagens usadas no programa de melhoramento da COODETEC (Cooperativa Central de Pesquisa Agrícola), o presente trabalho teve como objetivos: (1) Estimar a informatividade dos locos SSR de algodão; (2) Selecionar um conjunto de *primers* microssatélites capazes de diferenciar 53 cultivares e 130 linhagens de algodoeiro herbáceo criadas pela COODETEC; (3) Estimar a distância genética entre 53 cultivares de algodoeiro herbáceo atualmente cultivadas no Cone Sul; (4) Estimar a distância genética entre 130 linhagens de algodoeiro herbáceo desenvolvidas pela COODETEC.

MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL GENÉTICO E EXTRAÇÃO DE DNA

O material genético utilizado correspondeu a 53 cultivares de algodoeiro herbáceo, desenvolvidas e lançadas por instituições públicas e privadas do Brasil, assim como algumas cultivares da Argentina e Paraguai (Tabela 1), além de 130 linhagens desenvolvidas e usadas no programa de melhoramento da COODETEC. O DNA foi extraído a partir de um *bulk* de oito a dez sementes de cada cultivar ou linhagem. A extração foi feita com base no protocolo descrito por McDONALD *et al.* (1994), com algumas modificações.

Em tubo eppendorff de 1,5 mL contendo cerca de 50-60 mg de sementes foram adicionados 700 μ L de tampão de extração contendo Tris-HCl 0,2 M, NaCl 0,28 M, EDTA 25 mM e SDS 10%. As amostras foram extraídas em polítron e, em seguida, centrifugadas por 10 min a 14.000 RPM em microcentrífuga eppendorf 1405. Os sobrenadantes foram transferidos para novos tubos e centrifugados por mais 5 min a 14.000 RPM. Novamente, os sobrenadantes foram transferidos para novos tubos, sendo, em seguida, acrescentados 10 μ L de proteinase K 10 mg/mL e 10 μ L de CaCl_2 1 mM, e colocado em banho-maria a 55 °C por 1,5 horas. Foram, então, adicionados às amostras 900 μ L de isopropanol e deixadas em repouso por 2 min. Após este tempo as amostras foram centrifugadas por 10 min a 14.000 RPM. Os sobrenadantes foram descartados e os precipitados foram lavados duas vezes, uma vez com álcool 70% e, a segunda vez com álcool 90%. Após as lavagens os precipitados foram secos por 15 min à temperatura ambiente sendo, a seguir, ressuspensos em solução de Tris-EDTA (TE) 10 mM e 1 mM contendo RNase 60 μ g/mL e colocados em banho-maria por 1 hora. As amostras foram precipitadas novamente pela adição de 900 μ L de isopropanol e deixadas em precipitação por 2 min. Logo após, as amostras foram novamente centrifugadas por 10 min a 14.000 RPM e os sobrenadantes descartados. Os precipitados foram ressuspensos ao final em TE_{0,1} (Tris-HCl 10 mM, EDTA 0,1 mM, pH 7,5).

A qualidade do DNA foi avaliada em gel de agarose 0,8% bem como por espectrofotometria, considerando a razão A_{260}/A_{280} . A concentração foi estimada a partir da absorbância a 260 nm conforme SAMBROOK *et al.* (1989),

estocando-se as amostras a -20 °C e as amostras de trabalho (10 ng/μL) a 5 °C (em geladeira).

MARCADORES SSR E CONDIÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO

Foram utilizados *primers* microssatélites de algodão disponibilizados pela *Research Genetics*. Esses *primers* têm na sua denominação o laboratório onde foram obtidos, nesse caso, BNL (Brookhaven National Laboratory). REDDY *et al.* (2001) disponibilizaram a seqüência de 309 pares de *primers* microssatélites, sendo denominados de JESPR. Em primeiro lugar foi realizado um *screening* com os *primers* de algodão disponíveis no Laboratório de Genética Molecular de Plantas (BIOMOL), do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO), da Universidade Federal de Viçosa (UFV). No *screening* apenas 12 cultivares foram usadas, sendo testados 116 pares de *primers* BNL e 86 JESPR que foram sintetizados pela *Invitrogen Life Technologies*, sendo denominados CNL. Desses *primers* testados, 35 foram polimórficos, sendo 34 BNL e somente 1 CNL. Entretanto, apenas 31 pares de *primers* (Tabela 2) mostraram produtos de fácil detecção. Para as linhagens encontraram-se apenas 20 pares de *primers* polimórficos.

As reações de microssatélites foram realizadas em microtubos de 0,2 mL, sendo o volume total da reação de 15 μL, contendo tampão da PCR (Tris-HCl 10 mM e 50 mM, pH 8,0), 0,2 mM de cada desoxirribonucleotídeo, 2,0 - 3,0 mM de MgCl₂ (Tabela 2), 0,2 μM de cada primer, uma unidade da enzima *Taq* DNA polimerase e 30 ng de DNA molde. As amplificações foram feitas em termociclador *Perkin Elmer* (GeneAmp PCR System 9600) usando um programa *touch down*. Esse programa consistiu de um ciclo de desnaturação a 94 °C por 4 min, uma etapa de pareamento a 65 °C por 40s, seguidos de 10 ciclos *touch down* decrescendo 1 °C por ciclo até 55 °C, a partir da qual se seguiram 30 ciclos a 55 °C por 40s cada. Em cada ciclo foram mantidas as respectivas temperaturas de desnaturação (94° C/ 40s) e polimerização (72° C/ 1min). O final do programa consistiu de um ciclo de polimerização a 72 °C por 7 min.

Tabela 1– Cultivares de algodão recomendadas para plantio no Brasil, Argentina e Paraguai, origem, genealogia e ciclo.

Nº	ORIGEM	Cultivares	Genealogia*	CICLO (Dias)	REGIÃO (País)
1	Austrália	Sicala 3-2	Acala1517-70/TamcotSP-37//DP61/CSIRO	135-175	-
2	EMBRAPA	CNPA ITA 90	Seleção Deltapine AC-90	170/180	Cerrado (Brasil)
3	FundaçãoMT	BRS 96	Seleção EPAMIG 3	170/180	Cerrado (Brasil)
4	EMBRAPA	BRS Facual	Sicala 34/CNPA SRI5	170-180	Cerrado (Brasil)
5	FundaçãoMT/ EMBRAPA	BRS Antares	Seleção CNPA SRI5	160-170	Cerrado (Brasil)
6	FundaçãoMT	FMT Saturno	Seleção CS 50	160/170	Cerrado (Brasil)
7	DELTA PINE	Delta-Opal	-	145	Brasil
8	BAYER SEEDS	Fiber Max 966	Seleção no cultivar Sicala 34	156	Nordeste de São Paulo, GO, MS, MT, TO (Brasil)
9	BAYER SEEDS	Fiber Max 986	Seleção no cultivar Sicala 3-2	160	Nordeste de São Paulo, GO, MS, MT, TO (Brasil)
10	IAC	IAC 17	Seleção IAC RM ₃	140	São Paulo (Brasil)
11	IAC	IAC 19	Yucatanense/N1-HOA//IAC RM ₃	150	São Paulo (Brasil)
12	IAC	IAC 20	Seleção IAC 17	140	São Paulo (Brasil)
13	IAC	IAC 21	Seleção IAC 19	150	São Paulo (Brasil)
14	IAC	IAC 22	IAC 20/GH 11-9-75	140	SP, Centro-Oeste (Brasil)
15	IAC	IAC 23	Seleção IAC 20-RR.	150	São Paulo (Brasil)
16	IAPAR	IPR 94	IAPAR 71/Deltapine Acala 90	138-175	Paraná (Brasil)
17	IAPAR	IPR 95	CNPA ITA 90/IAPAR 71	138-175	Paraná (Brasil)
18	IAPAR	IPR 96	CNPA ITA 90/IAPAR 71	135-175	Paraná (Brasil)
19	Argentina	Guazuncho 2	Guazuncho/SP 8535	-	Argentina/Paraguai
20	Argentina	Cacique	MATACO/GUAZUNCHO	-	Argentina
21	Argentina	Oro Blanco	SP2473/SIOKRA	-	Argentina
22	SYNGENTA	Makina	KNX111/Acala SJ-5	160	MT, MS, GO, SP, BA (Brasil)
23	SYNGENTA	Fabrika	KNH390/Monar 135-366	175	MT, MS, GO, SP, BA (Brasil)
24	EMBRAPA	CNPA 7H	TAMCOT SP 37/IAC 17	120/130	NE/Centro-Sul (Brasil)
25	EMBRAPA	CNPA 8H	-	130/140	Norte/NE (Brasil)
26	EMBRAPA	CNPAPrecoce1	Seleção GH-11-9-75	110/120	Norte/NE/Cerrado (Brasil)
27	EMBRAPA	CNPAPrecoce2	C-100-7-81/PNH3	110/120	Norte/NE/Cerrado (Brasil)
28	EMBRAPA	CNPAPrecoce3	C-80-18-80 / PNH3	170/180	Cerrado (Brasil)
29	EMBRAPA	CNPA ITA 92	Seleção Island 542	110/120	Norte/NE/ Centro-Oeste (Brasil)
30	EMBRAPA	BRS 197	Seleção CNPA SRI5	170/180	Cerrado (Brasil)
31	EMBRAPA	BRS Itaúba	Seleção CS 50	170/180	Cerrado (Brasil)
32	EMBRAPA	BRS Aroeira	Seleção CNPA SRI5	160/170	Cerrado (Brasil)
33	EMBRAPA	BRS Ipê	Seleção CNPA ITA 90	170/180	Cerrado (Brasil)
34	EMBRAPA	BRSSucupira	Sicala 34/CNPA SR5	160/180	Cerrado (Brasil)
35	EMBRAPA	BRS 96-148	Seleção CS 50	160	Cerrado (Brasil)
36	EMBRAPA	BRS 96-227	Seleção CS 50	157	Cerrado (Brasil)
37	Fundação MT	FMT Fetagri	Seleção CNPA SRI5	146	MT (Brasil)
38	EPAMIG	Alva	Haplóide Duplo (C-25-1-80)	120	Minas Gerais (Brasil)
39	EPAMIG	Redenção	Seleção IAC 17	120-150	Minas Gerais (Brasil)
40	EPAMIG	Epamig 5	Seleção C -25 - 1 - 80	120-140	Minas Gerais/Centro-Oeste (Brasil)
41	EPAMIG	Liça	Haplóide Duplo (C -24-5-78)	120-140	Minas Gerais/Centro-Oeste (Brasil)
42	EPAMIG	MG/UFU 91-02	S 6046/IAC 17	120-140	Minas Gerais (Brasil)
43	Paraguai	IAN 338	CHACO 510/ISA 205//Reba P279	140-160	Paraguai
44	COODETEC	CD 401	SP86/ISA205	130-140	MS, PR e SP (Brasil)
45	COODETEC	CD 402	DP Ac 90//IAC 20/S295*IAC 20	140 a 155	BA, GO, MT, MS, MG, SP (Brasil)
46	COODETEC	CD 403	DP Ac 90//IAC 20/S295*IAC 20	140-145	BA, GO, MT, MS, MG, SP (Brasil)
47	COODETEC	CD 404	CHACO 520/DP Ac90	140 a 160	MS, MT e PR (Brasil).
48	COODETEC	CD 405	CNPA86-387/P288//PR 3060/87	145 a 155	PR e SP (Brasil).
49	COODETEC	CD 98-87	OC92-165/Sicala 3-3	-	-
50	COODETEC	CD 98-101	OC92-165/Sicala 3-3	-	-
51	COODETEC	CD 406 ou CD98-225 CD 407 ou	OC92-165/Sicala V1	140 a 160	BA, GO, SP, MG, MT, MS e Região Norte (Brasil).
52	COODETEC	CD98-383	DP Ac90//IAC 20/S295	140 a 160	BA, GO, MG, SP, MT, PR, MS e Região Norte (Brasil).
53	COODETEC	CD 98-440	DP Ac 90//IAC 20/S295*IAC 20	-	-

* Informações obtidas por comunicação pessoal com os respectivos obtentores e complementadas com informações obtidas na literatura.

Os fragmentos amplificados foram separados em gel desnaturante de poliacrilamida 7% (p/v) com acrilamida/bis-acrilamida na proporção de 19:1, 32% de formamida e 5,6 M de uréia, conforme protocolo proposto por LITT *et al.* (1993). Antes da aplicação das amostras o gel era submetido a uma pré-corrída de 30 minutos a uma potência constante (80W na corrída de duas placas). As amostras analisadas eram misturadas com igual volume (5 μ L) do tampão de carregamento STR 2X (formamida 95%, NaOH 2M e xileno cianol 0,09%) e, pouco antes do carregamento, as misturas eram desnaturadas a 94° C por 4-5 min e logo depois eram colocadas em gelo. Após o término da eletroforese os géis foram mergulhados em solução de brometo de etídio na concentração de 1 μ g/mL por 30 min. Posteriormente à coloração, os géis foram fotografados sob luz ultravioleta (*Eagle Eye II*).

Para determinar o comprimento dos fragmentos, utilizou-se o padrão de peso molecular 10 pb DNA *ladder* (Life Technologies, Cat. Nº 10821-015), o qual consiste de 33 fragmentos de dsDNA, variando de 10 a 330 pb em múltiplos de 10 pb. Além da análise visual através do DNA *ladder* utilizou-se o programa ONE-Dscan (ver. 1.0) para a análise do tamanho dos fragmentos.

Tabela 2. Especificações dos *primers* usados na caracterização das cultivares e linhagens.

Nome do Marcador		Seqüência de bases (5'-3')	Estrutura Repetida ^b	Localização no Cromossomo	MgCl ₂ (mM)
BNL139s^a	F	-	-	-	3,0
	R	-	-	-	
BNL 946	F	GCTGTTGCTCCACATCTCCT	GA ₁₄	20Lo*	2,5
	R	GGGCAAACAGATAGGCAGAA			
BNL 1053	F	AGGGTCTGTCATGGTTGGAG	AC ₁₆	3	2,0
	R	CATGCATGCGTACGTGTGGTA			
BNL 1064	F	TTTGCGGGTAATCCTATTGC	(CA) ₁₅ (GT) ₁₃	6sh**	2,5
	R	TGTCTATGGGACATTTGCA			
BNL1231	F	TAATAAAAGGGAAAGGAAAGAGTT	AG ₁₅	D02*	2,5
	R	TATGGCTCTAGAATATTCCTCG			
BNL1423	F	AAAAACCAATTGCCTCCAAA	AG ₁₂	9*	3,0
	R	CTCCTAACGATCAATGGGGA			
BNL 1673	F	CTCTTAATGCTTGGCCTTGG	AG ₂₄	12Lo*	2,5
	R	AGTACCGGACTCGGCACTAT			
BNL 1694(2)	F	CGTTTGTTCGTGTAACAGG	AG ₁₉	7*	2,5
	R	TGGTGGATTCACATCCAAG			
BNL 1721	F	TGTCCGAATCTTAAGACCGG	AG ₁₇	18Lo**	2,5
	R	GCGCAGATCCTCTTACCAA			
BNL 2448A	F	TAACTTTATCCCGGAATCG	GA ₁₇	5*	2,5
	R	TAGTTTGATCAGTTTGATGATTTAGC			
BNL 2449	F	ATCTTTCAAACAACGGCAGC	GA ₁₆	A01*	3,0
	R	CGATTCGGACTCTTGATGT			
BNL 2495	F	ACCGCCATTACTGGACAAG	AG ₁₄	26Lo*	2,5
	R	AATGGAATTTGAACCCATGC			
BNL 2496A	F	TCGAAATGAATTTAGATGACCA	GA ₁₅	-	3,0
	R	TCCTTTTTTTGTACTTCTCTTGC			
BNL 2590A	F	GAAAAACCAAAAAGGAAAATCG	AG ₁₁	9Lo**	2,5
	R	CTCCCTCTCTCTAACC GGCT			
BNL 2646	F	CCCCTTTGATAGATACACATTTTA	(CT) ₁₇ (AG) ₄	15*	3,0
	R	AAAATAAATACGAAAGAGAAAGAGAA			
BNL 2921	F	CGAGAGATTTAAAGGGAACA	AG ₁₀	-	2,5
	R	GGGAGTGGTCTGATGGAAAA			
BNL 2960	F	TAAGCTCTGGAGGCCAAAA	GA ₁₀	10Lo**	3,0
	R	CCATTTCAATTTCAAGCATACG			
BNL 2986	F	TAGAGCCAAGTGGTGATCCC	AG ₁₀	16Lo*	3,0
	R	AAAGGGGGGAATGATTATGC			
BNL 3089	F	TCGAACTTAACAAAAGAGAGAGAGA	AG ₁₀	-	2,5
	R	AAATCCGGATTCAAGCAATACTT			
BNL 3171	F	GAAAAATTGAGGAAGGACATACG	GA ₂₆	-	2,5
	R	GGCCACAACCGAATTTACTG			
BNL 3255	F	GACAGTCAAACAGAACAGATATGC	(GC) ₆ AT(AC) ₁₄	5sh**	3,0
	R	TTACACGACTTGTTCCACG			
BNL 3257	F	CAATCTGGGATCAAAAAACC	(AC) ₁₃ (AT) ₁₀	A02*	2,5
	R	GGTGAACATAGCGTGTTCG			
BNL 3408(2)	F	ATCCAAACCATTGCACCACT	(GT) ₂ A(TG) ₁₃	17Lo**	2,5
	R	GTGTACGTTGAGAAGTCATCTGC			
BNL 3482	F	ATTTGCCCCAGGTTTTTTTT	AC ₁₂	26Lo**	2,5
	R	GCAACACCTTTTCCTCCCTA			
BNL 3590	F	TCTTCCCTCTCTTTCTCTTTTCG	(CA) ₂₀ (TA) ₆	2*	2,0
	R	ACACGGAAGACCAACCAAGT			
BNL 3594	F	AGGGATTTTGATTGTTGTGC	TC ₃₇	6bot*	2,5
	R	TGAATTCAAAACAATGTTAGCC			
BNL 3800	F	GCCATTGATGGAAGGTCACT	TG ₂₁	-	2,0
	R	CATCCTCGGAATTTTCCAAA			
BNL 3838	F	GGAACTGGGTTTTATGGGG	GT ₁₀	20*	2,5
	R	CCCCAAAGACTGCACAATTT			
BNL 3902	F	GAGTTTGGGGGCTGTGTATG	GT ₁₈	15*	2,0
	R	GGGGTGCTTATGTCAGACGT			
BNL 4030	F	CCTCCCTCACTTAAGGTGCA	GT ₁₀	22*	2,5
	R	ATGTTGTAAGGGTGCAAGGC			
CNL 101	F	CCAAGTCAAGGTGAGTTATATG	(TA) ₃ (GT) ₁₅	-	2,5
	R	GCTCTTTGTTACTGAAATGGG			

Obs.: *sh* –short arm ; *Lo* – long arm. *, ** Informações obtidas em Lacape *et al.* (2003) e Liu *et al.* (2000), respectivamente. **a** - primers em negrito também foram usados na caracterização das linhagens; **b** – Informações obtidas no site <http://demeter.bio.bnl.gov/cgi-bin>. Cromossomos de 1 a 13 pertencem ao subgenoma A e de 14 a 26 ao subgenoma D.

ANÁLISE DOS DADOS

A diversidade genética de cada loco microssatélite foi obtida através da frequência dos alelos utilizando a seguinte fórmula:

$$\text{Informação do conteúdo de polimorfismo (PIC)} = 1 - j = 1 - \sum_{j=1}^n p_{ij}^2$$

Onde p_{ij} é a frequência do j -ésimo alelo para o *primer* i (ANDERSON *et al.*, 1993). O valor da diversidade genética do loco é muito similar a heterozigidade, que é comumente utilizada para descrever a informatividade de um marcador molecular em espécies alógamas. ANDERSON *et al.* (1993) indicaram que a diversidade genética do loco é essencialmente a mesma da informação do conteúdo de polimorfismo (PIC – polymorphism information content) como utilizado por BOTSTEIN *et al.* (1980).

As distâncias genéticas entre as cultivares e entre as linhagens foram avaliadas por meio de uma matriz de dissimilaridade construída utilizando-se o complemento do índice de similaridade (IS) para variáveis codominantes/multialélicas, por meio do programa Genes, versão Windows (CRUZ, 2001). O referido índice estimou a similaridade entre os genótipos a partir dos escores 0, 1 e 2, para alelo ausente, em heterozigose e homozigose, respectivamente. Esse índice foi obtido dividindo-se o total de locos de microssatélites contendo alelos comuns pelo número total dos locos avaliados. Os métodos usados para realizar a análise de agrupamento feita com base na matriz de dissimilaridade foram os do tipo hierárquico aglomerativo, sendo estes o método do vizinho mais próximo, vizinho mais distante e UPGMA. Os dendrogramas construídos a partir desses métodos foram feitos por meio do programa STATISTICA (StatSoft Inc., 1999). A eficiência do método de agrupamento foi avaliada através do coeficiente de correlação cofenética, observando a concordância entre a matriz de dissimilaridade original e o dendrograma. O cálculo da correlação cofenética (r_{cof}) foi realizado pela seguinte fórmula:

$$r_{\text{cof}} = r_{\text{DC}} = \frac{C\hat{O}V(D, C)}{\sqrt{\hat{V}(D)\hat{V}(C)}}$$

Onde D representa a matriz de distâncias, e C a matriz cofenética, obtida a partir do dendrograma.

Outro método de agrupamento utilizado foi o método de otimização de Tocher. Nesse método, adotou-se o critério de que a média das medidas de dissimilaridade dentro de cada grupo deve ser menor que as distâncias médias entre quaisquer grupos (CRUZ e REGAZZI, 1994).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

DIVERSIDADE ALÉLICA DOS SSR

Na avaliação das 53 cultivares, 31 pares de *primers* amplificaram 33 locos microssatélites. Apesar de dois *primers* (BNL 1694 e BNL 3408) terem amplificado dois locos cada, apenas um foi polimórfico (Figura 1). Avaliando-se as 130 linhagens encontraram-se 20 pares de *primers* polimórficos, os quais amplificaram 22 locos microssatélites. LIU *et al.* (2000a), realizando um trabalho de mapeamento de marcadores SSR em algodão, encontraram alguns *primers* amplificando dois locos, dentre eles o *primer* BNL 3408.

Os *primers* amplificaram um total de 66 alelos nas cultivares com uma média de 2,13 alelos por loco SSR (Tabela 3) e 41 alelos nas linhagens com uma média de 2,05 alelos por loco SSR (Tabela 4). Resultado semelhante foi obtido por GUTIÉRREZ *et al.* (2002), também trabalhando com algodão. Esses autores encontraram 60 pares de *primers* polimórficos, dos quais 69 locos foram amplificados e resultaram num total de 139 alelos com uma média de 2 alelos/loco. Por outro lado, trabalhando com essa mesma cultura, LIU *et al.* (2000b) encontraram 56 pares de *primers* polimórficos, dos quais 62 locos foram amplificados e resultaram num total de 325 alelos com uma média de 5 alelos/loco. Ambos os trabalhos utilizaram gel desnaturante de poli-acrilamida, *primers* marcados com fluorescência e um seqüenciador automático de DNA para detectar polimorfismo. Portanto, a metodologia usada no presente trabalho, apesar de diferente daquela usada pelos referidos autores, mostrou-se eficiente na avaliação dos locos microssatélites.

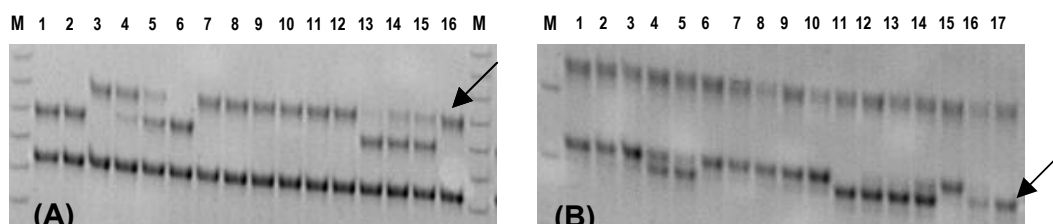


Figura 1. (A) *Primer* BNL 1694 amplificando dois locos, sendo o primeiro polimórfico e o segundo monomórfico, (B) *Primer* BNL 3408 amplificando dois locos, sendo o primeiro monomórfico e localizado no cromossomo 3 do subgenoma A e o segundo, polimórfico localizado no cromossomo 17 do subgenoma D. (M) Marcador de 10pb.

O valor do PIC calculado para estimar a informatividade de cada *primer* variou de 0,18 a 0,62, com uma média de 0,40 nas cultivares (Tabela 3) e de 0,25 a 0,51, com uma média de 0,43 nas linhagens (Tabela 4). No trabalho realizado por LIU *et al.* (2000b) o valor do PIC variou de 0,05 a 0,82 com um valor médio de 0,31. Uma possível razão do baixo polimorfismo encontrado no material genético usado no presente trabalho é que os materiais avaliados são todos provenientes de programas de melhoramento, podendo haver base genética estreita entre esses materiais. Contrariamente, o material usado no trabalho de LIU *et al.* (2000b) consistia de 97 acessos de *G. hirsutum* derivados de várias raças silvestres, explicando assim o maior polimorfismo encontrado por esses autores (5 alelos/loco). Entretanto, é válido ressaltar que o valor médio do PIC encontrado por aqueles autores foi de 0,31, ou seja, ainda assim obtiveram um baixo polimorfismo quando se levou em conta a média geral do PIC para todos os locos. No trabalho realizado por GUTIÉRREZ *et al.* (2002) grande parte do material genético usado era constituído por cultivares provenientes de programas de melhoramento dos Estados Unidos e Austrália e, segundo resultados obtidos por esses autores, bem como por outros (MULTANI e LYON, 1995; IQBAL *et al.*, 1997; ULLOA *et al.*, 1999), tanto em cultivares americanos quanto australianos verifica-se uma base genética estreita. Isso pode explicar a média de 2 alelos/loco obtida por meio de SSR nesses materiais.

Os *primers* mais informativos, tanto para as cultivares quanto para as linhagens, foram BNL 3257, BNL 3590, BNL 3408, BNL 2495 e BNL 1694. De acordo com as informações contidas na Tabela 2, 13 *primers* estão localizados no subgenoma A, sendo 2 no cromossomo 5, 2 no cromossomo 6, 2 no cromossomo 9 e os outros estão distribuídos nos cromossomos 2, 3, 7, 10 e 12. Os 11 *primers* restantes estão localizados no subgenoma D, sendo 2 no cromossomo 15, 2 no cromossomo 20, 2 no cromossomo 26 e os outros estão distribuídos nos cromossomos 16, 17, 18, e 22. Portanto, a grande maioria dos *primers* usados no trabalho encontra-se bem distribuída no genoma do algodão.

O perfil dos microssatélites para cada uma das cultivares caracterizadas com os 31 pares de *primers* mostra que os locos utilizados foram capazes de discriminar 52 das 53 cultivares (98%). As duas cultivares que não puderam ser distinguidas entre si foram Sicala 3-2 (1) e CNPA ITA 90 (2). Esse resultado

pode ser explicado pela genealogia. A primeira cultivar foi originada do cruzamento entre as variedades Acala e Tamcot SP-37 e DP 61 e CSIRO, enquanto a segunda foi uma seleção da cultivar Deltapine Acala 90 (DPAc90). A cultivar DPAc90 foi originada de um cruzamento envolvendo DP 16 e John Cotton Polycross. Tanto a variedade DP 61 quanto CSIRO são seleções da DP 16 e, as variedade John Cotton Polycross é proveniente de um cruzamento complexo que envolve variedades Acala e Tamcot SP-37. A probabilidade de que essas cultivares sejam iguais devido ao acaso, calculada com base no produtório das freqüências dos alelos detectados nesses cultivares em cada loco SSR, foi igual a zero, enquanto a probabilidade delas não serem iguais devido ao acaso (probabilidade de exclusão) foi igual a um.

Tabela 3 - Faixa de tamanho dos alelos (pb), número e freqüência dos alelos e informação do conteúdo de polimorfismo (PIC) dos 31 locos SSR analisados nas 53 cultivares de algodoeiro herbáceo.

LOCOS	Faixa de tamanho dos alelos (pb)	Número de alelos	Freqüência dos alelos	PIC
BNL139	150-170	3	0,06, 0,69, 0,25	0,46
BNL 946	330-350	2	0,85, 0,15	0,26
BNL 1053	170-190	2	0,57, 0,43	0,49
BNL 1064	130-140	2	0,11, 0,89	0,19
BNL1231	170-200	2	0,68, 0,32	0,44
BNL1423	130-140	2	0,58, 0,42	0,49
BNL 1673	300-360	2	0,13, 0,87	0,23
BNL 1694(2)	230-260	2	0,50, 0,50	0,50
BNL 1721	170-180	2	0,24, 0,76	0,36
BNL 2448	130-140	2	0,87, 0,13	0,23
BNL 2449	140-170	3	0,74, 0,03, 0,24	0,40
BNL 2495	190-200	2	0,55, 0,45	0,50
BNL 2496A	110-120	2	0,72, 0,28	0,41
BNL 2590	180-190	2	0,82, 0,18	0,29
BNL 2646	120-150	2	0,31, 0,69	0,43
BNL 2921	150-160	2	0,56, 0,44	0,50
BNL 2960	140-150	2	0,51, 0,49	0,50
BNL 2986	150-160	2	0,52, 0,48	0,50
BNL 3089	140-150	2	0,90, 0,10	0,18
BNL 3171	210-230	2	0,28, 0,72	0,40
BNL 3255	220-240	2	0,33, 0,67	0,44
BNL 3257	200-220	3	0,49, 0,32, 0,19	0,62
BNL 3408(2)	140-150	2	0,50, 0,50	0,50
BNL 3482	120-130	2	0,76, 0,24	0,37
BNL 3590	170-190	3	0,07, 0,56, 0,37	0,55
BNL 3594	170-190	2	0,89, 0,11	0,20
BNL 3800	180-190	2	0,83, 0,17	0,28
BNL 3838	120-130	2	0,73, 0,27	0,39
BNL 3902	170-200	2	0,58, 0,42	0,49
BNL 4030	110-120	2	0,32, 0,68	0,44
CNL 101	120-130	2	0,37, 0,63	0,47
TOTAL		66		
MÉDIA		2,13		0,40

Na caracterização das 130 linhagens, os 20 pares de *primers* SSR usados foram capazes de discriminar 123 das 130 linhagens (95%). As linhagens 2, 3, 23 e 26, 15 e 16, 117 e 118, não foram distinguíveis entre si. As linhagens 2 e 3, 23 e 26, 15 e 16 têm os mesmos pais, e as outras linhagens têm os mesmos parentais envolvidos nas suas genealogias. As probabilidades de identidade ao acaso e de exclusão foram calculadas e em todos os cálculos os resultados foram iguais a zero e um, respectivamente.

Tabela 4 - Faixa de tamanho dos alelos (pb), número e freqüência dos alelos e informação do conteúdo de polimorfismo (PIC) dos 20 locos SSR analisados nas 130 linhagens de algodoeiro herbáceo.

LOCOS	Faixa de tamanho dos alelos (pb)	Número de alelos	Freqüência dos alelos	PIC
BNL 3590	170-190	3	0,12; 0,24; 0,65	0,51
BNL 3257	200-220	2	0,47; 0,53	0,50
BNL 3408	140-150	2	0,48; 0,52	0,50
BNL 2495	190-200	2	0,50; 0,50	0,50
BNL 1694	230-260	2	0,49; 0,51	0,50
BNL 1053	170-190	2	0,44; 0,56	0,49
BNL 3482	120-130	2	0,43; 0,57	0,49
BNL 3902	170-200	2	0,45; 0,55	0,49
BNL 2986	150-160	2	0,44; 0,56	0,49
BNL 4030	110-120	2	0,38; 0,62	0,47
CNL 101	120-130	2	0,37; 0,63	0,47
BNL 1231	170-200	2	0,36; 0,64	0,46
BNL 1423	130-140	2	0,32; 0,68	0,44
BNL 139	150-170	2	0,30; 0,70	0,42
BNL 2496A	110-120	2	0,28; 0,72	0,40
BNL 2960	140-150	2	0,26; 0,74	0,38
BNL 946	330-350	2	0,21; 0,79	0,33
BNL 3255	220-240	2	0,18; 0,82	0,29
BNL 2921	150-160	2	0,17; 0,83	0,28
BNL 2449	140-170	2	0,14; 0,86	0,25
TOTAL		41		
MÉDIA		2,05		0,43

Considerando-se os valores do PIC dos locos mais informativos é possível reduzir bastante o número de locos utilizado na discriminação das cultivares. Utilizando-se somente os primers BNL 3257, BNL 3590, BNL 2495, BNL 2921, BNL 1694, BNL 3408, BNL 2960, BNL 1053, BNL 1423, BNL 139, BNL 3255, ao invés dos 31, é possível diferenciar as 52 cultivares. Na caracterização das 123 linhagens é possível diminuir de 20 para 14 pares de *primers*. Dessa forma, esses *primers* poderão ser usados na definição de perfis genéticos para cada uma das cultivares e linhagens. Esses perfis genéticos, ou impressões digitais, poderão auxiliar nos trabalhos de proteção de cultivares, análise de pureza genética e outros trabalhos que auxiliem os programas de

melhoramento, como por exemplo, no monitoramento de cruzamentos, taxa de contaminação de pólen, fidelidade de cruzamento controlado, etc.

DISTÂNCIA GENÉTICA E DIVERSIDADE

O coeficiente de dissimilaridade usado para calcular a distância genética entre as 53 cultivares avaliadas a partir dos locos SSR variaram de 0,00 a 0,71, com uma média de $0,40 \pm 0,01$. A análise de distribuição dos 1.378 pares de cultivares comparados (Figura 2) revelou uma concentração dos valores nas classes de 0,3-0,4 a 0,4-0,5. O valor zero indica cultivares similares enquanto àqueles pertencentes à classe de 0,7-0,8 indicam as cultivares mais divergentes. A distância genética mais alta (0,71) ocorreu entre as cultivares IAC 20 (12) e BRS Itaúba (31). Enquanto a distância mais baixa (0,00) ocorreu entre as cultivares Sicala 3-2 (1) e CNPA ITA 90 (2).

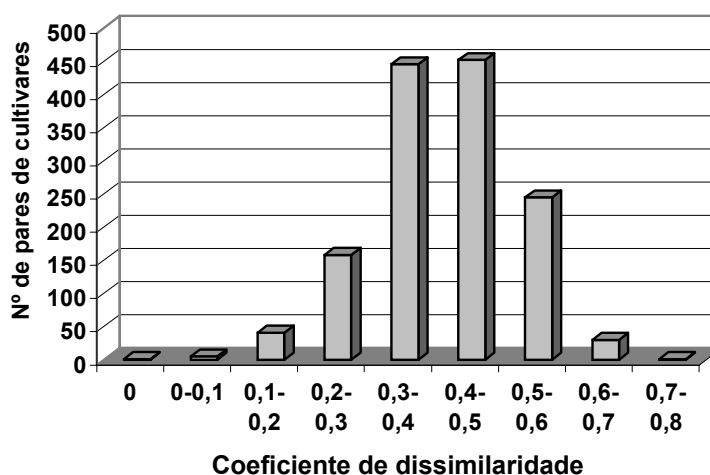


Figura 2- Distribuição das distâncias genéticas calculadas para 1.378 pares de cultivares.

O coeficiente de dissimilaridade usado para calcular a distância genética entre as 130 linhagens avaliadas a partir dos locos SSR variaram de 0,00 a 0,87, com uma média de 0,43. A análise de distribuição dos 8.385 pares de linhagens comparados (Figura 3) revelou uma concentração dos valores nas classes de 0,3-0,4, 0,4-0,5 e 0,5-0,6. As distâncias genéticas mais altas (0,87) ocorreram entre as linhagens 25 e 117 e, 25 e 118. Enquanto que as menores distâncias (0,00) ocorreram entre as linhagens 2 e 3, 2 e 23, 2 e 26, 3 e 23, 3 e 26, 23 e 26, 15 e 16, 117 e 118.

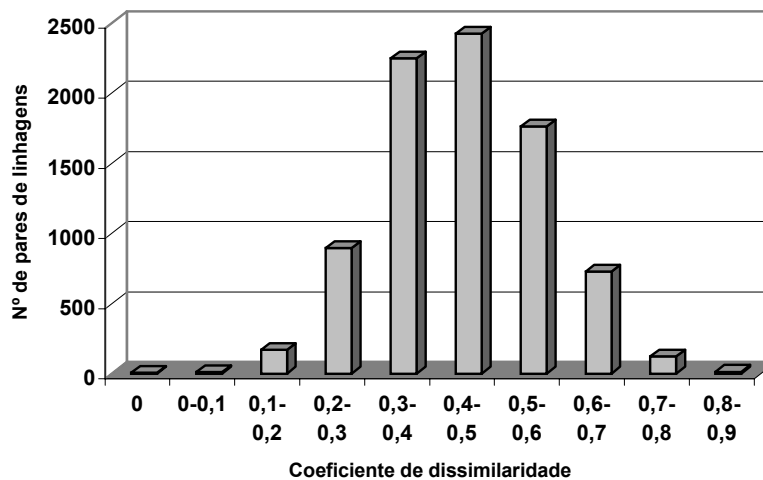


Figura 3- Distribuição das distâncias genéticas calculadas para 8.385 pares de linhagens.

Os resultados apresentados nas Figuras 2 e 3 mostram uma elevada similaridade entre as cultivares e entre as linhagens. Esses resultados também podem ser observados através da análise de agrupamento. As correlações cofenéticas entre os dados de dissimilaridade (Tabela 1 do anexo) e as matrizes fenéticas obtidas pelos métodos UPGMA, vizinho mais distante (VMD) e vizinho mais próximo (VMP) para as 53 cultivares foram de 65%, 63% e 43%, respectivamente, sendo esses valores significativos a 1% de probabilidade. O método do vizinho mais distante foi o que se aproximou mais do UPGMA.

A Tabela 5 apresenta uma comparação entre os diferentes grupos obtidos para as 53 cultivares por meio dos métodos UPGMA, VMD e agrupamento de Tocher. Os resultados obtidos pelos agrupamentos realizados por meio desses três métodos são bastante coincidentes entre si. Portanto, o método UPGMA (Figura 4) apresentou maior eficiência em representar as dissimilaridades entre os genótipos avaliados em relação aos outros métodos. Segundo CRUZ e CARNEIRO (2003), dos métodos hierárquicos, o UPGMA é o que apresenta os dendrogramas com correlação cofenética máxima. O método UPGMA também foi usado para realizar o agrupamento das 130 linhagens (Figura 5).

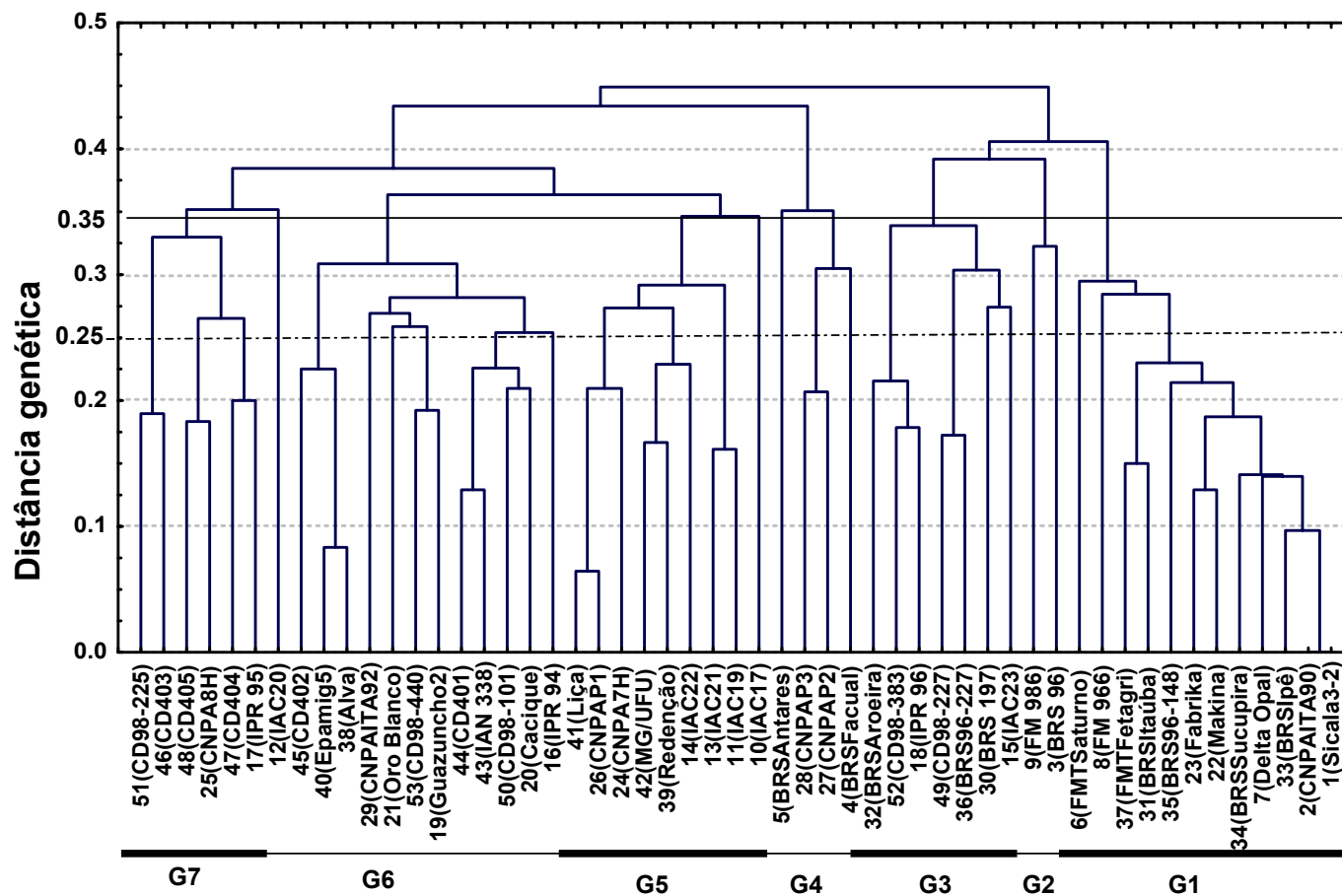


Figura 4 – Dendrograma construído com base nas medidas de dissimilaridade das 53 cultivares usando o método das médias das distâncias (UPGMA). Os grupos indicados abaixo da figura (G1, G2, G3, G4, G5, G6 e G7) foram obtidos considerando um limite superior de 35% da distância genética (linha cheia). Considerando-se um limite superior de 25% pode-se ainda formar 26 subgrupos (linha tracejada).

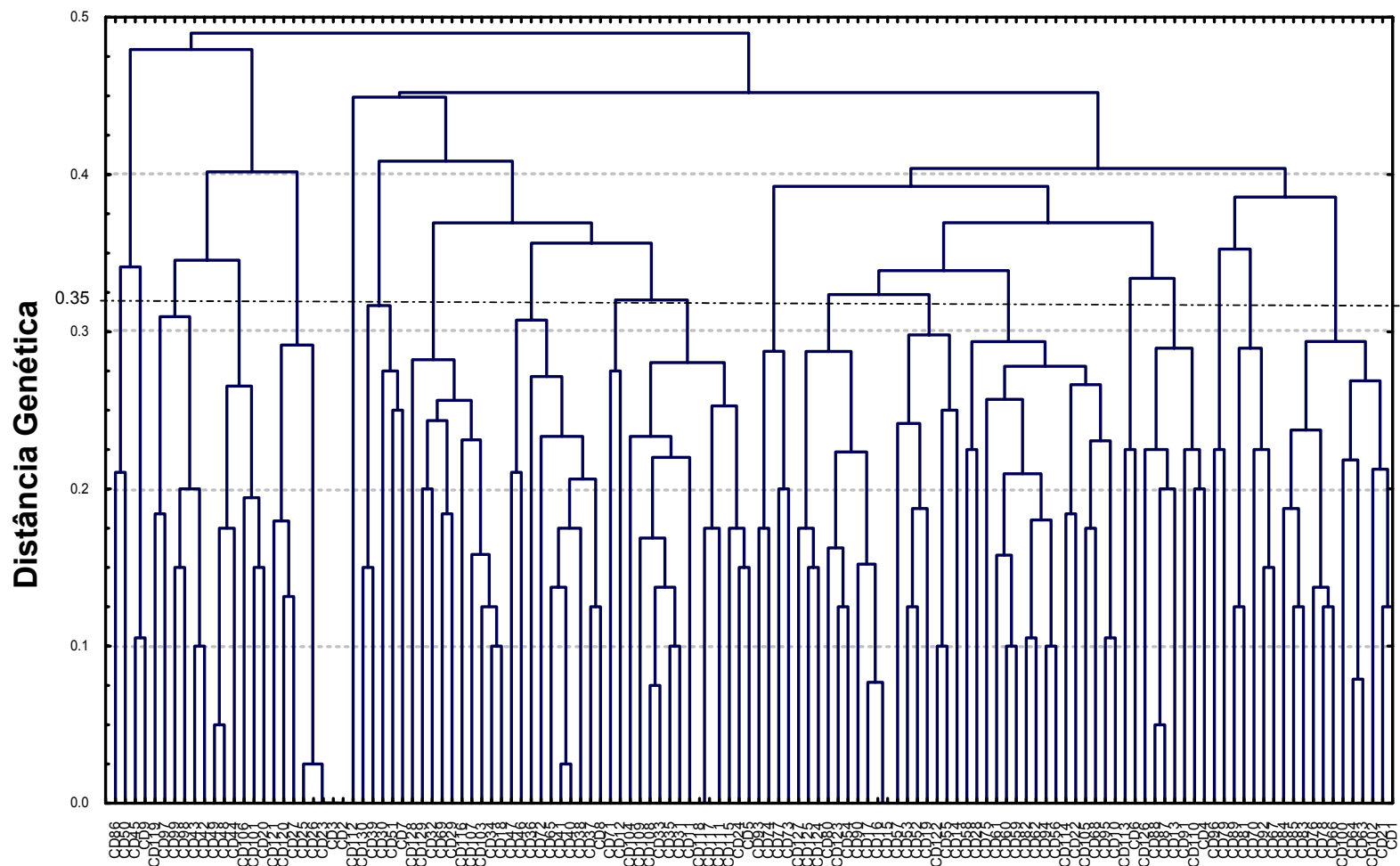


Figura 5 – Dendrograma construído com base nas medidas de dissimilaridade das 130 linhagens usando o método das médias das distâncias (UPGMA). Considerando-se um limite superior de 35% pode-se formar 14 grupos (linha tracejada).

Tabela 5- Comparação dos grupos obtidos para as 53 cultivares através dos métodos UPGMA, vizinho mais distante (VMD) e agrupamento de Tocher. G – corresponde aos grupos e SG – corresponde aos subgrupos formados em cada método avaliado.

(G, SG)	UPGMA	(G, SG)	VMD	(G)	TOCHER
(1,1)	1, 2, 33, 7, 34, 22, 23, 35, 31, 37*	(1,1)	1, 2, 33, 34, 35, 22, 23*	(1)	1, 2, 33, 7, 34, 23, 22, 31, 35, 37, 8, 6, 32*
(1,2)	8	(1,3)	7, 8		
(1,3)	6				
(2,1)	3	(1,4)	3, 9	(13)	3
(2,2)	9			(10)	9
(3,1)	15	(6)	15, 30, 36, 49	(4)	15, 30, 36, 49
(3,2)	30				
(3,3)	36, 49				
(3,4)	18, 52, 32	(7,1)		(5)	
(4,1)	4	(2,1)	4, 5		
(4,2)	27, 28	(2,2)	27, 28	(7)	27,28, 4
(4,3)	5			(8)	5
(5,1)	10			(9)	10
(5,2)	11,13	(4,1)	11, 13	(2)	24, 26, 41, 11, 14, 39, 42, 13, 40, 38
(5,3)	14, 39, 42	(4,2)	14, 39, 42, 24, 26, 41		
(5,4)	24,26, 41				
(6,1)	16	(5,1)	12, 29, 43, 44	(3)	16, 20, 50, 43, 44, 19, 53, 21, 29, 45, 46
(6,2)	20, 50, 43, 44	(5,2)	16, 20, 50, 19, 53		
(6,3)	19, 53				
(6,4)	21				
(6,5)	29				
(6,6)	38, 40, 45	(3)	10, 21, 38, 40, 45		
(7,1)	12			(11)	12
(7,2)	17, 47	(5,3)	17, 47 25, 48	(6)	17, 47, 25, 48
(7,3)	25, 48				
(7,4)	46,51	(7,2)	46, 51	(12)	51

* Numeração das cultivares realizada de acordo com a Tabela 1 e Figura 1.

Na avaliação do dendrograma obtido para as 53 cultivares (Figura 4) observou-se a formação de 7 grupos e 26 subgrupos, enquanto que para as 130 linhagens foram observados 14 grupos (Figura 5). Na Tabela 6 observa-se que a formação de alguns grupos é consistente com as informações da genealogia obtidas para alguns cultivares. No grupo 1, por exemplo, encontram-se cultivares cujos parentais são CS-50, Sicala 34 e CNPA SRI5. Tanto a cultivar CS 50 quanto a Sicala 34 têm como parentais as cultivares Deltapine Acala 90 e Siokra 1-1 que, por sua vez, tem os mesmos pais da cultivar Sicala 3-2. A cultivar CNPA SRI5 foi obtida a partir de uma população de base ampla, tendo várias cultivares envolvidas na sua genealogia. O grupo 3 contém algumas cultivares cujos pais envolvidos na genealogia são Deltapine Acala 90 e IAC 20. A cultivar IAPAR 71 é uma seleção de IAC 20, o que pode explicar a presença da cultivar IPR 96 nesse grupo. Os pais das cultivares CNPA P2 e CNPA P3 têm a mesma genealogia explicando, assim,

a presença dessas cultivares no mesmo grupo. No grupo 5 encontram-se cultivares cujos pais envolvidos na genealogia são IAC RM3, Tamcot SP-37 e IAC 17. As cultivares CD 401, Cacique, Guazuncho2, Oro Blanco e IAN 338, pertencentes ao grupo 6, têm pais em cujas genealogias encontram-se cultivares como Chaco 510, Guazuncho, Reba P279 e SP8535. Alguns cultivares do grupo 7 têm na sua genealogia os mesmos parentais, como é o caso das cultivares da COODETEC. Dentre esses parentais estão IAC 20 e Deltapine Acala 90, o que explica a presença da cultivar IPR 95 nesse grupo.

Apesar da consistência de alguns grupos com a genealogia, observaram-se também algumas inconsistências. Por exemplo, IPR 95 e IPR 96 têm os mesmos pais, mas não foram alocados no mesmo grupo. No entanto, a similaridade entre essas cultivares foi de 72%. Isso ocorreu também com outras cultivares, como BRS Facual e BRS Sucupira, com uma similaridade igual a 58%. O fato da cultivar CNPA SRI5 ter se originado de um cruzamento complexo pode explicar a divergência entre essas cultivares. Por outro lado, cultivares como Epamig 5 e Alva, que têm a mesma origem, ficaram no mesmo grupo e apresentaram similaridade igual a 92%. A presença das cultivares BRS 96 e Fiber Max 986 no mesmo grupo também é inconsistente de acordo com suas genealogias. A similaridade entre essas cultivares foi de 68%. A falta de informação de algumas genealogias pode ser um fator que levou ao não entendimento dessas inconsistências. Observou-se, também, uma independência entre as características das cultivares, tais como origem, ciclo e região de plantio, e o agrupamento genético. Cada grupo possui cultivares de diversas empresas de melhoramento, indicando que as empresas utilizam germoplasmas semelhantes entre si.

Segundo CARVALHO (1999), pouca diversidade genética é encontrada nas cultivares de algodoeiro plantadas no Brasil. Grande parte delas descende de apenas três origens diferentes (Auburn 56, Tamcot SP37 e Stoneville 213), o que torna estreita a base genética dessas cultivares e pode torná-las vulneráveis à ocorrência de doenças e, às vezes, vulneráveis a doenças sem muita importância até o momento. Baixos valores de distância genética também foram encontrados por MULTANI e LYON (1995). Usando marcadores RAPD esses autores encontraram distâncias genéticas variando de 0,01 a 0,08 entre nove cultivares de algodoeiro Australianos. IQBAL *et al.*

(1997) também encontraram baixos valores de distâncias genéticas (0,18 a 0,07), entre 17 cultivares de *G. hirsutum* com base em marcadores RAPD. Com base em marcadores SSR, ULLOA *et al.* (1999) encontraram valores de distâncias genéticas iguais a 0,18 entre cultivares Acala e Delta e a 0,16 entre cultivares da série Pima PS. Usando também marcadores SSR, GUTIÉRREZ *et al.* (2002) detectaram uma base genética estreita entre cultivares Australianos e Americanos. A monocultura de algumas cultivares de sucesso e seu uso extensivo como progenitores em programas de melhoramento têm limitado a diversidade genética (VAN ESBROECK *et al.*, 1998). BOWMAN (2000) menciona que os baixos valores de distância genética indicam a necessidade de introgressão de novos alelos no germoplasma do algodoeiro nos Estados Unidos para aumentar diversidade genética.

No presente trabalho, observou-se que a maioria das cultivares obtidas nos programas de melhoramento é resultante de seleção dentro de cultivares de sucesso. O outro método mais adotado é o do cruzamento entre cultivares e entre cultivares e linhagens. VAN ESBROECK e BOWMAN (1998) sugerem algumas explicações para justificar a fraca relação entre diversidade parental e melhoramento de cultivares. Eles argumentam que existe suficiente variação alélica, mutação ou recombinação entre os indivíduos proximalmente relacionados e/ou que o coeficiente de parentesco não reflete a verdadeira distância genética. O grande número de cultivares de sucesso obtido por meio de resseleções indica que uma pequena quantidade de recombinação resulta em uma variância genética suficiente para se obter progresso genético dentro dos programas de melhoramento. Apesar dessa constatação, um grande esforço para introgridir um germoplasma mais diverso que não acarrete efeitos negativos na produção, em cultivares já adaptados às regiões do País, pode oferecer maiores recompensas ao melhoramento da cultura e reduzir a vulnerabilidade genética destas.

Quadro 2- Comparação entre os grupos formados pelo método UPGMA através das medidas de dissimilaridades obtidas por marcadores microsatélites e os dados de genealogia das 53 cultivares de algodoeiro avaliadas.

Grupos	Cultivares	Genealogia
1	Sicala 3-2	Acala1517-70/TamcotSP-37//DP61/CSIRO
	CNPA ITA 90	Seleção DP AC-90
	BRS Ipê	Seleção CNPA ITA 90
	Delta-Opal	-
	BRSSucupira	Sicala 34/CNPA SRI5
	Makina	KNX111/Acala SJ-5
	Fabrika	KNH390/Monar 135-366
	BRS 96-148	Seleção CS 50
	BRS Itaúba	Seleção CS 50
	FMT Fetagri	Seleção CNPA SRI5
	Fiber Max 966	Seleção Sicala 34
FMT Saturno	Seleção CS 50	
2	BRS 96	Seleção EPAMIG 3
	Fiber Max 986	Seleção no cultivar Sicala 3-2
3	IAC 23	Seleção IAC 20-RR.
	BRS 197	Seleção CNPA SRI5
	BRS 96-227	Seleção CS 50
	CD 98-87	OC92-165/Sicala 3-3
	IPR 96	CNPA ITA 90/IAPAR 71
	CD 407/CD98-383	DP Ac90//IAC 20/S295
4	BRS Aroeira	Seleção CNPA SRI5
	BRS Facual	Sicala 34/CNPA SRI5
	CNPA P2	C-100-7-81/PNH3
	CNPA P3	C-80-18-80 / PNH3
5	BRS Antares	Seleção CNPA SRI5
	IAC 17	Seleção IAC RM ₃
	IAC 19	Yucatanense/N1-HOA//IAC RM ₃
	IAC 21	Seleção IAC 19
	IAC 22	IAC 20/GH 11-9-75
	Redenção	Seleção IAC 17
	MG/UFU 91-02	S 6046/IAC 17
	CNPA 7H	TAMCOT SP 37//IAC 17
	CNPA P1	Seleção GH-11-9-75
Liça	Haplóide Duplo (C -24-5-78)	
6	IPR 94	IAPAR 71/Deltapine Acala 90
	Cacique	MATACO/GUAZUNCHO
	CD 98-101	OC92-165/Sicala 3-3
	IAN 338	CHACO 510/ISA 205//Reba P279
	CD 401	SP86/ISA205
	Guazuncho 2	Guazuncho/SP 8535
	CD 98-440	DP Ac 90//IAC 20/S295*IAC 20
	Oro Blanco	SP2473/SIOKRA
	CNPA ITA 92	Seleção Island 542
	Alva	Haplóide Duplo (C-25-1-80)
	Epamig 5	Seleção C -25 - 1 - 80
	CD 402	DP Ac 90//IAC 20/S295*IAC 20
7	IAC 20	Seleção IAC 17
	IPR 95	CNPA ITA 90/IAPAR 71
	CD 404	CHACO 520/DP Ac90
	CNPA 8H	-
	CD 405	CNPA86-387/P288//PR 3060/87
	CD 403	DP Ac 90//IAC 20/S295*IAC 20
CD 406 / CD98-225	OC92-165/Sicala V1	

CONCLUSÕES

- (1) Os resultados mostraram o potencial dos marcadores microssatélites em estudos de diversidade genética entre indivíduos da mesma espécie.
- (2) Os marcadores microssatélites diferenciaram 52 de 53 cultivares e 123 de 130 linhagens utilizando-se 11 e 14 pares de *primers*, respectivamente.
- (3) Verifica-se uma base genética estreita entre as cultivares e entre as linhagens de algodoeiro e a necessidade de se introduzir novos alelos no *pool* gênico dos algodoeiros melhorados.
- (4) A utilização de marcadores microssatélites permite a comparação das distâncias genéticas entre as cultivares e entre as linhagens, podendo ser uma ferramenta auxiliar nos programas de melhoramento. Na escolha de progenitores pode-se selecionar aqueles indivíduos mais divergentes para gerar novas combinações genéticas, enquanto aqueles mais próximos podem permitir a recuperação mais rápida do genoma recorrente em programas de melhoramento baseados em retrocruzamentos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDALLA, A.M.; REDDY, O.U.K.; EL-ZIK, K.M. e PEPPER, A.E. Genetic diversity and relationships of diploid and tetraploid cottons revealed using AFLP. **Theor. Appl. Genet.**, v.102, p. 222-229, 2001.
- ANDERSON, J.A.; CHURCHILL, G.A.; AUTRIQUE, J.E.; TANKSLEY, S.D.; SORRELLS, M.E. Optimizing parental selection for genetic linkage maps. **Genome**, v. 36, p. 181-186, 1993.
- BOTSTEIN, D.; WHITE, R.L.; SKOLINCK, M.; DAVIS, R.W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 32, n. 1, p. 314-331, 1980.
- BOWMAN, D.T. Attributes of public and private cotton breeding programs. **Journal of Cotton Science**, v. 4, p. 130-136, 2000.
- BRUBAKER, C.L.; WENDEL, J.F. Reevaluating the origin of domesticated cotton (*Gossypim hirsutum*; Malvaceae) using nuclear restriction fragment length polymorphism (RFLPs). **Am. J. Bot.**, v. 81, p. 1309-1326, 1994.
- CARVALHO, L. Contribuição do melhoramento ao cultivo do algodão no Brasil. In: BELTRÃO, N.E.M. **O Agronegócio do Algodão no Brasil**. v. 2. Brasília, DF. 1999. p. 255-269.
- CRUZ, C. D. **Programa Genes: versão Windows; aplicativo computacional em genética e estatística**. Viçosa:UFV, 2001. 648p.
- CRUZ, C.D., REGAZZI, A.J. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. Viçosa, MG: UFV, 1994. 390p.
- CRUZ, C.D., CARNEIRO, P.C.S. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. v.2. Viçosa, MG: UFV, 2003. 585p.
- FREIRE, E.C., BARROSO, P.A.V., PENNA, J.C.V., BORÉM, A. Fluxo gênico: Análise do caso de algodão no Brasil. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**. Nº 29. p. 104-113. 2003.
- GUTIÉRREZ, O.A.; BASU, S.; SAHA, S.; JENKINS, J.N.; SHOEMAKER, D.B.; CHEATHAM, C.L.A.; McCARTY Jr., J.C. Genetic distances among selected cotton genotypes and its relationship with F₂ performance. **Crop Sci**. v.42, p. 1841-1847, 2002.
- IQBAL, M.J., AZIZ, N., SAEED, N.A., ZAFAR, Y. Genetic diversity evaluation of some elite cotton varieties by RAPD analysis. **Theor. Appl. Genet.** v.94, p. 139-144, 1997.

- LACAPE, J.M.; NGUYEN, T.B.; THIBIVILLIERS, S.; COURTOIS, B.; BOJINOV, B.M.; CANTRELL, R.G.; BURR, B., HAU, B. A combined RFLP-SSR-AFLP map of tetraploide cotton based on a *Gossypium hirsutum* x *Gossypium barbadense* backcross population. **Genome**, v. 46, p. 612-626, 2003.
- LANZA, M.A.; SCHUSTER, I.; GUIMARÃES, C.T.; Aplicação de marcadores moleculares no melhoramento genético. **Informe agropecuário**, v.21, n. 204, p. 97-108, 2000.
- LIU, S.; SAHA, S.; STELLY, D.; BURR, B.; CANTRELL, R.G. Chromosomal assignment of microsatellite loci in cotton. **Journal of Heredity**, v.91, n. 4, p. 326-332. 2000a.
- LIU, S.; CANTRELL, R.G.; McCARTY Jr., J.C.; STEWART, J. McD. Simple sequence repeat based assessment of genetic diversity in cotton race stock Accessions. **Crop Sci**. v.40, p. 1459-1469. 2000b.
- LU, H.J.; MYERS, G.O. Genetic relationships and discrimination of ten influential upland cotton varieties using RAPD markers. **Theor. Appl. Genet.**, v. 105, p. 325-331. 2002.
- McDONALD, M.B.; ELLIOT, L.J.; SWEENEY, P.M. DNA extraction from dry seeds for RAPD analyses in varietal identification studies. **Seed Sci & Technol**, v. 22, p. 171-176, 1994.
- MULTANI, D.S.; LYON, B.R. Genetic fingerprinting of Australian cotton cultivars with RAPD markers. **Genome**, v. 38, p. 1005-1008, 1995.
- NGUYEN, T.B.; GIBAND, M.; BROTTIER, P.; RISTERUCCI, A.M.; LACAPE, J.M. Wide coverage of the tetraploide cotton genome using newly developed microsatellite markers. **Theor Appl Genet**, v. 109, n.1, p. 167-175, 2004.
- PILLAY, M.; MYERS, G.O. Genetic diversity assessed by variation in ribosomal RNA genes and AFLP markers. **Crop Sci**, v. 39, p. 1881-1886, 1999.
- REDDY, O.U.; PEPPER, A.E.; ABDURAKHMONOV, I.; SAHA, S.; JENKINS, J.N.; BROOKS, T.; BOLEK, Y.; EL-ZIK, K.M. New dinucleotide and trinucleotide microsatellite marker resources for cotton genome research. **Crop Sci**, v. 5, p. 103-113, 2001.
- SAMBROOK, J; FRITSCH, EF; MANIATIS, T. **Molecular cloning: laboratory manual**, 2nd edition CSHL, Cold Spring Harbor, NY. 1989.
- ULLOA, M.; MEREDITH Jr., W.R.; PERCY, R., MOSER, H. Genetic variability within improved germplasm of *Gossypium hirsutum* and *G. barbadense* cottons. P. 73. **In Agronomy Abstracts**. ASA, Madison, WI.

- Van ESBROECK, G.A.; BOWMAN, D.T. Cotton germplasm diversity and its importance to cultivar development. **Journal of Cotton Science**, v. 2, p. 121-129, 1998.
- Van ESBROECK, G.A.; BOWMAN, D.T. Changes in the genetic diversity of cotton in the USA from 1970 to 1995. **Crop Sci.**, v. 38, p. 33-37. 1998.
- WANG, G.L.; DONG, J.-M; PATERSON, A.H. The distribution of *Gossypium hirsutum* chromatin in *G. barbadense* germplasm: molecular analysis of introgressive plant breeding. **Theor. Appl. Genet.**, v. 91, p. 1153-1161, 1995.
- WENDEL, J.F. ; BRUBAKER, C.L. RFLP diversity in *Gossypium hirsutum* L. and new insights into the domestication of cotton. **Am. J. Bot.**, v. 80, n.6, p. 71, 1993.
- WENDEL, J.F.; BRUBAKER, C.L.; PERCIVAL, A.E. Genetic diversity in *Gossypium hirsutum* and the origin of upland cotton. **Am. J. Bot.**, v. 79, p. 1291-1310, 1992.

ANEXO

Tabela 1 - Matriz de dissimilaridade entre as 53 cultivares de algodoeiro estimada com base no complemento do índice de similaridade calculado através da análise de microssatélites.

Cultivares	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	
Scala 3-2	0,00																										
ITA 90	0,00	0,00																									
BRS 96	0,42	0,42	0,00																								
BRS Facual	0,45	0,45	0,52	0,00																							
BRS Antares	0,50	0,50	0,53	0,31	0,00																						
SATURNO	0,27	0,27	0,50	0,39	0,47	0,00																					
Delta Opal	0,13	0,13	0,35	0,42	0,56	0,31	0,00																				
Fiber Max 966	0,27	0,27	0,37	0,48	0,53	0,35	0,15	0,00																			
Fiber Max 986	0,52	0,52	0,32	0,37	0,42	0,47	0,39	0,44	0,00																		
IAC 17	0,53	0,53	0,56	0,31	0,45	0,34	0,47	0,40	0,42	0,00																	
IAC 19	0,55	0,55	0,48	0,32	0,44	0,37	0,42	0,44	0,29	0,27	0,00																
IAC 20	0,61	0,61	0,35	0,39	0,47	0,61	0,48	0,48	0,40	0,37	0,39	0,00															
IAC 21	0,58	0,58	0,58	0,42	0,44	0,40	0,52	0,47	0,39	0,34	0,16	0,42	0,00														
IAC 22	0,55	0,55	0,42	0,45	0,37	0,47	0,45	0,40	0,35	0,37	0,29	0,29	0,23	0,00													
IAC 23	0,53	0,53	0,50	0,40	0,39	0,45	0,50	0,45	0,31	0,35	0,31	0,47	0,34	0,34	0,00												
IPR 94	0,42	0,42	0,44	0,44	0,44	0,42	0,32	0,32	0,50	0,37	0,45	0,32	0,52	0,45	0,50	0,00											
IPR 95	0,50	0,50	0,47	0,50	0,45	0,42	0,47	0,42	0,50	0,48	0,37	0,34	0,27	0,31	0,42	0,37	0,00										
IPR 96	0,43	0,43	0,40	0,50	0,62	0,40	0,36	0,31	0,50	0,38	0,36	0,47	0,43	0,47	0,38	0,34	0,28	0,00									
Guazuncho 2	0,39	0,39	0,45	0,29	0,37	0,42	0,35	0,35	0,37	0,37	0,32	0,35	0,39	0,35	0,31	0,29	0,34	0,26	0,00								
Cacique	0,48	0,48	0,55	0,42	0,50	0,45	0,48	0,45	0,60	0,40	0,45	0,39	0,45	0,39	0,40	0,26	0,34	0,33	0,23	0,00							
Oro Blanco	0,47	0,47	0,48	0,37	0,55	0,44	0,40	0,37	0,48	0,32	0,37	0,40	0,50	0,47	0,42	0,27	0,48	0,24	0,21	0,27	0,00						
Makina	0,16	0,16	0,29	0,42	0,47	0,27	0,23	0,37	0,35	0,50	0,45	0,45	0,48	0,45	0,37	0,45	0,47	0,47	0,35	0,48	0,47	0,00					
Fabrka	0,16	0,16	0,32	0,48	0,47	0,34	0,23	0,31	0,35	0,50	0,45	0,52	0,48	0,48	0,37	0,45	0,47	0,36	0,32	0,52	0,44	0,13	0,00				
CNPA 7H	0,56	0,56	0,53	0,44	0,45	0,40	0,47	0,44	0,42	0,35	0,34	0,40	0,34	0,31	0,42	0,37	0,48	0,48	0,31	0,44	0,35	0,47	0,53	0,00			
CNPA 8H	0,65	0,65	0,48	0,42	0,44	0,48	0,55	0,45	0,44	0,31	0,35	0,26	0,29	0,23	0,27	0,39	0,27	0,36	0,32	0,32	0,40	0,48	0,52	0,27	0,00		
CNPAPrecocel	0,58	0,58	0,58	0,35	0,34	0,42	0,52	0,45	0,37	0,27	0,23	0,42	0,32	0,26	0,34	0,45	0,47	0,53	0,35	0,42	0,40	0,55	0,55	0,21	0,32	0,00	
CNPAPrecocel2	0,53	0,53	0,67	0,29	0,38	0,50	0,43	0,50	0,41	0,34	0,36	0,50	0,50	0,43	0,38	0,47	0,62	0,56	0,40	0,43	0,45	0,50	0,50	0,38	0,47	0,29	
CNPAPrecocel3	0,58	0,58	0,58	0,32	0,37	0,48	0,55	0,62	0,43	0,43	0,45	0,48	0,62	0,48	0,50	0,52	0,67	0,61	0,45	0,52	0,43	0,52	0,55	0,43	0,52	0,28	
CNPAITA92	0,48	0,48	0,52	0,35	0,50	0,52	0,42	0,35	0,47	0,27	0,26	0,32	0,35	0,42	0,40	0,32	0,34	0,29	0,23	0,32	0,27	0,52	0,45	0,44	0,42	0,35	
BRS 197	0,58	0,58	0,45	0,35	0,44	0,48	0,52	0,45	0,47	0,37	0,48	0,45	0,55	0,42	0,27	0,52	0,47	0,43	0,39	0,32	0,47	0,48	0,52	0,47	0,35	0,39	

Tabela 1 - Matriz de dissimilaridade entre as 53 cultivares de algodoeiro estimada com base no complemento do índice de similaridade calculado através da análise de microsatélites (Continuação).

Cultivares	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26
BRSTALUBA	0,16	0,16	0,45	0,52	0,50	0,31	0,23	0,31	0,48	0,53	0,45	0,71	0,42	0,55	0,50	0,48	0,44	0,40	0,42	0,45	0,50	0,26	0,19	0,63	0,65	0,61
BRSAROEIRA	0,31	0,31	0,40	0,42	0,53	0,37	0,31	0,32	0,39	0,37	0,35	0,52	0,42	0,42	0,24	0,42	0,40	0,24	0,26	0,39	0,34	0,29	0,21	0,50	0,39	0,45
BRS IPÊ	0,10	0,10	0,44	0,42	0,47	0,32	0,16	0,29	0,50	0,50	0,55	0,52	0,58	0,55	0,53	0,32	0,50	0,47	0,29	0,39	0,37	0,16	0,19	0,47	0,58	0,58
BRSUCUPIRA	0,15	0,15	0,44	0,42	0,53	0,26	0,15	0,23	0,44	0,47	0,47	0,58	0,50	0,50	0,45	0,39	0,48	0,34	0,26	0,35	0,34	0,24	0,18	0,50	0,55	0,52
BRS 96-148	0,23	0,23	0,40	0,35	0,43	0,28	0,27	0,33	0,43	0,43	0,45	0,55	0,48	0,45	0,37	0,45	0,57	0,45	0,32	0,42	0,37	0,18	0,23	0,43	0,48	0,48
BRS 96-227	0,38	0,38	0,34	0,41	0,40	0,45	0,41	0,34	0,36	0,40	0,45	0,45	0,52	0,48	0,26	0,50	0,53	0,35	0,28	0,48	0,34	0,24	0,21	0,47	0,45	0,52
FETAGRI	0,25	0,25	0,50	0,55	0,50	0,25	0,25	0,32	0,50	0,50	0,52	0,68	0,45	0,52	0,43	0,42	0,40	0,41	0,38	0,42	0,47	0,32	0,28	0,53	0,53	0,58
Alva	0,63	0,63	0,47	0,37	0,35	0,50	0,53	0,47	0,35	0,32	0,30	0,43	0,33	0,27	0,38	0,37	0,52	0,45	0,33	0,33	0,28	0,53	0,53	0,32	0,33	0,27
Redenção	0,52	0,52	0,50	0,47	0,52	0,47	0,38	0,33	0,43	0,40	0,23	0,32	0,27	0,18	0,37	0,38	0,33	0,43	0,35	0,35	0,40	0,48	0,55	0,30	0,28	0,28
EPAMIG 5	0,68	0,68	0,48	0,32	0,37	0,55	0,55	0,48	0,33	0,30	0,25	0,35	0,32	0,28	0,37	0,32	0,50	0,46	0,32	0,28	0,30	0,58	0,58	0,30	0,32	0,22
Liça	0,52	0,52	0,52	0,42	0,40	0,37	0,45	0,40	0,35	0,34	0,23	0,48	0,32	0,26	0,34	0,45	0,47	0,47	0,35	0,42	0,40	0,48	0,48	0,21	0,39	0,06
MG/UFU	0,53	0,53	0,50	0,47	0,48	0,47	0,47	0,44	0,45	0,42	0,34	0,37	0,37	0,27	0,48	0,37	0,42	0,48	0,31	0,31	0,35	0,50	0,56	0,19	0,34	0,31
IAN 338	0,50	0,50	0,50	0,31	0,45	0,50	0,44	0,40	0,48	0,35	0,34	0,27	0,37	0,31	0,39	0,27	0,32	0,47	0,24	0,27	0,32	0,47	0,53	0,32	0,31	0,34
CD 401	0,53	0,53	0,53	0,34	0,42	0,53	0,47	0,40	0,52	0,32	0,34	0,31	0,40	0,34	0,32	0,21	0,39	0,41	0,24	0,21	0,26	0,50	0,56	0,35	0,31	0,31
CD 402	0,48	0,48	0,55	0,28	0,33	0,48	0,45	0,45	0,43	0,33	0,28	0,32	0,38	0,35	0,40	0,28	0,47	0,43	0,25	0,32	0,30	0,42	0,45	0,30	0,32	0,35
CD 403	0,43	0,43	0,50	0,40	0,32	0,43	0,47	0,40	0,55	0,37	0,43	0,37	0,47	0,33	0,42	0,28	0,28	0,34	0,27	0,25	0,37	0,40	0,40	0,45	0,28	0,43
CD 404	0,38	0,38	0,46	0,42	0,38	0,44	0,42	0,42	0,48	0,42	0,42	0,38	0,38	0,34	0,40	0,40	0,20	0,29	0,22	0,44	0,42	0,34	0,34	0,44	0,28	0,54
CD 405	0,65	0,65	0,45	0,45	0,43	0,52	0,62	0,48	0,50	0,40	0,38	0,35	0,35	0,35	0,40	0,42	0,27	0,39	0,32	0,35	0,40	0,55	0,58	0,37	0,18	0,45
CD 98-87	0,47	0,47	0,39	0,26	0,44	0,42	0,37	0,29	0,31	0,31	0,31	0,32	0,40	0,40	0,32	0,35	0,42	0,28	0,19	0,39	0,24	0,37	0,34	0,34	0,35	0,35
CD 98-101	0,39	0,39	0,52	0,37	0,48	0,37	0,39	0,40	0,55	0,35	0,42	0,40	0,45	0,39	0,40	0,27	0,44	0,43	0,31	0,21	0,32	0,35	0,48	0,42	0,40	0,44
CD 98-225	0,33	0,33	0,42	0,45	0,53	0,45	0,40	0,35	0,57	0,40	0,53	0,42	0,60	0,50	0,45	0,38	0,45	0,38	0,38	0,35	0,37	0,30	0,37	0,53	0,42	0,58
CD 98-383	0,43	0,43	0,31	0,47	0,55	0,48	0,43	0,41	0,36	0,47	0,33	0,43	0,40	0,43	0,28	0,38	0,38	0,18	0,22	0,28	0,26	0,36	0,33	0,48	0,34	0,50
CD 98-440	0,35	0,35	0,35	0,42	0,38	0,44	0,38	0,42	0,40	0,50	0,35	0,38	0,38	0,48	0,48	0,29	0,37	0,38	0,19	0,21	0,31	0,31	0,35	0,48	0,44	0,46

Tabela 1- Matriz de dissimilaridade entre as 53 cultivares de algodoeiro estimada com base no complemento do índice de similaridade calculado através da análise de microssatélites (Continuação).

Cultivares	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	
CNPAPrecoce2	0,00																											
CNPAPrecoce3	0,21	0,00																										
CNPAITA92	0,43	0,55	0,00																									
BRS 197	0,33	0,45	0,42	0,00																								
BRSITAÚBA	0,57	0,68	0,45	0,55	0,00																							
BRSAROEIRA	0,43	0,52	0,34	0,39	0,34	0,00																						
BRS IPÊ	0,43	0,55	0,42	0,48	0,19	0,32	0,00																					
BRSUCUPIRA	0,43	0,55	0,35	0,45	0,18	0,23	0,13	0,00																				
BRS 96-148	0,40	0,50	0,40	0,38	0,30	0,28	0,18	0,17	0,00																			
BRS 96-227	0,43	0,52	0,34	0,31	0,41	0,28	0,33	0,33	0,20	0,00																		
FETAGRI	0,50	0,66	0,45	0,42	0,15	0,35	0,22	0,17	0,28	0,41	0,00																	
Alva	0,30	0,33	0,43	0,40	0,53	0,43	0,53	0,50	0,47	0,46	0,53	0,00																
Redenção	0,50	0,59	0,38	0,48	0,53	0,42	0,52	0,50	0,52	0,55	0,55	0,40	0,00															
EPAMIG 5	0,32	0,38	0,35	0,38	0,58	0,48	0,58	0,55	0,52	0,52	0,59	0,08	0,35	0,00														
Liça	0,36	0,35	0,42	0,45	0,55	0,45	0,58	0,50	0,48	0,48	0,52	0,30	0,25	0,25	0,00													
MG/UFGU	0,48	0,53	0,40	0,47	0,56	0,47	0,44	0,47	0,47	0,53	0,53	0,32	0,17	0,30	0,31	0,00												
IAN 338	0,41	0,53	0,21	0,40	0,56	0,40	0,40	0,44	0,43	0,47	0,50	0,38	0,23	0,30	0,40	0,26	0,00											
CD 401	0,38	0,47	0,24	0,40	0,56	0,37	0,44	0,47	0,47	0,50	0,53	0,25	0,27	0,17	0,37	0,32	0,13	0,00										
CD 402	0,29	0,41	0,35	0,48	0,55	0,42	0,38	0,48	0,41	0,41	0,62	0,25	0,35	0,20	0,38	0,32	0,27	0,20	0,00									
CD 403	0,38	0,43	0,37	0,37	0,47	0,30	0,33	0,40	0,40	0,39	0,50	0,34	0,36	0,40	0,50	0,32	0,28	0,28	0,26	0,00								
CD 404	0,50	0,58	0,34	0,46	0,42	0,30	0,34	0,38	0,40	0,31	0,40	0,52	0,42	0,58	0,58	0,48	0,32	0,40	0,38	0,22	0,00							
CD 405	0,61	0,59	0,35	0,42	0,55	0,42	0,55	0,55	0,55	0,45	0,55	0,40	0,33	0,41	0,52	0,33	0,30	0,33	0,45	0,29	0,24	0,00						
CD 98-87	0,36	0,45	0,23	0,32	0,50	0,34	0,39	0,32	0,28	0,17	0,47	0,37	0,40	0,35	0,34	0,40	0,34	0,37	0,35	0,37	0,36	0,42	0,00					
CD 98-101	0,38	0,47	0,34	0,40	0,45	0,29	0,31	0,31	0,33	0,45	0,42	0,32	0,38	0,33	0,48	0,35	0,26	0,16	0,30	0,25	0,38	0,40	0,40	0,00				
CD 98-225	0,50	0,59	0,35	0,35	0,43	0,27	0,25	0,32	0,31	0,30	0,47	0,53	0,47	0,55	0,63	0,43	0,33	0,37	0,38	0,19	0,31	0,38	0,35	0,23	0,00			
CD 98-383	0,59	0,61	0,36	0,47	0,40	0,19	0,43	0,34	0,39	0,33	0,46	0,38	0,38	0,36	0,43	0,38	0,41	0,34	0,39	0,36	0,40	0,32	0,31	0,36	0,34	0,00		
CD 98-440	0,50	0,52	0,31	0,54	0,31	0,38	0,27	0,25	0,29	0,38	0,38	0,32	0,40	0,34	0,46	0,33	0,33	0,33	0,34	0,27	0,33	0,34	0,35	0,29	0,37	0,21	0,00	

CAPÍTULO 3

DIVERSIDADE GENÉTICA DE CULTIVARES E LINHAGENS DE ALGODOEIRO ESTIMADA COM BASE NO COEFICIENTE DE PARENTESCO E MARCADORES MICROSSATÉLITES

RESUMO

A relação entre métodos que usam marcadores moleculares e coeficiente de parentesco como medidas para estimar a diversidade genética varia dependendo da espécie estudada e do material genético amostrado. Os objetivos desse trabalho foram: (1) verificar a associação entre as estimativas dos coeficientes de parentesco (CP) e de técnicas multivariadas calculadas com base em marcadores microssatélites (SSR) como medidas de diversidade genética de cultivares e linhagens de algodoeiro e, (2) avaliar a contribuição genética de cultivares ancestrais para algumas cultivares de algodoeiro em uso no Brasil. Foram utilizadas 30 cultivares e 40 linhagens de algodoeiro herbáceo. A diversidade genética entre cultivares e entre linhagens foi estimada por meio dos coeficientes de parentesco (Malecot) e, por meio de técnicas multivariadas utilizando-se marcadores microssatélites (SSR). Na avaliação das cultivares foram usados 31 pares de *primers*, enquanto na avaliação das linhagens foram usados 20 pares de *primers*. A dissimilaridade genética, calculada com base nos marcadores SSR para os 435 pares de cultivares, variou de 0,097 a 0,71 obtendo-se uma média de 0,42, enquanto a dissimilaridade genética calculada com base nos CPs variou de 0,25 a 1,00 com uma média de 0,89. Nos 780 pares de linhagens avaliados foi obtida uma variação de 0,00 a 0,83 com uma média de 0,44 para a dissimilaridade genética calculada com base nos marcadores SSR e uma variação de 0,27 a 0,99 com uma média de 0,73 para a dissimilaridade genética calculada com base nos coeficientes de parentesco. Observou-se uma maior divergência tanto entre as cultivares, quanto entre as linhagens, quando se avaliou a dissimilaridade por meio dos coeficientes de parentesco. A correlação entre as distâncias genéticas obtidas pelos CPs e SSRs tanto para as cultivares quanto para as linhagens foi positiva e significativa ($P < 0,001$). Entretanto, a magnitude das correlações não foi elevada, com valores iguais a 0,25 entre as cultivares e a 0,29 entre as linhagens. Os 18 ancestrais avaliados no trabalho contribuíram com 69% para a constituição genética das 30 cultivares. Desses 69%, o ancestral Auburn 56 contribuiu com 12,7%, Tamcot SP-37, com 8,9%, DP Smoothleaf, com 7,74% e DP 45, com 6,07%, sendo todas cultivares norte-americanas. Apesar das menores freqüências na genealogia, as cultivares Auburn 56 e Tamcot SP-37 contribuem bastante para o *pool* gênico das cultivares brasileiras. A estimativa da diversidade genética com base em

marcadores microssatélites fornece mais informações sobre as relações genéticas entre indivíduos. A constatação de que poucos ancestrais contribuem para a constituição genética das cultivares de algodoeiro usadas no Brasil, sugere maior preocupação em introgridir novos alelos no *pool* gênico dessas cultivares e, assim, aumentar sua base genética.

Palavras chaves: Distâncias genéticas, marcadores moleculares, genealogia, *Gossypium hirsutum* L.

INTRODUÇÃO

A vulnerabilidade genética se tornou uma preocupação constante no melhoramento de qualquer espécie vegetal, principalmente a partir da década de 70 quando ocorreu um desastre com a cultura do milho nos Estados Unidos devido à epidemia causada pelo fungo *Helminthosporium maydis* (NASS, 2001). A uniformidade genética em uma cultura pode acelerar o aparecimento de biótipos virulentos e causar grandes perdas na produção se existir uma susceptibilidade uniforme a pragas ou doenças (VAN ESBROECK *et al.*, 1998). Dessa forma, a manutenção da diversidade genética entre genótipos em uma cultura torna-se uma medida de proteção contra potenciais perdas devido ao ataque de doenças e pragas. Uma maior diversidade genética entre genótipos também facilita a criação de populações segregantes a partir das quais plantas contendo combinações de genes superiores podem ser selecionadas. Os melhoristas de planta têm avaliado os níveis de diversidade genética a partir da análise genealógica ou a partir da análise multivariada realizada com base em alguns atributos da planta (características morfológicas, agronômicas, isoenzimas e polimorfismo em nível de DNA) (VAN ESBROECK *et al.*, 1999).

A similaridade ou diversidade genética tem sido estimada por meio da análise genealógica para muitas culturas, tais como, trigo (AUTRIQUE *et al.*, 1996; KIM e WARD, 1997; REIS *et al.*, 1999; BERED *et al.*, 2002), aveia (MOSER e LEE, 1994), cevada (GRANER *et al.*, 1994), milho (MESSMER *et al.*, 1993), arroz (XU *et al.*, 1999), cana-de-açúcar (LIMA *et al.*, 2002), soja (COX *et al.*, 1985a; HIROMOTO e VELLO, 1986; ABDELNOOR *et al.*, 1995) e algodão (MAY *et al.*, 1995; BOWMAN *et al.*, 1996; CALHOUN *et al.*, 1997; VAN ESBROECK *et al.*, 1998; VAN ESBROECK e BOWMAN, 1998; VAN ESBROECK *et al.*, 1999). Quando comparada a outros métodos, a análise genealógica, usada para estimar a distância genética entre genótipos, traz como vantagem seu baixo custo. Por outro lado, esse método apresenta as seguintes desvantagens: 1) disponibilidade de informações detalhadas em relação à genealogia dos genótipos e, 2) o fato do coeficiente de parentesco, usado para estimar a similaridade genética, ser calculado com base em pressuposições não realísticas.

As principais características usadas nas análises multivariadas em algodão incluem, características morfológicas (TATINENI *et al.*, 1996),

características agronômicas (BROWN, 1991), isoenzimas (WENDEL *et al.*, 1992) e polimorfismo em nível do DNA (BRUBAKER e WENDEL, 1994; TATINENI *et al.*, 1996). O polimorfismo em nível do DNA é considerado o marcador mais adequado para estimar distâncias genéticas por ser encontrado em maior número e por não sofrer influências ambientais (VAN ESBROECK *et al.*, 1999). O baixo polimorfismo em nível do DNA verificado dentro da cultura do algodão indica um nível de diversidade genética menor do que aquele verificado por meio da análise genealógica (WENDEL *et al.*, 1992; BRUBAKER e WENDEL, 1994). A relação entre métodos que usam marcadores moleculares e coeficiente de parentesco como medidas para estimar a diversidade genética tem variado dependendo da espécie estudada e do material genético amostrado (KIM e WARD, 1997).

Correlação (r) baixa foi detectada entre a similaridade genética (SG) calculada com base em marcadores RFLP (“Restriction Fragment Length Polymorphism”) e coeficiente de parentesco (CP) entre cultivares de inverno ($r=0,21$) e entre cultivares de primavera ($r=0,42$) no germoplasma de cevada européia (GRANER *et al.*, 1994). BARBOSA-NETO *et al.* (1996) encontraram correlação negativa ($r=-0,33$) entre a SG calculada com base em RFLP e CP entre linhagens de trigo. Por outro lado, KIM e WARD (1997) encontraram correlação elevada ($r=0,73$) entre a SG calculada com base em RFLP e CP quando foram considerados todos os pares de linhagens de trigo de inverno, isto é, trigo vermelho (TV) e trigo branco (TB). Entretanto, quando as linhagens de TV e TB foram consideradas separadamente, a correlação diminuiu, passando esses valores para 0,23 entre as linhagens de TV e 0,28 entre as linhagens de TB. A associação entre marcadores microssatélites (SSR) e análise genealógica na cultura do arroz foi realizada por XU *et al.* (1999). A correlação entre esses dois métodos encontrada por esses autores foi de 0,092. Na cultura da cana-de-açúcar encontrou-se correlação de 0,42 entre SG calculada com base em marcadores AFLP (“Amplified Fragment Length Polymorphism”) e coeficiente de parentesco (LIMA *et al.*, 2002).

Apesar da existência de baixas correlações entre medidas de distâncias genéticas calculadas com base em marcadores moleculares e coeficiente de parentesco, encontram-se na literatura trabalhos que mostram elevadas correlações entre esses dois métodos. Por exemplo, MESSMER *et al.* (1993) encontraram boa associação entre a SG calculada com base em RFLP e CP

entre linhagens de milho. Os valores encontrados por esses autores foram iguais a 0,71 e 0,86. MOSER e LEE (1994) detectaram correlação de 0,63 entre a SG calculada com base em RFLP e CP entre cultivares de aveia. Marcadores RFLP e SSR foram utilizados para estimar a divergência genética entre linhagens de milho. Os resultados obtidos para os marcadores foram associados com aqueles obtidos através da análise genealógica encontrando-se valores de correlação iguais a 0,80 e 0,81 para RFLP e SSR, respectivamente (SMITH *et al.*, 1997).

Na cultura do algodão, VAN ESBROECK *et al.* (1999) não encontraram relação entre parentesco e medidas de similaridade baseadas em características morfológicas e agronômicas. TATINENI *et al.* (1996) detectaram correlação igual a 0,63 entre similaridades genéticas calculadas com base em marcadores RAPD ("Random Amplified Polymorphic DNA") e caracteres morfológicos entre linhagens de algodoeiro. Informações sobre a correlação entre distâncias genéticas calculadas com base em marcadores moleculares e coeficiente de parentesco na cultura do algodoeiro são escassas.

Os objetivos desse trabalho foram: (1) verificar a associação entre as estimativas dos coeficientes de parentesco e de técnicas multivariadas calculadas com base em marcadores microssatélites usadas como medidas de diversidade genética de cultivares e linhagens de algodoeiro e, (2) avaliar a contribuição genética de cultivares ancestrais para algumas cultivares de algodoeiro em uso no Brasil.

MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL GENÉTICO

Foram utilizadas 30 cultivares de algodoeiro herbáceo (*Gossypium hirsutum* L.) provenientes de empresas públicas e privadas de melhoramento genético de plantas do Cone Sul. Essas cultivares são indicadas para plantio em diversas regiões do Brasil. Algumas delas, de grande importância comercial, enquanto que outras, são usadas nos programas de melhoramento das empresas de pesquisa brasileiras. Também foram utilizadas 40 linhagens de algodoeiro provenientes do programa de melhoramento da COODETEC (Cooperativa Central de Pesquisa Agrícola). As linhagens da COODETEC foram codificadas e correspondem aos seguintes números: CD1, CD2, CD3, CD9, CD10, CD11, CD12, CD13, CD14, CD15, CD16, CD17, CD18, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24, CD25, CD26, CD45, CD46, CD47, CD86, CD87, CD88, CD91, CD98, CD99, CD100, CD101, CD102, CD103, CD104, CD105, CD106, CD107, CD120, CD127, CD128. Uma vez que estas são linhagens do programa de melhoramento da COODETEC, a distância genética obtida pelo coeficiente de parentesco foi fornecida pela COODETEC.

EXTRAÇÃO DO DNA E REAÇÃO DOS SSR

O DNA das cultivares e linhagens foi extraído a partir de um *bulk* de oito a dez sementes. A extração foi feita com base no protocolo descrito por McDONALD *et al.* (1994), com algumas modificações. Em tubo eppendorff de 1,5 mL contendo cerca de 50-60 mg de sementes foram adicionados 700 μ L de tampão de extração contendo Tris-HCl 0,2 M, NaCl 0,28 M, EDTA 25 mM e SDS 10%. As amostras foram extraídas em politron e, em seguida, centrifugadas por 10 min a 14.000 RPM em microcentrífuga eppendorf 1405. Os sobrenadantes foram transferidos para novos tubos e centrifugados por mais 5 min a 14.000 RPM. Novamente, os sobrenadantes foram transferidos para novos tubos, sendo, em seguida, acrescentados 10 μ L de proteinase K 10 mg/mL e 10 μ L de CaCl₂ 1 mM, e colocado em banho-maria a 55 °C por 1,5 horas. Foram, então, adicionados às amostras 900 μ L de isopropanol e deixadas em repouso por 2 min. Após este tempo as amostras foram centrifugadas por 10 min a 14.000 RPM. Os sobrenadantes foram descartados e os precipitados foram lavados duas vezes, uma vez com álcool 70% e, a

segunda vez com álcool 90%. Após as lavagens os precipitados foram secos por 15 min à temperatura ambiente sendo, a seguir, ressuspensos em solução de Tris-EDTA (TE) 10 mM e 1 mM contendo RNase 60 µg/mL e colocados em banho-maria por 1 hora. As amostras foram precipitadas novamente pela adição de 900 µL de isopropanol e deixadas em precipitação por 2 min. Logo após, as amostras foram novamente centrifugadas por 10 min a 14,000 RPM e os sobrenadantes descartados. Os precipitados foram ressuspensos ao final em TE_{0,1} (Tris-HCl 10 mM, EDTA 0,1 mM, pH 7,5). A qualidade do DNA foi avaliada em gel de agarose 0,8% bem como por espectrofotometria, considerando a razão A_{260}/A_{280} . A concentração foi estimada a partir da absorbância a 260 nm, conforme SAMBROOK *et al.* (1989), estocando-se as amostras a -20 °C e as amostras de trabalho (10 ng/µL), a 5 °C (em geladeira).

Foram utilizados *primers* microssatélites de algodão disponibilizados pela *Research Genetics*. Na avaliação das cultivares foram usados 31 pares de *primers*, enquanto na avaliação das linhagens foram usados 20 pares de *primers*. As reações de microssatélites foram realizadas em microtubos de 0,2 mL, sendo o volume total da reação de 15 µL, contendo tampão da PCR (Tris-HCl 10 mM e 50 mM, pH 8,0), 0,2 mM de cada desoxirribonucleotídeo, 2,0 - 3,0 mM de MgCl₂, 0,2 µM de cada *primer*, uma unidade da enzima *Taq* DNA polimerase e 30 ng de DNA molde. As amplificações foram feitas em termociclador *Perkin Elmer* (GeneAmp PCR System 9600) usando um programa *touch down*. Os fragmentos amplificados foram separados em gel desnaturante de poliacrilamida 7% (p/v) com acrilamida/bis-acrilamida na proporção de 19:1, 32% de formamida e 5,6 M de uréia, conforme protocolo proposto por LITT *et al.* (1993). Após o término da eletroforese os géis foram mergulhados em solução de brometo de etídio (1 µg/mL) por 30 min. Posteriormente à coloração, os géis foram fotografados sob luz ultravioleta (*Eagle Eye II*).

Tabela 1– Cultivares de algodoeiro, origem, genealogia e região indicada para plantio.

Nº	ORIGEM	Cultivares	Genealogia	REGIÃO (País)
1	IAC	IAC 17	Seleção IAC RM ₃	São Paulo (Brasil)
2	IAC	IAC 19	Yucatanense/N1-HOA//IAC RM ₃	São Paulo (Brasil)
3	IAC	IAC 20	Seleção IAC 17	São Paulo (Brasil)
4	IAC	IAC 21	Seleção IAC 19	São Paulo (Brasil)
5	IAC	IAC 22	IAC 20/GH 11-9-75	SP, Centro-Oeste (Brasil)
6	EPAMIG	Redenção	Seleção IAC 17	Minas Gerais (Brasil)
7	EPAMIG	Epamig 5	Seleção C -25 - 1 - 80	Minas Gerais / Centro-Oeste (Brasil)
8	EPAMIG	Alva	Haplóide Duplo (C-25-1-80)	Minas Gerais (Brasil)
9	EMBRAPA	CNPA 7H	TAMCOT SP 37//IAC 17	NE/Centro-Sul (Brasil)
10	EMBRAPA	CNPAPrec.1	Seleção GH-11-9-75	Norte/NE/Cerrado (Brasil)
11	EMBRAPA	CNPAPrec.2	C-100-7-81/PNH3	Norte/NE/Cerrado (Brasil)
12	EMBRAPA	CNPA ITA90	Seleção Deltapine AC-90	Cerrado (Brasil)
13	FundaçãoMT	BRS 96	Seleção EPAMIG 3	Cerrado (Brasil)
14	EMBRAPA	BRS Ipê	Seleção CNPA ITA 90	Cerrado (Brasil)
15	EMBRAPA	BRS Itaúba	Seleção CS 50	Cerrado (Brasil)
16	EMBRAPA	BRS 96-148	Seleção CS 50	Cerrado (Brasil)
17	EMBRAPA	BRS 96-227	Seleção CS 50	Cerrado (Brasil)
18	IAPAR	IPR 94	IAPAR 71/Deltapine Acala 90	Paraná (Brasil)
19	IAPAR	IPR 95	CNPA ITA 90/IAPAR 71	Paraná (Brasil)
20	IAPAR	IPR 96	CNPA ITA 90/IAPAR 71	Paraná (Brasil)
21	COODETEC	CD 401	SP86//ISA205	MS, PR e SP (Brasil)
22	COODETEC	CD 402	DP Ac 90//IAC 20/S295*IAC 20	BA, GO, MT, MS, MG, SP (Brasil)
23	COODETEC	CD 403	DP Ac 90//IAC 20/S295*IAC 20	BA, GO, MT, MS, MG, SP (Brasil)
24	COODETEC	CD 404	CHACO 520/DP Ac90	MS, MT e PR (Brasil),
25	COODETEC	CD 98-440	DP Ac 90//IAC 20/S295*IAC 20	-
26	COODETEC	CD98-383	DP Ac90//IAC 20/S295	BA, GO, MG, SP, MT, PR, MS e Região Norte (Brasil),
27	Paraguai	IAN 338	CHACO 510//ISA 205//Reba P279	Paraguai
28	Argentina	Cacique	MATACO/GUAZUNCHO	Argentina
29	Argentina	Guazuncho2	Guazuncho/SP 8535	Argentina/Paraguai
30	Argentina	Oro Blanco	SP2473/SIOKRA	Argentina

/, // - indica a ordem em que os cruzamentos foram realizados; (*) indica retrocruzamento.

ESTIMATIVA DO COEFICIENTE DE PARENTESCO (CP)

Os coeficientes de parentesco foram estimados entre as 30 cultivares e entre as 40 linhagens combinando-as duas a duas, totalizando 435 pares de cultivares e 780 pares de linhagens. Foram utilizadas cultivares e linhagens cujas informações sobre seus pais e/ou avós eram conhecidas. Os valores de CP foram calculados com base nas seguintes pressuposições: (A1) as cultivares ancestrais não foram consideradas relacionadas (CP=0); (A2) uma cultivar derivada de um cruzamento recebe metade de seus genes de cada pai (CP=0,5); (A3) todos os pais foram considerados homocigotos e homogêneos; (A4) pais cuja genealogia não se conhecia, não foram considerados relacionados (CP=0); (A5) considerou-se CP=1 entre uma cultivar e ela própria; (A6) considerou-se CP=0,75 entre uma cultivar e uma outra obtida a partir da seleção dessa (resseleção). Esse valor é um ajuste realizado entre o valor do

CP de uma fecundação cruzada com um indivíduo desconhecido (CP=0,5) e o valor do CP de uma autofecundação (CP=1); (A7) considerou-se CP=0,56 entre duas seleções obtidas de uma mesma cultivar (BOWMAN *et al.*, 1997). Cada CP calculado dessa maneira foi usado para estimar a contribuição de uma cultivar ancestral para a constituição genética de todas as 30 cultivares. Para cada cultivar ancestral, a média da contribuição genética relativa para todas as cultivares resultou na contribuição genética relativa (CGR) de cada ancestral para o *pool* gênico das cultivares de algodoeiro avaliadas. As cultivares ancestrais foram classificadas em ordem decrescente de magnitude quanto à CGR de cada uma. Calculou-se também a frequência das cultivares ancestrais na genealogia (FAG) das 30 cultivares.

ANÁLISE DOS DADOS MOLECULARES

A diversidade genética de cada loco microsatélite foi obtida através da frequência dos alelos utilizando a seguinte fórmula:

$$\text{Informação do conteúdo de polimorfismo (PIC)} = 1 - j = 1 - \sum_{j=1}^n p_{ij}^2$$

Onde p_{ij} é a frequência do j -ésimo alelo para o *primer* i (ANDERSON *et al.*, 1993). O valor da diversidade genética do loco é muito similar a heterozigosidade que é comumente utilizada para descrever a informatividade de um marcador molecular em espécies alógamas.

As distâncias genéticas entre as cultivares e entre as linhagens obtidas utilizando-se marcadores SSR foram avaliadas por meio de uma matriz de dissimilaridade construída utilizando-se o complemento do índice de similaridade (IS) para variáveis codominantes/multialélicas, por meio do programa Genes versão Windows (CRUZ, 2001). O referido índice estimou a similaridade entre os genótipos a partir dos escores 0, 1 e 2, para alelo ausente, em heterozigose e homozigose, respectivamente. Esse índice foi obtido dividindo-se o número total de locos de microsatélites contendo alelos comuns pelo número total dos locos avaliados. Os valores do coeficiente de parentesco obtidos para as cultivares e linhagens foram subtraídos de um para a obtenção da matriz de dissimilaridade.

Os métodos usados para realizar a análise de agrupamento feita com base na matriz de dissimilaridade, obtida por marcadores SSR e coeficiente de parentesco, foram os do tipo hierárquico aglomerativo, UPGMA e, o método de

otimização de Tocher. Os dendrogramas construídos com base na matriz de dissimilaridade foram feitos por meio do programa STATISTICA (StatSoft Inc., 1999).

A associação entre as distâncias genéticas, calculadas com base nos dados moleculares e do coeficiente de parentesco, foi avaliada usando o coeficiente de correlação de Pearson (r), O grau de significância da correlação foi avaliado pelo teste t de Student.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os 31 pares de *primers* usados na avaliação das 30 cultivares amplificaram 65 alelos com uma média de 2,10 alelos por loco SSR. O valor da informação do conteúdo de polimorfismo (PIC) calculado para estimar a informatividade de cada *primer* variou de 0,10 a 0,62, com uma média de 0,39 (Tabela 2). Na avaliação das 40 linhagens, os 20 pares de *primers* amplificaram 41 alelos com uma média de 2,05 alelos por loco SSR, enquanto o valor do PIC variou de 0,12 a 0,56, com uma média de 0,43 (Tabela 3). A grande maioria dos *primers* usados no trabalho encontra-se bem distribuídas no genoma do algodão, como pode ser observado nas Tabelas 2 e 3.

Tabela 2 – *Primers* SSR usados na análise de diversidade genética das 30 cultivares de algodoeiro.

LOCOS	Localização no cromossomo	Faixa de tamanho dos alelos (pb)	Número de alelos	Frequência dos alelos	PIC
BNL139	-	150-170	3	0,08, 0,73, 0,18	0,42
BNL 946	20Lo*	330-350	2	0,83, 0,17	0,29
BNL 1053	3	170-190	2	0,68, 0,32	0,43
BNL 1064	6sh**	130-140	2	0,05, 0,95	0,10
BNL1231	D02*	170-200	2	0,78, 0,22	0,34
BNL1423	9*	130-140	2	0,58, 0,42	0,49
BNL 1673	12Lo*	300-360	2	0,07, 0,93	0,12
BNL 1694(2)	7*	230-260	2	0,48, 0,52	0,50
BNL 1721	18Lo**	170-180	2	0,22, 0,78	0,34
BNL 2448	5*	130-140	2	0,82, 0,18	0,30
BNL 2449	A01*	140-170	3	0,70, 0,02, 0,28	0,43
BNL 2495	26Lo*	190-200	2	0,63, 0,37	0,46
BNL 2496A	-	110-120	2	0,75, 0,25	0,38
BNL 2590	9Lo**	180-190	2	0,79, 0,21	0,33
BNL 2646	15*	120-150	2	0,21, 0,79	0,33
BNL 2921	-	150-160	2	0,52, 0,48	0,50
BNL 2960	10Lo**	140-150	2	0,53, 0,47	0,50
BNL 2986	16Lo*	150-160	2	0,54, 0,46	0,50
BNL 3089	-	140-150	2	0,90, 0,10	0,18
BNL 3171	-	210-230	2	0,27, 0,73	0,39
BNL 3255	5sh**	220-240	2	0,47, 0,53	0,44
BNL 3257	A02*	200-220	3	0,47, 0,37, 0,17	0,62
BNL 3408(2)	17Lo**	140-150	2	0,62, 0,38	0,47
BNL 3482	26Lo**	120-130	2	0,74, 0,26	0,38
BNL 3590	2*	170-190	2	0,64, 0,36	0,55
BNL 3594	6bot*	170-190	2	0,85, 0,15	0,26
BNL 3800	-	180-190	2	0,90, 0,10	0,18
BNL 3838	20*	120-130	2	0,69, 0,31	0,43
BNL 3902	15*	170-200	2	0,58, 0,42	0,49
BNL 4030	22*	110-120	2	0,27, 0,73	0,39
CNL 101	-	120-130	2	0,42, 0,58	0,49
TOTAL			65		
MÉDIA			2,10		0,39

Obs.: *sh* –short arm ; *Lo* – long arm, *, ** Informações obtidas em Lacape *et al.* (2003) e Liu *et al.* (2000), respectivamente, Cromossomos de 1 a 13 pertencem ao subgenoma A e de 14 a 26 ao subgenoma D.

Tabela 3 - *Primers* SSR usados na análise de diversidade genética das 40 linhagens de algodoeiro.

LOCOS	Localização no cromossomo	Faixa de tamanho dos alelos (pb)	Número de alelos	Frequência dos alelos	PIC
BNL 3590	2*	170-190	3	0,13, 0,58, 0,29	0,56
BNL 3257	A02*	200-220	2	0,62, 0,38	0,47
BNL 3408	17Lo**	140-150	2	0,48, 0,53	0,50
BNL 2495	26Lo*	190-200	2	0,54, 0,46	0,50
BNL 1694	7*	230-260	2	0,51, 0,49	0,50
BNL 1053	3	170-190	2	0,79, 0,21	0,33
BNL 3482	26Lo**	120-130	2	0,60, 0,40	0,48
BNL 3902	15*	170-200	2	0,53, 0,48	0,50
BNL 2986	16Lo*	150-160	2	0,65, 0,35	0,46
BNL 4030	22*	110-120	2	0,39, 0,61	0,47
CNL 101	-	120-130	2	0,54, 0,46	0,50
BNL 1231	D02*	170-200	2	0,50, 0,50	0,50
BNL 1423	9*	130-140	2	0,81, 0,19	0,30
BNL 139	-	150-170	2	0,69, 0,31	0,43
BNL 2496A	-	110-120	2	0,59, 0,41	0,48
BNL 2960	10Lo**	140-150	2	0,66, 0,34	0,45
BNL 946	20Lo*	330-350	2	0,83, 0,18	0,29
BNL 3255	5sh**	220-240	2	0,06, 0,94	0,12
BNL 2921	-	150-160	2	0,71, 0,29	0,41
BNL 2449	A01*	140-170	2	0,70, 0,30	0,42
TOTAL			41		
MÉDIA			2,05		0,43

Obs.: *sh* –short arm ; *Lo* – long arm, *, ** Informações obtidas em Lacape *et al.* (2003) e Liu *et al.* (2000), respectivamente, Cromossomos de 1 a 13 pertencem ao subgenoma A e de 14 a 26 ao subgenoma D.

Os resultados da matriz de dissimilaridade obtidos para as 30 cultivares utilizando-se os marcadores SSR e os coeficientes de parentesco estão apresentados na Tabela 4. A dissimilaridade genética calculada com base nos marcadores SSR para os 435 pares de cultivares variou de 0,097 a 0,71 obtendo-se uma média de $0,42 \pm 0,01$, enquanto a dissimilaridade genética calculada com base nos coeficientes de parentesco variou de 0,25 a 1,00 com uma média de $0,89 \pm 0,01$, O menor valor de dissimilaridade, quando se utilizou os SSR, foi obtido para as cultivares CNPA ITA 90 e BRS Ipê, enquanto o maior valor foi para as cultivares IAC 20 e BRS Itaúba. Quando se utilizaram os coeficientes de parentesco (CPs), o menor valor obtido foi para os seguintes pares de cultivares: IAC 17 e IAC 20, IAC17 e Redenção, IAC 19 e IAC 21 e, CNPA ITA 90 e BRS Ipê, enquanto o maior valor foi observado para 203 pares de cultivares. Esses resultados concordam com a genealogia observada na Tabela 1. Tomando-se como exemplo as cultivares CNPA ITA 90 e BRS Ipê, verifica-se que a elevada similaridade observada entre essas cultivares, encontrada tanto por SSR (0,90) quanto por CPs (0,75), pode ser justificada pelo fato da segunda cultivar ter sido obtida a partir de seleção da primeira.

Tabela 4- Matrizes de dissimilaridade obtidas para as 30 cultivares estimadas com base nos coeficientes de parentesco (diagonal superior) e com base no complemento do índice de similaridade calculado através da análise de microssatélites (diagonal inferior).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	
1		0,625	0,250	0,719	0,789	0,250	1,000	1,000	0,500	1,000	1,000	1,000	0,881	1,000	1,000	1,000	1,000	0,842	0,842	0,842	1,000	0,842	0,842	1,000	0,842	0,895	1,000	1,000	1,000	1,000	
2	0,274		0,719	0,250	0,859	0,719	1,000	1,000	0,813	1,000	1,000	1,000	0,921	1,000	1,000	1,000	1,000	0,895	0,895	0,895	1,000	0,895	0,895	1,000	0,895	0,930	1,000	1,000	1,000	1,000	
3	0,371	0,387		0,789	0,500	0,437	1,000	1,000	0,625	1,000	1,000	1,000	0,911	1,000	1,000	1,000	1,000	0,625	0,625	0,625	1,000	0,625	0,625	1,000	0,625	0,750	1,000	1,000	1,000	1,000	
4	0,339	0,161	0,419		0,895	0,789	1,000	1,000	0,859	1,000	1,000	1,000	0,941	1,000	1,000	1,000	1,000	0,921	0,921	0,921	1,000	0,921	0,921	1,000	0,921	0,947	1,000	1,000	1,000	1,000	
5	0,371	0,290	0,290	0,226		0,719	1,000	1,000	0,813	1,000	1,000	1,000	0,956	1,000	1,000	1,000	1,000	0,895	0,895	0,895	1,000	0,895	0,895	1,000	0,895	0,930	1,000	1,000	1,000	1,000	
6	0,419	0,258	0,339	0,290	0,210		1,000	1,000	0,625	1,000	1,000	1,000	0,911	1,000	1,000	1,000	1,000	0,789	0,789	0,789	1,000	0,789	0,789	1,000	0,789	0,859	1,000	1,000	1,000	1,000	
7	0,323	0,274	0,371	0,339	0,306	0,371		0,437	0,859	0,842	0,895	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	
8	0,339	0,323	0,452	0,355	0,290	0,419	0,113		0,859	0,842	0,895	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	
9	0,355	0,339	0,403	0,339	0,306	0,323	0,323	0,339		0,719	0,813	1,000	0,941	1,000	0,953	0,953	0,953	0,859	0,859	0,859	1,000	0,859	0,859	1,000	0,859	0,906	1,000	1,000	1,000	1,000	
10	0,274	0,226	0,419	0,323	0,258	0,306	0,242	0,290	0,210		0,625	1,000	1,000	1,000	0,947	0,947	0,947	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	
11	0,387	0,403	0,532	0,532	0,468	0,548	0,387	0,371	0,419	0,339		1,000	1,000	1,000	0,953	0,953	0,953	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	
12	0,532	0,548	0,613	0,581	0,548	0,532	0,694	0,645	0,565	0,581	0,565		1,000	0,250	0,692	0,692	0,692	0,625	0,500	0,500	1,000	0,625	0,625	0,625	0,625	0,625	0,625	0,977	1,000	0,988	0,994
13	0,565	0,484	0,355	0,581	0,419	0,516	0,500	0,484	0,532	0,581	0,694	0,419		1,000	1,000	1,000	1,000	0,967	0,967	0,967	1,000	0,967	0,967	1,000	0,967	0,978	1,000	1,000	1,000	1,000	
14	0,500	0,548	0,516	0,581	0,548	0,532	0,597	0,548	0,468	0,581	0,468	0,097	0,435		0,558	0,558	0,558	0,719	0,625	0,625	1,000	0,719	0,719	0,719	0,719	0,719	1,000	1,000	1,000	1,000	
15	0,532	0,452	0,710	0,419	0,548	0,548	0,597	0,548	0,629	0,613	0,597	0,161	0,452	0,194		0,437	0,437	0,813	0,859	0,859	1,000	0,813	0,813	0,813	0,813	0,813	0,813	0,983	1,000	0,991	0,995
16	0,452	0,468	0,565	0,500	0,468	0,548	0,548	0,500	0,452	0,500	0,435	0,258	0,419	0,210	0,323		0,437	0,813	0,859	0,859	1,000	0,813	0,813	0,813	0,813	0,813	0,813	0,983	1,000	0,991	0,995
17	0,435	0,484	0,484	0,548	0,516	0,597	0,565	0,516	0,500	0,548	0,500	0,419	0,355	0,371	0,452	0,258		0,813	0,859	0,859	1,000	0,813	0,813	0,813	0,813	0,813	0,813	0,983	1,000	0,991	0,995
18	0,371	0,452	0,323	0,516	0,452	0,403	0,339	0,387	0,371	0,452	0,500	0,419	0,435	0,323	0,484	0,468	0,532		0,563	0,563	1,000	0,609	0,609	0,750	0,609	0,656	0,969	1,000	0,984	0,992	
19	0,484	0,371	0,339	0,274	0,306	0,355	0,516	0,532	0,484	0,468	0,645	0,500	0,468	0,500	0,435	0,581	0,565	0,371		0,500	0,988	0,672	0,672	0,813	0,672	0,719	0,977	1,000	0,988	0,994	
20	0,419	0,403	0,500	0,468	0,500	0,484	0,516	0,500	0,516	0,565	0,613	0,468	0,435	0,500	0,435	0,500	0,435	0,387	0,323		0,988	0,672	0,672	0,813	0,672	0,719	0,977	1,000	0,988	0,994	
21	0,323	0,339	0,306	0,403	0,339	0,290	0,194	0,274	0,355	0,306	0,419	0,532	0,532	0,435	0,565	0,484	0,532	0,210	0,387	0,452		0,992	0,992	0,844	0,992	0,984	0,688	0,906	0,844	0,922	
22	0,355	0,306	0,339	0,403	0,371	0,371	0,226	0,274	0,323	0,371	0,355	0,500	0,565	0,403	0,565	0,452	0,468	0,306	0,484	0,484	0,226		0,500	0,750	0,500	0,656	0,969	1,000	0,984	0,992	
23	0,387	0,452	0,387	0,484	0,355	0,403	0,435	0,387	0,468	0,452	0,435	0,452	0,516	0,355	0,484	0,435	0,452	0,306	0,306	0,403	0,306	0,306		0,750	0,500	0,656	0,969	1,000	0,984	0,992	
24	0,532	0,532	0,500	0,500	0,468	0,548	0,677	0,629	0,548	0,629	0,613	0,500	0,565	0,468	0,532	0,532	0,468	0,516	0,355	0,452	0,516	0,516	0,371		0,750	0,750	0,844	0,934	0,840	0,750	
25	0,581	0,452	0,484	0,484	0,484	0,516	0,468	0,452	0,565	0,548	0,597	0,452	0,452	0,387	0,419	0,403	0,516	0,403	0,468	0,500	0,435	0,468	0,387	0,500		0,656	0,969	1,000	0,984	0,992	
26	0,500	0,371	0,468	0,435	0,468	0,435	0,419	0,435	0,516	0,532	0,645	0,468	0,355	0,468	0,435	0,452	0,419	0,419	0,419	0,258	0,387	0,452	0,403	0,516	0,339		1,000	1,000	1,000	1,000	
27	0,355	0,339	0,274	0,371	0,306	0,258	0,323	0,403	0,323	0,339	0,452	0,500	0,500	0,403	0,565	0,452	0,500	0,274	0,323	0,500	0,129	0,290	0,306	0,452	0,435	0,452		0,875	0,750	0,875	
28	0,403	0,452	0,387	0,452	0,387	0,371	0,306	0,355	0,435	0,419	0,468	0,484	0,548	0,387	0,452	0,435	0,516	0,258	0,339	0,371	0,210	0,339	0,274	0,548	0,339	0,323	0,274		0,750	0,875	
29	0,371	0,323	0,355	0,387	0,355	0,371	0,339	0,355	0,306	0,355	0,435	0,387	0,452	0,290	0,419	0,339	0,323	0,290	0,339	0,306	0,242	0,274	0,290	0,371	0,323	0,274	0,242	0,226		0,750	
30	0,323	0,371	0,403	0,500	0,468	0,419	0,323	0,306	0,355	0,403	0,484	0,468	0,484	0,371	0,500	0,387	0,387	0,274	0,484	0,290	0,258	0,323	0,387	0,532	0,419	0,306	0,323	0,274	0,210		

Nos 780 pares de linhagens avaliados foi obtida uma variação de 0,00 a 0,83, com uma média de $0,44 \pm 0,01$, para a dissimilaridade genética calculada com base nos marcadores SSR e uma variação de 0,27 a 0,99, com uma média de $0,73 \pm 0,01$, para a dissimilaridade genética calculada com base nos coeficientes de parentesco.

Na Figura 1 observa-se que a maioria dos pares de cultivares e de linhagens tem valores de dissimilaridade em torno de 0,4 a 0,6 quando se usam marcadores SSRs, enquanto valores em torno de 0,8 a 1,0 são encontrados quando se usa os coeficientes de parentesco. Isto significa que maior divergência é observada tanto entre as cultivares, quanto entre as linhagens, quando se avalia a dissimilaridade por meio dos coeficientes de parentesco.

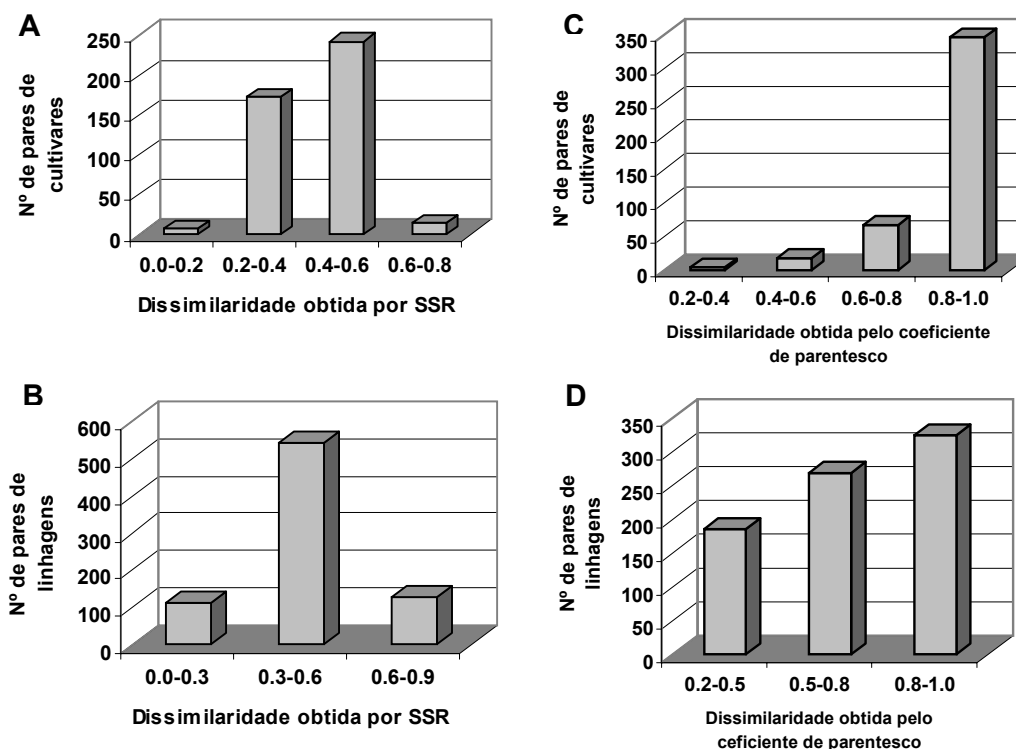


Figura 1- Distribuição das distâncias genéticas para 435 pares de cultivares e para 780 pares de linhagens avaliadas a partir de marcadores SSR (A e B) e coeficiente de parentesco (C e D).

Resultados apresentados em outros trabalhos também têm revelado uma baixa diversidade genética entre cultivares de algodoeiro herbáceo quando a diversidade genética é avaliada com marcadores moleculares. MULTANI e

LYON (1995) detectaram elevados valores de similaridade genética (92,1% - 98,9%) entre nove cultivares de algodoeiro Australianos usando marcadores RAPD, IQBAL *et al.* (1997) também encontraram elevada similaridade genética (0,82 a 0,93), entre 17 cultivares de *G. hirsutum* com base em marcadores RAPD. Utilizando marcadores SSR, ULLOA *et al.* (1999) encontraram valores de distâncias genéticas iguais a 0,18 entre cultivares Acala e Delta e a 0,16 entre cultivares da série Pima PS. Usando também marcadores SSR, GUTIÉRREZ *et al.* (2002) detectaram uma base genética estreita entre cultivares Australianos e Americanos.

Por outro lado, quando se usa o coeficiente de parentesco para estimar a similaridade genética entre cultivares de algodoeiro a diversidade genética é maior do que aquela encontrada por marcadores moleculares. BOWMAN *et al.* (1996) detectaram um valor médio de 0,07 para o coeficiente de parentesco estimado entre 260 cultivares de algodoeiro. MAY *et al.* (1995) mostraram que embora o CP médio entre 126 cultivares de algodoeiro fosse baixo (0,07), o CP calculado entre cultivares regionalmente adaptadas variou de 0,17 a 0,34. O baixo nível de similaridade entre as cultivares avaliadas nesses trabalhos sugerem que a análise genealógica pode estar superestimando o nível de diversidade genética entre as cultivares de algodoeiro. VAN ESBROECK *et al.* (1998), avaliando 24 cultivares ancestrais de algodoeiro, consideraram que essas cultivares não eram relacionadas e encontraram um valor médio de CP igual a 0,16, Avaliando as conseqüências do erro em assumir que as cultivares ancestrais não são relacionadas, VAN ESBROECK *et al.* (1999) recalcularam o CP para essas cultivares, mas assumiram a existência de uma relação entre os ancestrais, considerando-se o CP entre elas igual a 0,38. Esses autores obtiveram um valor médio para o CP de 0,46, ou seja, o CP passou de 0,16 para 0,46, mostrando redução no nível de diversidade genética entre essas cultivares.

Segundo BOWMAN *et al.* (1996), mais de 30% das cultivares de algodoeiro, lançadas entre 1970 e 1990 nos Estados Unidos, foram obtidas por seleção dentro de outras cultivares (resseleção). Embora o algodoeiro seja considerado uma planta autógama, taxas de alogamia acima de 50% já foram mencionadas quando da presença de insetos polinizadores (*Bombus* spp. e *Aphis mellifera* L.). Na análise da genealogia, o CP calculado para uma resseleção é considerado igual a 0,75, ou seja, considera-se que uma cultivar

originada de outra, tem metade de chance de ter sido originada de uma autofecundação de plantas não homocigotas, em populações desuniformes, e metade de chance de ter sido originada de uma fecundação cruzada com um indivíduo não relacionado (MURPHY *et al.*, 1986; BOWMAN *et al.*, 1997). As freqüentes resseleções detectadas no algodoeiro têm efeito de incorporar continuamente germoplasmas não relacionados na estimativa do CP e, assim, provavelmente superestimar a diversidade entre as cultivares. Estudos recentes com isoenzimas e marcadores de DNA mostraram que os ancestrais dos cultivares de algodoeiros “upland” modernos provavelmente se originaram de uma pequena área na Guatemala (WENDEL *et al.*, 1992; BRUBAKER e WENDEL, 1994), sugerindo, portanto, que os ancestrais dos algodoeiros introduzidos eram proximamente relacionados.

Grande parte das cultivares lançadas no Brasil são provenientes de introduções de cultivares ou linhagens dos Estados Unidos ou de resseleção feitas a partir de outras cultivares já existentes (PENNA, 1999). Dentre as 30 cultivares avaliadas no presente trabalho, 14 foram obtidas de resseleção. Uma vez que se considera os ancestrais das cultivares não relacionadas e que, há uma probabilidade de que 25% dos genes provenham de indivíduos desconhecidos, não os considerando no cálculo do CP, pode-se estar superestimando a diversidade genética dessas cultivares. Apesar do progresso genético obtido por meio dessas cultivares, há que se lembrar que a utilização de parentais muito próximos pode levar a estreitamento da base genética e a redução da diversidade genética. Tal fato foi constatado por CARVALHO (1999), que comenta que a pouca diversidade genética das cultivares plantadas no Brasil caracteriza-se pelo uso contínuo, nos cruzamentos, de materiais descendentes de Auburn 56 e Tamcot SP-37, ambas originárias dos Estados Unidos.

A contribuição genética de 18 ancestrais para a constituição genética das 30 cultivares de algodoeiro avaliadas no presente trabalho está apresentada na Tabela 5. A genealogia considerada variou de 33,8 a 100%, com média de 68,74% (69%). Observa-se, portanto, que esses ancestrais contribuíram com 69% da constituição genética das 30 cultivares (Tabela 6). Desses 69%, o ancestral Auburn 56 contribuiu com 12,7%, o Tamcot SP-37 com 8,9%, o DP Smoothleaf com 7,74% e o DP 45 com 6,07%, sendo todas cultivares norte-americanas. Apesar de apresentar baixa contribuição para as cultivares, o

ancestral DP Smoothleaf teve a maior frequência (57%) na genealogia dessas cultivares, quando comparado à frequência dos ancestrais Auburn 56 (50%), DP 45 (43%) e Tamcot SP-37 (30%). Tal frequência se explica pela utilização de cultivares como DP 16 e Reba P279 nos cruzamentos realizados para a obtenção da maioria das cultivares avaliadas. Essas cultivares têm a cultivar DP (DeltaPine) Smoothleaf na sua genealogia, sendo sua utilização necessária para introgridir a característica smoothleaf (folha lisa, isto é, ausência ou pubescência reduzida na superfície abaxial da folha) que aumenta a qualidade da fibra (LEE, 1985). Apesar das menores frequências na genealogia, as cultivares Auburn 56 e Tamcot SP-37 contribuem bastante para o *pool* gênico das cultivares brasileiras.

Tabela 5– Identificação, origem, contribuição genética relativa (CGR), contribuição genética acumulada (CGAc), número de ancestrais acumulados (NAAc) e frequência do ancestral na genealogia (FAG) das 30 cultivares de algodoeiro.

ANCESTRAIS			CGR	CGAc	NAAc	FAG
Letras	Identificação	Origem	%	%		%
A	Auburn56	Estados Unidos	12,70	12,7	1	50
B	Tamcot-SP37	Estados Unidos	8,90	21,6	2	30
C	DP Smoothleaf	Estados Unidos	7,74	29,34	3	57
D	DP 45	Estados Unidos	6,07	35,41	4	43
E	CHACO 510	Argentina	5,00	40,41	5	20
F	Stoneville 213	Estados Unidos	4,20	44,61	6	10
G	Reba B50	Estados Unidos	3,96	48,57	7	20
H	John Cotton Polycross	Estados Unidos	3,18	51,75	8	23
I	AZ 5909	Estados Unidos	3,20	54,95	9	23
J	ISA 205	África	2,50	57,45	10	7
K	S 295	África	2,08	59,53	11	13
L	Mataco	Argentina	1,70	61,23	12	3
M	Siokra	Austrália	1,70	61,23	13	3
N	<i>G. hirsutum</i> r, <i>yucatanense</i>	América Central	1,50	64,43	14	7
O	Tn1-Hoa	-	1,50	65,93	15	7
P	Toba/Hopicala/DP16	Híbrido triplo/E,U,A	1,46	67,39	16	10
Q	Acala 1517-70	Estados Unidos	0,94	68,33	17	10
R	DPL	Estados Unidos	0,70	69,03	18	3

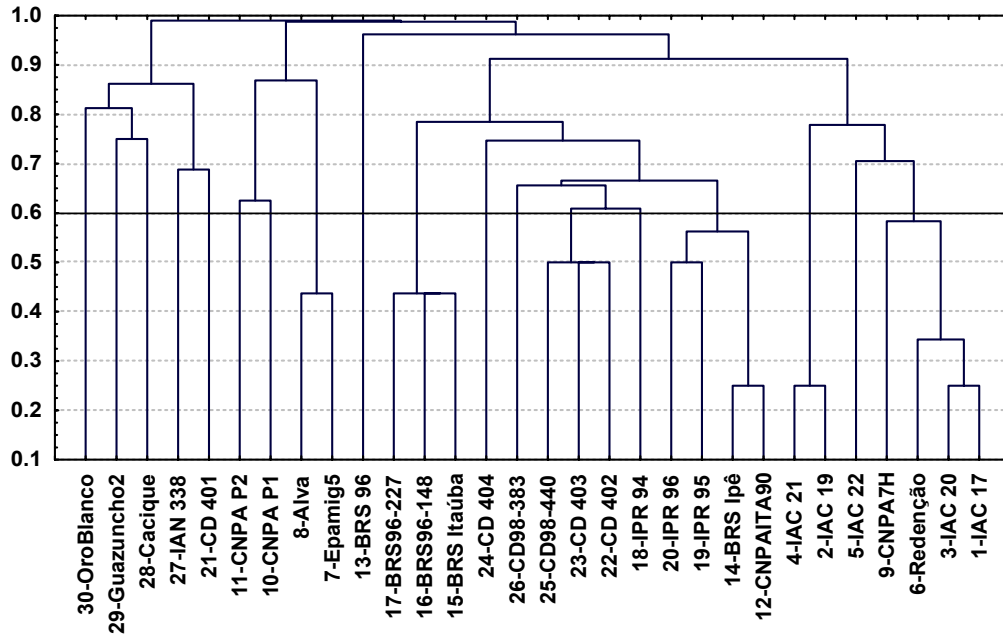
Tabela 6- Constituição genética das 30 cultivares de algodoeiro obtida com base na sua genealogia.

CULTIVARES	CONSTITUIÇÃO GENÉTICA ^a	% DA GENEALOGIA CONSIDERADA
1. IAC 17	0,562A	56,2
2. IAC 19	0,375A + 0,25N + 0,25O	87,5
3. IAC 20	0,422A	42,2
4. IAC 21	0,281A + 0,187N + 0,187O	65,5
5. IAC 22	0,211A + 0,375B	58,6
6. Redenção	0,422A	42,2
7. Epamig 5	0,281B + 0,375F	65,6
8. ALVA	0,281B + 0,375F	65,6
9. CNPA 7H	0,281A + 0,5B	78,1
10. CNPA P1	0,562B	56,2
11. CNPA P2	0,375B + 0,5F	87,5
12. CNPA ITA90	0,187D + 0,187C + 0,187H + 0,187I	74,8
13. BRS 96	0,211R + 0,211A	42,2
14. BRS Ipê	0,141D + 0,141C + 0,141H + 0,141I	56,4
15. BRS Itaúba	0,164D + 0,164C + 0,094Q + 0,094B	51,6
16. BRS 96-148	0,164D + 0,164C + 0,094Q + 0,094B	51,6
17. BRS 96-227	0,164D + 0,164C + 0,094Q + 0,094B	51,6
18. IPR 94	0,158A + 0,125D + 0,125C + 0,125H + 0,125I	65,8
19. IPR 95	0,158A + 0,094D + 0,094C	33,8
20. IPR 96	0,158A + 0,094D + 0,094C	33,8
21. CD 401	0,25E + 0,125G + 0,125C + 0,5I	100
22. CD 402	0,125D + 0,125C + 0,125H + 0,125I + 0,158A + 0,125K	78,3
23. CD 403	0,125D + 0,125C + 0,125H + 0,125I + 0,1582A + 0,125K	78,3
24. CD 404	0,187D + 0,125C + 0,0,125H + 0,125I + 0,187E + 0,187G + 0,062P	100
25. CD 98-440	0,125D + 0,125C + 0,125H + 0,125I + 0,1582A + 0,125K	78,3
26. CD 98-383	0,125D + 0,125C + 0,105A + 0,25K	60,5
27. IAN 338	0,25E + 0,25J + 0,25G + 0,25C	100
28. CACIQUE	0,5L + 0,25E + 0,25G	100
29. Guazuncho 2	0,375E + 0,25G + 0,125C + 0,25P	100
30. Oro Blanco	0,187E + 0,125G + 0,062C + 0,125P + 0,5M	100
MÉDIA		68,74

^a Letras usadas como símbolo mostrado na Tabela 5.

Os dendrogramas obtidos a partir das medidas de dissimilaridades genéticas calculadas com base nos marcadores SSR e coeficientes de parentesco para as 30 cultivares e as 40 linhagens estão apresentados nas Figuras 2 e 3. Foram obtidos 18 grupos, considerando-se um limite superior de 60%, no agrupamento das cultivares usando os CPs e 15 grupos, considerando-se um limite superior de 30%, no agrupamento das cultivares usando os SSRs. No agrupamento das linhagens foram obtidos 11 grupos, considerando-se um limite superior de 55% na distância genética obtida por meio dos CPs e 14 grupos, considerando-se um limite superior de 30% na distância genética obtida através dos SSRs. As Tabelas 7 e 8 mostram a comparação realizada entre os grupos formados pelo método UPGMA por meio dos coeficientes de parentesco e microssatélites, e também, a comparação realizada entre os grupos formados pelo método de otimização de Tocher.

A - DISTÂNCIAS GENÉTICAS OBTIDAS COM BASE NOS CPs



B - DISTÂNCIAS GENÉTICAS OBTIDAS COM BASE NOS SSRs

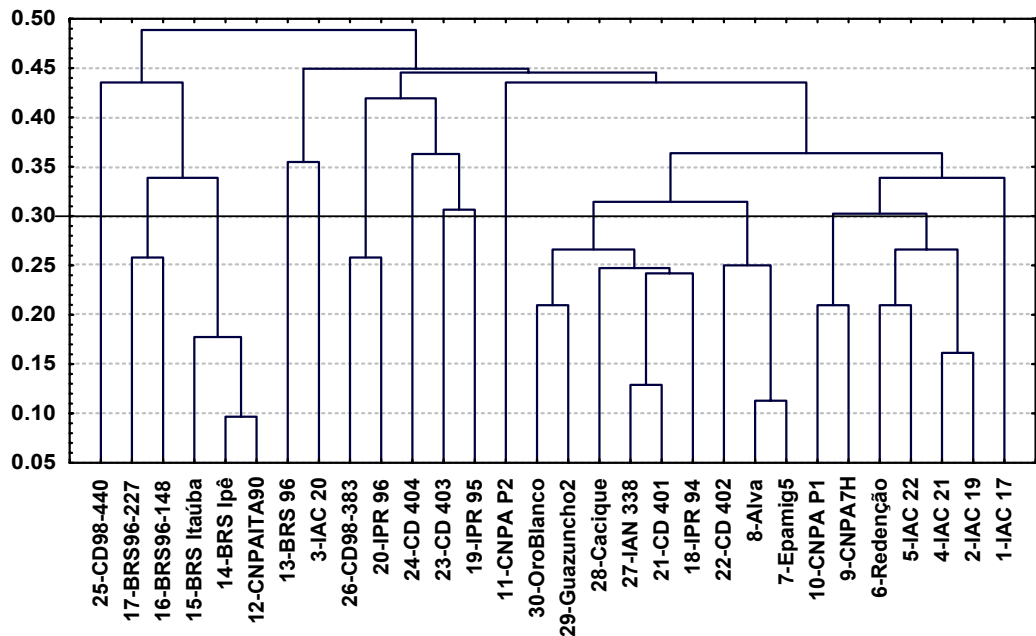


Figura 2- Distâncias genéticas entre 30 cultivares de algodoeiro obtido com base nas medidas de dissimilaridades calculadas através dos coeficientes de parentesco (A) e dos marcadores microssatélites (B), O método de agrupamento utilizado foi o das médias das distâncias ou UPGMA (*Unweigthed pair-group method using an arithmetic average*).

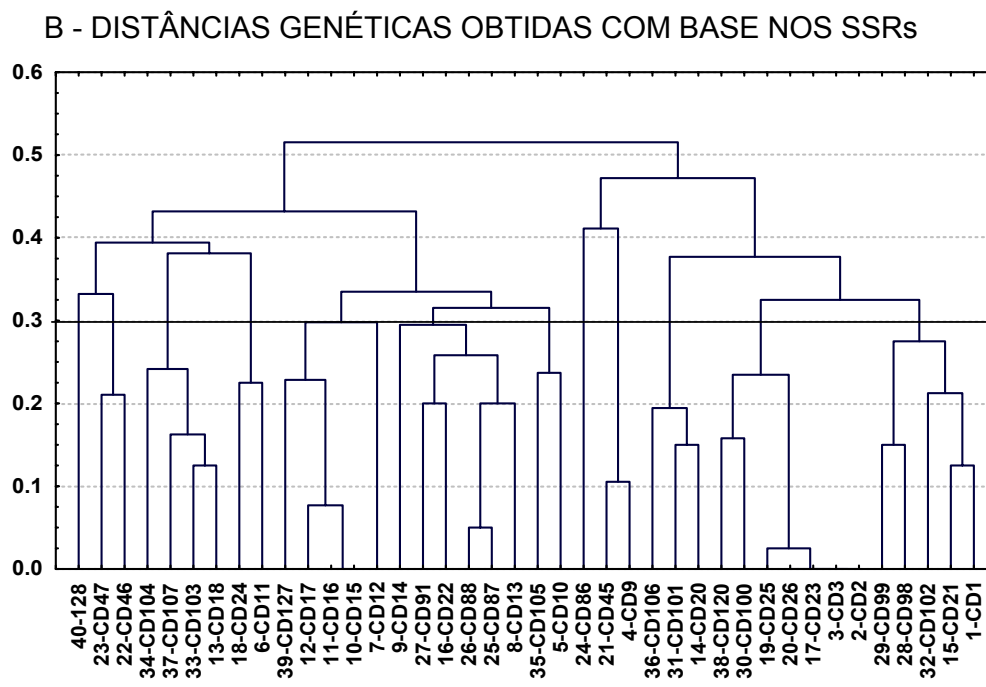
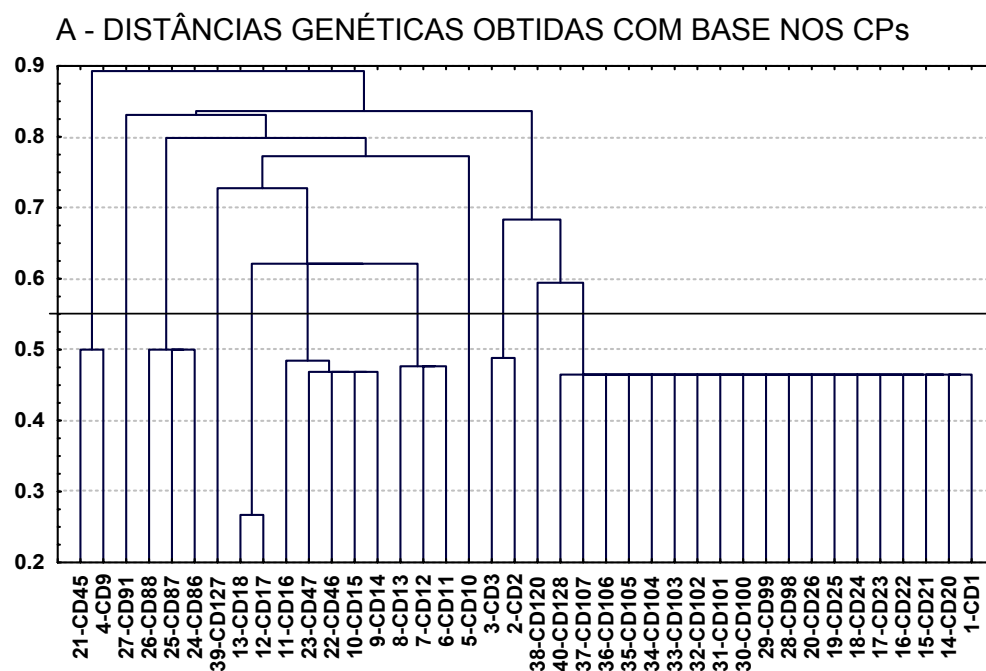


Figura 3- Distâncias genéticas entre 40 linhagens de algodoeiro obtidas com base nas medidas de dissimilaridades calculadas através dos coeficientes de parentesco (A) e dos marcadores SSRs (B), O método de agrupamento utilizado foi o das médias das distâncias ou UPGMA (*Unweighted pair-group method using an arithmetic average*).

Tabela 7- Comparação dos grupos obtidos para as 30 cultivares com base nas medidas de dissimilaridade calculadas através do Coeficiente de Parentesco (CP) e marcadores SSR, O agrupamento de Tocher também foi realizado com base no CP e SSR, **G** – corresponde aos grupos formados, Em negrito estão as cultivares em comum aos dois métodos (CP e SSR).

AGRUPAMENTO PELO MÉTO UPGMA			
(G)	CP	(G)	SSR
1	1, 3, 6, 9	1	1
2	5	2	2, 4, 5, 6
3	2, 4	3	9, 10
4	12, 14, 19, 20	4	7, 8, 22
5	18	5	18, 21, 27, 28, 29, 30
6	22, 23, 25	6	11
7	26	7	19
8	24	8	23
9	15, 16, 17	9	24
10	13	10	20, 26
11	7, 8	11	3
12	10	12	13
13	11	13	12, 14, 15
14	21	14	16, 17
15	27	15	25
16	28		
17	29		
18	30		
AGRUPAMENTO PELO MÉTODO DE TOCHER			
(G)	CP	(G)	SSR
1	1, 3, 6, 9, 5, 2, 4, 18, 19, 20, 22, 23, 25, 26, 12, 14, 24, 15, 16, 17	1	12, 14, 15, 16
2	7, 8, 10, 11	2	7, 8, 21, 27, 29, 28, 30, 18, 22, 23, 1, 10, 2, 9, 5, 6
3	21, 27, 29, 28, 30	3	20, 26
4	13	4	4, 19
		5	3, 13
		6	17
		7	25
		8	24
		9	11

Obs.: A numeração das cultivares está de acordo com a apresentada na Figura 2.

Tabela 8- Comparação dos grupos obtidos para as 40 linhagens com base nas medidas de dissimilaridade calculadas através do Coeficiente de Parentesco (CP) e marcadores SSR, O agrupamento de Tocher também foi realizado com base no CP e SSR, **G** – corresponde aos grupos formados, Em negrito estão as cultivares em comum aos dois métodos (CP e SSR).

AGRUPAMENTO PELO MÉTODO UPGMA			
(G)	CP	(G)	SSR
1	1, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 40	1	1, 15, 32, 28, 29
2	38	2	2, 3, 17, 20, 19, 30, 38
3	2, 3	3	14, 31, 36
4	5	4	4, 21
5	6, 7, 8	5	24
6	9, 10, 22, 23, 11	6	5, 35
7	12, 13	7	8, 25, 26, 16, 27
8	39	8	9
9	24, 25, 26	9	7
10	27	10	10, 11, 12, 39
11	4, 21	11	6, 18
		12	13, 33, 37, 34
		13	22, 23, 40
AGRUPAMENTO PELO MÉTODO DE TOCHER			
(G)	CP	(G)	SSR
1	12, 13, 6, 7, 8, 9, 10, 22, 23, 11	1	2, 3, 17, 20, 19, 38, 30, 29, 32, 15
2	1, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 40, 38	2	10, 11, 12, 8, 39, 25, 5, 16, 9
	2, 3		
3	4, 21	3	4, 21
4	24, 25, 26	4	13, 33, 37, 34
5	39	5	14, 31, 36, 1
6	27	6	22, 23
7	5	7	6, 18
		8	26, 27
		9	35
		10	7
		11	40
		12	24
		13	28

Obs.: A numeração das cultivares está de acordo com a apresentada na Figura 3.

A comparação entre os grupos formados tanto pelo método UPGMA quanto pelo método de Tocher, para as cultivares e as linhagens, revela pouca concordância entre os agrupamentos obtidos. A correlação (r) entre as distâncias genéticas obtidas pelos CPs e SSRs tanto para as cultivares quanto para as linhagens foi positiva e significativa ($P < 0,001$). Entretanto, a magnitude dessas correlações não foi muito elevada, com valores de 0,25 entre as cultivares e 0,29 entre as linhagens. Resultado semelhante foi obtido por COX *et al.* (1985b) para a cultura do trigo. Esses autores encontraram baixa correlação ($r=0,27$) entre similaridade genética (SG) calculada com base no polimorfismo detectado em proteínas de reserva (gliadinas) e coeficiente de parentesco. Correlação significativa, mas com valores baixo ($r=0,21$) a moderado ($r=0,42$), entre a SG obtida com base em marcadores RFLP e coeficiente de parentesco também foi encontrada por GRANER *et al.* (1994) na cultura do trigo. Por outro lado, BARBOSA-NETO *et al.* (1996) encontraram correlação negativa ($r=-0,33$) entre a similaridade genética obtida com base em marcadores RFLP e coeficiente de parentesco para linhagens de trigo. KIM e WARD (1997) encontraram correlação elevada ($r=0,73$) entre a SG calculada com base em RFLP e CP quando se considerou todos os pares de linhagens de trigo de inverno, isto é, trigo vermelho (TV) e trigo branco (TB). Entretanto, quando as linhagens de TV e de TB foram consideradas separadamente, a correlação diminuiu, passando esses valores para 0,23 entre as linhagens de TV e 0,28 entre as linhagens de TB.

Na cultura do arroz, XU *et al.* (1999) encontraram correlação igual a 0,092 entre distâncias genéticas calculadas com base em SSR e análise de pedigree. Por outro lado, PLASCHKE *et al.* (1995), comparando estimativas da SG entre cultivares de trigo calculada com base em SSR e coeficiente de parentesco, encontraram correlação igual a 0,55. LIMA *et al.* (2002), avaliando genótipos de cana-de-açúcar, encontraram uma correlação de 0,42 entre SG calculada com base em marcadores AFLP e coeficiente de parentesco. Utilizando-se apenas os valores do CP acima de 0,125 (correlação “ranqueada”) na análise dos pares de cultivares, TINKER *et al.* (1993) detectaram uma correlação de 0,61 entre a SG calculada com base em marcadores RAPD e CP. MOSER e LEE (1994) detectaram uma correlação de 0,63 entre a SG calculada com base em RFLP e CP entre cultivares de aveia. Em contraste a esses resultados, constatou-se em alguns trabalhos com milho, forte correlação entre estimativas

da SG realizadas com base em marcadores moleculares e coeficiente de parentesco. MESSMER *et al.* (1993) encontraram valores elevados ($r=0,71$ e $r=0,86$) de correlação entre SG calculada com base em RFLP e CP entre linhagens de milho. SMITH *et al.* (1997) também encontraram valores elevados de correlação quando associaram a divergência genética calculada com base em marcadores RFLP ($r=0,80$) e SSR ($r=0,81$) com a divergência genética obtida por CP em linhagens de milho.

Segundo GRANER *et al.* (1994) os métodos usados para estimar a similaridade genética com base em marcadores moleculares e coeficiente de parentesco têm abordagens bem diferentes. Eles se baseiam em diferentes tipos de informações e, como consequência, estão sujeitos a diferentes fontes de erros. Do ponto de vista dessas diferenças, é de grande interesse investigar a relação entre os dois métodos e comparar suas vantagens e desvantagens. O coeficiente de parentesco entre dois indivíduos i e j (f_{ij}) é definido como sendo a probabilidade de genes homólogos tomados ao acaso, um de um progenitor e o outro do outro progenitor, serem idênticos por descendência, isto é, cópias de um mesmo gene proveniente de um mesmo ancestral (FALCONER, 1987). Em contraste, a similaridade genotípica entre indivíduos se baseia em genes semelhantes em estado, isto é, genes indistinguíveis por seus efeitos. Entretanto, genes que são somente semelhantes em estado, mas não são idênticos por descendência, são ignorados no cálculo do coeficiente de parentesco (MESSMER *et al.*, 1993). Por outro lado, a similaridade genética quando estimada por marcadores moleculares reflete a semelhança entre os genótipos a partir de uma amostra direta do genoma, refletindo similaridade em estado e/ou por descendência (GRANER *et al.*, 1994). Portanto, essa estimativa pode ser mais compreensível do que aquela obtida por coeficiente de parentesco que considera somente a identidade por descendência.

Uma grande vantagem da análise de similaridade genética baseada na genealogia é seu baixo custo. No entanto, ela apresenta como desvantagens a necessidade de informações detalhadas sobre a genealogia das cultivares avaliadas e o fato do coeficiente de parentesco ser calculado com base em algumas pressuposições não realísticas. Segundo CARVALHO *et al.* (2003), a falta de registros de ancestrais dificulta o estudo da diversidade por meio de estudos genealógicos. De fato a genealogia de alguns ancestrais, considerada no presente trabalho, não era conhecida, sendo esses ancestrais considerados

não relacionados de acordo com a pressuposição A1. Se, ao contrário, esses ancestrais fossem relacionados poder-se-ia estar superestimando a diversidade entre as cultivares. Na pressuposição A2 considera-se que uma cultivar derivada de um cruzamento herda 50% de seus alelos de cada progenitor. Entretanto, trabalhos realizados com marcadores moleculares indicam que sob intensa seleção esse valor sofre um desvio de até 20% (BERNARDO *et al.*, 1996). Resultados obtidos a partir de dados morfológicos sugerem que os melhoristas têm seletivamente favorecido determinadas características e como consequência, determinados genes. Tal fato é suportado por dados obtidos por meio de marcadores RFLP em milho, os quais mostram que após um cruzamento entre dois progenitores, linhagens derivadas da F2 podem herdar parte dos alelos de um dos pais de forma desproporcional (BERNARDO *et al.*, 1996). Portanto, desvios devido à seleção e deriva genética são esperados, mas não são considerados no cálculo do coeficiente de parentesco. Ao se considerar que os progenitores são homozigotos e homogêneos (pressuposição A3) pode-se estar superestimando as relações genéticas entre as cultivares desde que elas não refletem a ocorrência de fecundações cruzadas e segregação residual devido a seleções de plantas realizadas em gerações precoces. Na cultura do algodão já foram constatadas diferentes taxas de fecundação cruzada quando da presença de insetos polinizadores (MAY *et al.*, 1995).

A obtenção de uma estimativa mais precisa da similaridade genética com base em marcadores microsatélites dependerá do número de marcadores SSR usados no estudo e a distribuição desses marcadores no genoma da cultura avaliada. O algodão (*G. hirsutum* L.) possui número de cromossomos $2n = 4x = 52$. No presente trabalho, o número de pares de *primers* SSR usados na avaliação das cultivares e linhagens foi de 31 e 20, respectivamente. Isto corresponderia, em média, a um par de *primers* por cromossomo no genoma do algodoeiro. Dos 31 e 20 *primers* utilizados no trabalho 21 e 13 *primers* têm sua localização precisa já definida, como pode ser observado nas Tabelas 2 e 3. Desses primers, 11 estão localizados no subgenoma A e 10 no subgenoma D. LIU *et al.* (2000), localizaram 42 pares de *primers* SSR nos cromossomos do algodão. Desses 42 *primers*, 24 estavam localizados no subgenoma A. Segundo REINISCH *et al.* (1994), espera-se encontrar um maior número de

marcadores no subgenoma A do que no D, devido ao maior tamanho do subgenoma A em relação ao D.

Os valores médios do PIC encontrado para os *primers* avaliados nas cultivares foi de 0,39 (Tabela 2) e para as linhagens foi de 0,43 (Tabela 3). Baixo polimorfismo molecular a nível intraespecífico no algodoeiro também foi detectado por outros autores (TATINENI *et al.*, 1996; BRUBAKER e WENDEL, 2001).

Segundo BARBOSA-NETO e BERED (1998), o número de marcadores a serem amostrados é importante do ponto de vista de precisão das estimativas de distância genética. Nesse sentido, diversos pesquisadores têm apresentado preocupações em termos de quantificar a precisão das estimativas de distância genética e determinar um número ideal de marcadores a serem empregados (KEIM *et al.*, 1992; TIVANG *et al.*, 1994), entretanto, existem dificuldades para o estabelecimento de variâncias para estes estimadores. Além disso, na literatura ainda são escassas as informações a respeito do número ideal de marcadores moleculares na determinação da diversidade genética tanto de populações naturais quanto de plantas melhoradas.

CONCLUSÕES

(1) Constata-se, no presente trabalho, baixa associação entre os métodos usados para estimar a diversidade genética com base na análise genealógica e análise multivariada obtida por meio de marcadores microssatélites.

(2) O método usado para estimar a diversidade genética com base na análise genealógica superestima o nível de diversidade genética, o qual pode ser influenciado pela seleção, deriva genética e registros incompletos de genealogia. Por outro lado, a estimativa da diversidade genética com base em marcadores microssatélites fornece mais informações sobre as relações genéticas do que a estimativa com base no coeficiente de parentesco. Além disso, a análise da diversidade genética por meio de marcadores microssatélites detecta maior diversidade entre os materiais avaliados.

(3) As cultivares de algodoeiro descendem de poucos ancestrais, tais como, Auburn 56, Tamcot SP-37, DP Smoothleaf e DP 45. Dessa forma, caso não haja introgressão de novos alelos no germoplasma do algodoeiro, a vulnerabilidade genética se tornará um risco para a cotonicultura brasileira.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSON, J.A.; CHURCHILL, G.A.; AUTRIQUE, J.E.; TANKSLEY, S.D.; SORRELLS, M.E. Optimizing parental selection for genetic linkage maps. **Genome**, v. 36, p. 181-186, 1993.
- AUTRIQUE, E.; NACHIT, M.M.; MONNEVEUX, P.; TANKSLEY, S.D.; SORRELLS, M.E. Genetic diversity in durum wheat based on RFLPs, morphophysiological traits, and coefficient of parentage. **Crop Sci.**, v. 36, p. 735-742, 1996.
- BARBOSA-NETO, J.; BERED, F. Marcadores moleculares e diversidade genética no melhoramento de plantas. In: MILACH, S. (Ed.), **Marcadores moleculares em plantas**, Porto Alegre, 1998, p. 29-40.
- BARBOSA-NETO, J.F.; SORRELLS, M.E.; CISAR, G. Prediction of heterosis in wheat using coefficient of parentage and RFLP-based estimates of genetic relationship. **Genome**, v. 39, p. 1142-1149, 1996.
- BERED, F.; BARBOSA-NETO, J.F.; CARVALHO, F.I.F. Genetic variability in common wheat germplasm based on coefficients of parentage. **Genetic and Molecular Biology**, v. 25, p. 211-215, 2002.
- BERNARDO, R.; MURIGNEUX, A.; KARAMAN, Z. Marker-based estimates of identity by descent and likeness in state among maize inbreds. **Theor. Appl. Genet.**, v. 93, p. 262-267, 1996.
- BOWMAN, D.T.; MAY, O.L.; CALHOUN, D.S. Coefficient of parentage for 260 cotton cultivars released between 1970 and 1990, **USDA Tech, Bull**, 1852, 1997.
- BOWMAN, D.T.; MAY, O.L.; CALHOUN, D.S. Genetic base of upland cotton cultivars released between 1970 and 1990, **Crop Sci.**, v. 36, p. 577-581, 1996.
- BROWN, J.S. Principal component and cluster analysis of cotton variability across the U,S, cotton belt. **Crop Sci.**, v. 31, p. 915-922, 1991.
- BRUBAKER, C.L.; WENDEL, J.F. Reevaluating the origin of domesticated cotton (*Gossypium hirsutum*; Malvaceae) using nuclear restriction fragment length polymorphism (RFLPs). **Am. J. Bot.**, v. 81, p. 1309-1326, 1994.
- BRUBAKER, C.L.; WENDEL, J.F. RFLP in cotton, In: Jenkins J.N., Saha S. (eds.) **Genetic improvement of cotton, emerging technologies**. Science, Enfield, N.H., USA, p. 81-101, 2001.
- CALHOUN, D.S.; BOWMAN, D.T.; MAY, O.L. Pedigrees of upland and pima cotton cultivars released between 1970 and 1997. **Missi. Agric. and For. Exp. Sta. Bull.** 1069, 1997.

- CARVALHO, L.P.; LANZA, M.A.; FALLIERI, J.; SANTOS, J.W. Análise da diversidade genética entre acessos de banco ativo de germoplasma de algodão. **Pesq. Agrop. Bras.** Brasília, v. 38, n. 10, p. 1149-1155, 2003.
- CARVALHO, L.P. O gênero *Gossypium* e suas espécies cultivadas e silvestres, *In*: BELTRÃO, N.E. de M. **O Agronegócio do algodão no Brasil**. Brasília: EMBRAPA, 1999, p. 231-251.
- CRUZ, C. D. **Programa Genes: versão Windows; aplicativo computacional em genética e estatística**. Viçosa:UFV. 2001, 648p.
- GRANER, A.; LUDWIG, W.F.; MELCHINGER, A.E. Relationships among European barley germplasm: II, Comparison of RFLP and pedigree data. **Crop Sci.**, v. 34, p. 1199-1205, 1994.
- GUTIÉRREZ, O.A.; BASU, S.; SAHA, S.; JENKINS, J.N.; SHOEMAKER, D.B. CHEATHAM, C.L.A.; McCARTY Jr., J.C. Genetic distances among selected cotton genotypes and its relationship with F₂ performance. **Crop Sci.**, v. 42, p. 1841-1847, 2002.
- IQBAL, M.J.; AZIZ, N.; SAEED, N.A.; ZAFAR, Y. Genetic diversity evaluation of some elite cotton varieties by RAPD analysis. **Theor. Appl. Genet.**, v. 94, p. 139-144, 1997.
- KEIM, P.; BEAVIS, W.; SCHUPP, J.; FREESTONE, R. Evaluation of soybean RFLP marker diversity in adapted germplasm. **Theor. Appl. Genet.**, v. 83, p. 205-212, 1992.
- KIM, H.S.; WARD, R.W. Genetic diversity in Eastern U.S. soft winter wheat (*Triticum aestivum* L. Thell.) based on RFLPs and coefficients of parentage. **Theor. Appl. Genet.**, v. 94, p. 472-479, 1997.
- LEE, J.A. Revision of the genetics of the hairiness-smoothness system of *Gossypium*. **Journal of Heredity**, v. 76, p. 123-126, 1985.
- LIMA, M.L.A.; GARCIA, A.A.F.; OLIVEIRA, K.M.; MATSUOKA, S.; ARIZONO, H.; SOUZA Jr., C.L. Analysis of genetic similarity detected by AFLP and coefficient of parentage among genotypes of sugar cane (*Saccharum* spp.). **Theor. Appl. Genet.**, v. 104, p. 30-38, 2002.
- LITT, M.; HAUGE, X.; SHARMA, V. Shadows bands seen when typing polymorphic dinucleotide repeats: some causes and cures. **Biotechniques**, v. 15, p. 280-284, 1993.
- LIU, S.; SAHA, S.; STELLY, D.; BURR, B.; CANTRELL, R.G. Chromosomal assignment of microsatellite loci in cotton. **Journal of Heredity**, v. 91, n. 4, p. 326-332, 2000.
- MAY, O.L.; BOWMAN, D.T.; CALHOUN, D.S. Genetic diversity of U.S. upland cotton cultivars released between 1980 and 1990. **Crop Sci.**, v. 35, p. 1570-1574, 1995.

- McDONALD, M.B.; ELLIOT, L.J.; SWEENEY, P.M. DNA extraction from dry seeds for RAPD analyses in varietal identification studies. **Seed Sci. & Technol.**, v. 22, p. 171-176, 1994.
- MESSMER, M.M.; MELCHINGER, A.E.; HERMANN, R.G.; BOPPENMAIER, J. Relationships among early European maize inbreds: II. Comparison of pedigree and RFLP data, **Crop Sci.**, v. 33, p. 944-950, 1993.
- MOSER, H.; LEE, M. RFLP variation and genealogical distance, multivariate distance, heterosis, and genetic variance in oats, **Theor. Appl. Genet.**, v. 87, p. 947-956, 1994.
- MULTANI, D.S.; LYON, B.R. Genetic fingerprinting of Australian cotton cultivars with RAPD markers, **Genome**, v. 38, p. 1005-1008, 1995.
- MURPHY, J.P.; COX, T.S.; RODGERS, D.M. Cluster analysis of red winter wheat cultivars based upon coefficients of parentage, **Crop Sci.**, v. 26, p. 672-676, 1986.
- NASS, L.L. Utilização dos recursos genéticos vegetais no melhoramento. *In*: NASS, L.L.; VALOIS, A.C.C.; MELO, I.S.; VALADARES-INGLIS, M.C, **Recursos Genéticos e Melhoramento – Plantas**, Rondonópolis: Fundação MT, 2001, p.29-55.
- NGUYEN, T.B.; GIBAND, M.; BROTTIER, P.; RISTERUCCI, A.M.; LACAPE, J.M. Wide coverage of the tetraploide cotton genome using newly developed microsatellite markers, **Theor. Appl. Genet.**, v. 109, n. 1, p. 167-175, 2004.
- PENNA, J.C.V. Melhoramento do algodão. *In*: BORÉM, A. **Melhoramento de espécies cultivadas**, 1999, p.1-50.
- PLASCHKE, J.; GANAL, M.W.; Roder, M.S. Detection of genetic diversity in closely related bread wheat using microsatellite markers. **Theor. Appl. Genet.**, v. 91, p. 1001-1007, 1995.
- PURDY, L.H.; LOEGERING, W.Q.; KONZAK, C.F.; PETERSON, C.J.; ALLAN, R.E. A proposed standard method for illustrating pedigrees of small grain varieties, **Crop Sci.**, v. 4, n. 8, p. 405-406, 1968.
- REINISCH, A.J.; DONG, J.M.; BRUDOKER, C.L.; STELLY, D.M.; WENDEL, J.F.; PATERSON, A.H. A detailed RFLP map of cotton *Gossypium hirsutum* x *Gossypium barbadense*: chromosome organization and evolution in a disomic polyploide genome. **Genetics**, v. 138, p. 829-847, 1994.
- REIS, W.P.; VELLO, N.A.; FERREIRA, D.F.; RAMALHO, M.A.P. Associação entre coeficiente de parentesco e técnicas multivariadas como medidas de divergência genética de cultivares de trigo. **Ciênc. e Agrotec.**, Lavras, v. 23, p. 258-269, 1999.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: laboratory manual**. 2nd edition CSHL, Cold Spring Harbor, NY, 1989.

- SMITH, J.S.C.; CHIN, E.C.L.; SHU, H.; SMITH, O.S.; WALL, S.J.; SENIOR, M.L.; MITCHELL, S. E.; KRESOVITCH, S.; ZIEGLE, J. An evaluation of the utility of SSR loci as molecular markers in maize (*Zea mays* L.): Comparisons with data from RFLPs and pedigree. **Theor. Appl. Genet.**, v. 95, p. 163-173, 1997.
- TATINENI, V.; CANTRELL, R.G.; DAVIS, D.D. Genetic diversity in elite cotton germplasm determined by morphological characteristics and RAPDs. **Crop Sci.**, v. 36, p. 186-192, 1996.
- TINKER, N.A.; FORTIN, M.G.; MATHER, D.E. Random amplified polymorphic DNA and pedigree relationships in spring barley. **Theor. Appl. Genet.**, v. 85, p. 976-984, 1993.
- TIVANG, J.G.; NIENHUIS, J.; SMITH, O.S. Estimation of sampling variance of molecular marker data using the bootstrap procedure. **Theor. Appl. Genet.**, v. 89, p. 259-264, 1994.
- ULLOA, M.; MEREDITH, Jr.; W.R.; PERCY, R.; MOSER, H. Genetic variability within improved germplasm of *G. hirsutum* and *G. barbadense* cottons. p. 73, **In Agronomy abstracts**, ASA, Madison, WI, 1999.
- VAN ESBROECK, G.A.; BOWMAN, D.T. Cotton germplasm diversity and its importance to cultivar development. **Journal of Cotton Science**, v. 2, p. 121-129, 1998.
- VAN ESBROECK, G.A.; BOWMAN, D.T.; MAY, O.L.; CALHOUN, D.S. Genetic similarity indices for ancestral cotton cultivars and their impact on genetic diversity estimates of modern cultivars, **Crop Sci.**, v. 39, p. 323-328, 1999.
- WENDEL, J.F.; BRUBAKER, C.L.; PERCIVAL, A.E. Genetic diversity in *Gossypium hirsutum* and the origin of upland cotton. **Am. J. Bot.**, v. 79, p. 1291-1310, 1992.
- XU, W.; VIRMANI, S.S.; LI, Z.K. Association between simple sequence repeat (SSR) marker diversity, pedigree record, quantitative trait variation, and hybrid performance in rice. **International Rice Research Notes**, v. 24, p. 10-11, 1999.