

Romero de Lima Sousa

**AVALIAÇÃO DE COMPETIÇÃO ENTRE PÓLEN NAS
ESPÉCIES DE ALGODOEIROS *Gossypium hirsutum* L. e *G.
mustelinum* (Miers) Watt.**

Recife - PE

2010

Romero de Lima Sousa

**AVALIAÇÃO DE COMPETIÇÃO ENTRE PÓLEN NAS
ESPÉCIES DE ALGODOEIROS *Gossypium hirsutum* L. e *G.
mustelinum* (Miers) Watt.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Agronomia – Melhoramento Genético de Plantas – da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Agronomia, área de concentração em Melhoramento Genético de Plantas.

ORIENTADOR:

Prof. DSc. Edson Ferreira da Silva – DB/UFRPE.

CO-ORIENTADOR:

DSc. Paulo Augusto Vianna Barroso – Embrapa Algodão.

Recife - PE

2010

**AVALIAÇÃO DE COMPETIÇÃO ENTRE PÓLEN NAS
ESPÉCIES DE ALGODOEIROS *Gossypium hirsutum* L. e *G.
mustelinum* (Miers) Watt.**

Romero de Lima Sousa

Dissertação defendida e aprovada pela banca examinadora em: ____/____/____

ORIENTADOR:

Prof. DSc. Edson Ferreira da Silva – DB/UFRPE.

EXAMINADORES:

DSc.^a Marleide Magalhães de Andrade Lima – Embrapa Algodão.

Prof.^a DSc.^a Luiza Suely Semen Martins – DB/UFRPE.

Prof. DSc. Martin Alejandro Montes – DB/UFRPE.

Dedico a Deus que sempre ilumina os meus caminhos. Aos meus pais, Maria José e João Gonçalves, minha família e amigos, pessoas que sempre estão ao meu lado em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

Ao meu Deus, por me guiar e iluminar durante toda minha vida, mostrando o caminho correto a seguir e protegendo todas as minhas conquistas.

À minha mãe, Maria José, pelo seu amor incondicional, por ter acreditado em mim e me apoiado em todos os momentos de alegria, tristeza e angústia.

Às minhas amigas Jaislanny e Marina, minha família em Recife (PE), que sempre levarei dentro do meu coração. Agradeço-lhes pelos ensinamentos e pela paciência. Com vocês, vivenciei muitos momentos felizes que jamais esquecerei. Obrigado minhas irmãs!

Ao Programa de Pós-graduação em Agronomia – Melhoramento Genético de Plantas, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, pela oportunidade da realização do curso de mestrado.

Ao meu orientador DSc. Edson Ferreira da Silva, pelos conhecimentos passados, sugestões, paciência, conselhos, compreensão, reclamações e amizade. Aqui manifesto a minha admiração pela pessoa e profissional que me orientou. Pessoa sempre disposta a ajudar e a compartilhar todo o seu conhecimento.

Ao meu coorientador DSc. Paulo Augusto Vianna Barroso, pela compreensão e voto de confiança dado a mim. Aos ensinamentos transmitidos, paciência, sábios conselhos, valiosa orientação, generosidade em dispor toda a sua estrutura para realização deste trabalho. Aqui registro toda minha gratidão e admiração.

Ao Centro Nacional de Pesquisa de Algodão (CNPQ) da Embrapa, por disponibilizar toda a estrutura necessária para realização deste trabalho, sem a qual o mesmo não seria realizado.

Aos professores do Curso de Mestrado em Melhoramento Genético de Plantas, em especial aos docentes: Gerson Quirino, Clodoaldo da Anunciação e Francisco Oliveira, pelos conhecimentos e experiências transmitidas, pelo grande exemplo de profissionais dedicados, por acreditar no potencial de cada discente, motivação e amizade.

Aos coordenadores do Curso de Mestrado Prof. DSc. Dimas Menezes e Prof.^a DSc.^a Vivian Loges, pelo trabalho para crescimento do curso e ensinamentos ministrados.

Aos colegas e amigos do mestrado: Jaqueline, João, Júlio, Kaliny, Lucas, Manuela, Morganna, Isabel, Paula, Rômulo e Silvany, em especial Eva, minha amiga de todos os momentos.

Aos amigos companheiros do laboratório da Embrapa Algodão: Uiara, Maria Aparecida, Monalisa, Raissa, Milena, Tiago, Rodolfo, Fabio, Morgana, Vanessa, Valeska, e Ivandilson.

Aos Funcionários da Embrapa Algodão: Francisco Alves, Fábria Lima, Joabson Araujo e Arroxelas Filho, pelos ensinamentos e amizade.

À Bernadete, secretaria do curso de Mestrado, pela amizade e disposição sempre que foi necessária.

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

Aos membros constituintes da Banca Examinadora: DSc.^a Marleide Magalhães, DSc.^a Luiza Suely e DSc. Martin Alejandro por aceitarem o convite de participação na Defesa da Dissertação.

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

A todos meu eterno agradecimento!

*“Um sonho, sonhado sozinho, é um sonho. Um sonho,
sonhado junto, é realidade”*

Edward Schillebeeckx

SUMÁRIO

	PÁGINA
Lista de Figuras	IX
Lista de Tabelas	X
Resumo	XI
Abstract	XII
Capítulo I - Revisão Bibliográfica	14
1 Introdução geral	15
2 O gênero <i>Gossypium</i>	18
2.1 A espécie <i>Gossypium hirsutum</i> L.	19
2.2 A espécie <i>Gossypium mustelinum</i> (Miers) Watt.	20
3 Fluxo gênico	21
4 Competição de pólen	23
5 Aplicações de marcadores moleculares	25
Referências Bibliográficas	28
Capítulo II - Avaliação de competição entre pólen nas espécies de algodoeiros <i>Gossypium hirsutum</i> L. e <i>G. mustelinum</i> (Miers) Watt.	37
Resumo	38
Abstract	39
Introdução	39
Material e Métodos	42
Resultados e Discussão	44
Conclusões	47
Agradecimentos	48
Referências Bibliográficas	48
Anexo	56

LISTA DE FIGURAS

CAPITULO I	PÁGINA
Figura 1: Mapa com os municípios da região Nordeste onde ocorrem as populações de <i>G. mustelinum</i> . Adaptado de Freitas (2009).	16
Figura 2: Características morfológicas da espécie <i>Gossypium mustelinum</i> . (A) Representante da espécie, (B) folha, (C) flor, (D) pólen, (E) capulho, (F) fibra, (G) línter. Adaptado Alves (2009) e Freitas (2009).	21
CAPITULO II	PÁGINA
Figura1: Representação de alguns indivíduos analisados pelo primer CIR 222, mostrando o padrão polimórfico para mistura de pólen 50% <i>G. hirsutum</i> e 50% <i>G. mustelinum</i> . P: Genitores; P ₁ : <i>G. mustelinum</i> receptor de pólen; P ₂ : <i>G. mustelinum</i> doador de pólen; P ₃ : <i>G. hirsutum</i> doador de pólen; P ₄ : Repetição do genótipo de <i>G. hirsutum</i> ; D: Sementes do cruzamento; X: Controle (híbrido entre <i>G. mustelinum</i> e <i>G. hirsutum</i>); Z: Sementes híbridas.	55
Figura 2. Regressão da proporção de descendentes não híbridos em função da proporção de pólen.	55

LISTA DE TABELAS

CAPITULO II	PÁGINA
Tabela 1. Acessos das espécies <i>G. mustelinum</i> e <i>G. hirsutum</i> utilizados em polinização controlada, porcentagem de pólen utilizado, número de híbridos obtidos e número de sementes produzidas.	51
Tabela 2. Pares de primers SSR utilizados para amplificar marcadores moleculares em algodoeiro, desenvolvidos por Nguyen et al. (2004), tamanho esperado, temperatura de anelamento e motivo.	53
Tabela 3. Teste do χ^2 para as diferentes proporções de grãos de pólen utilizados nos cruzamentos das espécies <i>G. mustelinum</i> e <i>G. hirsutum</i> .	54
Tabela 4. Variáveis obtidas em relação ao número médio de sementes para as quatro proporções de pólen utilizadas nos cruzamentos entre as espécies <i>G. mustelinum</i> e <i>G. hirsutum</i> .	54

AVALIAÇÃO DE COMPETIÇÃO ENTRE PÓLEN NAS ESPÉCIES DE ALGODOEIROS *Gossypium hirsutum* L. e *G. mustelinum* (Miers) Watt.

Resumo

O Nordeste brasileiro é o centro de origem do algodão *Gossypium mustelinum* (Miers) Watt. Esta espécie ainda não foi melhorada ou explorado comercialmente, entretanto há evidências de sua introgressão no genoma das variedades de algodoeiro herbáceo *G. hirsutum* L. variedade *marie galante* Hutch. Ao considerar a perda de variabilidade pode-se afirmar que *G. mustelinum*, *G. barbadense* L. e *G. hirsutum* L. variedade *marie galante* Hutch estão com risco de extinção muito alto, alto e médio, respectivamente, necessitando de esforços imediatos para sua preservação. Este trabalho tem por finalidade verificar se há competição de pólen entre *G. mustelinum* e herbáceo em relação à fertilização da espécie silvestre, bem como se há diferença de competição em diferentes proporções de polens das referidas espécies. Para tanto, foram realizados cruzamentos entre as duas espécies, utilizado o *G. mustelinum* como genitor feminino tendo sido fecundado por pólen de: i) mistura de 50% herbáceo e 50% de *G. mustelinum*; ii) mistura de 75% herbáceo e 25% de *G. mustelinum*; iii) mistura de 25% herbáceo e 75% de *G. mustelinum*; iv) herbáceo e v) *G. mustelinum*. Estes dois últimos foram utilizados como controle para saber o padrão da expressão dos alelos nos géis de poliacrilamida e validar os cruzamentos com misturas de pólen. Foram obtidas sementes provenientes de cada cruzamento. Na análise molecular foi determinada a proporção de sementes provenientes de cruzamentos inter e intraespecíficos por meio da genotipagem com marcadores do tipo SSR. A frequência de descendentes em cada proporção de pólen usada no cruzamento foi comparada por meio de teste estatístico do qui-quadrado (χ^2), com frequência esperada de: 50% de sementes híbridas e 50% de sementes oriundas de autofecundação; 75% de sementes híbridas e 25% de sementes de autofecundação; 25% de sementes híbridas e 75% de sementes de autofecundação. Foram polinizadas entre dez e 42 flores nos cruzamentos com mistura de pólen. O número médio de sementes obtidas variou entre nove e 11. Comparando-se tais valores com o número médio de sementes provenientes do cruzamento com 100% de pólen das respectivas espécies, verificou-se que houve pouca variação. Não foi verificada diferenças de fertilidade ou de cruzabilidade entre os genótipos de *G. mustelinum*. Os únicos genitores masculinos nos cruzamentos que não obtiveram sementes foram o C27 e Mac 01, fato este ocasionado possivelmente por condições fisiológicas desfavoráveis. Por intermédio dos dados pode-se constatar que quanto maior a

porcentagem de pólen de *G. hirsutum*, maior tendência de híbridos entre as duas espécies. Consequentemente, quanto maior a porcentagem de pólen de *G. mustelinum*, menor a quantidade de híbridos. Após análise dos resultados obtidos pelo teste de qui-quadrado (χ^2), a 1% de probabilidade, foi possível constatar que houve competição entre pólen da espécie silvestre e cultivada em todos os níveis estudados.

Palavras Chave: Hibridação, fluxo gênico, marcadores SSR.

ASSESSMENT POLEN COMPETITION BETWEEN SPECIES IN COTTON *Gossypium hirsutum* L. and *G. mustelinum* (Miers) Watt.

Abstract

The Brazilian Northeast is the center of origin of cotton *Gossypium mustelinum* (Miers) Watt. This cotton has not been improved or exploited commercially, but there is evidence of their introgression into the genome of varieties of upland cotton *G. hirsutum* L. variety *marie galante* Hutch. When considering the loss of variability can be said that *G. mustelinum*, *G. barbadense* L. and *G. hirsutum* L. var. *marie galante* Hutch of extinction are very high, high and medium, respectively, requiring immediate efforts for their preservation. This study aims to determine whether there is competition between pollen *G. mustelinum* and herbaceous in relation to fertilization of wild species, as well as whether there are differences of competition in different proportions of pollen of these species. For both crossings were performed between the two species used the *G. mustelinum* mother as having been fertilized by pollen from: i) mixture of 50% *G. mustelinum* and 50% herbaceous ii) a mixture of 75% herbaceous and 25% *G. mustelinum* iii) a mixture of 25% herbaceous and 75% *G. mustelinum* iv) herbaceous v) *G. mustelinum*. The latter two were used as controls to determine the expression pattern of alleles in polyacrylamide gels and validate the crosses with mixed pollen. We obtained seeds from each cross. The molecular analysis determined the proportion of seeds from crosses inter-and intra-specific by genotyping with SSR markers of the type. The frequency of offspring in each proportion of pollen used in crosses were compared using statistical test, chi-square (χ^2), with expected frequencies of 50% of hybrid seeds and 50% of seeds derived from selfing, 75% of seeds hybrid and 25% of the seeds of self-fertilization, 25% seed and 75% hybrid seed selfing. Were pollinated between 10:42 Flowers in the crosses with mixed pollen. The

average number of seeds obtained ranged between nine and 11. Comparing these values with the average number of seeds from the intersection with 100% of pollen of the respective species, it was found that there was little variation. There were no differences in fertility or crossability between the genotypes of *G. mustelinum*. The only male parent in crosses that did not get the seeds was C27, and this was possibly caused by physiological conditions unfavorable. Through the data can be seen that the higher the percentage of pollen from *G. hirsutum*, the greater tendency of hybrids between two species. Therefore the higher the percentage of pollen from *G. mustelinum*, the lower the amount of hybrids. After analyzing the results, the chi-square (χ^2), a 1% probability it was established that there was competition between pollen from wild species and cultivated at all levels studied.

Key words: Hybridization, gene flow, SSR markers

CAPÍTULO I

Revisão Bibliográfica

1. Introdução geral

A cultura do algodoeiro está distribuída em mais de 150 países, apresentando consumo mundial de cerca de 22,5 milhões de toneladas de pluma de algodão por ano na safra 2009/2010 (CONAB, 2010). No Brasil, esta cultura tem importante papel na economia, com lugar de destaque na cadeia do agronegócio do País (NEHMI et al., 2004). No mundo é considerado a quinta oleaginosa, e no Brasil é a segunda, perdendo apenas para a soja (*Glycine max* L. Merril). Três espécies do gênero *Gossypium* ocorrem no Brasil: *G. barbadense* L., *G. hirsutum* L., e *G. mustelinum* (Miers) Watt. (FREIRE et al., 2003).

Gossypium barbadense foi introduzida por povos pré-colombianos que habitavam o Brasil antes da chegada dos portugueses em 1500. Existem relatos da sua utilização para fins medicinal, fiação, pavio de lamparina e ornamental. A planta ocorre em quintais de zonas rurais de quase todo Brasil (RIBEIRO, 2008).

Gossypium hirsutum é a espécie mais difundida e comercialmente utilizada, possuindo duas variedades botânicas: a variedade *latifolium* ou algodoeiro herbáceo, responsável pela quase totalidade da produção comercial de fibra de algodão no Brasil, e a variedade *marie galante* ou algodoeiro Mocó, encontrado principalmente no semiárido nordestino, na forma de variedades cultivadas e fundo de quintal (ALMEIDA, 2007).

Gossypium mustelinum, silvestre no Brasil, ocorre apenas no semiárido nordestino em mata ciliar de lagos e rios temporários. Ela é a espécie menos estudada dentre as três presentes no Brasil. Segundo Freire et al. (2003), não existem trabalhos de melhoramento ou exploração comercial desta espécie.

Pouco se conhece a cerca da variabilidade genética das populações existentes. Até o início de 2006, apenas quatro populações naturais de *G. mustelinum* eram conhecidas. Elas estão localizadas nos municípios de Caicó, no Estado do Rio Grande do Norte, e Macururê e Jaguarari no Estado da Bahia (Figura 1). Apenas no final de 2006, novos sítios de ocorrência foram encontrados em bacias dos rios Tocó e Capivara no Estado da Bahia (ALVES, 2009).

Nas regiões em que *G. mustelinum* é encontrado também ocorrem as espécies *G. barbadense* L. e *G. hirsutum* L. var. *marie galante* Hutch. Sabe-se que estes algodoeiros possuem áreas de distribuição simpátricas, o que, em teoria, possibilita a ocorrência de hibridações e consequente introgressões entre estas espécies (FREIRE, 1978). Todos os algodoeiros que ocorrem no Brasil são alotetraplóides ($2n = 4x = 52$), portadores do genoma AD originados por hibridações entre espécies diploides de algodão, uma cultivada de genoma A com outra silvestre de genoma D. As espécies portadoras desse genoma não possuem

barreiras reprodutivas completas e apresentam compatibilidade genética devido ao alto grau de homologia entre cromossomos, possibilitando o pareamento de homólogos e a formação de híbridos interespecíficos viáveis e férteis (FREIRE, 2002).

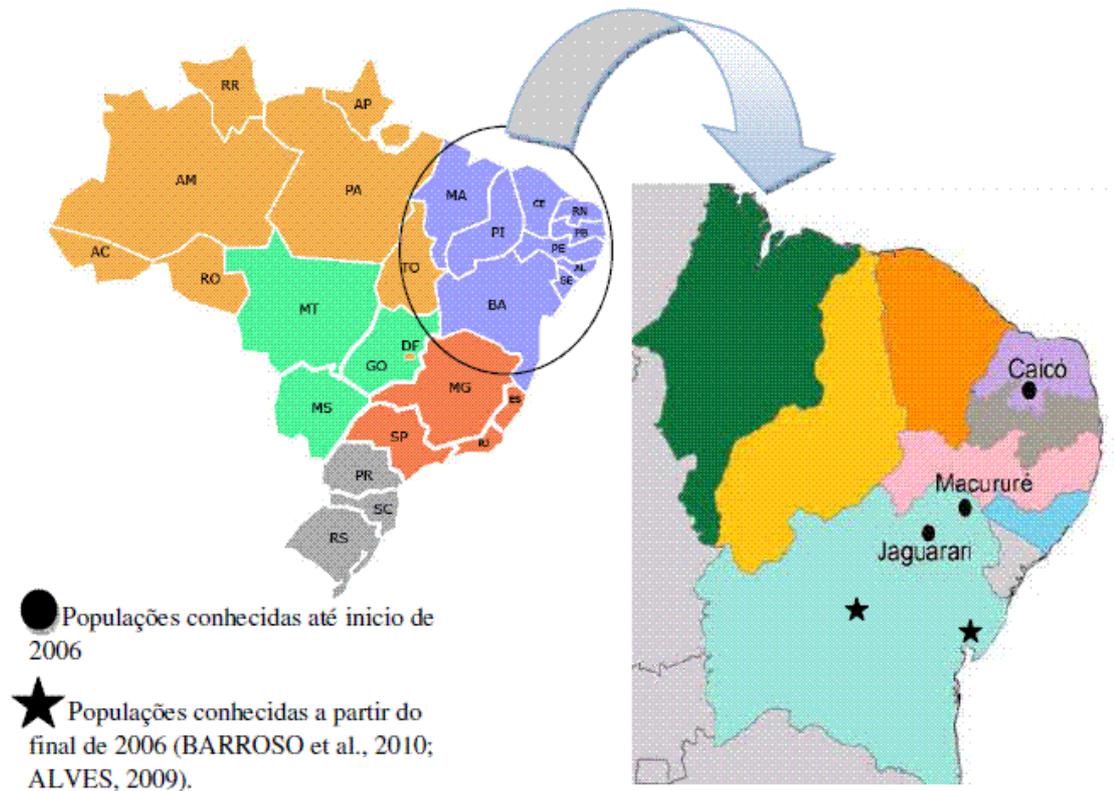


Figura 1: Mapa com os municípios da região Nordeste onde ocorrem às populações de *G. mustelinum*. Adaptado de Freitas (2009).

Por intermédio de estudos de pareamento meiótico foi possível observar que há pequena diferenciação cromossômica entre as espécies cultivadas, havendo quantidades menores de quiasmas durante a meiose de híbridos interespecíficos de *G. hirsutum* e *G. mustelinum*, quando comparados a *G. hirsutum* (MENZEL e HASENKAMPF, 1982). Apesar da simpatria e compatibilidade sexual com outras espécies, aparentemente a *G. mustelinum* manteve sua integridade genética. O único relato de introgressão foi descrito por Freire e Moreira (1991), em uma lavoura de algodoeiro mocó, na região do Seridó do Rio Grande do Norte, dando a entender que o fluxo ocorreu do material silvestre para o material cultivado.

A aparente ausência de hibridações de *G. mustelinum* com outros algodoeiros simpátricos seria explicada, caso a espécie fosse autógama. Porém, como em outras espécies do gênero *Gossypium*, *G. mustelinum* possui taxas de fecundação cruzada, as quais permitem

classificá-la como do tipo intermediária, uma vez que as percentagens de autopolinização são variáveis e superiores aos 5%, mas inferiores aos 95% (ALLARD, 1971).

Em face à possibilidade de ocorrência de fluxo gênico, a Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio) determinou a implementação de zonas de exclusão de algodoeiros geneticamente modificados que foi transformada em Portaria (Nº 21, de 13 de janeiro de 2005, publicado no Diário Oficial da União de 16/01/2006, Seção 1, Página 1) pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). O fluxo gênico a partir de cultivares convencional ou transgênica é indesejado, pois podem afetar a estrutura genética das demais populações de algodão. Na falta de barreiras sexuais completas, o isolamento geográfico entre cultivares e as populações que se deseja proteger tem sido usado para reduzir a probabilidade de introgressões.

As zonas proibitivas de cultivo visando proteger populações de *G. mustelinum* abrangem municípios de três Estados: Paraíba, Rio Grande do Norte e Bahia (BARROSO et al., 2010). Apesar de importantes para a preservação de espécies silvestres, a imposição de zonas de exclusão impede que agricultores usem inovações tecnológicas que podem ser importantes. No caso específico do Brasil, trabalhos em desenvolvimento visam obter variedades geneticamente modificadas com maior tolerância à seca e resistente ao bicudo, importante inseto-praga da cultura. Se forem desenvolvidas variedades transgênicas, a cultura do algodão pode voltar a ser a melhor opção agrícola para o semiárido e os locais de preservação de populações silvestres de *G. mustelinum* não seriam contempladas para usufruir de um eventual novo ciclo de prosperidade.

Pereira (2008) verificou a ocorrência de restrição de cruzamentos devido à competição de pólen entre *G. barbadense* e cultivares de algodoeiro herbáceo. Possivelmente, este fato também exista em *G. mustelinum*. Caso isso se confirme, as zonas de exclusão poderão ser substituídas por medidas menos restritivas de contenção do fluxo gênico, possibilitando que os produtores das regiões dentro destas zonas, caso desejem, possam optar pelo cultivo de algodoeiros transgênicos. Por este motivo, a realização de estudos para determinar se *G. mustelinum* possui barreira pré-zigótica do tipo competição que limite a frequência de híbridos interespecíficos com cultivares de algodoeiro herbáceo é de fundamental importância.

2. O Gênero *Gossypium*

O algodoeiro, planta pertencente à ordem Malvales, à família Malvaceae e à tribo Hibisceae, cujo gênero *Gossypium* apresenta grande variação morfológica, sendo descrito desde arbustos perenes a pequenas árvores. Sua distribuição ocorre nos trópicos e subtropicais onde é encontrado em regiões áridas e semiáridas (FRYXELL, 1965). Um dos primeiros relatos de cultivo de algodoeiros data de 3500 a.C., período a que pertencem os fragmentos macrobotânicos encontrados em uma floresta tropical durante escavações no Vale de Ñanchoc próximos ao Andes, no norte do Peru (DILLEHAY et al., 2007).

Estão identificadas 50 espécies no gênero *Gossypium*, dentre as quais apenas cinco são alotetraplóides ($2n=4x=52$). De acordo com Fryxell (1965) e Valicek (1978), a origem e diferenciação do gênero *Gossypium* ocorreu no período Neogénico, entre cinco e quinze milhões de anos, na época Miocénico, tendo como centro de origem a África Central. Desde então, evoluiu para oito grupos de espécies diplóides ($2n=26$), denominados grupos genômicos diplóides (A, B, C, D, E, F, G, K) e um grupo de espécies alotetraplóides (AD). Este último grupo surgiu da hibridização entre duas espécies diplóides, uma cultivada no Velho Mundo pertencente ao genoma A, com outra selvagem do genoma D, nativo da América (VALICEK, 1978). O evento que deu origem ao genoma AD ocorreu a aproximadamente 1,5 milhões de anos, provavelmente no México (LIU et al., 2001; WENDEL e CRONN, 2003). As espécies diplóides que passaram por essa hibridização estão extintas (ADAMS e WENDEL, 2004). Entre as espécies atuais, *G. raimondii* L. é considerado o ancestral mais próximo do doador do genoma D, e *G. herbaceum* L. e *G. arboreum* L. são os descendentes mais próximos do genoma A (ADAMS e WENDEL, 2004).

Entre as espécies tetraploides, três são selvagens, *G. darwinii* L., nativa do arquipélago de Galápagos, *G. tomentosum* L. de ilhas do Havaí e *G. mustelinum* que têm como centro de origem o Nordeste do Brasil. As outras duas espécies tetraplóides são as mais importantes cultivadas, *G. hirsutum* e *G. barbadense* (ADAMS e WENDEL, 2004). Segundo Freire (2002), todas essas espécies são sexualmente compatíveis. As espécies tetraplóides cultivadas tiveram origens em centros de domesticação independentes. *G. hirsutum* é originária da região que compreende a Guatemala e o México, na América Central, e *G. barbadense* entre o Peru e o Equador, na América do Sul (STEPHENS, 1967).

Dentre as 50 espécies deste gênero, quatro possuem interesse econômico, sendo duas de origem americana e alotetraplóides; *G. hirsutum* L. e *G. barbadense* L., e outras duas diplóides originadas da África e Ásia, *G. arboreum* L. e *G. herbaceum* L. (FREIRE, 2000).

As espécies da América possuem cromossomos relativamente pequenos, enquanto as demais espécies diplóides possuem cromossomos maiores (BEASLEY, 1940).

2.1 A espécie *Gossypium hirsutum*

O algodoeiro conhecido como herbáceo ou anual (*G. hirsutum* var. *latifolium*) representa quase 100% do algodão cultivado no mundo, principalmente sob condições de média e alta tecnologia. Apresenta porte subarbustivo, é uma espécie anual, pois, havendo condições favoráveis após o período de produção, continuam vegetando por um período de dois ou três anos (PENNA, 1999).

De acordo com o International Cotton Advisory Committee (ICAC), a área cultivada no mundo vem aumentando progressivamente, crescendo 32% em pouco mais de 50 anos, em mais de 100 países onde é cultivado. Na safra de 2007/2008, foram produzidos 26,6 milhões de toneladas de algodão, sendo que a China, a Índia, os Estados Unidos e o Paquistão somam 72,7% da produção mundial (COSTA et al., 2008). No levantamento da safra brasileira a área plantada com algodão está estimada em 833,7 mil ha na safra 2009/10. Quanto à produção, a estimativa é de que sejam colhidos 3.176,8 mil toneladas de algodão em caroço. Em pluma, a estimativa é de 1.238,8 mil toneladas, contra 1.213,7 mil toneladas da safra 2008/2009 estabelecendo incrementos de 2,1%, na oferta brasileira da fibra (CONAB, 2010).

Segundo Beltrão (2007), *G. hirsutum* é uma das espécies vegetais de maior utilidade, pois a fibra possui múltiplas aplicações, tais quais tecelagem, confecção de feltro, celulose, películas fotográficas, chapas para radiografia e vestuário. Suas sementes são importante fonte de óleo e proteínas, coprodutos extraídos, com larga aplicação na indústria de alimentos e na fabricação de bicompostíveis.

Das duas variedades de *G. hirsutum* encontradas no Brasil, a mais cultivada, composta quase que exclusivamente por cultivares, é a *G. hirsutum* var. *latifolium* Hutch, nativa do México introduzida via Estados Unidos. A segunda variedade *G. hirsutum* var. *marie galante* (Watt) Hutch, originária das Antilhas e introduzida no Brasil pelos holandeses ou africanos durante o período colonial, teve ampla distribuição do México ao semiárido Nordeste do Brasil (BARROSO et al., 2005).

Entre 1998 e 2008, o Brasil passou de importador a exportador de algodão, consumiu 3,6% da produção mundial e ocupou a quinta colocação dentre os países que mais produzem algodão no mundo, respondendo por 5,7% da produção mundial (COSTA et al., 2008). Os Estados do Mato Grosso e Bahia são os principais produtores, responsáveis por 81,1% da

produção nacional (RIGON et al., 2008). No 12º levantamento de grãos da Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), na safra 2007/2008, a produção nacional de algodão foi a maior de todos os tempos, cerca de 2,5 milhões de toneladas em caroço e 1,6 milhões de toneladas em pluma.

2.2 A espécie *Gossypium mustelinum*

O Nordeste brasileiro é o centro de origem da espécie *Gossypium mustelinum*, também conhecido como algodão bravo, o qual é encontrado nas serras secas do semiárido. Ela foi originalmente descrita por Watt em 1907, baseado em material vegetal coletado por Gardner em 1838. De acordo Neves et al. (1965), Freire et al. (1990) e Vidal Neto et al. (2005), acreditava-se que existiam apenas quatro populações naturais descritas de *G. mustelinum* nos municípios de Caicó no Estado do Rio Grande do Norte, e Macururé e Jaguarari no Estado da Bahia. Mas, no final do ano de 2006, novos sítios de ocorrência foram localizados no Estado da Bahia por Barroso et al. (2010). Novas populações também foram identificadas na Bahia, em bacias de alguns rios nos municípios de Nova Fátima, Iaçú, Milagres, Jequié, Boa Nova e Manoel Vitorino (ALVES, 2009).

Gossypium mustelinum apresenta particularidades em relação às outras espécies naturalizadas no Brasil: são plantas arbóreas, com folhas pequenas e bastante pubescentes nas linhas de sutura e dos lóbulos dos capulhos, flores amarelas com mancha, pólen amarelo-claro, capulho pequeno, cônico bem espaçado e sementes com línter curto e marrom com fibras bastante aderidas e pouco torcidas (Figura 2) (ARANHA e LEITÃO, 1969; PICKERSGILL et al., 1975).

Esta espécie foi considerada extinta até que Aranha e Leitão (1969) encontraram uma população na cidade de Caicó no Estado do Rio Grande do Norte. Eles a descreveram como sendo uma nova espécie denominada *G. caicoense*. Entretanto, esta classificação não foi aceita por Pickersgill et al. (1975), Valicek (1977) e Fryxell (1984). Coletas de exemplares de *G. mustelinum* e *G. caicoense* realizadas na mesma região, passaram por estudos de comparações morfológicas e análise de bandeamento cromossômico, os quais confirmaram que os exemplares tratavam-se da mesma espécie (VALICEK, 1977; FRYXELL, 1984). Outro fato que chama a atenção nesta espécie são as elevadas diferenças genéticas existentes entre as populações já estudadas. Nelas as estimativas de diferenciação genética entre populações (F_{ST}) fica acima de 0,5 (FREIRE, 2002). Tais diferenças ressaltam a importância para fins de conservação.

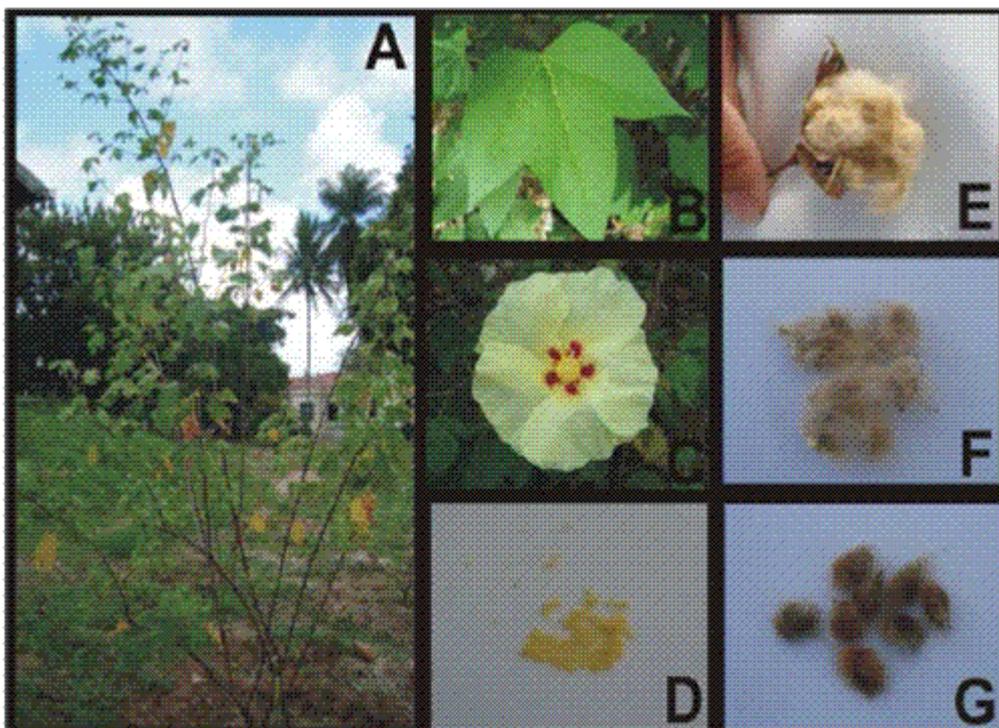


Figura 2: Características morfológicas da espécie *Gossypium mustelinum*. (A) Representante da espécie, (B) folha, (C) flor, (D) pólen, (E) capulho, (F) fibra, (G) línter. Adaptado Alves (2009) e Freitas (2009).

Não há relato de uso nem evidências arqueológicas de que houve utilização da planta de *G. mustelinum*. A razão pela qual a planta não tenha sido utilizada pelo homem é desconhecida. Porém, a hipótese mais provável está relacionada com a introdução de *Gossypium barbadense* por povos pré-colombianos a partir do Peru e a sua ampla disseminação por todo o país. (BOULANGER e PINHEIRO, 1972; STEPHENS, 1973).

As substituições das variedades crioulas (como são chamadas as variedades locais rústicas cultivadas pelos agricultores) por cultivares melhoradas causam preocupação entre os curadores de germoplasma em relação à erosão genética. Em face a esta realidade é importante que tanto os acessos silvestres quanto as variedades crioulas sejam preservadas como reservatório de variabilidade (FREIRE, 2002).

3. Fluxo gênico

O fluxo gênico é a transferência de informações genéticas de uma população a outra (BÓREM et al., 2007). Em populações de plantas o fluxo gênico ocorre durante as gerações gametofíticas e esporofíticas, através da dispersão do pólen e de semente (MARTINS, 1997). Existem quatro modelos básicos de fluxo gênico que correspondem a diferenças na estrutura

de populações: a) o modelo continente-ilha, em que o movimento dos genes é unidirecional, partindo de uma população maior para outra menor e isolada ou, para colonização; b) o modelo de ilhas, onde a migração ocorre ao acaso entre um grupo de pequenas populações bem definidas; c) o modelo de alpondras ou *stepping-stone* (“trampolim”), em que as populações trocam migrantes entre populações vizinhas e d) o modelo de isolamento por distância, no qual o fluxo ocorre entre grupos vizinhos, em uma população contínua (FUTUYMA, 1992).

O grau em que uma população pode ser delimitada de outras depende da intensidade do fluxo gênico entre elas, ou seja, a distribuição esperada da informação genética dentro e entre populações está intimamente relacionada com a organização física e a capacidade de dispersão da espécie (NASS, 2007). O padrão de dispersão de pólen está diretamente ligado com o comportamento dos agentes polinizadores, que podem sofrer influência de certos fatores como: territorialidade, especificidade ao recurso, disponibilidade de recursos e sociabilidade dos animais, sendo estes fatores determinantes para os padrões de distância no transporte de pólen (HIGA e SILVA, 2006).

Segundo Futuyma (1992), a taxa média de fluxo gênico entre populações estabelecidas de uma espécie é, com frequência, mais baixa e tem probabilidade de ser menor se os indivíduos imigrantes necessitarem competir com os residentes para sobreviver e reproduzir. Caso a taxa média de fluxo gênico entre populações seja maior que o valor sugerido, as populações locais serão extintas. Se os sítios forem recolonizados por indivíduos retirados de diversas populações, quanto maior a taxa de extinção e recolonização, maior será a taxa de fluxo gênico e menor a variância nas frequências alélicas entre populações (FUTUYMA, 1992).

No gênero *Gossypium*, devido à sua pequena capacidade colonizadora, dificilmente é observado fluxo gênico, embora possa ocorrer dispersão durante o transporte das sementes e no uso indevido de caroços. O fluxo gênico via pólen é possível, uma vez que as variedades e espécies de *Gossypium* existentes no Brasil são sexualmente compatíveis. Pode ocorrer a partir de lavouras e de plantas isoladas, sendo necessária a intervenção de insetos polinizadores (FREIRE, 2002).

Na Austrália e nos Estados Unidos da América, as tentativas de eliminação do fluxo indesejado entre cultivares transgênicas são feitas por separação física de campos (FREIRE et al., 2003; BARROSO et al., 2005). Esta medida tem-se mostrado eficaz, pois nenhum relato de transferência do transgene e introgressão foi notificado até 2005 (BARROSO et al., 2005).

A determinação da influência do movimento do pólen sobre o tamanho efetivo da população reprodutiva, ou tamanho da vizinhança requer detalhada análise do sistema de reprodução das populações. Tais análises incluem a determinação da paternidade de sementes de polinização aberta e da distância entre a planta materna e o doador de pólen (NASON et al., 1996), bem como da distância de dispersão das sementes (BURCZYK et al., 2004). Estes estudos têm sido eficientemente conduzidos com base em marcadores genéticos altamente polimórficos, como microssatélites. Alguns desses estudos têm mostrado que o pólen pode mover-se a distâncias consideráveis entre plantas dentro de populações e que o fluxo de genes dentro de populações é muitas vezes alto (WANG et al., 2007; LACERDA et al., 2008; SILVA et al., 2008).

4. Competição de pólen

Devido ao tamanho e à formação de grumos do grão de pólen no gênero *Gossypium*, o seu transporte pelo vento não tem sido reportado. Portanto, para que haja fecundação cruzada é necessária a presença de insetos polinizadores, frequentemente representados por abelhas melíferas e silvestres, dentre outros, cujo hábito de forrageamento depende a dispersão do pólen, inclusive a longas distâncias (FREIRE, 2002). Flores atraentes, pólen colorido, nectários produtores de carboidratos e estruturas frutíferas jovens atraem os insetos que, pela dinâmica de seu movimento nas visitas, fazem com que o pistilo que se projeta acima da coluna estaminal fique exposto ao contato com pólen transportado (PENNA, 1999).

Assim como em todas as angiospermas, no algodão, os tubos polínicos se prolongam do estigma pelo pistilo em tecido contínuo até o ovário, conduzindo os gametas masculinos para fertilização. Frequentemente, o número de grãos de pólen depositado sobre o estigma excede o número de oosferas no ovário da flor polinizada, resultando em competição entre os grãos de pólen para a fecundação das oosferas (ERBAR, 2003). De acordo com Swanson et al. (2004), é possível enumerar todas as fases em que ocorre competição de pólen, sendo elas: *i)* captura do grão de pólen pelo estigma; *ii)* início da germinação do pólen e invasão do tecido do estigma; *iii)* alongação do tubo polínico; *iv)* adesão e navegação pelo espaço intercelular do pistilo; *v)* acesso ao ovário; e *vi)* entrada na micrópila à oosfera.

A competição pode resultar em fecundações preferenciais, tendo sido relatados na literatura diversos casos em que a competição entre pólen de espécies sexualmente compatíveis constitui um mecanismo importante para a manutenção da identidade genética.

Song et al. (2002), em estudo realizado com a espécie de arroz cultivado *Oryza sativa* L., e a silvestre *O. rufipogon* Griff., observaram que, embora a hibridação fosse possível, quando misturas de pólen na proporção de 50% para cada espécie eram aplicadas em estigmas de *O. rufipogon*, apenas 2,0% das sementes eram híbridas, revelando uma forte desvantagem do pólen de *O. sativa* e competição com pólen da espécie silvestre.

Klips (1999), avaliando aspectos semelhantes em espécies do gênero *Hibiscus* (família Malvaceae), verificou a ocorrência de competição entre pólen como barreira sexual pré-zigótica. A produção de híbridos interespecíficos resultantes de polinizações com misturas 50% de pólen de *H. moscheutos* e 50% de *H. laevis* aplicadas nos estigmas geraram apenas 8,8 e 7,4% de descendência híbrida, respectivamente.

Estudos realizados com duas espécies de *Ipomopsis* (Polemoniaceae): *I. agregata* e *I. tenuituba*, geograficamente isoladas em ambiente natural comprovam que a polinização manual com mistura de polens na mesma proporção de ambas as espécies, em vez de vantagem de pólen da própria espécie, havia evidência de vantagem para *I. agregata* de um dos locais, originando 70-80% de sementes em cruzamentos competitivos, independentes do local do receptor ou da espécie, contrária a ambas as expectativas: 50% de progênie híbrida ou sucesso reduzido de pólen de *I. agregata* em *I. tenuituba* receptoras (ALDRIDGE e CAMPBELL, 2006). Em análise de competição com *I. arizonica*, *I. agregata* também mostrou melhor desempenho quando em concorrência polínica (WOLF et al., 2001)

Há ainda outros casos em que a competição entre polens é fenômeno provável de isolamento genético acima do esperado entre espécies sexualmente compatíveis e passíveis de hibridação: *Piriqueta caroliniana*, mais competitiva que *P. viridis* (Turnevarietyae) (WANG e CRUZAN, 1998); *Senecio aethnensis* e *S. chrysanthemifolius* (Astevarietyae), mais competitiva (CHAPMAN et al., 2005); entre *Betula occidentalis* e *B. papyrifera* fortes barreiras de pós-polinização foram observadas (WILLIAMS JR et al., 1999)

Em relação ao gênero *Gossypium*, Stephens (1949) cita estudo de Kearney e Harrison (1932), que mostrou fertilização preferencial de pólen de variedades de *G. barbadense* quando misturado com pólen de cultivares de *G. hirsutum* e aplicado a estigmas de *G. barbadense*. Tal fertilização seletiva também foi verificada quando estigmas de *G. hirsutum* foram polinizados com misturas de pólen de variedades das duas espécies de *G. barbadense* (variedade *brasiliense* e variedade “Inteiro”), silvestres do Brasil, também apresentam o mesmo comportamento reprodutivo dos materiais cultivados americanos (PEREIRA, 2008).

5. Aplicações de marcadores moleculares

Marcadores moleculares são características de DNA que diferenciam dois ou mais indivíduos e que são herdadas geneticamente. Os diferentes tipos de marcadores moleculares hoje disponíveis diferenciam-se pela tecnologia utilizada para revelar variabilidade em nível de DNA (VIDOR, et al., 2002). As diferenças na sequência gênica podem ser diretamente observadas e descritas com alto grau de precisão. Os marcadores são utilizados no estudo da extensão e distribuição da variação entre espécies como também para investigar questões taxonômicas e evolutivas (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998).

Marcador molecular baseado em PCR como os microssatélites ou simplesmente SSR (*Simple Sequence Repeats*) que possibilitam a análise de vários alelos e a distinção entre indivíduos homocigotos e heterocigotos, são os mais utilizados em estudos de diversidade genética. Para os algodoeiros, mais de 1500 locos microssatélites já foram isolados de bibliotecas de DNA (AVISE, 2004; ALVES 2009).

Cada loco microssatélite é analisado individualmente, sendo obtido pela utilização de um par de iniciadores específicos (com vinte a trinta pares de bases) complementares às sequências únicas que flanqueiam o microssatélite. Estas sequências são conservadas, permitindo que *primers* específicos a elas sejam sintetizados e utilizados para amplificar apenas esta região. O polimorfismo é baseado na variação do número de sequências simples amplificado em um determinado loco. Segmentos amplificados são distintos com base em diferentes números de unidades repetitivas, que se reflete em diferenças de tamanho, medidas em pares de bases (pb) (HARDY, 2003). Locos SSR possuem expressão codominante, ou seja, ambos os alelos de um indivíduo heterocigoto são visualizados, e são altamente multialélicos. Desse modo, marcadores microssatélites possuem elevado polimorfismo. Entretanto a maior limitação desta técnica é o dispendioso trabalho necessário para o desenvolvimento de iniciadores, já que requer sequenciamento prévio de partes específicas do DNA em estudo, além do alto custo financeiro (ZANE et al., 2002).

Em análises de paternidade utilizam-se informações cumulativas de locus polimórficos múltiplos (AVISE, 2004). Dessa forma, diversas classes de marcadores moleculares, tais como aloenzimas, RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), VNRT (*Variable Number of Tandem Repeats*; microssatélites), RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) e SSR (*Simple Sequence Repeats*; microssatélites), podem ser utilizados (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998). Os ensaios de microssatélites ultrapassaram em grande parte os demais métodos de análise (AVISE, 2004).

Dessa forma, se os genitores diferirem em números de base na sequência flanqueada pelos *primers* de microssatélites tem-se um polimorfismo. A detecção apenas dos alelos maternos possibilita a conclusão de que a progênie foi oriunda de autofecundação; a presença de alelos dos dois genitores caracteriza, por outro lado, um descendente híbrido. O uso de marcadores microssatélites em estudos populacionais, onde centenas de indivíduos são genotipados, evoluiu consideravelmente após o desenvolvimento de sistemas automatizados, que buscam a informação de sistemas *multiplex* e metodologias que possam diminuir a marcação fluorescente, cujo custo é elevado, sem perder a qualidade e precisão da genotipagem (AZEVEDO, 2007). Sistemas automáticos capilares de eletroforese separam o DNA por tamanho, através da aplicação de uma corrente elétrica, para detecção de alelos por fluorescência, obtidos pela utilização de *primers* marcados. Esta técnica permite a análise simultânea entre 1 e 96 amostras de DNA em capilares separados dependendo do instrumento usado (KOUMI et al., 2004). Embora sejam utilizados principalmente para análises de sequenciamento, sistemas de eletroforese capilar são usados amplamente para genotipagem (FLORES et al., 2005).

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

Vários são os trabalhos que utilizam os microssatélites em análise de paternidade ou fluxo gênico. Jones et al. (2008) determinaram o fluxo de pólen de *Eucalyptus grandis* Hill por meio de análise de paternidade, utilizando marcadores microssatélites. Os parâmetros de fluxo de pólen forneceram informações úteis sobre a dinâmica do movimento de pólen dentro de populações de *E. grandis* e, segundo os autores, podem ser utilizados na avaliação de risco de fluxo gênico das plantações para as áreas adjacentes de mata nativa.

Bacles e Ennos (2008) realizaram estudo com base na análise de paternidade por genotipagem de marcadores microssatélites. Este trabalho teve como objetivo averiguar a ligação genética atual ocasionada pela dispersão dos grãos de pólen, pelo vento, de três remanescentes de uma população desmatada de *Fraxinus excelsior* L. Os autores concluíram que a dispersão de pólen pelo vento em uma paisagem estéril garante que as sementes produzidas na bacia hidrográfica incluem material genético de uma ampla área geográfica.

Análise de paternidade com base em oito locos de microssatélites foram utilizados por Bittencourt e Sebbenn (2007) para investigar o pólen e os padrões de dispersão de sementes pelo vento de *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze. Utilizou-se um fragmento de floresta isolado e um pequeno grupo de árvores situado a 1,7 Km de distância da floresta. De acordo com os autores, a partir da interpretação dos resultados foi possível concluir que a dispersão de sementes é restrita, mas que não há dispersão de pólen de longa distância entre os fragmentos florestais.

Robledo-Arnuncio e Gil (2005) ao estudarem uma população pequena e isolada de *Pinus sylvestris* L. com o intuito de saber os padrões de dispersão dos grãos de pólen, utilizaram o teste de paternidade por meio de SSR e concluíram que o número e a distribuição de potenciais doadores de pólen em populações pequenas podem influenciar fortemente os padrões de dispersão de pólen.

Referências Bibliográficas

ADAMS, K.L.; WENDEL, J.F. Exploring the genomic mysteries of polyploidy in cotton. **Biological Journal of the Linnean Society**, Londres, v.82, p.573-581, 2004.

ALDRIDGE, G.; CAMPBELL, D.R. Asymmetrical pollen success in *Ipomopsis* (Polemoniaceae) contact sites. **American Journal of Botany**, Columbus, v.93, n.6, p.903-909, 2006.

ALLARD, R.W. **Princípios do melhoramento genético das plantas**. São Paulo: Edgard, 1971. 381p.

ALMEIDA, V.C. **Caracterização genética e *in situ* de *Gossypium barbadense* na região Norte do Brasil**. 2007. 77f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular). Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2007.

ALVES, M.F. **Caracterização *in situ* e estrutura genética de populações de *Gossypium mustelinum* Miers ex Watt**. 2009. 86f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular). Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2009.

ARANHA, C.; LEITÃO, H.F. Uma nova espécie para o gênero *Gossypium* L. **Bragantia**, Campinas, v.28, n.23, p.273-290, 1969.

AVISE, J.C. **Molecular markers, natural history, and evolution**. 2. ed. Massachusetts: Sinauer, 2004. 541p.

AZEVEDO, V. **Desenvolvimento e aplicação de microssatélites, análise de cpDNA e modelagem computacional para estudos da estrutura e dinâmica genética de maçaranduba – *Manilkara huberi* (Ducke) Chev. Sapotaceae**. 2007. 0f. Tese de Doutorado. UNB (Universidade de Brasília). Brasília, DF, Brasil. 2007.

BACLES, C.F.E.; ENNOS, R.A. Paternity analysis of pollen-mediated gene flow for *Fraxinus excelsior*. L. in a chronically fragmented landscape. **Heredity**, London, v.101, p.368-380, 2008.

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

BARROSO, P.A.V.; HOFFMANN, L.V.; BATISTA, C.E.A.; FREITAS, R.B.; ALVES, M.F.; SILVA, U.C.; ANDRADE, F.P. de. *In situ* conservation and genetic diversity of three populations of *Gossypium mustelinum* Miers (ex Watt). **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, v.52, n.25, p.1-7, 2010.

BEASLEY, J.O. The origin of American tetraploid *Gossypium* species. **American Naturalist**, Chicago, v.74, p.285-286, 1940.

BELTRÃO, N.E. de M. Algodão e a agroenergia. **Cotton Business**, Pirassununga, v.1, n.3, p.26-28, 2007.

BITTENCOURT, J.M.; SEBBENN, A.M. Patterns of pollen and seed dispersal in a small fragmented population of a wind pollinated *Araucaria angustifolia* in southern Brazil. **Heredity**, London, v.99, p.580-591, 2007.

BLENDA, A.; SCHEFFLER, J.; SCHEFFLER, B.; PALMER, M.; LACAPE, J.M.; YU, J.Z.; JESUDURAI, C.; JUNG, S.; MUTHUKUMAR, S.; YELLAMBALASE, P.; FICKLIN, S.; STATON, M.; ESHELMAN, R.; ULLOA, M.; SAHA, S.; BURR, B.; LIU, S.; ZHANG, T.; FANG, D.; PEPPER, A.; KUMPATLA, S.; JACOBS, J.; TOMKINS, J.; CANTRELL, R.; MAIN, D. CMD. A Cotton Microsatellite database resource for *Gossypium* genomics. **BMC Genomics**, UK, v.7, n.132, 2006.

BORÉM, A.; ROMANO, E.; GROSSI DE SÁ, M.F. **Fluxo gênico e transgênicos.** Editora UFV, Viçosa. 2007, 199p.

BOULANGER, J.; PINHEIRO, D. Consequências genéticas da evolução da cultura algodoeira do Nordeste do Brasil. **Pesquisas Agropecuárias no Nordeste**, SUDENE: Recife, v.4, n.1, p.05-52, 1972.

BURCZYK, J.; DIFAZIO, S.P.; ADAMS, W.T. Gene flow in forest trees: how far do genes really travel. **Forest Genetic**, Rome, v.11, p.1-14, 2004.

CHAPMAN, M.A.; FORBES, D.G.; ABBOTT, R.J. Pollen competition among two species of *Senecio* (Asteraceae) that form a hybrid zone on Mt. Etna, Sicily. **American Journal of Botany**, Columbus, v.92, n.4, p.730–735, 2005.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. **Nono levantamento de avaliação da safra 2009/2010**, 2010.

COSTA, A.C.P.; MACEDO, F.S.; HONCZAR, G. Algodão, In: **Agronegócio brasileiro**, São Paulo: Sonopress Gráfica, 2008. p.24-29.

DILLEHAY, T.D.; ROSSEN, J.; ANDRES, T.C.; WILLIAMS, D.E. Pre-ceramic adoption of peanut, squash, and cotton in Northern Peru. **Science**, New York, n.316, p.1890-1893, 2007.

ERBAR, C. Pollen tube transmitting tissue: place of competition of male gametophytes. **International Journal of Plant Sciences**, Chicago, n.164, p.265–277, 2003.

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

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

FREIRE, E.C. **Distribuição, coleta, uso e preservação das espécies silvestres de algodão no Brasil**. Campina Grande: Embrapa-CNPq, 2000. 22p. (Documento, 78).

FREIRE, E.C. **Variedades de algodão**. Campina Grande: EMBRAPA-CNPq, 1978. 40p.

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

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

FREIRE, E.C.; MOREIRA, J.A.N.; MIRANDA, A.R. de.; PERCIVAL, P.E.; STEWART, J.M. **Identificação de novos sítios de ocorrência de *Gossypium mustelinum* no Brasil**. Campina Grande: EMBRAPA-CNPA, 1990. 7p. (EMBRAPA-CNPA. Pesquisa em andamento, 10).

FREIRE, E.C.; MOREIRA, J.A.N. Relações genéticas entre o algodoeiro mocó e diferentes espécies e variedades de algodoeiro. **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, v.14, n.2, p.393-411, 1991.

FREITAS, R.B. **Estrutura e diversidade genética de populações de *Gossypium mustelinum* miers ex watt e estratégias para a conservação *in situ***. 2009, 44p. Monografia – Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande.

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

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

FUTUYMA, D.J. **Biologia evolutiva**. 2.ed. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética/CNPq, 1992. 646p.

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

HIGA, A.R.; SILVA, L.D. **Pomar de sementes de espécies florestais nativas**. Curitiba: FUPEF, 2006. 266p.

JONES, M.E.; SHEPHERD, M.; HENRY, R.; DELVES, A. Pollen flow in *Eucalyptus grandis* determined by paternity analysis using microsatellite markers. **Tree Genetics & Genomes**, [S.I.], n.4, p.37-47, 2008.

KLIPS, R.A. Pollen competition as a reproductive isolating mechanism between two sympatric *Hibiscus* species (Malvaceae). **American Journal of Botany**, Columbus, v.86, n.2, p.269-272, 1999.

KOUMI, P.; GREEN, H.E.; HARTLEY, S.; JORDAN, D.; LAHEC, S.; LIVETT, R.J.; TSANG, J.W.; WARD, D.M. Evaluation and validation of the ABI 3700, ABI3100, and the MegaBACE 1000 capillary array electrophoresis instruments for use with short tandem repeat microsatellite typing in a forensic environment. **Electrophoresis**, UK, n.25, p.2227–2241, 2004.

LACAPE, J.M.; NGUYEN, T.B.; THIBIVILIER, S.; BOJINOV, B.; COURTOIS, B.; CANTRELL, R.G.; BURR, B.; HAU, B. A combined RFLP-SSR-AFLP map of tetraploid cotton based on a *Gossypium hirsutum* x *Gossypium barbadense* backcross population. **Genome**, Ottawa, v.46, n.4, p.612-26, 2003.

LACERDA, A.B.; SEBBENN, A.M.; KANASHIRO, M. Long-pollen movement and deviation of random mating in a low-density continuous population of *Hymenaea courbaril* in the Brazilian Amazon. **Biotropica**, Washington, v.40, p.462-470, 2008.

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

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

LIU, S.; SAHA, S.; STELLY, D.; BURR, B.; CANTRELL, R.G. Chromosomal assignment of microsatellite loci in cotton. **The Journal of Heredity**, Washington, n.91, p.326-332, 2000b.

MARTINS, P.S. Estrutura populacional, fluxo gênico e conservação "*in situ*". **Instituto de Pesquisa e Estudos Florestais**, Piracicaba, n.35, p.71-78, 1997.

MENZEL, M.Y.; HASENKAMPF, C.A. Incipient genome differentiation in *Gossypium*. III. Comparison of chromosomes of *G. Hirsutum* and asiatic diploids using heterozygous translocations. **Genetics**, Austin, v.100, p.89-103, 1982.

NASON, J.D.; HERRE, E.A.; HAMIRICK, J.L. Paternity analysis of the breeding structure of strangler fig populations: evidence for substantial long-distance wasp dispersal. **Journal of Biogeography**, Oxford, v.23, p.501-512, 1996.

NASS, L.L. **Recursos genéticos vegetais**. Brasília: Embrapa, 2007. 858p.

NEHMI, I.M.D.; FERRAZ, J.V.; NEHMI FILHO, V.A.; SILVA, M.L.M. **Agrianual 2005**, São Paulo: Oeste, 2004, 545p.

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

NGUYEN, T.B.; GIBAND, M.; BROTTIER, P.; RISTERUCCI, A.M.; LACAPE, J.M. Wide coverage of the tetraploid cotton genome using newly developed microsatellite markers. **Theoretical and applied genetics**, Berlin, v.109, p.167-175, 2004.

PENNA, J.C.V. Hibridação em algodão. In: BORÉM, A. (Ed.). **Hibridação artificial de plantas**. Viçosa: UFV, 1999. p.63-81.

PEREIRA, G.S. **Competição intra e interespecífica entre pólen de algodoeiros**, 2008, 54p. Monografia – Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande.

PICKERGILL, B.; BARRETT, S.C.H.; ANDRADE, D. Wild Cotton in Northeast Brasil. **Biotropica**, Chicargo, v.7, p.42-54, 1975.

RIBEIRO, C.S.N. **Caracterização *in situ*, molecular e morfológica de acessos de *Gossypium* do estado de Pernambuco**. 2008. 111f. Dissertação de Mestrado. UFRPE (Universidade Federal Rural de Pernambuco). Recife, Pernambuco. Brasil. 2008.

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

ROBLEDO-ARNUNCIO, J.J.; GIL, L. Patterns of pollen dispersal in a small population of *Pinus sylvestris* L. revealed by total-exclusion paternity analysis. **Heredity**, London, v.94, p.13-22, 2005.

SILVA, M.B.; KANASHIRO, M.; CIAMPI, A.Y.; TOMPSON, I.; SEBBENN, A.M. Genetic effects of selective logging and pollen gene flow in a low-density population of the dioecious tropical tree *Bagassa guianensis* in the Brazilian Amazon. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v.255, p.1548-1558, 2008.

SONG, Z.; LU, B.; ZHU, Y.; CHEN, J. Pollen competition between cultivated and wild rice species (*Oryza sativa* and *O. rufipogon*). **New Phytologist**, Cambridge, v.153, p.289-296, 2002.

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

STEPHENS, S.G. Geographical distribution of cultivated cottons relative to probable centers of domestication in the new world. In: ADRIAN, M. (Ed.) **Genes, enzymes and populations**, New York: Plenum Press, p.239-254. 1973.

STEPHENS, S.G. The cytogenetics of speciation in *Gossypium* I. Selective elimination of the donor parent genotype in interspecific backcrosses. **Genetics**, Austin, v.34, p.627-637, 1949.

SWANSON, R.; EDLUND, A.F.; PREUSS, D. Species specificity in pollen-pistil interactions. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, v.38, p.793-818, 2004.

VALICEK, P. Some notes on the taxonomy of the new species *Gossypium caicoense* Aran. Leit et Grid. **Agricultura Trópical e Subtropical**, [S.I.], v.10, p.119-128, 1977.

VALICEK, P. Wild and cultivated cottons. **Cotton at Fiber Trop.**, [S.I.], v.33, p.363-385, 1978.

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

VIDOR, M.A.; RUIZ, C.P.; MORENO, S.V.; FLOSS, P.A. Marcadores moleculares em estudos de caracterização de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St.Hil.): o sabor. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.32, p.415-420, 2002.

WANG, J.; CRUZAN, M.B. Interspecific mating in the *Piriqueta caroliniana* (Turnevarietiae) complex: effects of pollen load size and composition. **American Journal of Botany**, Columbus, v.85, n.9, p.1172-1179, 1998.

WANG, J.; YE, Q.; KANG, M.; HUANG, H. Novel polymorphic microsatellite loci and patterns of pollen-mediated gene flow in an *ex situ* population of *Eurycorymbus cavaleriei* (Sapindaceae) as revealed by categorical paternity analysis. **Conservation Genetics**, [S.I.], p.1358-130, 2007.

WATT, G. **The wild and cultivated cotton plants of the world**. New York, Longmans-Green, 1907. 406p.

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

WILLIAMS JR., J.H.; FRIEDMAN, W.E.; ARNOLD, M.L. Developmental selection within the angiosperm style: using gamete DNA to visualize interspecific pollen competition. **Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America**, Washington, v.96, p.9201-9206, 1999.

WOLF, P.G.; CAMPBELL, D.R.; WASER, N.M.; SIPES, S.D.; TOLER, T.R.; ARCHIBALD, J.K. Tests of pre- and postpollination barriers to hybridization between sympatric species of *Ipomopsis* (Polemoniaceae). **American Journal of Botany**, Columbus, v.88, n.2, p.213-219, 2001.

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

CAPÍTULO II

**AVALIAÇÃO DE COMPETIÇÃO ENTRE PÓLEN NAS ESPÉCIES DE
ALGODOEIROS *Gossypium hirsutum* L. e *G. mustelinum* (Miers) Watt.**

1 ***Competição entre pólen nas espécies de algodoeiros Gossypium hirsutum L. e G.***
2 ***mustelinum (Miers) Watt.***

3 Romero Lima Sousa ^(1, 2); Edson Ferreira da Silva ⁽²⁾; Paulo Augusto Vianna Barroso ⁽¹⁾;

4 Rodolfo Barbosa de Freitas ⁽¹⁾ e Lúcia Vieira Hoffmann ⁽¹⁾

5 ¹Embrapa Algodão, Caixa Postal 174, CEP 58428-095. Campina Grande, PB. E-mail:

6 romero@live.com, pbarroso@cnpa.embrapa.br, rodolfofbfreitas@hotmail.com,

7 hoff@cnpa.embrapa.br, ² Universidade Federal Rural de Pernambuco. Programa de Pós-graduação em

8 Agronomia – Melhoramento Genético de Plantas – Rua: Dom Manoel de Medeiros, s/n , Dois irmãos,

9 CEP 52171-900, Recife, PE. E-mail: edson@db.ufrpe.br

10 **Resumo**

11 Objetivou-se com este trabalho verificar se há competição de pólen entre *G. mustelinum* e
12 herbáceo em relação à fertilização da espécie silvestre, bem como se há diferença de
13 competição em diferentes proporções de polens das referidas espécies. Realizou-se os
14 cruzamentos entre as duas espécies, em campo experimental, utilizando o *G. mustelinum*
15 como genitor feminino, fecundado por polens oriundos de: i) mistura de 50% herbáceo mais
16 50% *G. mustelinum*; ii) mistura de 75% herbáceo mais 25% *G. mustelinum*; iii) mistura de
17 25% herbáceo mais 75% *G. mustelinum*; iv) herbáceo e v) *G. mustelinum*. Foram obtidas
18 sementes provenientes de cada cruzamento, as quais passaram por extração de DNA e análise
19 molecular para determinação da proporção de sementes provenientes de cruzamentos inter e
20 intraespecíficos por meio da genotipagem com marcadores do tipo SSR. Não foram
21 verificadas diferenças de fertilidade ou de cruzabilidade entre os genótipos de *G. mustelinum*.
22 A frequência de descendentes de proporção de pólen usado no cruzamento foi comparada
23 utilizando-se o teste estatístico do qui-quadrado (χ^2), a 1% de probabilidade. Comprovou-se a
24 existência de competição de polens em todas as proporções de mistura dos mesmos o que
25 pode implicar em fecundação preferencial.

26

27 Termos para indexação: Híbridação, fluxo gênico, marcadores SSR.

28 **Assessment pollen competition between species in cotton *Gossypium hirsutum* L. and *G.***
29 ***mustelinum* (Miers) Watt.**

30 **Abstract**

31 This study aimed to determine whether there is competition between pollen *G. mustelinum*
32 and herbaceous in relation to fertilization of wild species, and whether there are differences of
33 competition in different proportions of pollen of these species. We performed crosses between
34 the two species in the experimental field, used the *G. mustelinum* as a mother that was
35 fertilized by pollen from: i) a mixture of 50% herbaceous plus 50% *G. mustelinum* ii) a
36 mixture of 75% herbaceous and 25% *G. mustelinum* iii) a mixture of 25% herbaceous and
37 75% *G. mustelinum* iv) herbaceous and v) *G. mustelinum*. We obtained seeds from each
38 cross, which underwent DNA extraction and molecular analysis to determine the proportion
39 of seeds from crosses inter-and intra-specific by genotyping with SSR markers of the type. No
40 significant differences in fertility or crossability between the genotypes of *G. mustelinum*. The
41 frequency of the descendants of the proportion of pollen used in crossing were compared
42 using statistical test, chi-square (χ^2), a 1% probability. Proved the existence of pollen
43 competition in all mixing ratios of pollen.

44

45 Index terms: Hybridization, gene flow, SSR markers.

46

47 **Introdu o**

48 O Nordeste brasileiro   o centro de origem do algodão *Gossypium mustelinum* (Miers)
49 Watt. Essa espécie   encontrada nas serras secas do semiárido, apresentando algumas
50 particularidades com rela o às outras espécies encontradas no Brasil, como capulhos
51 pequenos, fibra curta e marrom, semente pequena, pilosidade marcante no caule e na folha.

52 *Gossypium mustelinum* foi considerada extinta até Aranha e Leitão (1969)
53 encontrarem uma nova população descrita como sendo uma nova espécie denominada de *G.*
54 *caicoense*. Entretanto, coletas de *G. mustelinum* e *G. caicoense*, realizadas na mesma região,
55 passaram por estudos de comparações morfológicas e análise de bandeamento cromossômico,
56 confirmando tratarem-se da espécie de *G. mustelinum* (VALICEK, 1977; FRYXELL, 1984;
57 FREIRE et al., 1990).

58 Até o início de 2006, apenas quatro populações naturais de *G. mustelinum* eram
59 conhecidas. Elas estão localizadas nos municípios de Caicó, no Rio Grande do Norte, e
60 Macururê e Jaguarari no Estado da Bahia. Apenas no final de 2006, novos sítios de ocorrência
61 foram encontrados em bacias dos rios Tocó e Capivara no Estado da Bahia (BARROSO et al.,
62 2010).

63 Nas regiões em que *G. mustelinum* é encontrado também ocorrem as espécies *G.*
64 *barbadense* L. e *G. hirsutum* L. var. *marie galante* Hutch. Sabe-se que estes algodoeiros
65 possuem áreas de distribuição simpátricas, o que, em teoria, há possibilidade de ocorrência de
66 hibridações e conseqüente introgressões entre estas espécies. O fluxo gênico a partir de
67 cultivares convencional ou transgênica de qualquer espécie é indesejado, pois podem afetar a
68 estrutura genética das demais populações. Todos os algodoeiros que ocorrem no Brasil são
69 alotetrapóides ($2n = 4x = 52$), portadores do genoma AD. As espécies portadoras desse
70 genoma não possuem barreiras reprodutivas completas e apresentam compatibilidade genética
71 devido ao alto grau de homologia entre cromossomos, que permite o pareamento de
72 homólogos e a formação de híbridos interespecíficos viáveis e férteis (BRUBAKER et al.,
73 1999; FREIRE, 2002; BARROSO & FREIRE, 2003). Freire (2002) relata que é possível
74 realizar cruzamentos entre raças e espécies de *Gossypium* presentes no Brasil e obter
75 descendentes férteis, inclusive com transgene. Os híbridos entre *G. hirsutum* e *G. barbadense*
76 são exemplos.

77 As flores de algodão abrem-se no início da manhã e fecham-se ao entardecer do
78 mesmo dia, não ocorrendo antese. O pólen é disperso pelas anteras logo após a abertura da
79 flor, permanecendo viável por aproximadamente 12 a 24 horas (COBLEY, 1956). Free (1993)
80 relata que a viabilidade do pólen do algodão pode durar por até 17 horas e a fertilização
81 ocorre 30 horas depois da polinização.

82 Na falta de barreiras sexuais completas, o isolamento geográfico entre cultivares e as
83 populações que se deseja proteger têm sido usados para reduzir a probabilidade de
84 cruzamentos entre elas. Em face à possibilidade de ocorrência de fluxo gênico entre espécies
85 de algodão geneticamente modificados para cultivares convencionais, a Comissão Técnica
86 Nacional de Biossegurança (CTNBio) determinou a implementação de zonas de exclusão que
87 foi transformada em Portaria (Nº 21, de 13 de janeiro de 2005) pelo Ministério da Agricultura,
88 Pecuária e Abastecimento (MAPA).

89 Por outro lado, competição pode resultar em fecundações preferenciais, tendo sido
90 relatados na literatura diversos casos em que há competição entre pólen de espécies
91 sexualmente compatíveis. Caso tal competição constitua um mecanismo importante para
92 manutenção da identidade genética, a mesma pode ser usada ou servir de parâmetro para se
93 evitar o fluxo entre as espécies em questão.

94 Percy e Wendel (1990) comprovaram a restrição de cruzamentos devido à competição
95 de pólen entre *G. barbadense* e cultivares de algodoeiro herbáceo. Caso isso ocorra entre *G.*
96 *mustelinum* e herbáceo, as zonas de exclusão poderão ser substituídas por medidas menos
97 restritivas de contenção do fluxo gênico ou redimensionadas, possibilitando que os produtores
98 das regiões dentro das zonas de exclusão possam optar pelo cultivo de algodoeiros
99 transgênicos, caso desejem. O objetivo deste trabalho foi verificar se há competição de polens
100 em *G. mustelinum* e herbáceo em relação à fertilização da espécie silvestre, bem como se há
101 diferença de competição em diferentes proporções de polens das referidas espécies.

102
103
104
105
106
107
108
109
110
111
112
113
114
115
116
117
118
119
120
121
122
123
124
125
126

Material e Métodos

Acessos de *G. mustelinum* (Miers) Watt. e cultivares de *G. hirsutum* var. *latifolium*, mantidas em campo no Centro Nacional de Pesquisa de Algodão – CNPA – Embrapa Algodão, foram utilizadas para realização de polinizações controladas sem e com mistura de pólen, no período de janeiro a agosto de 2009 (Tabela 1). Como genitores femininos utilizou-se acessos de *G. mustelinum* e, como genitores masculinos cultivares de *G. hirsutum* e acessos de *G. mustelinum*. A coleta do pólen de cada genótipo foi realizada antes da antese, no início da manhã e os cruzamentos foram conduzidos ao entardecer.

A emasculação foi efetuada na tarde do dia precedente à abertura do botão floral, período em que se mostrava mais desenvolvido (aproximadamente a partir das quinze horas). Cuidadosamente, removeu-se a corola, manualmente ou com auxílio de tesoura pequena de ponta, mantendo-se as brácteas. Com fricção dos dedos ou com a tesoura, eliminou-se as anteras, deixando apenas os filetes. Por fim, recobriu-se o estigma com canudo de papelão, dobrado em uma das pontas para evitar polinização por insetos. Na mesma tarde da emasculação das flores do genitor feminino, os botões florais do genitor masculino foram protegidos por amarrações com fio de cobre, para evitar possível contaminação por pólen de outras plantas no ato da abertura.

Por volta das nove horas do dia seguinte em que foi realizada a emasculação e a preparação das flores do genitor masculino, flores não emasculadas de ambos os genitores foram recolhidas em sacos de papel identificados. Levadas ao laboratório, as pétalas foram liberadas para a abertura plena. Avaliou-se a antese visualmente ou com auxílio de lupa, sempre evitando movimentos bruscos para evitar perda de polens.

Os grãos de polens liberados naturalmente da antera foram coletados em tubo *Falcon* com o menor intervalo de tempo possível, pois considera-se que certa diminuição de viabilidade do pólen esteja relacionada com o seu desprendimento da flor.

127 Os grãos de polens foram pesados em balança de precisão e massas de polens, de
128 acordo com proporção de cada cruzamento, de ambos os genótipos foram reunidos em um
129 único tubo, e homogeneizados através de movimentos leves. Considerou-se que 100 g de
130 pólen equivalem a 100 % de massa de polens.

131 Para a polinização, recolheu-se parte da mistura com pincel artístico limpo, retirou-se
132 o canudo de papelão que recobria o gineceu da flor emasculada e, em seguida, friccionou-se
133 as cerdas do pincel repletas de pólen no estigma da flor emasculada para deposição dos
134 mesmos. Em seguida, o canudo de papelão para proteger o estigma foi recolocado. As
135 sementes colhidas de cada flor foram armazenadas em câmara fria até a sua utilização nas
136 extrações de DNA. A obtenção de sementes provenientes de autofecundação de todos os
137 genótipos trabalhados foi realizada pelo método da amarração com fio de cobre com
138 aproximadamente 20 cm de comprimento. Conforme descrito por Penna (1999).

139 O DNA genômico foi obtido de duas formas: para os genitores, pela extração a partir
140 das folhas, já nos descendentes utilizaram-se as sementes. No tecido foliar, a extração foi feita
141 pelo método CTAB proposto por Ferreira e Grattapaglia (1998) com modificações de Vidal et
142 al. (2003) e de Barroso et al. (2006). A extração de DNA de semente foi realizada de acordo
143 com método SDS sugerido por McDonald et al. (1994).

144 Alíquotas do volume total de DNA extraído foram quantificadas por comparação
145 visual das bandas, geradas de uma série de concentrações conhecidas de DNA fago λ (50,
146 100, 150, 200 e 250 ng) em géis de agarose a 0,8%. Posteriormente, o DNA foi diluído em TE
147 (pH 8) a 1 ng L^{-1} para as reações de PCR.

148 Os pares de primers, desenvolvidos por Nguyen et al. (2004) (Tabela 2), foram
149 utilizados em reações com volume total de 20 μL , contendo 20 ng de DNA genômico, 0,15
150 μM de cada primer, 0,2 mM de dNTP, 50 mM de KCl, 10 mM de Tris-HCl pH 8,3, uma
151 unidade de Taq DNA polimerase e 2 mM de MgCl_2 . As condições físicas durante a PCR

152 foram constituídas por uma desnaturação inicial de 94 °C por 5 minutos, a partir do qual se
153 seguiram 35 ciclos. A desnaturação em cada ciclo foi realizada a uma temperatura de 94 °C
154 por 30 segundos e duas diferentes temperaturas de anelamento foram utilizadas de acordo
155 com a especificidade de cada primer (51 °C e 55 °C), por 1 minuto, seguido da extensão de 72
156 °C por 1 minuto. A extensão final ocorreu a 72 °C por 8 minutos. Os produtos de amplificação
157 foram corados com nitrato de prata conforme metodologia descrita por Creste et al. (2001).

158 Os marcadores microssatélites foram avaliados como marcadores dominantes, tendo
159 sido atribuídos os valores 1 para presença do alelo e 0 para a ausência. O cruzamento foi
160 confirmado pela presença dos dois alelos no indivíduo que representa a geração F₁. A
161 frequência de descendentes de cada tipo de pólen usado no cruzamento foi comparada
162 utilizando o teste estatístico do qui-quadrado (χ^2).

163 As relações entre a proporção de pólen de *G. mustelinum* usada nos cruzamentos
164 (variável dependente) e a proporção de indivíduos não híbridos interespecíficos (variável
165 dependente) foram avaliadas pela busca da equação com melhor ajuste. Foram empregadas
166 equações lineares e não lineares para determinar aquela com o melhor ajuste usando o
167 software TableCurve 2D v5.01 for Windows (Jandel Scientific).

168

169

Resultados e discussão

170 Não foram verificadas diferenças de fertilidade ou de cruzabilidade entre os genótipos
171 de *G. mustelinum*, embora nos cruzamentos envolvendo mistura de pólen como os genitores
172 masculinos C27 e Mac 01 não se obtiveram híbrido (Tabela 1). Isso pode ter ocorrido em
173 decorrência de incompatibilidade genética ou de outra condição fisiológica desfavorável, mas
174 também pode ter sido em decorrência dos cruzamentos terem sido realizados em estágio
175 inadequado de fertilidade das flores.

176 Com a polinização entre de 10 a 42 flores usadas nos cruzamento com as três
177 proporções de mistura de pólen de *G. mustelinum* e herbáceo, o número médio de sementes
178 obtidas variou entre nove e 11 (Tabela 3). Comparando-se tais valores com o número médio
179 de sementes obtidas nos cruzamentos com 100% de pólen das respectivas espécies, verifica-se
180 que houve pouca variação, pois as médias do número de sementes obtidas foram de 15 e 14
181 para *G. mustelinum* e herbáceo, respectivamente. A condição de homogeneidade ambiental
182 em que as plantas foram mantidas na ocasião dos cruzamentos e também por ter havido
183 padronização do estágio fisiológico das flores na ocasião da polinização, pode ter contribuído
184 para a baixa variação. Essa condição, também contribuiu para a baixa variação no número
185 médio de sementes por flor observada tanto nos cruzamentos com mistura de pólen quanto
186 nos sem mistura, cujos valores variaram entre nove e 15 (Tabela 3).

187 Foram obtidas 492 sementes híbridas provenientes de 89 flores de *G. mustelinum*
188 emasculadas e cruzadas com herbáceo e mistura de ambas as espécies (Tabela 3). Esse
189 resultado confirma compatibilidade genética entre as duas espécies relatada por Brubaker et
190 al. (1999), Freire (2002), Barroso & Freire (2003). A ocorrência de fluxo gênico da *G.*
191 *mustelinum* para algodoeiro mocó da espécie *G. hirsutum* L. var. *marie galante* foi relatada
192 por Wendel et al. (1994). Embora, neste trabalho, os híbridos tenham sido obtidos em
193 condições de cruzamento artificial, os resultados confirmam que há possibilidade de fluxo
194 gênico da espécie herbáceo para a espécie silvestre.

195 Com base nas análises dos marcadores moleculares, as sementes híbridas originadas
196 de cruzamento entre os algodoeiros *G. mustelinum* e os herbáceos apresentaram alelos de
197 ambos os pais, enquanto as não híbridas apresentaram os alelos apenas de um dos pais (Figura
198 1).

199 Em condições de campo, seja em populações naturais ou em condições de cultivo, a
200 distância entre os materiais é determinante em relação à possibilidade de fluxo gênico por

201 pólen. Isto porque a viabilidade e proporção do pólen tende a diminuir e, além disso, pode
202 haver competição entre pólen da própria espécie e da outra em questão. O teste do χ^2
203 considerando-se frequências observadas e esperadas de sementes híbridas e não híbridas foi
204 significativo ($p= 0,01$) para as três proporções de misturas de pólen utilizadas nos
205 cruzamentos (Tabela 3), confirmando, portanto, que houve competição entre pólen das duas
206 espécies.

207 A competição de pólen de espécies do gênero *Gossypium* foi relatada por Stephens
208 (1949), em estudo realizado por Kearney e Harrison (1932), que utilizaram mistura de pólen
209 de *G. hirsutum* e *G. barbadense*, esta última como genitor feminino. Pereira (2008), em
210 trabalho realizado com as mesmas espécies, também verificou competição utilizando mistura
211 de pólen na proporção 50% e a espécie *G. hirsutum* como genitor feminino.

212 Para outros vegetais, a competição de pólen interespecífico é bem documentada na
213 literatura. Song et al. (2002) relatam a competição entre pólen de *Oryza sativa* e *O. rufipogon*,
214 utilizando a última como genitor feminino. Klips (1999) observou o mesmo fenômeno em
215 cruzamento de espécies do gênero *Hibiscus* (família Malvaceae), *H. moscheutos* e *H. laevis*
216 em cruzamentos recíproco. Em estudos realizados com espécies de *Ipomopsis*
217 (Polemoniaceae) geograficamente isoladas, Aldridge & Campbell (2006) verificaram
218 vantagem competitiva do pólen da espécie utilizada como genitor feminino para ambas as
219 espécies quando mistura na proporção de 50% eram utilizadas em cruzamento recíproco entre
220 as espécies *I. aggregata* e *I. tenuituba*.

221 No presente estudo, comparando-se as três diferentes proporções de pólen utilizadas
222 nos cruzamentos, verificou-se maior percentagem de híbridos quando se utilizou pólen do
223 algodoeiro herbáceo em maior percentagem. Nos cruzamentos em que foi utilizada mistura de
224 75% de pólen de herbáceos e 25% de *G. mustelinum*, obteve-se 64,71% de híbridos; nos
225 cruzamento em que se utilizou mistura de 50% de pólen de cada espécie obteve-se 21,46% de

226 híbridos e nos cruzamentos em que se utilizou mistura de 75% de pólen *G. mustelinum* e 25%
227 de herbáceo, a porcentagem de híbrido obtido foi de 4,71% (Tabela 4).

228 No gráfico de regressão linear (Figura 2), observa-se que há expressiva correlação
229 entre as variáveis, sendo que 89,5% são decorrentes da variação das proporções de polens, e
230 10,5% não são atribuídas às referidas proporções de polens das duas espécies. Portanto,
231 quanto maior a porcentagem de pólen de *G. mustelinum*, menor tende ser a porcentagem de
232 híbrido entre as duas espécies.

233 A redução da taxa de cruzamento em baixas porcentagens de pólen de *G. hirsutum*,
234 apesar de reduzir, não elimina as possibilidades de fluxo gênico para populações de *G.*
235 *mustelinum*. Portanto, para se avaliar a probabilidade de ocorrência de fluxo gênico é
236 necessário o estudo de forrageamento dos insetos polinizadores que ocorrem na região. Entre
237 os polinizadores de algodoeiro há relatos de que abelhas melíferas podem forragear a
238 distância máxima de 10 km da colmeia, sendo que a maioria foi encontrada a 6 km (SILVA,
239 2007). Portanto, a possibilidade de fluxo gênico *G. hirsutum* para as populações de *G.*
240 *mustelinum* será menor quanto mais baixa for a porcentagem de pólen da primeira em relação
241 à segunda espécie, mas para ser quantificada ou mesmo eliminar os riscos, fazem-se
242 necessários estudos da fauna de insetos polinizadores de espécies deste gênero. Na ausência
243 de tais informações, o mais adequado é adotar os controles por meio das zonas de exclusão,
244 conforme a Portaria (Nº 21, de 13 de janeiro de 2005) do Ministério da Agricultura, Pecuária
245 e Abastecimento (MAPA).

246 **Conclusões**

247 1- Há competição entre pólen de *G. mustelinum* e *G. hirsutum* quando genitores
248 femininos da primeira espécie são polinizados com de mistura de pólen de ambas as espécies.

249 2- Quanto maior porcentagem de pólen de *G. hirsutum* em relação à mistura com
250 pólen de *G. mustelinum* maior será a porcentagem de híbridos obtidos entre as espécies.

251
252
253
254
255
256
257
258
259
260
261
262
263
264
265
266
267
268
269
270
271
272
273
274
275

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudo. À Embrapa algodão pela disponibilização de toda estrutura necessária para o desenvolvimento desta pesquisa e aos funcionários Francisco Alves, Fábila Lima Pinto e Joabson Araújo pelo suporte técnico.

Referências

ALDRIDGE, G.; CAMPBELL, D.R. Asymmetrical pollen success in *Ipomopsis* (Polemoniaceae) contact sites. **American Journal of Botany**, v.93, n.6, p.903-909, 2006.

ARANHA, C.; LEITÃO, H.F. Uma nova espécie para o gênero *Gossypium* L. **Bragantia**, v.28, n.23, p.273-290, 1969.

BARROSO, P.A.V.; FREIRE, E.C. Fluxo gênico em algodão no Brasil. In: PIRES, C.S.S.; FONTES, E.M.G.; SUJII, E.R. (Ed.). **Impacto ecológico de plantas geneticamente modificadas: o algodão resistente a insetos como estudo de caso**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia: CNPq, 2003. p.163-193.

BARROSO, P.A.V.; HOFFMANN, L.V.; BATISTA, C.E.A.; ARAÚJO, R.L.; MORESCO, E.R. **Uso de esferas de inox na maceração de tecidos foliares de algodoeiro destinados à extração de DNA**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2006. (Comunicado Técnico 297).

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

BRUBAKER, C.L.; BOURLAND, F.M.; WENDEL, J.F. The origin and domestication of cotton. In: SMITH, C.W.; COTHEN, J.T. (Ed.). **Cotton: origin, history, technology and production**. New York: John Wiley & Sons, 1999. p.23-32.

276 COBLEY, L.S. **An introduction to the botany of tropical crops**. London: Longmans, 1956.
277 457p.

278 CRESTE, S.; TULMANN NETO, A.; FIGUEIRA, A. Detection of single sequence repeat
279 polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. **Plant**
280 **Molecular Biology Reporter**, v.19, p.299-306, 2001.

281 FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares**
282 **em análise genética**. 3. ed. Brasília: Embrapa-Cenargen, 1998. 220p.

283 FREE, J.B. **Insect pollination of crops**. London: Academic Press. 1993. 648p.

284 FREIRE, E.C.; MOREIRA, J.A.N.; MIRANDA, A.R.; PERCIVAL, P.E.; STEWART, J.M.
285 **Identificação de novos sítios de ocorrência de *Gossypium mustelinum* no Brasil**. Campina
286 Grande: EMBRAPA-CNPA, 1990. 7p. (EMBRAPA-CNPA. Pesquisa em andamento, 10).

287 FREIRE, E.C. Viabilidade de cruzamentos entre algodoeiros transgênicos e comerciais e
288 silvestres do Brasil. **Revista Brasileira de Oleaginosas e Fibrosas**, v.6, n.1, p.465-470,
289 2002.

290 FRYXELL, P.A. Taxonomy and germoplasm resources. **American society of agronomy**,
291 p.27-58, 1984.

292 KLIPS, R.A. Pollen competition as a reproductive isolating mechanism between two
293 sympatric *Hibiscus* species (Malvaceae). **American Journal of Botany**, v.86, n.2, p.269-272,
294 1999.

295 McDONALD, M. B.; ELLIOT, L. J.; SWEENEY, P. M. DNA extraction from dry seeds for
296 RAPD analyses in varietal identification studies. **Seed Science & Technology**, v.22, p.171-
297 176, 1994.

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

301 PENNA, J.C.V. Hibridação em algodão. In: BORÉM, A. (Ed.). **Hibridação artificial de**
302 **plantas**. Viçosa: UFV, 1999. p.63-81.

303 PERCY, R.G.; WENDEL, J.F. Allozyme evidence for the origin and diversification of
304 *Gossypium barbadense* L. Theoretical and Applied. **Genetics**, v.79, p.529-542, 1990.

305 PEREIRA, G. S. **Competição intra e interespecífica entre pólen de algodoeiros**, 2008, 54p.
306 Monografia – Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande.

307 SILVA, E.M.S. **Abelhas visitantes florais do algodoeiro (*Gossypium hirsutum*) em**
308 **Quixeramobim e Quixeré, estado do Ceará, e seus efeitos na qualidade da fibra e**
309 **sementes**. 2007. 118p. Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

310 SONG, Z.; LU, B.; ZHU, Y.; CHEN, J. Pollen competition between cultivated and wild rice
311 species (*Oryza sativa* and *O. rufipogon*). **New Phytologist**, v.153, p.289-296, 2002.

312 STEPHENS, S. G. The cytogenetics of speciation in *Gossypium* I. Selective elimination of the
313 donor parent genotype in interspecific backcrosses. **Genetics**, v.34, p.627-63, 1949.

314 VALICEK, P. Some notes on the taxonomy of the new specie *Gossypium caicoense* Aran.
315 **Agricultura tropica et subtropical**, v.10, p.119-123, 1977.

316 VIDAL, M.S.; COUTINHO, T.C.; HOFFMANN, L.V. **Comparação entre protocolos de**
317 **extração de DNA de algodão para emprego em ensaios com marcadores moleculares**.
318 Campina Grande: Embrapa Algodão, nov. 2003. (Circular Técnica 74.)

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

Tabela 1. Acessos das espécies *G. mustelinum* e *G. hirsutum* utilizados em polinização controlada, porcentagem de pólen utilizado, número de híbridos obtidos e número de sementes produzidas.

Família	Genitores			Porcentagem de pólen (%)*	Nº de híbridos	Nº total de sementes
	Feminino	Masculino 1	Masculino 2			
1	Must 7	Mac 33	-	100 m	-	18
2	Must 8	Mac 33	-	100 m	-	16
3	C 24	C 26	-	100 m	-	13
4	C 26	Mac 33	-	100 m	-	14
5	C 27	C 26	-	100 m	-	14
6	Must 6	Buriti	-	100 h	26	26
7	Must 6	Deltaopal	-	100 h	35	35
8	Must 6	Safira	-	100 h	45	45
9	Must 6	FM 966	-	100 h	18	18
10	Must 7	Buriti	-	100 h	20	20
11	Must 8	Buriti	-	100 h	92	92
12	Must 9	Buriti	-	100 h	30	30
13	Must 7	Deltaopal	-	100 h	32	32
14	Must 6	Buriti	C 26	50 m + 50 h	3	22
15	Must 6	Deltaopal	C 26	50 m + 50 h	2	6
16	Must 6	Rubi	Must 8	50 m + 50 h	4	15
17	Must 7	Buriti	C 29	50 m + 50 h	3	18
18	Must 7	Buriti	Must 8	50 m + 50 h	4	25
19	Must 7	Buriti	C 26	50 m + 50 h	6	41
20	Must 7	Buriti	Mac 33	50 m + 50 h	4	22
21	Must 7	Deltaopal	Mac 33	50 m + 50 h	3	12
22	C 29	Buriti	C 29	50 m + 50 h	3	7

Tabela 1. (Continuação)...

23	Must 8	Buriti	C 29	50 m + 50 h	2	25
24	Must 6	Deltaopal	C 26	50 m + 50 h	8	42
25	Must 8	Buriti	C 24	50 m + 50 h	4	11
26	Must 8	Buriti	Must 8	50 m + 50 h	3	9
27	Must 10	Buriti	C 29	50 m + 50 h	8	18
28	Must 10	Buriti	Mac 33	50 m + 50 h	3	12
29	Mac 33	Buriti	C 26	50 m + 50 h	10	39
30	C 24	Buriti	C 26	50 m + 50 h	11	43
31	C 26	Buriti	C 26	50 m + 50 h	3	11
32	C 27	Buriti	C 26	50 m + 50 h	4	16
33	C 26	Buriti	C 29	50 m + 50 h	5	28
34	C 29	Deltaopal	Mac 33	50 m + 50 h	4	10
35	Mac 33	Buriti	C28	75 m + 25 h	0	13
36	Must 6	Buriti	C28	75 m + 25 h	1	16
37	C24	Buriti	C28	75 m + 25 h	3	26
38	Must 6	Buriti	C27	75 m + 25 h	0	5
39	Mac 33	Deltaopal	C24	75 m + 25 h	0	14
40	C28	Deltaopal	C24	75 m + 25 h	0	9
41	CP33	Safira	Mac 01	75 m + 25 h	0	10
42	C24	Safira	C24	75 m + 25 h	1	13
43	C 29	Buriti	Must 8	25 m + 75 h	6	10
44	C 26	Buriti	Must 8	25 m + 75 h	8	13
45	Mac 33	Buriti	Must 8	25 m + 75 h	12	18
46	Must 8	Buriti	Must 8	25 m + 75 h	3	6
47	C 27	Buriti	Must 8	25 m + 75 h	5	9
48	Must 8	Safira	Must 8	25 m + 75 h	5	5

Tabela 1. (Continuação)...

49	Must 7	Safira	Must 8	25 m + 75 h	11	17
50	TC 104	Safira	C 28	25 m + 75 h	12	18
51	Must 6	Safira	Must 8	25 m + 75 h	9	14
52	C 28	FM 966	C 25	25 m + 75 h	3	7
53	C 27	FM 966	C 26	25 m + 75 h	8	11
54	C 25	Buriti	Must 8	25 m + 75 h	10	14

(*) Algodão m: *G. mustelinum*; h: Algodão herbáceo.

Tabela 2. Pares de primers SSR utilizados para amplificar marcadores moleculares em algodoeiro, desenvolvidos por Nguyen et al. (2004), tamanho esperado, temperatura de anelamento e motivo.

Primer	Sequência dos primers (5'-3')	Sequência dos primers (5'-3')	Tamanho esperado	Temperatura usada (°C)	Motivo
CIR 009	GTGGGTATGGAGTTGTTT	CCGTTAGGTGTCTTTCTC	215	55	TG ₆ N ₁ TATG ₆
CIR058	CCATCTTCCTTTCATACC	AGCTGAAGAAGTATAACCCA	58	55	GT ₈
CIR169	GAAGCACAATAAGGCAA	CAAACAAGCGATGAAAC	141	55	AC ₈
CIR218	GCGAAGCAAAGGAAG	CTCCAACATCGTCTCAA	180	55	GT ₉
CIR222	TCATCAACAATCCTTCC	TACTGTCCCTCTTGCAT	291	55	GT ₁₄
CIR233	AGGCAGTAGCATTATCAG	GTGTTGGTTGTTTATGGTT	187	51	GT ₁₀

Tabela 3. Teste do χ^2 para as diferentes proporções de grãos de pólen utilizados nos cruzamentos das espécies *G. mustelinum* e *G. hirsutum*.

Proporção de pólen**	Nº de flores utilizada	Média de sementes por flor	Nº de sementes	Frequência esperada***		Frequência observada***		χ^2
				y	r	y	r	
100% h	21	14 ± 4,65	298	0	298	0	298	-
25% m + 75% h	16	9 ± 2,65	142	35.5	106.5	50	92	7,90*
50% m + 50% h	42	11 ± 2,56	432	216	216	335	97	131,12*
75% m + 25% h	10	10 ± 3,80	106	79.5	26.5	101	5	23,26*
100 % m	05	15 ± 1,06	75	75	0	75	0	-
Total	94		1053					

* Significativo $\alpha=0,01$

** m: *G. mustelinum*, h: herbáceo;

*** y: não híbrido, r: híbrido;

Tabela 4. Variáveis obtidas em relação ao número médio de sementes para as quatro proporções de pólen utilizadas nos cruzamentos entre as espécies *G. mustelinum* e *G. hirsutum*.

Proporção de pólen*	Nº médio de sementes	Porcentagem de híbridos (%)	Variância	Coefficiente de Variação
100 % h	37,25 ± 23,71	100,00	562,49	63,65
25% m + 75% h	11,83 ± 4,56	64,71	20,86	38,54
50% m + 50% h	20,57 ± 11,94	21,46	142,75	58,04
75% m + 25% h	13,25 ± 6,18	4,71	38,21	46,64
100% m	15 ± 2	-	4,0	13,33

(*) Algodão m: *G. mustelinum*; h: *G. hirsutum*.

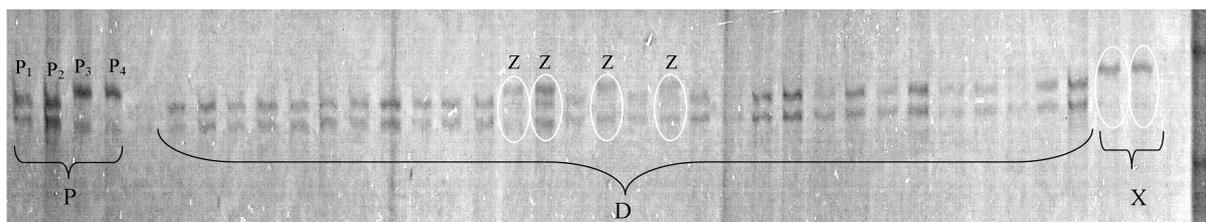


Figura1: Representação de alguns indivíduos analisados pelo primer CIR 222, mostrando o padrão polimórfico para mistura de pólen 50% *G. hirsutum* e 50% *G.mustelinum*. P: Genitores; P₁: *G. mustelinum* receptor de pólen; P₂: *G. mustelinum* doador de pólen; P₃: *G. hirsutum* doador de pólen; P₄: Repetição do genótipo de *G. hirsutum*; D: Sementes do cruzamento; X: Controle (híbrido entre *G. mustelinum* e *G. hirsutum*); Z: Sementes híbridas.

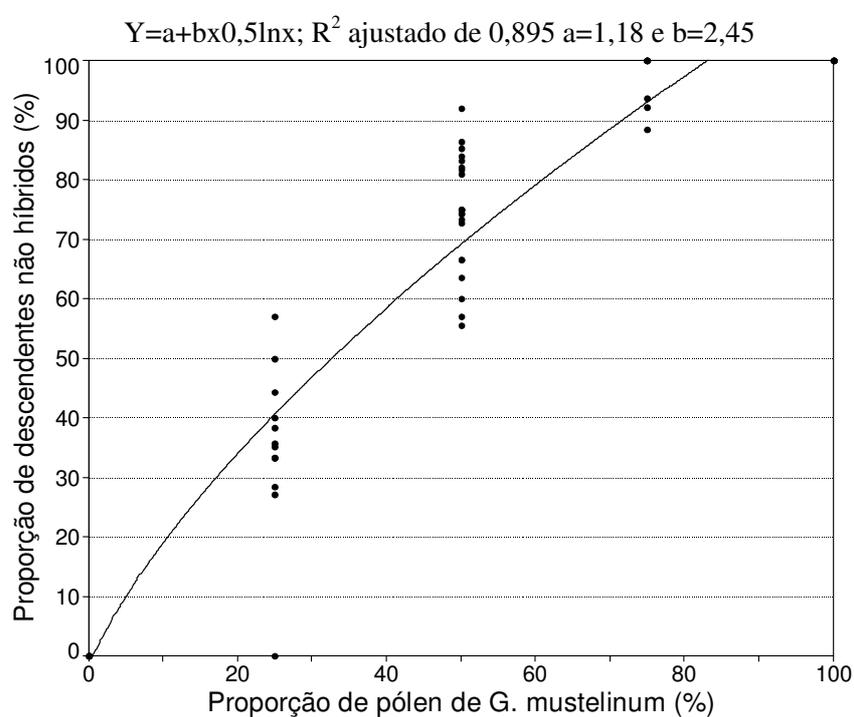


Figura 2. Regressão da proporção de descendentes não híbridos em função da proporção de pólen.

ANEXOS

**INSTRUÇÕES PARA SUBMISSÃO DE ARTIGO A REVISTA PAB – PESQUISA
AGROPECUÁRIA BRASILEIRA.**

INSTRUÇÕES

Os trabalhos enviados à PAB devem ser inéditos e não podem ter sido encaminhados a outro periódico científico ou técnico. Dados publicados na forma de resumos, com mais de 250 palavras, não devem ser incluídos no trabalho.

A Comissão Editorial faz análise dos trabalhos antes de submetê-los à assessoria científica. Nessa análise, consideram-se aspectos como: escopo; apresentação do artigo segundo as normas da revista; formulação do objetivo de forma clara; clareza da redação; fundamentação teórica; atualização da revisão da literatura; coerência e precisão da metodologia; resultados com contribuição significativa; discussão dos fatos observados frente aos descritos na literatura; qualidade das tabelas e figuras; originalidade e consistência das conclusões. Após a aplicação desses critérios, se o número de trabalhos aprovados ultrapassa a capacidade mensal de publicação, é aplicado o critério da relevância relativa, pelo qual são aprovados os trabalhos cuja contribuição para o avanço do conhecimento científico é considerada mais significativa.

Esse critério só é aplicado aos trabalhos que atendem aos requisitos de qualidade para publicação na revista, mas que, em razão do elevado número, não podem ser todos aprovados para publicação. Os trabalhos rejeitados são devolvidos aos autores e os demais são submetidos à análise de assessores científicos, especialistas da área técnica do artigo.

São considerados, para publicação, os seguintes tipos de trabalho: Artigos Científicos, Notas Científicas e Artigos de Revisão, este último a convite do Editor. Os trabalhos publicados na PAB são agrupados em áreas técnicas, cujas principais são: Entomologia, Fisiologia Vegetal, Fitopatologia, Fitotecnia, Fruticultura, Genética, Microbiologia, Nutrição Mineral, Solos e Zootecnia. O texto deve ser digitado no editor de texto Word, em espaço duplo, fonte Times New Roman, corpo 12, folha formato A4, margens de 2,5 cm, com páginas e linhas numeradas.

Acesso aos itens:

[Escopo e política editorial](#)

[Análise dos artigos](#)

[Forma e preparação de manuscritos](#)

[Informações necessárias na](#)

[submissão on-line de trabalhos](#)

[Organização do Artigo Científico](#)

[Título](#)

[Nome dos autores](#)

[Endereço dos autores](#)

[Resumo](#)

[Termos para indexação](#)

[Introdução](#)

[Material e Métodos](#)

[Resultados e Discussão](#)

[Conclusões](#)

[Agradecimentos](#)

[Referências](#)

[Citações](#)

[Fórmulas, expressões e equações](#)

[matemáticas](#)

[Tabelas](#)

[Figuras](#)

[Notas Científicas](#)

[Outras informações](#)

Escopo e política editorial

A revista Pesquisa Agropecuária Brasileira (PAB) é uma publicação mensal da Embrapa, que edita e publica trabalhos técnico-científicos originais, em português, espanhol ou inglês, resultantes de pesquisas de interesse agropecuário. A principal forma de contribuição é o Artigo, mas a PAB também publica Notas Científicas e Revisões a convite do Editor.

Análise dos artigos

A Comissão Editorial faz a análise dos trabalhos antes de submetê-los à assessoria científica. Nessa análise, consideram-se aspectos como escopo, apresentação do artigo segundo as normas da revista, formulação do objetivo de forma clara, clareza da redação, fundamentação teórica, atualização da revisão da literatura, coerência e precisão da metodologia, resultados com contribuição significativa, discussão dos fatos observados em relação aos descritos na literatura, qualidade das tabelas e figuras, originalidade e consistência das conclusões. Após a aplicação desses critérios, se o número de trabalhos aprovados ultrapassa a capacidade mensal de publicação, é aplicado o critério da relevância relativa, pelo qual são aprovados os trabalhos cuja contribuição para o avanço do conhecimento científico é considerada mais significativa. Esse critério é aplicado somente aos trabalhos que atendem aos requisitos de qualidade para publicação na revista, mas que, em razão do elevado número, não podem ser todos aprovados para publicação. Os trabalhos rejeitados são devolvidos aos autores e os demais são submetidos à análise de assessores científicos, especialistas da área técnica do artigo.

Forma e preparação de manuscritos

- Os trabalhos enviados à PAB devem ser inéditos (não terem dados – tabelas e figuras – publicadas parcial ou integralmente em nenhum outro veículo de divulgação técnico-científica, como boletins institucionais, anais de eventos, comunicados técnicos, notas científicas etc.) e não podem ter sido encaminhados simultaneamente a outro periódico científico ou técnico. Dados publicados na forma de resumos, com mais de 250 palavras, não devem ser incluídos no trabalho.
- São considerados, para publicação, os seguintes tipos de trabalho: Artigos Científicos, Notas Científicas e Artigos de Revisão, este último a convite do Editor.
- Os trabalhos publicados na PAB são agrupados em áreas técnicas, cujas principais são: Entomologia, Fisiologia Vegetal, Fitopatologia, Fitotecnia, Fruticultura, Genética, Microbiologia, Nutrição Mineral, Solos e Zootecnia.
- O texto deve ser digitado no editor de texto Microsoft Word, em espaço duplo, fonte Times New Roman, corpo 12, folha formato A4, com margens de 2,5 cm e com páginas e linhas numeradas.

Informações necessárias na submissão on-line de trabalhos

No passo 1 da submissão:

(Início), em "comentários ao editor", informar a relevância e o aspecto inédito do trabalho.

No passo 2 da submissão:

(Inclusão de metadados), em "resumo da biografia" de cada autor, informar a formação e o grau acadêmico. Clicar em "incluir autor" para inserir todos os coautores do trabalho, na ordem de autoria.

Copiar e colar o título, resumo e termos para indexação (key words) do trabalho nos respectivos campos do sistema. Depois, ir à parte superior da tela, no campo "Idioma do formulário", e selecionar "English". Descer a tela (clicar na barra de rolagem) e copiar e colar o "title", "abstract" e os "index terms" nos campos correspondentes. (Para dar continuidade ao processo de submissão, é necessário que tanto o título, o resumo e os termos para indexação quanto o title, o abstract e os index terms do manuscrito tenham sido fornecidos.)

No passo 3 da submissão

(Transferência do manuscrito), carregar o trabalho completo em arquivo Microsoft Word1997 a 2003.

No passo 4 da submissão

(Transferência de documentos suplementares), carregar, no sistema on-line da revista PAB, um arquivo Word com todas as cartas (mensagens) de concordância dos coautores coladas conforme as explicações abaixo:

- Colar um e-mail no arquivo word de cada coautor de concordância com o seguinte conteúdo: "Eu, ..., concordo com o conteúdo do trabalho intitulado "....." e com a submissão para a publicação na revista PAB.
- Como fazer: Peça ao coautor que lhe envie um e-mail de concordância, encaminhe-o para o seu próprio e-mail (assim gerará os dados da mensagem original: assunto, data, de e para), marque todo o email e copie e depois cole no arquivo word. Assim, teremos todas as cartas de concordâncias dos co-autores num mesmo arquivo.

Organização do Artigo Científico

- A ordenação do artigo deve ser feita da seguinte forma: Artigos em português - Título, autoria, endereços institucionais e eletrônicos, Resumo, Termos para indexação, título em inglês, Abstract, Index terms, Introdução, Material e Métodos, Resultados e Discussão, Conclusões, Agradecimentos, Referências, tabelas e figuras.
- Artigos em inglês - Título, autoria, endereços institucionais e eletrônicos, Abstract, Index terms, título em português, Resumo, Termos para indexação, Introduction,

Materials and Methods, Results and Discussion, Conclusions, Acknowledgements, References, tables, figures.

- Artigos em espanhol - Título, autoria, endereços institucionais e eletrônicos, Resumen, Términos para indexación; título em inglês, Abstract, Index terms, Introducción, Materiales y Métodos, Resultados y Discusión, Conclusiones, Agradecimientos, Referencias, cuadros e figuras.
- O título, o resumo e os termos para indexação devem ser vertidos fielmente para o inglês, no caso de artigos redigidos em português e espanhol, e para o português, no caso de artigos redigidos em inglês.
- O artigo científico deve ter, no máximo, 20 páginas, incluindo-se as ilustrações (tabelas e figuras), que devem ser limitadas a seis, sempre que possível.

Título

- Deve representar o conteúdo e o objetivo do trabalho e ter no máximo 15 palavras, incluindo-se os artigos, as preposições e as conjunções.
- Deve ser grafado em letras minúsculas, exceto a letra inicial, e em negrito.
- Deve ser iniciado com palavras chaves e não com palavras como "efeito" ou "influência".
- Não deve conter nome científico, exceto de espécies pouco conhecidas; neste caso, apresentar somente o nome binário.
- Não deve conter subtítulo, abreviações, fórmulas e símbolos.
- As palavras do título devem facilitar a recuperação do artigo por índices desenvolvidos por bases de dados que catalogam a literatura.

Nomes dos autores

- Grafar os nomes dos autores com letra inicial maiúscula, por extenso, separados por vírgula; os dois últimos são separados pela conjunção "e", "y" ou "and", no caso de artigo em português, espanhol ou em inglês, respectivamente.
- O último sobrenome de cada autor deve ser seguido de um número em algarismo arábico, em forma de expoente, entre parênteses, correspondente à chamada de endereço do autor.

Endereço dos autores

- São apresentados abaixo dos nomes dos autores, o nome e o endereço postal completos da instituição e o endereço eletrônico dos autores, indicados pelo número em algarismo arábico, entre parênteses, em forma de expoente.
- Devem ser agrupados pelo endereço da instituição.
- Os endereços eletrônicos de autores da mesma instituição devem ser separados por vírgula.

Resumo

- O termo Resumo deve ser grafado em letras minúsculas, exceto a letra inicial, na margem esquerda, e separado do texto por travessão.
- Deve conter, no máximo, 200 palavras, incluindo números, preposições, conjunções e artigos.
- Deve ser elaborado em frases curtas e conter o objetivo, o material e os métodos, os resultados e a conclusão.
- Não deve conter citações bibliográficas nem abreviaturas.
- O final do texto deve conter a principal conclusão, com o verbo no presente do indicativo.

Termos para indexação

- A expressão Termos para indexação, seguida de dois-pontos, deve ser grafada em letras minúsculas, exceto a letra inicial.
- Os termos devem ser separados por vírgula e iniciados com letra minúscula.
- Devem ser no mínimo três e no máximo seis, considerando-se que um termo pode possuir duas ou mais palavras.
- Não devem conter palavras que componham o título.
- Devem conter o nome científico (só o nome binário) da espécie estudada.
- Devem, preferencialmente, ser termos contidos no [AGROVOC: Multilingual Agricultural Thesaurus](#) ou no [Índice de Assuntos da base SciELO](#).

Introdução

- A palavra Introdução deve ser centralizada e grafada com letras minúsculas, exceto a letra inicial, e em negrito;
- Deve apresentar a justificativa para a realização do trabalho, situar a importância do problema científico a ser solucionado e estabelecer sua relação com outros trabalhos publicados sobre o assunto.
- O último parágrafo deve expressar o objetivo de forma coerente com o descrito no início do Resumo.

Material e Métodos

- A expressão Material e Métodos deve ser centralizada e grafada em negrito; os termos Material e Métodos devem ser grafados com letras minúsculas, exceto as letras iniciais.
- Deve ser organizado, de preferência, em ordem cronológica.
- Deve apresentar a descrição do local, a data e o delineamento do experimento, e indicar os tratamentos, o número de repetições e o tamanho da unidade experimental.

- Deve conter a descrição detalhada dos tratamentos e variáveis.
- Deve-se evitar o uso de abreviações ou as siglas.
- Os materiais e os métodos devem ser descritos de modo que outro pesquisador possa repetir o experimento.
- Devem ser evitados detalhes supérfluos e extensas descrições de técnicas de uso corrente.
- Deve conter informação sobre os métodos estatísticos e as transformações de dados.
- Deve-se evitar o uso de subtítulos; quando indispensáveis, grafá-los em negrito, com letras minúsculas, exceto a letra inicial, na margem esquerda da página.

Resultados e Discussão

- A expressão Resultados e Discussão deve ser centralizada e grafada em negrito, com letras minúsculas, exceto a letra inicial.
- Todos os dados apresentados em tabelas ou figuras devem ser discutidos.
- As tabelas e figuras são citadas seqüencialmente.
- Os dados das tabelas e figuras não devem ser repetidos no texto, mas discutidos em relação aos apresentados por outros autores.
- Evitar o uso de nomes de variáveis e tratamentos abreviados.
- Dados não apresentados não podem ser discutidos.
- Não deve conter afirmações que não possam ser sustentadas pelos dados obtidos no próprio trabalho ou por outros trabalhos citados.
- As chamadas às tabelas ou às figuras devem ser feitas no final da primeira oração do texto em questão; se as demais sentenças do parágrafo referirem-se à mesma tabela ou figura, não é necessária nova chamada.
- Não apresentar os mesmos dados em tabelas e em figuras.
- As novas descobertas devem ser confrontadas com o conhecimento anteriormente obtido.

Conclusões

- O termo Conclusões deve ser centralizado e grafado em negrito, com letras minúsculas, exceto a letra inicial.
- Devem ser apresentadas em frases curtas, sem comentários adicionais, com o verbo no presente do indicativo.
- Devem ser elaboradas com base no objetivo do trabalho.
- Não podem consistir no resumo dos resultados.
- Devem apresentar as novas descobertas da pesquisa.
- Devem ser numeradas e no máximo cinco.

Agradecimentos

- A palavra Agradecimentos deve ser centralizada e grafada em negrito, com letras minúsculas, exceto a letra inicial
- Devem ser breves e diretos, iniciando-se com "Ao, Aos, À ou Às" (pessoas ou instituições).
- Devem conter o motivo do agradecimento.

Referências

- A palavra *Referências* deve ser centralizada e grafada em negrito, com letras minúsculas, exceto a letra inicial.
- Devem ser de fontes atuais e de periódicos: pelo menos 70% das referências devem ser dos últimos 10 anos e 70% de artigos de periódicos.
- Devem ser normalizadas de acordo com a NBR 6023 da ABNT, com as adaptações descritas a seguir.
- Devem ser apresentadas em ordem alfabética dos nomes dos autores, separados por ponto-e-vírgula, sem numeração.
- Devem apresentar os nomes de todos os autores da obra.
- Devem conter os títulos das obras ou dos periódicos grafados em negrito.
- Devem conter somente a obra consultada, no caso de citação de citação.
- Todas as referências devem registrar uma data de publicação, mesmo que aproximada.
- Devem ser trinta, no máximo.

Exemplos:

- Artigos de Anais de Eventos (aceitos apenas trabalhos completos)

AHRENS, S. A fauna silvestre e o manejo sustentável de ecossistemas florestais. In: SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO SOBRE MANEJO FLORESTAL, 3., 2004, Santa Maria. **Anais**. Santa Maria: UFSM, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, 2004. p.153-162.

- Artigos de periódicos

SANTOS, M.A. dos; NICOLÁS, M.F.; HUNGRIA, M. Identificação de QTL associados à simbiose entre *Bradyrhizobium japonicum*, *B. elkanii* e soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, p.67-75, 2006.

- Capítulos de livros

AZEVEDO, D.M.P. de; NÓBREGA, L.B. da; LIMA, E.F.; BATISTA, F.A.S.; BELTRÃO, N.E. de M. Manejo cultural. In: AZEVEDO, D.M.P.; LIMA, E.F. (Ed.). **O agronegócio da mamona no Brasil**. Campina Grande: Embrapa Algodão; Brasília:

Embrapa Informação Tecnológica, 2001. p.121-160.

- Livros

OTSUBO, A.A.; LORENZI, J.O. **Cultivo da mandioca na Região Centro-Sul do Brasil**. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste; Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2004. 116p. (Embrapa Agropecuária Oeste. Sistemas de produção, 6).

- Teses

HAMADA, E. **Desenvolvimento fenológico do trigo (cultivar IAC 24 - Tucuruí), comportamento espectral e utilização de imagens NOAA-AVHRR**. 2000. 152p. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

- Fontes eletrônicas

EMBRAPA AGROPECUÁRIA OESTE. **Avaliação dos impactos econômicos, sociais e ambientais da pesquisa da Embrapa Agropecuária Oeste: relatório do ano de 2003**. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, 2004. 97p. (Embrapa Agropecuária Oeste. Documentos, 66). Disponível em: . Acesso em: 18 abr. 2006.

Citações

- Não são aceitas citações de resumos, comunicação pessoal, documentos no prelo ou qualquer outra fonte, cujos dados não tenham sido publicados.
- A autocitação deve ser evitada.
- Devem ser normalizadas de acordo com a NBR 10520 da ABNT, com as adaptações descritas a seguir:
 - ✓ Redação das citações dentro de parênteses
 - ✓ Citação com um autor: sobrenome grafado com a primeira letra maiúscula, seguido de vírgula e ano de publicação.
 - ✓ Citação com dois autores: sobrenomes grafados com a primeira letra maiúscula, separados pelo "e" comercial (&), seguidos de vírgula e ano de publicação.
 - ✓ Citação com mais de dois autores: sobrenome do primeiro autor grafado com a primeira letra maiúscula, seguido da expressão et al., em fonte normal, vírgula e ano de publicação.
 - ✓ Citação de mais de uma obra: deve obedecer à ordem cronológica e em seguida à ordem alfabética dos autores.
 - ✓ Citação de mais de uma obra dos mesmos autores: os nomes destes não devem ser repetidos; colocar os anos de publicação separados por vírgula.
 - ✓ Citação de citação: sobrenome do autor e ano de publicação do documento original, seguido da expressão "citado por" e da citação da obra consultada.

- ✓ Deve ser evitada a citação de citação, pois há risco de erro de interpretação; no caso de uso de citação de citação, somente a obra consultada deve constar da lista de referências
- ✓ Redação das citações fora de parênteses
- ✓ Citações com os nomes dos autores incluídos na sentença: seguem as orientações anteriores, com os anos de publicação entre parênteses; são separadas por vírgula.

Fórmulas, expressões e equações matemáticas

- Devem ser iniciadas à margem esquerda da página e apresentar tamanho padronizado da fonte Times New Roman.
- Não devem apresentar letras em itálico ou negrito, à exceção de símbolos escritos convencionalmente em itálico.

Tabelas

- As tabelas devem ser numeradas seqüencialmente, com algarismo arábico, e apresentadas em folhas separadas, no final do texto, após as referências.
- Devem ser auto-explicativas
- Seus elementos essenciais são: título, cabeçalho, corpo (colunas e linhas) e coluna indicadora dos tratamentos ou das variáveis.
- Os elementos complementares são: notas-de-rodapé e fontes bibliográficas.
- O título, com ponto no final, deve ser precedido da palavra Tabela, em negrito; deve ser claro, conciso e completo; deve incluir o nome (vulgar ou científico) da espécie e das variáveis dependentes.
- No cabeçalho, os nomes das variáveis que representam o conteúdo de cada coluna devem ser grafados por extenso; se isso não for possível, explicar o significado das abreviaturas no título ou nas notas-de-rodapé.
- Todas as unidades de medida devem ser apresentadas segundo o Sistema Internacional de Unidades.
- Nas colunas de dados, os valores numéricos devem ser alinhados pelo último algarismo.
- Nenhuma célula (cruzamento de linha com coluna) deve ficar vazia no corpo da tabela; dados não apresentados devem ser representados por hífen, com uma nota-de-rodapé explicativa.
- Na comparação de médias de tratamentos são utilizadas, no corpo da tabela, na coluna ou na linha, à direita do dado, letras minúsculas ou maiúsculas, com a indicação em nota-de-rodapé do teste utilizado e a probabilidade.
- Devem ser usados fios horizontais para separar o cabeçalho do título, e do corpo; usá-los ainda na base da tabela, para separar o conteúdo dos elementos complementares. Fios horizontais adicionais podem ser usados dentro do cabeçalho e do corpo; não usar fios verticais.

- As tabelas devem ser editadas em arquivo Word, usando os recursos do menu Tabela; não fazer espaçamento utilizando a barra de espaço do teclado, mas o recurso recuo do menu Formatar Parágrafo.
- Notas de rodapé das tabelas
- Notas de fonte: indicam a origem dos dados que constam da tabela; as fontes devem constar nas referências.
- Notas de chamada: são informações de caráter específico sobre partes da tabela, para conceituar dados. São indicadas em algarismo arábico, na forma de expoente, entre parênteses, à direita da palavra ou do número, no título, no cabeçalho, no corpo ou na coluna indicadora. São apresentadas de forma contínua, sem mudança de linha, separadas por ponto.
- Para indicação de significância estatística, são utilizadas, no corpo da tabela, na forma de expoente, à direita do dado, as chamadas ns (não-significativo); * e ** (significativo a 5 e 1% de probabilidade, respectivamente).

Figuras

- São consideradas figuras: gráficos, desenhos, mapas e fotografias usados para ilustrar o texto.
- Só devem acompanhar o texto quando forem absolutamente necessárias à documentação dos fatos descritos.
- O título da figura, sem negrito, deve ser precedido da palavra Figura, do número em algarismo arábico, e do ponto, em negrito.
- Devem ser auto-explicativas.
- A legenda (chave das convenções adotadas) deve ser incluída no corpo da figura, no título, ou entre a figura e o título.
- Nos gráficos, as designações das variáveis dos eixos X e Y devem ter iniciais maiúsculas, e devem ser seguidas das unidades entre parênteses.
- Figuras não-originais devem conter, após o título, a fonte de onde foram extraídas; as fontes devem ser referenciadas.
- O crédito para o autor de fotografias é obrigatório, como também é obrigatório o crédito para o autor de desenhos e gráficos que tenham exigido ação criativa em sua elaboração.
- As unidades, a fonte (Times New Roman) e o corpo das letras em todas as figuras devem ser padronizados.
- Os pontos das curvas devem ser representados por marcadores contrastantes, como: círculo, quadrado, triângulo ou losango (cheios ou vazios).
- Os números que representam as grandezas e respectivas marcas devem ficar fora do quadrante.
- As curvas devem ser identificadas na própria figura, evitando o excesso de informações que comprometa o entendimento do gráfico.
- Devem ser elaboradas de forma a apresentar qualidade necessária à boa reprodução gráfica e medir 8,5 ou 17,5 cm de largura.

- Devem ser gravadas nos programas Word, Excel ou Corel Draw, para possibilitar a edição em possíveis correções.
- Usar fios com, no mínimo, 3/4 ponto de espessura.
- No caso de gráfico de barras e colunas, usar escala de cinza (exemplo: 0, 25, 50, 75 e 100%, para cinco variáveis).
- Não usar negrito nas figuras.
- As figuras na forma de fotografias devem ter resolução de, no mínimo, 300 dpi e ser gravadas em arquivos extensão TIF, separados do arquivo do texto
- Evitar usar cores nas figuras; as fotografias, porém, podem ser coloridas.

Notas científicas

- Notas científicas são breves comunicações, cuja publicação imediata é justificada, por se tratar de fato inédito de importância, mas com volume insuficiente para constituir um artigo científico completo.
- Apresentação de Notas Científicas.
- A ordenação da Nota Científica deve ser feita da seguinte forma: título, autoria (com as chamadas para endereço dos autores), Resumo, Termos para indexação, título em inglês.
- Abstract, Index terms, texto propriamente dito (incluindo introdução, material e métodos, resultados e discussão, e conclusão, sem divisão), Referências, tabelas e figuras.
- As normas de apresentação da Nota Científica são as mesmas do Artigo Científico, exceto nos seguintes casos:
 - ✓ Resumo com 100 palavras, no máximo.
 - ✓ Deve ter apenas oito páginas, incluindo-se tabelas e figuras
 - ✓ Deve apresentar, no máximo, 15 referências e duas ilustrações (tabelas e figuras).

Outras informações

- Não há cobrança de taxa de publicação.
- Os manuscritos aprovados para publicação são revisados por no mínimo dois especialistas.
- O editor e a assessoria científica reservam-se o direito de solicitar modificações nos artigos e de decidir sobre a sua publicação.
- São de exclusiva responsabilidade dos autores as opiniões e conceitos emitidos nos trabalhos.
- Os trabalhos aceitos não podem ser reproduzidos, mesmo parcialmente, sem o consentimento expresso do editor da PAB.

Contatos com a secretaria da revista podem ser feitos por telefone: (61) 3448-4231 e 3273-9616 fax: (61)3340-5483, via e-mail: pab@sct.embrapa.br ou pelos correios: Embrapa
Informação Tecnológica
Pesquisa Agropecuária Brasileira – PAB
Caixa Postal 040315
CEP 70770 901 Brasília, DF.