

# DETERMINAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA ENTRE ACESSOS DE ALGODÃO POR MEIO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES

## GENETIC DIVERSITY DETERMINATION AMONG ACCESSIONS OF COTTON BY MICROSATELLITES MARKERS

Taciana de Carvalho COUTINHO<sup>1</sup>; Marcelo de Almeida GUIMARÃES<sup>2</sup>;  
Márcia Soares VIDAL<sup>3</sup>;

1. Bióloga, Professora, Universidade Federal do Amazonas, Benjamin Constant, AM, Brasil; 2. Agrônomo, Professor, Doutor em Fisiologia Vegetal, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil; 3. Bióloga, Pesquisadora da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro Nacional de Pesquisa de Agrobiologia, Seropédica, RJ, Brasil. [mvidal@cnpa.embrapa.br](mailto:mvidal@cnpa.embrapa.br).

**RESUMO:** A utilização de marcadores moleculares microssatélites ou SSR (Simple Sequência Repetitiva) tem se mostrado uma excelente técnica para identificação de cultivares, análise genealógica e de distância genética entre organismos. O conhecimento da diversidade genética entre grupos de genitores por meio da utilização de marcadores moleculares vem permitindo estabelecer diferenças entre acessos de algodão, facilitando a seleção de genitores a serem empregados em programas de melhoramento. O trabalho teve por objetivo avaliar a diversidade genética entre acessos provenientes do Banco de germoplasma de algodão da Empresa de Pesquisa de Minas Gerais (EPAMIG) por meio de marcadores moleculares SSR. Os 37 oligonucleotídeos da série BNL amplificaram um total de 106 alelos. Uma média de 2,86 alelos por *locus* foi detectada, com uma média de conteúdo informativo de polimorfismo (PIC) de 0,068. A maior taxa de heterozigosidade (0,15) foi obtida para o acesso Dendera e (0,12) para o acesso Giza 80. As menores taxas de heterozigosidade (0,05) foram observadas para os acessos T-7044 e Coker-310. A partir das estimativas de dissimilaridade de Nei a maior distância genética foi obtida entre os acessos Giza 80 e T-7044 (0,88), e a menor distância (0,042) entre os acessos SL 24-82885 e o T-295. O dendrograma gerado apresentou a formação de nove grupos distintos, sendo os acessos Giza 80 e Dendera os mais divergentes entre os todos os estudados.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Gossypium* sp. Dissimilaridade de Nei. SSR. Variabilidade genética.

### INTRODUÇÃO

O algodoeiro é uma dicotiledônea, da família das Malváceas. Seu gênero, *Gossypium*, é bastante variado já que é composto por espécies diplóides ( $2n = 2x = 26$  cromossomos) e alotetraplóides ( $2n = 4x = 52$  cromossomos). Atualmente, já foram identificadas mais de 50 espécies pertencentes ao gênero *Gossypium*, estando distribuído amplamente pelo continente asiático, africano, americano e oceânico. Dentre as diversas espécies, apenas quatro são consideradas economicamente importantes, por serem as únicas espécies cultiváveis, *G. hirsutum* L. e *G. barbadense* L. (alotetraplóides), *G. herbaceum* L. e *G. arboreum* L. (diplóides; CEDRONI et al., 2003).

O Brasil, considerado um dos principais produtores mundiais de fibras têxteis, experimentou períodos de desestímulo na produção algodoeira, principalmente devido a uma série de fatores econômicos e agrônômicos desfavoráveis, resultando na queda da produção anual (CARVALHO et al., 2003). No entanto, em meados de 1997, a cotonicultura brasileira entrou em um processo de ascensão. Um fator importante que possibilitou essa revitalização foi a expansão da área cultivada na região do Centro-Oeste, principal

região produtora do país (MENEZES et al., 2008). Além disso, de acordo com Carvalho et al. (2003), a adoção de novas tecnologias relacionadas ao melhoramento vegetal, direcionadas para o desenvolvimento de variedades mais resistentes a pragas e doenças, também tiveram participação importante neste processo.

Assim como para outras culturas agronomicamente importantes, o melhoramento genético do algodoeiro tem ganhado atenção especial nos últimos anos. Isso porque dificilmente se encontra algum genótipo cultivável que possua todas as características agrônômicas e qualitativas desejáveis (MENEZES et al., 2008).

Para o melhoramento do algodão tem-se utilizado os chamados métodos convencionais de cruzamentos clássicos, sendo a variação natural entre os diferentes genótipos o principal fornecedor de novas características fenotípicas. No entanto, para algumas características importantes como resistência às pragas e doenças que incidem na cultura, não se tem obtido sucesso em sua prospecção no *pool* genético disponível para o algodoeiro (CARVALHO et al., 2003).

Sendo assim, é importante que técnicas de avaliação mais criteriosas, sejam utilizadas na caracterização genotípica de subamostras e/ou

cultivares, o que proporciona maior eficiência na determinação da diversidade genética da população em estudo e, conseqüentemente, auxilia no melhoramento genético da espécie. Dentre as técnicas existentes, os chamados marcadores moleculares são capazes de proporcionar tal efeito.

Inúmeros estudos, a partir da utilização de marcadores moleculares, têm sido conduzidos para investigar a diversidade genética em subamostras e/ou cultivares do algodoeiro (LACAPE et al., 2007), sendo o RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphisms) (ZHANG et al., 2008), RAPD (Random Amplified Polymorphic DNAs) (ZHANG et al., 2008; MALEIA et al., 2010), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphisms) (ZHANG et al., 2008; RAKSHIT et al., 2010) e SSR (Simple Sequence Repeats) (ZHANG et al., 2008; RAKSHIT et al., 2010) os mais utilizados para estudos com algodão (STICH et al., 2005; AMORIM et al., 2008). No geral, tais metodologias proporcionam definição de diferenças nas sequências nucleotídicas dos indivíduos, sendo perfeitamente aplicáveis no melhoramento vegetal, na identificação de origem parental e na proteção de variedades, no monitoramento de cruzamentos, e em estudos de diversidade e distância genética (HAN et al., 2006).

Dos marcadores mencionados, o SSR tem sido destacado como o mais promissor (MOIANA, et al., 2012), já que é baseado em uma metodologia simples e rápida, capaz de gerar elevado conteúdo de informação genética que pode ser utilizada em avaliações de diversidade genômica (FERREIRA et al., 2012). Segundo inúmeros pesquisadores (COLLARD, et al. 2005; AGARWAL, 2008; LIN et al., 2010; KALIA et al, 2011), os microssatélites ou SSRs estão em grande número no genoma, mostram alto nível de polimorfismo e são marcadores co-dominantes presentes tanto nas regiões codificadas como não codificadas distribuídas ao longo do genoma. Os locos SSR além de apresentarem segregação mendeliana, também são altamente multialélicos (SILVA et al., 2007). Segundo Moiana et al. (2012), no Brasil há poucos estudos que tenham utilizado marcadores moleculares com o intuito de relacionar características estruturais de populações de algodão com diversidade genética.

Baseado no exposto acima, o presente trabalho teve por objetivo avaliar a diversidade genética entre subamostras pertencentes ao Banco de Germoplasma de Algodão (BAG) da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG) através da utilização de marcadores moleculares do tipo microssatélites.

## MATERIAL E MÉTODOS

O material vegetal em estudo pertence ao Banco Ativo de Germoplasma da EPAMIG, composto por 221 subamostras. A diversidade genética das subamostras do BAG foram classificadas em 10 grupos a partir das análises de similaridade morfológica e de fibra (CARVALHO et al., 2003). De todas as subamostras, 36 foram utilizadas para a construção da árvore filogenética com os dados das características obtidas. Dessas 36 subamostras, 32 foram selecionadas com base no agrupamento realizado, sendo plantadas em casa de vegetação localizada na Embrapa Algodão, em vasos de 20 litros contendo uma mistura de massame, esterco e solo, nas proporções de 30-30-40%, respectivamente.

Após cinco semanas de desenvolvimento, folhas foram coletadas e colocadas em nitrogênio líquido para extração de DNA (FERREIRA; GRATAPAGLIA, 1998). As amostras de DNA foram quantificadas em gel de agarose 0,8%, tampão TBE 0,5X (Tris-Borato 0,045 mM, EDTA 0,001 M, pH 8,0), corado com brometo de etídio (0,012 mg/mL) e visualizadas em transluminador (Hing Performance Ultraviolet Transilluminator).

Para a corrida eletroforética foram aplicados 10 µL de uma solução contendo 1 µL de DNA diluído 10X, acrescido de 2 µL de tampão de carregamento (4 g de sacarose + 0,025 g azul de bromofenol) e 7 µL de água MilliQ®.

A quantificação do DNA das amostras foi realizada pela comparação entre estas e o DNA do bacteriófago *lambda* cuja concentração foi de 25 ng/µL. Foram aplicadas, nos géis, as seguintes massas do λ DNA: 50, 100, 150 e 200 ng.

As 32 subamostras selecionadas no Banco de Germoplasma foram submetidas a avaliações com marcadores microssatélites (Tabela 1), sendo para isso, utilizados trinta e sete pares de oligonucleotídeos que flanqueiam as regiões microssatélites, anteriormente desenvolvidos e publicados pelo Laboratório Nacional de Brookhaven – BNL (LIU et al., 2000).

As reações de amplificação para as 32 subamostras foram realizadas em solução total de 20 µL contendo: 10 ng de DNA genômico de algodão; 1 µL de Taq sintetizada no Laboratório de Biotecnologia da Embrapa Algodão; 10X Tampão da Taq DNA polimerase; 0,2 mM de dNTP; 3 e 2 mM de MgCl<sub>2</sub>; e, 3 µL de oligonucleotídeo (Tabela 2).

**Tabela 1.** Subamostras de algodão pertencentes ao Banco de Germoplasma de Algodão da EPAMIG, utilizadas para estudos com marcadores microssatélites. Embrapa Algodão, Campina Grande-PB. 2005

Nº	Subamostra	Origem/Espécie* ou observação
1	4S 180	Grécia
2	ACALA 4-42-A	EUA
3	AUBURN FG 277	EUA / Brácteas “frêgo”
4	BJ 3129	EUA / Brink. – Johns resistente bact.
5	C25-6-79	EUA9
6	DENDERA	Egito / <i>G. barbadense</i>
7	DES 24-8	EUA
8	PEE DEE 695	EUA
9	GIZA 80	Egito / <i>G. barbadense</i>
10	SL 22-61131	Brasil / IPEACO
11	SL 24-82885	Brasil / IPEACO
12	SL 5(3-5600)	Brasil / IPEACO
13	SU 0450-8909	Brasil
14	T 277-13-2	EUA
15	T 295-1-1	EUA / Texas “race stock”, sel.
16	T 295-6-2	EUA / Texas “race stock”, sel.
17	T-7044	EUA / Progr. Melh. Shafter, Cal.
18	TAMCOT 788	EUA
19	TAMCOT SP 37	EUA
20	THORPE	EUA
21	TX CABUCS 1-81	EUA
22	TXCACES 1-81	EUA
23	TX CDPS 177	EUA
24	V 79-098	EUA / Linhag. Avanç. Oklahoma
25	V 79-109	EUA / Linhag. Avanç. Oklahoma
26	T-295	EUA / México / tex. Raça morrilli
27	COKER-310	EUA
28	STONEVILLE 213	EUA
29	STONEVILLE 7A	EUA
30	EMPIRE GRANDLES	Brasil (EUA) / Sem glândulas
31	BJ 3137	EUA / Brink. – Johns resistente bact.
32	T-277-2-6	EUA

**Tabela 2.** Sequências dos 37 oligonucleotídeos de microssatélites empregados para as 32 subamostras do banco de germoplasma

Nº	Locus SSR	Tamanho estimado do alelo (pb)	Composição do SSR	MgCl <sub>2</sub> (mM)
1	BNL 1064	145/153	(CA) <sub>13</sub>	3,00
2	BNL 3255	232/210	(GC) <sub>6</sub> AT(AC) <sub>13</sub>	2,50
3	BNL 3599-1	193/179	(TC) <sub>15</sub>	2,50
4	BNL 3599-2	216/212	(TC) <sub>15</sub>	2,50
5	BNL 3649	183/193	(TC) <sub>20</sub>	2,50
6	BNL 169	198/214	(GA) <sub>15</sub>	3,00
7	BNL 1053	194/176	(AC) <sub>16</sub>	3,00
8	BNL 3065	192/182	(AG) <sub>21</sub>	3,00
9	BNL 3279-1	126/108	(AG) <sub>15</sub>	2,50
10	BNL 3646	166/155	(TC) <sub>14</sub>	2,50
11	BNL 2553	196/200	(GA) <sub>10</sub>	2,50
12	BNL 3627	184/176	(TC) <sub>17</sub>	2,50
13	BNL 3034	158/174	(AG) <sub>12</sub>	2,50
14	BNL 1679	164/190	(AG) <sub>17</sub>	3,00
15	BNL 3955	171/195	(CA) <sub>12</sub>	2,50

16	BNL 2590	190/206	(AG) <sub>11</sub>	3,00
17	BNL 1414	138/128	(AG) <sub>16</sub>	3,00
18	BNL 3084	158/174	(GA) <sub>12</sub>	3,00
19	BNL 3971	146/122	(TC) <sub>15</sub>	2,50
20	BNL 2496	112/130	(GA) <sub>15</sub>	2,50
21	BNL 3147	165/155	(AG) <sub>11</sub>	3,00
22	BNL 2544	219/207	(AG) <sub>11</sub>	3,00
23	BNL 786	117/107	(AG) <sub>14</sub>	2,50
24	BNL 3359	212/218	(AG) <sub>16</sub>	2,50
25	BNL 3888	182/194	(TG) <sub>15</sub>	2,50
26	BNL 3279-2	248/256	(TC) <sub>6</sub> T(AC) <sub>15</sub> G(CA) <sub>2</sub>	2,50
27	BNL 3383	191/177	(AG) <sub>4</sub> AC(AG) <sub>10</sub>	2,50
28	BNL 2960	150/186	(GA) <sub>30</sub>	3,00
29	BNL 3995	171/195	(AC) <sub>14</sub>	3,25
30	BNL 3902	194/174	(GT) <sub>18</sub>	2,50
31	BNL 3563	230/248	(CA) <sub>13</sub> (TA) <sub>4</sub>	3,00
32	BNL 1721	188/176	(AG) <sub>17</sub>	2,50
33	BNL 3008	133/141	(GA) <sub>13</sub>	2,50
34	BNL 3558	216/212	(AC) <sub>11</sub>	2,50
35	BNL 1597	201/207	(GA) <sub>13</sub>	2,50
36	BNL 3482	140/146	(AC) <sub>12</sub>	2,50
37	BNL 3816	203/187	(TG) <sub>5</sub> TA(TG) <sub>15</sub>	2,50

A ciclagem foi obtida em termocicladores (Eppendorf-Mastercyher Gradient), onde inicialmente o DNA foi desnaturado a 95 °C por 12 minutos. Seguiram-se 47 ciclos de desnaturação - anelamento - extensão. Nos primeiros 11 ciclos de amplificação, a desnaturação foi feita a 94 °C por 15 segundos; a temperatura de anelamento, no primeiro ciclo foi de 65 °C por 30 segundos, sendo diminuída um grau a cada ciclo (*touch down*), chegando a 55 °C no décimo primeiro ciclo. Para a extensão utilizou-se temperatura de 72 °C por 1 minuto. Os trinta e seis ciclos restantes ocorreram à temperatura de 94 °C por 15 segundos; 55 °C por 30 segundos e 72 °C por 1 minuto. Seguiu-se extensão final a 72 °C por 6 minutos. Os fragmentos amplificados foram separados por eletroforese vertical em gel de poliacrilamida 6%, a 1.700 V por 3 horas, corados conforme procedimento proposto por Creste et al. (2001) e documentados em Scanner MK 300s TCE.

Para análise dos 35 *loci* de microssatélites utilizou-se o programa Genes versão 2005.6.1 (CRUZ, 2005). O número médio de alelos por *locus* foi obtido pela relação entre o número total de alelos e o número total de *loci*. A diversidade entre as subamostras foi calculada a partir da frequência alélica, ( $p_i$ ) da heterozigosidade esperada entre as subamostras e a distância genética.

A frequência alélica ( $p_i$ ) foi estimada pela expressão:  $p_{ij} = n_{ij} / n_j$ .

A heterozigosidade foi calculada para os 35 *loci* de cada população por meio da expressão:

$$H = 1 - \sum p_i^2$$

O conteúdo informativo de polimorfismo (PIC), que fornece uma estimativa do poder discriminatório de um marcador, sinônimo do termo diversidade gênica, foi calculado a partir da

$$\text{expressão: } PIC = 1 - \sum_i p_i^2 - \sum_j \sum_j p_i^2 p_j^2$$

Os valores de PIC variam de zero (monomórficos) a um (altamente discriminativo, com vários alelos). O índice de diversidade genética de Nei entre as 32 subamostras foi avaliado a partir das estimativas de similaridade ( $S_{ii'}$ ) entre todos os pares de subamostras ( $ii'$ ) que foram convertidas em medidas de dissimilaridades a partir do complemento aritmético ( $D_{ii'} = 1 - S_{ii'}$ ). O índice de similaridade foi obtido pela seguinte expressão:  $IS = (N + 2M)/2 (D + M)$ , onde, N = Soma dos alelos comuns considerando todos os *loci*; D = N° total de *loci*; e, M = N° de marcadores monomórficos homozigotos.

A partir das distâncias obtidas pelo índice de dissimilaridade, análises de agrupamento foram realizadas empregando-se o método hierárquico aglomerativo da média aritmética entre pares não ponderados (UPGMA) e o método hierárquico de Tocher. A partir da matriz de distância obtida pelo método de agrupamento UPGMA, efetuou-se a representação simplificada das distâncias por meio de um dendrograma, utilizando o Programa

NTSYS-pc (ROHLF, 1992). Para avaliar a consistência dos agrupamentos, análises de *bootstrap* foram calculadas, empregando-se 999 permutações.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

As 32 subamostras pertencentes ao Banco de germoplasma de algodão da EPAMIG, quando avaliadas através de 37 pares de oligonucleotídeos de microssatélites, apresentaram 95% de polimorfismo.

Os 37 *loci* de microssatélites amplificaram um total de 106 alelos, com uma média de 2,86 alelos por *locus* amplificados, distribuídos entre as 32 subamostras de algodão. Os oligonucleotídeos BNL 3482 e 3816 foram monomórficos para todas as subamostras, amplificando apenas um alelo por *locus*. Dos 35 oligonucleotídeos avaliados 17 amplificaram dois alelos (BNLs 1064, 3599-2, 3649, 3646, 2553, 1414, 3084, 2496, 3147, 2544, 3359, 3888, 3279-2, 3995, 3008, 3558 e 1597). O oligonucleotídeo BNL 3971 amplificou um total de sete alelos. Somente um alelo, em BNL 3279-2, mostrou uma frequência alta de 0,968 (Tabela 3).

**Tabela 3.** Número dos alelos, frequência e diversidade gênica dos 35 SSR *loci* das 32 subamostras de algodão

	<i>Locus</i>	Nº de alelos	Frequência dos alelos	Diversidade gênica
1	BNL 1064	2	0,062; 0,937	0,000
2	BNL 3255	3	0,625; 0,312; 0,062	0,023
3	BNL 3599-1	4	0,812; 0,062; 0,093; 0,031	0,000
4	BNL 3599-2	2	0,937; 0,062	0,000
5	BNL 3649	2	0,578; 0,421	0,011
6	BNL 169	6	0,062; 0,437; 0,031; 0,015; 0,437; 0,015	0,363
7	BNL 1053	3	0,527; 0,031; 0,453	0,363
8	BNL 3065	3	0,125; 0,812; 0,062	0,000
9	BNL 3279-1	4	0,453; 0,015; 0,500; 0,031	0,375
10	BNL 3646	2	0,906; 0,093	0,000
11	BNL 2553	2	0,062; 0,937	0,000
12	BNL 3627	3	0,937; 0,031; 0,031	0,023
13	BNL 3034	3	0,031; 0,593; 0,375	0,000
14	BNL 1679	3	0,031; 0,468; 0,500	0,375
15	BNL 3955	3	0,031; 0,937; 0,031	0,023
16	BNL 2590	4	0,016; 0,016; 0,306; 0,661	0,035
17	BNL 1414	2	0,937; 0,062	0,000
18	BNL 3084	2	0,937; 0,062	0,000
19	BNL 3971	7	0,031; 0,031; 0,062; 0,281; 0,140; 0,078; 0,375	0,375
20	BNL 2496	2	0,937; 0,062	0,000
21	BNL 3147	2	0,937; 0,062	0,000
22	BNL 2544	2	0,937; 0,062	0,000
23	BNL 786	6	0,046; 0,468; 0,265; 0,156; 0,031; 0,031	0,093
24	BNL 3359	2	0,937; 0,062	0,000
25	BNL 3888	2	0,062; 0,937	0,000
26	BNL 3279-2	2	0,968; 0,031	0,023
27	BNL 3383	3	0,937; 0,031; 0,031	0,000
28	BNL 2960	4	0,062; 0,781; 0,062; 0,093	0,000
29	BNL 3995	2	0,906; 0,093	0,000
30	BNL 3902	3	0,343; 0,593; 0,062	0,000
31	BNL 3563	3	0,015; 0,562; 0,421	0,328
32	BNL 1721	5	0,062; 0,531; 0,187; 0,156; 0,062	0,000
33	BNL 3008	2	0,062; 0,937	0,000
34	BNL 3558	2	0,437; 0,562	0,000
35	BNL 1597	2	0,062; 0,937	0,000
36	BNL 3482	1	-	-
37	BNL 3816	1	-	-

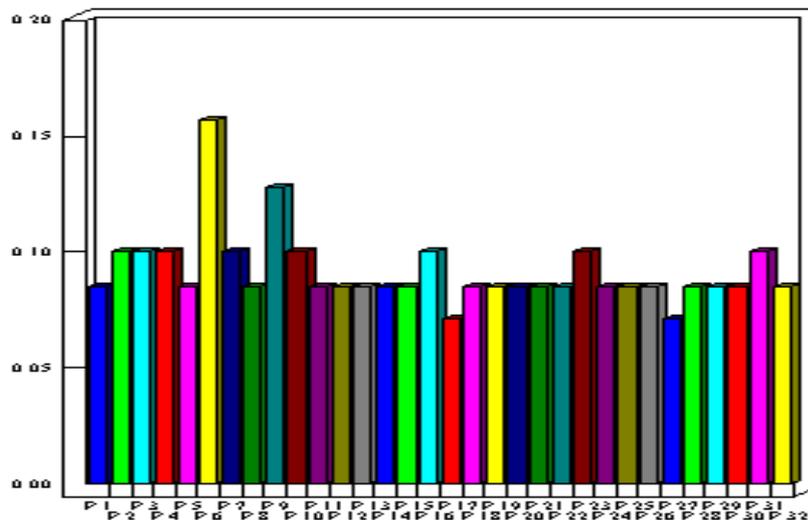
A avaliação da diversidade genética entre as subamostras do Banco de Germoplasma de Algodão da EPAMIG, por meio de marcadores moleculares SSR, mostrou a formação de grupos próximos, o que deve ter sido ocasionado principalmente pelo grande número de subamostras que foram originadas de programas de melhoramento.

Os resultados obtidos neste trabalho são compatíveis com os apresentados por Liu et al. (2000), que avaliando a diversidade genética de subamostras de algodão, a partir da utilização de 56 pares de oligonucleotídeos da série BNL, verificaram a amplificação de 62 *loci* polimórficos, sendo que destes, um total de 325 alelos foram amplificados, com média de cinco por marcador. Da mesma forma, Moiana et al. (2012) buscando identificar a diversidade genética e a estrutura populacional de 43 cultivares e linhagens de algodão, observaram que dos 33 marcadores SSRs utilizados, 15 apresentaram a amplificação de 104 alelos polimórficos. No entanto, Menezes et al. (2008) estudando 65 linhagens e 4 genótipos de algodão, verificaram que apenas 9 dos 19 pares de iniciadores SSR utilizados apresentaram polimorfismo, sendo que cada iniciador amplificou apenas um loco, sendo o número de alelos produzidos nos locos polimórficos igual a 2. Já Rakshit et al. (2010) verificaram que dos 177 iniciadores SSR testados, apenas quatro detectaram

algum tipo de polimorfismo entre as linhagens avaliadas.

Marcadores microssatélites têm sido muito utilizados para a caracterização de várias espécies, devido suas vantagens em relação a outros marcadores, como RFLPs, RAPDs e AFLPs (KALIA et al, 2011). Os *loci* de microssatélites são multialélicos, amplificando, em média, de um a sete alelos por *locus* (MENEZES et al., 2008; MUZZALUPO et al., 2009; CRUZ et al., 2009; MOIANA et al., 2012). Chiba et al. (2003) estudando 12 variedades de melão, detectaram cerca de três alelos por *locus* para 28 *loci* de microssatélites. Em variedades de pimenta, Kwon et al. (2005) observaram um número médio de alelos amplificados por *locus* de 3,3 para 27 *loci* polimórficos avaliados, amplificando de dois a sete alelos por marcador.

A taxa de heterozigosidade média determinada pelo índice de diversidade de Nei entre as subamostras de algodão é demonstrada na Figura 1. A maior taxa de heterozigosidade (0,15) foi obtida para a subamostra Dendera, seguido pela subamostra Giza 80 (0,12). As menores taxas de (0,05) foram observadas para as subamostras T-7044 e Coker-310. A maioria das subamostras apresentaram heterozigosidade de 0,085, correspondendo a um nível baixo de diversidade genética.



**Figura 1.** Heterozigosidade média das 32 subamostras (P) de algodão avaliadas com 35 marcadores microssatélites.

A baixa taxa de heterozigosidade determinada entre as subamostras de algodão do BGA EPAMIG pode ser determinada pelo alto índice de parentesco entre as subamostras. Segundo Queiroz et al. (2000) a endogamia resulta do

acasamento de indivíduos aparentados, sendo capaz de alterar a constituição genética da população. Isto se dá por meio do aumento da homozigose e, conseqüentemente, da diminuição da heterozigose, alterando assim, a frequência

genotípica, mas não as frequências gênicas. Em plantas como o algodão que apresentam sistema misto de reprodução, diferentes coeficientes de endogamia são encontrados devido a variações nas taxas de autofecundação natural (PEDROSA, 2005).

Os valores do conteúdo informativo de polimorfismo (PIC) refletem a diversidade e a

frequência alélica entre variedades, medindo a diversidade de cada marcador. A média dos valores de PIC dos 35 *loci* de marcadores de microssatélites foi de 0,068 com oscilação de 0 a 0,375. Entre os 35 *loci* de microssatélites, 22 apresentaram PIC igual à zero. Os marcadores mais informativos foram BNLs 169, 1053, 3279, 1679, 3971 e 3563 (Tabela 4).

**Tabela 4.** Conteúdo informativo de polimorfismo (PIC) avaliado para os 35 *loci* de microssatélites entre os 32 acessos de algodão

Nº	<i>Loci</i>	PIC	Nº	<i>Loci</i>	PIC
1	BNL 1064	0,000	19	BNL 3971	0,375
2	BNL 3255	0,023	20	BNL 2496	0,000
3	BNL 3599-1	0,000	21	BNL 3147	0,000
4	BNL 3599-2	0,000	22	BNL 2544	0,000
5	BNL 3649	0,011	23	BNL 786	0,093
6	BNL 169	0,363	24	BNL 3359	0,000
7	BNL 1053	0,363	25	BNL 3888	0,000
8	BNL 3065	0,000	26	BNL 3279	0,023
9	BNL 3279	0,375	27	BNL 3383	0,000
10	BNL 3646	0,000	28	BNL 2960	0,000
11	BNL 2553	0,000	29	BNL 3995	0,000
12	BNL 3627	0,023	30	BNL 3902	0,000
13	BNL 3034	0,000	31	BNL 3563	0,328
14	BNL 1679	0,375	32	BNL 1721	0,000
15	BNL 3955	0,023	33	BNL 3008	0,000
16	BNL 2590	0,035	34	BNL 3558	0,000
17	BNL 1414	0,000	35	BNL 1597	0,000
18	BNL 3084	0,000	Média		0,068

Os valores PIC determinam a diversidade entre as subamostras, detectando alelos heterozigotos existentes nas amostras avaliadas. Os valores determinados de PIC (Tabela 4) demonstram baixa distribuição dos alelos nas amostras avaliadas. Azmat e Khan (2010), analisando a diversidade genética de 25 variedades de algodão através do uso de marcadores SSRs, encontraram valores de PIC entre 0,000 e 0,744. Folkertsma et al. (2005) identificaram 100 subamostras de *Sorghum bicolor* L. de uma coleção de 293, através da utilização de 21 oligonucleotídeos desenvolvidos para esta espécie. O valor do PIC, para estes 21 marcadores, apresentou média de 0,44, sendo o valor mínimo de conteúdo informativo de 0,06 e o máximo de 0,81. Em milho, dos 215 pares de marcadores de microssatélites, 50 apresentaram-se bem distribuídos entre os dez cromossomos avaliados para a cultura, amplificando um total de 262 alelos, sendo os valores de PIC entre 0,24 a 0,90 com média de 0,61 de conteúdo informativo (LABORDA et al., 2005).

Liu et al. (2000) avaliando o conteúdo informativo de subamostras de algodão através do uso de 62 marcadores microssatélites da série BNL,

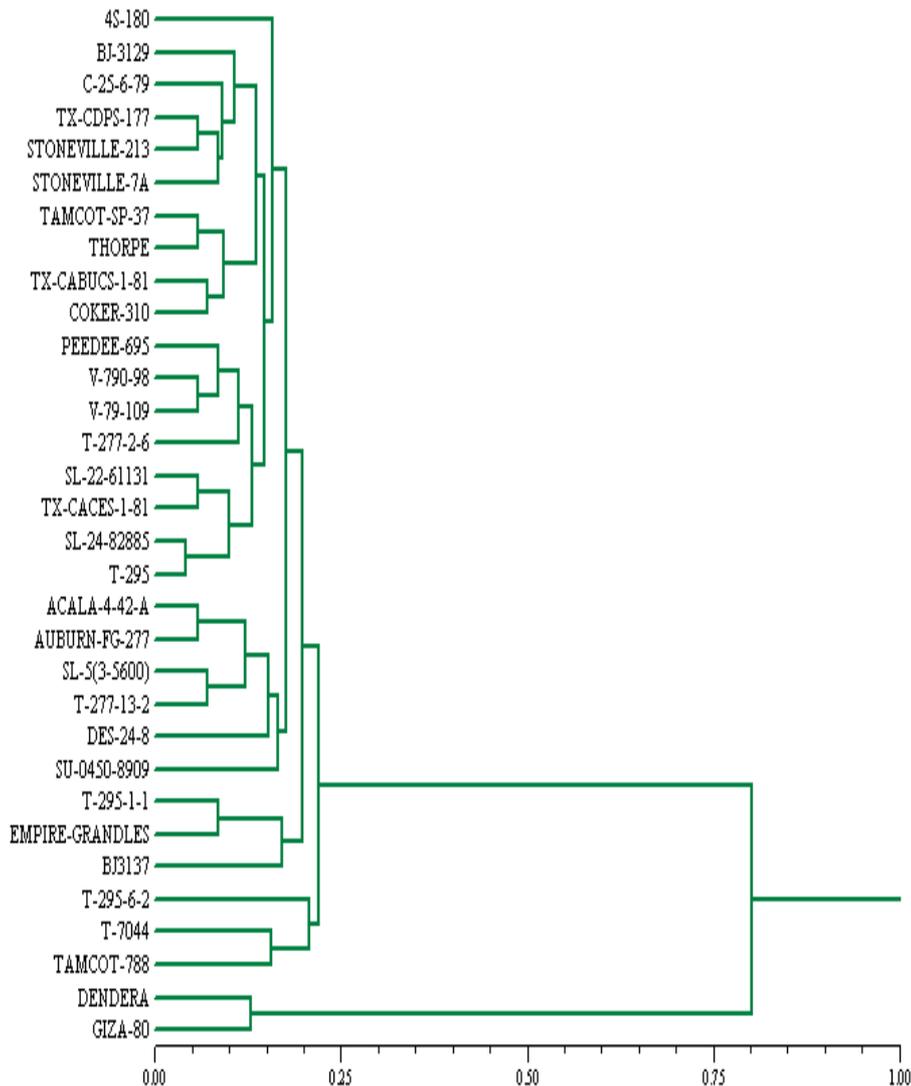
observaram média de 0,31, com valores mínimos de 0,05 e máximo de 0,85, sendo os oligonucleotídeos mais informativos os: BNLs 2572 (0,76), 1053 (0,71), 1721 (0,74) e 3649 (0,85). Diferentemente do observado por Liu et al., apenas o oligonucleotídeo BNL 1053 (Tabela 4) encontra-se entre os que tiveram maiores valores de PIC para as subamostras do BGA da EPAMIG determinados neste estudo.

A partir das estimativas de dissimilaridade, a maior distância genética foi verificada entre as subamostras Giza 80 e T-7044 (0,88), e a menor distância (0,042) entre as SL 24-82885 e a T-295.

A partir da matriz de distância, o dendrograma foi obtido aplicando-se o método aglomerativo da UPGMA. A consistência do agrupamento foi avaliada a partir de análises de *bootstrap*, efetuando-se 1000 permutações, gerando o dendrograma consenso entre as subamostras estudadas (Figura 2). A análise de agrupamento pelo método UPGMA apresentou um ajuste de correlação cofenética de 0,98 com os dados originais, indicando que o agrupamento obtido é representativo dos dados.

O dendrograma obtido a partir da matriz de dissimilaridade de dados pelo método aglomerativo UPGMA apresentou a formação de nove grupos, sendo o primeiro formado pelas subamostras Dendera e Giza-80, ambas de origem Egípcia / *G. barbadense*. A subamostra mais distante em relação

à Dendera e Giza-80 foi a subamostra 4S-180 originária da Grécia, a qual constituiu isoladamente um grupo em relação às demais subamostras. A tendência de agrupamento das demais subamostras, no geral, ocorreu de acordo com as suas origens (Figura 2).



**Figura 2.** Dendrograma obtido pelo método aglomerativo UPGMA, relacionando os 32 acessos de algodão baseado na informação de 35 *loci* de microssatélites.

A partir do agrupamento utilizando-se o método de Tocher, também se verificou a formação de nove grupos (Tabela 5). Coincidentemente, dá mesma forma como observado para o método UPGMA, verificou-se a formação de um grupo (4) composto pelas subamostras Dendera e Giza-80. No entanto, pelo método de Tocher, o grupo 1 foi formado pela maioria das subamostras, as quais pelo método de agrupamento UPGMA encontram-se distribuídas em vários grupos.

O sucesso em programas de melhoramento vegetal reside na existência de variabilidade na população que se deseja estudar. A divergência genética pode ser avaliada a partir de caracteres moleculares, agronômicos e morfológicos, onde informações múltiplas de cada subamostra podem ser expressas em medidas de dissimilaridade, que representam a diversidade existente no conjunto de subamostras estudadas (CRUZ; CARNEIRO, 2003). Embora os dados morfológicos e agronômicos

sejam de grande importância para avaliar a diversidade genética em determinado estudo, estes devem ser interpretados com cautela, devido a

possíveis efeitos ambientais (interações genótipo-ambiente).

**Tabela 5.** Agrupamento obtido pelo método de Tocher das subamostras avaliadas por marcadores microssatélites

Grupos	Acessos
1	SL 24-82885 (11), T-295 (26), SL 22-61131 (10), TXCACES 1-81 (22), PEE DEE 695 (8), TAMCOT SP 37 (19), V-79-109 (25), THORPE (20), TX CABUCS 1-81 (21), TX CDPS 177 (23), STONEVILLE 213 (28), STONEVILLE 7A (29), C25-6-79 (5), T-277-2-6 (32), COKER-310 (27), 4S 180 (1) e AUBURN FG 277 (3).
2	ACALA 4-42-A (2), T-277-13-2 (14), SL 5(3-5600) (12), T-295-1-1 (15) e SU 0450-8909 (13)
3	EMPIRE GRANDLES (30) e BJ 3137 (31)
4	DENDERA (6) E GIZA 80 (9)
5	T-7044 (17) e TAMCOT 788 (18)
6	BJ 3129 (4)
7	T-295-6-2 (16)
8	V-79-098 (24)
9	DES 24-8 (7)

A caracterização por métodos moleculares tem sido ultimamente utilizada nos estudos de diversidade (AGARWAL et al., 2008; MALEIA et al. 2010; KALIA et al., 2011; MOIANA et al., 2012) pois as sequências de DNA e proteínas são estritamente herdáveis, o que nem sempre ocorre para muitos dos caracteres morfológicos. Segundo Borém e Caixeta (2006), dados moleculares são mais receptivos a tratamentos quantitativos que os morfológicos, já que teorias matemáticas e estatísticas mais sofisticadas estão desenvolvidas para análises de sequências de DNA, enquanto que estudos morfológicos são baseados em sua essência nas argumentações qualitativas.

O trabalho de caracterização agrônômica por meio de descritores associados aos componentes de produção e de fibras realizado por Carvalho et al. (2003), detectou grande variabilidade genética, entre as 221 subamostras, sendo estas agrupadas em 10 grupos distintos. No estudo de Carvalho et al. a maior distância euclidiana obtida foi de 4,36 entre as subamostras S8186 e T-295-1-1, sendo a menor distância (0,25) entre as subamostras TX CACES 1-81 e TX CDPS 177. Com a utilização de marcadores moleculares microssatélites (SSR), dentre as 32 subamostras, as quais também foram avaliadas agronomicamente por Carvalho et al., verificou-se a formação de 9 grupos, sendo a maior distância obtida entre as subamostras Giza-80 e T-7044 (0,88) e a menor distância entre as subamostras SL 24-82885 e T-295 (0,042).

Em comparação aos resultados obtidos por Carvalho et al. (2003) e os apresentados neste trabalho, pode-se inferir que a diversidade genética obtida por meio de marcadores moleculares SSR é mais minuciosa e precisa na formação de grupos. Isso porque, os marcadores moleculares são menos influenciados a variações de forma geral, o que a torna uma importante ferramenta em estudos de variabilidade genética entre subamostras, eliminando-se possíveis clones de subamostras e permitindo uma melhor seleção de genótipos mais estáveis para serem utilizados em programas de melhoramento.

## CONCLUSÕES

Agrupamentos realizados por marcadores moleculares microssatélites (SSR) foram diferentes dos obtidos a partir das análises realizadas por descritores agrônômicos;

As subamostras Dendera e Giza 80, quando avaliadas por marcadores moleculares, foram as que apresentaram maior diversidade genética;

A diversidade genética obtida por meio de marcadores moleculares SSR é mais minuciosa e precisa na formação de grupos, podendo ser utilizada com mais precisão para a avaliação da diversidade genética de subamostras de bancos de germoplasma.

**ABSTRACT:** The use of microsatellite molecular markers or SRS (Simple Repetitive Sequence) has proved to be an excellent technique for cultivar identification, genealogical analysis and genetic distance between organisms. The knowledge of genetic diversity among groups of parents through the use of molecular markers has allowed establishing differences among accessions of cotton, facilitating the selection of parents to be used in breeding programs. The study aimed to assess the genetic diversity among accessions from the germplasm bank Cotton Research Company of Minas Gerais (EPAMIG) using SRS markers. The 37 primers from BNL series amplified a total of 106 alleles. An average of 2.86 alleles per locus was detected with average polymorphism information content (PIC) of 0.068. The highest rate of heterozygosity (0.15) was obtained for access Dendera and (0.12) for Giza 80. The lowest rates of heterozygosity (0.05) were observed for the accessions Coker T-7044-310. From the Nei's dissimilarity estimation the largest genetic distance was observed between Giza 80 and T-7044 (0.88), and the shortest distance (0.042) between accessions 24-82885 SL and T-295. The dendrogram generated showed the formation of nine distinct groups, accesses Giza 80 and Dendera were the most divergent among all studied.

**KEYWORDS:** *Gossypium* sp. Nei's dissimilarity. SRS. Genetic variability.

---

## REFERÊNCIAS

- AGARWAL, M.; SHRIVASTAVA, N.; PADH, H. Advances in molecular marker techniques and their applications in plant science. *Plant Cell Reports*, Heidelberg, v. 27, p. 617-631, 2008.
- AMORIM, E. P.; REIS, R. V.; AMORIM, V. B. O.; SANTOSSEREJO, J. A.; SILVA, S. O. Variabilidade genética estimada entre diplóides de banana por meio de marcadores microssatélites. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 43, n. 8 p. 1045-1052, 2008.
- BORÉM, Aloízio; CAIXETA, Eveline Teixeira. Marcadores moleculares. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa: UFV, 2006. 374 p.
- CARVALHO, L. P.; LANZA, M. A.; FALLIER, J.; SANTOS, J. W. Análise da diversidade genética entre acessos de banco ativo de germoplasma de algodão. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 38, n. 10, p. 1149-1155, 2003.
- CEDRONI, M. L.; CRONN, R. C.; ADAMS, K. L.; WILKINS, T. A.; WENDEL J. F. Evolution and expression of MYB genes in diploid and polyploidy cotton. *Plant Molecular Biology*, Zurich, v. 51, p. 313-325, 2003.
- CHIBA, N.; SUWABE, K.; NUNOME., T.; HIRAI, M. Development of microsatellite markers in melon (*Cucumis melo* L.) and their application to major Cucurbit crops. *Breeding Science*, Tokyo, v. 53, p. 21-27, 2003.
- COLLARD, B. C. Y.; JAHUFER, A. W. F. BROWER, J. B.; PANG, E. C. K. An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: basic concepts. *Euphytica*, Dordrecht, v. 142, p. 169-196, 2005.
- CRESTE, S.; TULMANN, A.; FIGUEIRA, A. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. *Plant Molecular Biology Reporter*, New York, v. 19, p. 299-306, 2001.
- CRUZ, Cosme Damião. Programa GENES – Versão Windows 2005.6.1. Universidade Federal de Viçosa, 2005. Disponível em: <http://www.ufv.com.br>.
- CRUZ, Cosme Damião; CARNEIRO, Pedro Crescêncio de Souza. Modelos Biométricos aplicados ao melhoramento genético. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa: UFV, 2003. 585 p.

CRUZ, M. F. A.; MACIEL, J. L. N.; PRESTES, A. M.; BOMBONATTO, E. A. S.; PEREIRA, J. F.; CONSOLI, L. Caracterização genética e fenotípica de isolados de *Pyricularia grisea* do TRIGO. Tropical Plant Pathology, Brasília, v. 53, n. 6, p. 393-401, 2009.

FERREIRA, F. R. A.; CLOVIS, L. R.; SCAPIM, C. A.; SENHORINHO, A. C.; ROMANI, I.; BOLSON, E. Análise de diversidade genética de linhagens de milho tropical e temperado por marcados microssatélites. In: Anais do XXIX Congresso Nacional de Milho e Sorgo. Águas de Lindóia, 67-74 p, 2012.

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

FOLKERTSMA, R. T.; RATTUNDE, H. F. W.; CHANDRA, S.; RAJU, G. S.; HASH, C. T. The pattern of genetic diversity o Guinea-rice *Sorghum bicolor* (L.) Moench landraces as revealed with SSR markers. Theoretical and Applied Genetics, Heidelberg, v. 111, n. 3, p. 399-409, 2005.

HAN, Z.; WANG, C.; GUO, X. S. W.; GOU, J.; ZHANG, C. L. X. C.; ZHANG, T. Characteristics, development and mapping of *Gossypium hirsutum* derived EST-SSRs in allotetraploid cotton. Theoretical and Applied Genetics, Heidelberg, v. 112, n. 3, p. 430-439, 2006.

KALIA, R. K.; RAÍ, M. K.; KALIA, S.; DHAWAN, A. K. Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants. Euphytica, Dordrecht, v. 177, p. 309-334, 2011.

KWON, Y. S.; LEE, J. M.; YI, G. B.; YI, S. I.; KIM, K. M.; SOH, E. H.; BAE, K. M.; PARK, E. K.; SONG, I. H.; KIM, B. D. Use of SSR markers to complement tests of Distinctiveness, uniformity, and stability (DUS) of pepper (*Capsicum annuum* L.) varieties. Molecules and Cells, Dordrecht, v. 19, n. 3, p. 428-435, 2005.

LABORDA, P. R.; OLIVEIRA, K. M.; GARCIA, A. A. F.; PATERNIANI, M. E. A. G. Z.; SOUZA, A. P. Tropical maize germplasm: what can we say about its genetic diversity in the light of molecular markers. Theoretical and Applied Genetics, Heidelberg, v. 111, p. 1288-1299, 2005.

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

LIN, Z.; YUAN, D.; ZHANG, X. Mapped SSR markers unevenly distributed on the cotton chromosomes. Frontiers of Agriculture in China, China, v. 4, p. 257-264, 2010.

LIU, S.; SAHA, S.; STELLY, D.; BURR, B.; CANTRELL, R. G. Chromosomal assignment of microsatellite loci in cotton. Journal Hereditaria, v.91, n. 4, p.326-332, 2000.

MALEIA, M. P.; VIDIGAL FILHO, P. S.; GONELA, A.; LACANALLO, G. F.; MOIANA, L. D.; CHAMUENE, A.; SOUSA, L. L.; DARBEN, L. M. Genetic divergence among african and american cotton (*Gossypium hirsutum* L. race *latifolium* H.) cultivars inbred lines through random amplification of polymorphic DNA (RAPD) markers. African Journal of Biotechnology, Grahamstown, v. 9, p. 8539-8548, 2010.

MENEZES, I. P. P.; HOFFMANN, L. V.; ALVES, M. F.; MORELLO, C. L.; BARROSO, P. A. V. Distância genética entre linhagens avançadas de germoplasma de algodão com uso de marcadores de RAPD e microssatélites. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v. 43, n. 10, p.1339-1347, 2008.

MOIANA, L. D.; VIDIGAL FILHO, P. S.; GONÇALVES VIDIGAL, M. C.; LACANALLO, G. F.; GALVÁN, M. Z.; CARVALHO, L. P.; MALEIA, M. P.; PACHECO, C. M.; RIBEIRO, T.; ZENI NETO, H.; COIMBRA, G. K. Genetic diversity and populations structure of cotton (*Gossypium hirsutum* L. race *latifolium* H.) using microsatellite markers. African Journal of Biotechnology, v. 54, n. 11, p. 11640-11647, 2012.

MUZZALUPO, I.; STEFANIZZI, F.; SALIMONTI, A. FALABELLA, R.; PERRI, E. Microsatellite markers for identification of a group of italian olive accessions. *Scientia Agricola*, Piracicaba, v. 66, n. 5, p. 685-690, 2009.

PEDROSA, Murilo Barros. Potencial genético para seleção de uma população de algodoeiro de fibra colorida. 2005. 75 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Curso de Pós-graduação em Fitotecnia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2005.

QUEIROZ, S. A. Efeito da endogamia sobre características de crescimento de bovinos da raça gir no Brasil. *Revista Brasileira de Zootecnia*, Viçosa, v. 29, n. 4, p. 1014-1019, 2000.

RAKSHIT A.; RAKSHIT, S.; SINGH, J.; CHOPRA, S. K.; BALYAN, H. S.; GUPTA, P. K.; BAHAT, S. R. Association of AFLP and SSR markers with agronomic and fibre quality traits in *Gossypium hirsutum* L. *Journal of Genetics*, Dehli, v. 89, n. 2, p. 155-162, 2010.

ROHLF, F. James Software NTSYS-pc: Numerical taxonomy and multivariate analysis system. version 1.10. New York: Exeter Software, 1992. 470p.

STICH, B.; MELCHINGER, A. E.; FRISCH, M.; MAURER, H. P.; HECKENBERGER, M.; REIF, J. C. Linkage disequilibrium in European elite maize germplasm investigated with SSRs. *Theoretical and Applied Genetics*, Heidelberg, v. 111, n. 4, p. 723-730, 2005.

ZHANG, H. B.; LI, Y. N.; WANG, B. H.; CHEE, P. W. Recent advances in cotton genomics. *International Journal of Plant Genomics*, New York, 2008. 20p.