



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CAMPUS I
CENTRO PRPGP
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS**

GEISENILMA MARIA GONÇALVES DA ROCHA

**DIVERSIDADE GENÉTICA E EXPRESSÃO GÊNICA EM FIBRAS DE ALGODÃO
COLORIDO**

**CAMPINA GRANDE
2015**

GEISENILMA MARIA GONÇALVES DA ROCHA

**DIVERSIDADE GENÉTICA E EXPRESSÃO GÊNICA EM FIBRAS DE ALGODÃO
COLORIDO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias da Universidade Estadual da Paraíba, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Agrárias.

Área de concentração: Biotecnologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Liziane Maria de Lima.
Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Roseane Cavalcanti dos Santos.

**CAMPINA GRANDE
2015**

É expressamente proibida a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano da dissertação.

R672d Rocha, Geisenilma Maria Gonçalves da.
Diversidade genética e expressão gênica em fibras de algodão colorido [manuscrito] / Geisenilma Maria Gonçalves da Rocha. - 2015.
45 p. : il. color.

Digitado.
Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias) - Universidade Estadual da Paraíba, Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa, 2015.
"Orientação: Profa. Dra. Liziane Maria de Lima, EMBRAPA Algodão".
"Co-Orientação: Profa. Dra. Roseane Cavalcanti dos Santos, EMBRAPA Algodão".
1. Algodão colorido. 2. Melhoramento genético. 3. Gossypium. 4. Marcador molecular. 5. RT-PCR. I. Título.
21. ed. CDD 633.51

GEISENILMA MARIA GONÇALVES DA ROCHA

DIVERSIDADE GENÉTICA E EXPRESSÃO GÊNICA EM FIBRAS DE ALGODÃO
COLORIDO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias da Universidade Estadual da Paraíba, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Agrárias.

Área de concentração: Biotecnologia.

Aprovada em: 09 / 02 / 2015.

BANCA EXAMINADORA



Prof^ª. Dr^ª. Liziane Maria de Lima (Orientadora)
Embrapa Algodão



Prof^ª. Dr^ª. Roseane Cavalcanti dos Santos (Coorientadora)
Embrapa Algodão



Prof. Dr. Francisco José de Correia Farias
Embrapa Algodão



Prof. Dr. Mailson Monteiro do Rego
Universidade Federal da Paraíba (UFPB)

À Deus que me ilumina e abençoa em todos os momentos. À minha família, em especial aos meus pais, José Gonçalves e Maria de Lourdes, por toda dedicação, incentivo e amor.

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus, primeiramente, pela presença em espírito, sem ele não teria dado nenhum passo, pela oportunidade de viver cada dia, com o objetivo de realizar este sonho, mesmo com todas as dificuldades que enfrentei no decorrer desta caminhada rumo ao sucesso, obrigada senhor por todas as tuas bênçãos e oportunidades concedidas.

Aos meus pais e irmãos, em especial à José Gerson (*in memoriam*), obrigada pelos esforços que fizeram para que eu estivesse aqui, por me proporcionar tudo o que tenho, pela confiança que depositaram em mim, enfim por contribuírem para meu sucesso e para meu crescimento como pessoa.

Agradeço de modo muito especial ao meu companheiro Alberto, por fazer a minha vida mais feliz, pelo apoio, amor, confiança, dedicação, respeito e por compartilhar cada momento de alegria, felicidade e angústia com muita compreensão, carinho e paciência.

À minha orientadora Dr^a. Liziane Maria de Lima, por ter participado ativamente da minha formação, servindo como exemplo de profissionalismo, ética, simplicidade, pelos valiosos ensinamentos transmitidos, conselhos, incentivos e, sobretudo pela amizade.

A meus coorientadores, Dr^a. Roseane Cavalcanti dos Santos e Dr. José Jaime Vasconcelos Cavalcanti, pelas contribuições e suporte nas análises estatísticas.

Ao Dr. Luiz Paulo, pela concessão do germoplasma e pelo incentivo para realização desse trabalho.

À amiga Morganna Pollynne, pelo companheirismo e suporte técnico na execução da pesquisa.

Aos amigos do Laboratório de Biotecnologia da Embrapa Algodão, Aline, Cássia, Ciro, Daniela, Eveline, Fátima, Géssica, Jean, Milena, Patrícia, Samara, Taiza, Valeska e Vandrê pela convivência e companheirismo.

Aos funcionários da Embrapa Algodão, Antonio e Juarez pela disponibilidade, em especial a Fábria Suely, pela ampla disponibilidade e suporte na execução do trabalho.

A todos os mestres do Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias, Universidade Estadual da Paraíba, que com seus ensinamentos me proporcionaram ampla minha formação acadêmica.

A Embrapa Algodão, pelo uso da infraestrutura e a Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

A todas as pessoas que participaram direta ou indiretamente da realização desse trabalho.

RESUMO

A demanda por fibras de algodão colorido tem crescido em nível internacional, motivada especialmente pelo apelo ecológico que o manejo proporciona. No Brasil, especialmente na região Nordeste, os nichos agrícolas se concentram em pequenas áreas de agricultores de base familiar, que adotam tanto o manejo convencional quanto o orgânico, gerando emprego e renda. O programa de melhoramento de algodão da Embrapa Algodão tem envidado esforços no desenvolvimento de novas cultivares de fibras coloridas com o intuito de contribuir com o crescimento do agronegócio regional, detendo atualmente cinco cultivares, com tonalidades de fibras variando do verde até várias tonalidades de marrom. O desafio dos pesquisadores, contudo, é gerar cultivares com novas tonalidades que possam contribuir para movimentar o competitivo mercado da indústria têxtil, especialmente o de fibras naturais e isentas de corantes para fixação da cor. Para avançar nesse segmento, é imprescindível que se entenda a base molecular dos metabólitos envolvidos na síntese da cor das fibras para que se possa estabelecer estratégias para o melhoramento genético, tanto por vias convencionais como por meio de engenharia genética. Sabe-se que os flavonoides são metabólitos secundários que conferem cor as fibras e que, dependendo da rota de sua biossíntese, várias tonalidades de cores podem ser sintetizadas ao final da cascata de eventos. Por ser um componente de natureza bioquímica, estima-se que a identificação de acessos detentores de diferentes biossintetizados possam ser discriminados por meio de marcadores moleculares associados, diretamente ou não, aos flavonoides. Tal estratégia pode se configurar em uma ferramenta útil para contribuir posteriormente na identificação de acessos de fibras coloridas, auxiliando a reduzir o tempo nos procedimentos de seleção, que levam entre 120 a 150 dias para que o caráter possa ser fenotipado. Com intuito de gerar informações que possam contribuir com o melhoramento de fibras de algodão colorido, objetivou-se nesse trabalho proceder um estudo envolvendo abordagens genética e molecular em acessos de algodão colorido, baseando-se em análise de divergência e de expressão molecular, focalizando em genes específicos de fibra envolvidos na biossíntese de flavonoides. Para análise da diversidade genética, doze acessos foram fenotipados por meio de PCR-ISSR, utilizando-se 12 oligonucleotídeos comerciais. Os métodos de Tocher, UPGMA e Projeção 2D foram adotados para análise de agrupamento, baseado no padrão de 50 bandas polimórficas. Em função dos resultados obtidos, procederam-se as análises de expressão de transcritos, utilizando-se os genes *PP2A1*, *C4H*, *DFR*, *ANR* e *ANS* em cDNAs de fibras coletadas aos 8, 10 e 18 DPA (dias pós antese) dos acessos BRS Rubi, BRS topázio, BRS 200 e V3. Na análise de agrupamento via UPGMA, verificou-se a formação de seis grupos, sendo os grupos B, D e E os que aglomeraram apenas os materiais coloridos. Nos resultados da expressão via RT-PCR semiquantitativa, observaram-se *amplicons* de aproximadamente 200, 290, 1100, 1024 e 1067 pb para *PP2A1*, *C4H*, *DFR*, *ANR* e *ANS*, respectivamente, como esperado. Observou-se maior expressão dos genes *C4H*, *DFR* e *ANR* nos acessos de coloração marrom, sugerindo que estes genes podem estar envolvidos na biossíntese de flavonoides de fibras marrons. Os resultados obtidos neste trabalho podem ser aplicados no programa de melhoramento do algodão visando a obtenção de cultivares com novas cores ou novas tonalidades.

Palavras-chave: 1. *Gossypium*; 2. marcador molecular; 3. RT-PCR.

ABSTRACT

The demand for colored cotton fibers has grown internationally, especially motivated by ecological appeal that management provides. In Brazil, especially in the Northeast, agricultural niches are concentrated in small areas of family-based farmers who adopt both the conventional management as the organic, generating employment and income. The cotton breeding program of Embrapa Cotton has made efforts in developing new varieties of colored fibers in order to contribute to the regional agribusiness growth, nowadays with five cultivars, with fibers of colors ranging from green to various shades of brown. The challenge for researchers, however, is to generate varieties with new shades that can contribute to move the competitive market of the textile industry, especially the natural and dyes free. To advance in this segment, it is essential to understand the molecular basis of the metabolites involved in the synthesis of the color of the fibers so that we can establish strategies for genetic improvement, both by conventional means such as by genetic engineering. It is known that flavonoids are secondary metabolites which confers color to fibers and that depending on the route of biosynthesis, various color tones can be synthesized by events cascade. Being a component of biochemical nature, it is estimated that the identification of genotypes holders of biosynthesized by associated molecular markers, directly or not, to flavonoids. This strategy can configure a useful tool to identify genotypes colored fibers, helping to reduce the time the selection procedures that take between 120 to 150 days for the character can be phenotyped. Seeking to generate information that may help with the colored cotton fiber improvement aimed this work a study of genetic and molecular approaches in colorful cotton accesses, based on analysis of divergence and molecular expression, focusing on fiber specific genes involved in flavonoid biosynthesis. For analysis of genetic diversity, twelve genotypes were phenotyped by ISSR-PCR, using 12 commercial oligonucleotides. The methods of Tocher, UPGMA and 2D Projection were adopted for cluster analysis based on the standard of 50 polymorphic bands. In light of the results, proceeded to the analysis of transcripts expression, using the genes *PP2A1*, *C4H*, *DFR*, *ANR* and *ANS* in cDNAs fibers collected at 8, 10 and 18 DPA (after anthesis days) from BRS Rubi, BRS Topázio, BRS 200 and V3 access. In the cluster analysis by UPGMA, there was the formation of six groups being groups B, D and E only those clustered colored materials. The results of the expression through semiquantitative RT-PCR, the amplicons were observed of approximately 200, 290, 1100, 1024 and 1067 bp for *PP2A1*, *C4H*, *DFR*, *ANS* and *ANR*, respectively, as expected. We observed increased expression of genes *C4H*, *DFR* and *ANR* in brown color genotypes, suggesting that these genes may be involved in flavonoid biosynthesis brown fibers. The results obtained in this study can be applied in the cotton breeding program aimed at obtaining varieties with new colors or new shades.

Keywords: 1. *Gossypium*; 2. molecular marker; 3. RT-PCR.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Capulhos de algodão colorido nas tonalidades variando de creme a marrom. Foto: Sergio Cobel (Embrapa Algodão), 2014	14
Figura 2. A estrutura química dos flavonoides. Fonte: Taiz e Zeiger (2004)	29
Figura 3. Estruturas básicas de algumas classes de flavonoides. Fonte: Coutinho et al. (2009)	20
Figura 4. Esquema das principais vias da biossíntese dos flavonoides. Fonte: Winkel-Shirley (2001)	22
Figura 5. Padrão de bandas obtidos com os oligonucleotídeos UBC 813 (A) e UBC 827 (B). M - marcador 1 Kb (<i>Ludwig Biotec</i>); Acessos: 1. PI 608.352, 2. BRS Topázio, 3. BRS 336, 4. BRS 200, 5. PI 435.250, 6. PI 435.259, 7. PI 528.086, 8. BRS Verde, 9. BRS Rubi, 10. BRS 286, 11. MO, 12. V3	30
Figura 6. Dendograma do agrupamento UPGMA construído a partir do complemento aritmético do Coeficiente de Jaccard. Acessos: 1. PI 608.352, 2. BRS Topázio, 3. BRS 336, 4. BRS 200, 5. PI 435.250, 6. PI 435.259, 7. PI 528.086, 8. BRS Verde, 9. BRS Rubi, 10. BRS 286, 11. MO, 12. V3	32
Figura 7. Projeção gráfica das estimativas de distâncias de dissimilaridade de 12 acessos de algodão a partir de marcadores ISSR. Acessos: 1. PI 608.352, 2. BRS Topázio, 3. BRS 336, 4. BRS 200, 5. PI 435.250, 6. PI 435.259, 7. PI 528.086, 8. BRS Verde, 9. BRS Rubi, 10. BRS 286, 11. MO, 12. V3	33
Figura 8. Expressão semiquantitativa de genes específicos e constitutivo (<i>PP2A1</i>) em cDNA de algodão, durante três fases fenológicas das fibras	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Genealogia e origem dos acessos de algodão utilizados no estudo	24
Tabela 2. Sequência dos oligonucleotídeos ISSR desenvolvidos pelo Laboratório de Biotecnologia da Universidade da Columbia Britânica (UCB).....	26
Tabela 3. Sequência dos oligonucleotídeos de <i>G. hirsutum</i> , tamanho esperado dos fragmentos e temperatura de anelamento	28
Tabela 4. Bandas geradas e polimórficas dos 12 iniciadores ISSR utilizados na caracterização dos acessos de algodão colorido	29
Tabela 5. Agrupamento dos doze acessos de algodão pelo método de otimização de Tocher, a partir dos dados obtidos pelos marcadores ISSR.....	31

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
1. OBJETIVOS	13
1.1. Geral.....	13
1.2. Específicos	13
2. REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1. Origem e histórico do algodão colorido	14
2.2. Importância econômica e social do algodão colorido.....	15
2.3. Marcadores moleculares	16
2.4. Diversidade genética.....	18
2.5. Biossíntese de flavonoides.....	19
3. MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1. Análise da divergência entre acessos de algodão colorido	24
3.1.1. Recursos genéticos de algodão	24
3.1.2. Extração de DNA genômico e reações de PCR-ISSR.....	24
3.1.3. Análise genética dos acessos	26
3.2. Análise de expressão com genes específicos.....	27
3.2.1. Extração de RNA total e síntese de cDNA	27
3.2.2. RT-PCR semiquantitativa.....	28
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
4.1. Análise da divergência genética em acessos de algodão colorido.....	29
4.2. Expressão de genes específicos durante a fenologia das fibras	34
5. CONCLUSÕES	36
REFERÊNCIAS	37

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, vem crescendo o interesse no cultivo do algodão colorido no Brasil, especialmente na região Nordeste. A adoção se dá por agricultores de base familiar, tanto em manejo convencional quanto orgânico em função de sua valorização. Segundo Carvalho et al. (2011), esse crescimento deve-se, principalmente, pelo valor superior da fibra colorida em comparação ao algodão branco. A fibra naturalmente colorida agrega valor aos produtos da indústria têxtil devido atender a uma demanda de mercado mais ecológica e saudável, já que dispensa o processo de tingimento químico para modificação da cor da fibra.

No Brasil, as cultivares de algodão com fibras coloridas que estão no mercado foram desenvolvidas pela Embrapa Algodão, sendo representadas pelas cultivares BRS 200, BRS Verde, BRS Rubi, BRS Safira e BRS Topázio. A cultivar BRS 200, lançada no ano 2000 foi obtida por meio de seleção a partir de plantas matrizes de algodoeiro arbóreo coletadas nas cidades de Acari (RN) e Milagres (CE), com fibra de coloração marrom clara. As cultivares, BRS Verde, BRS Rubi, BRS Safira e BRS Topázio, lançadas respectivamente nos anos 2003, 2004, 2004 e 2010, tiveram como doadores dos genes destas colorações materiais introduzidos de outros países (CARVALHO et al., 2011).

Apesar da larga aceitação desse produto pelo mercado de fibras coloridas naturais, o melhoramento convencional voltado para aquisição de fibras com novas cores e diferentes tonalidades sofre limitações em função da variabilidade para cor nos acessos do Banco de Germoplasma de algodão. No aspecto genético, Carvalho e Santos (2003) citam a dificuldade de selecionar materiais com fibras coloridas devido às correlações negativas entre cor e boa qualidade da fibra. Apesar disso, o programa de melhoramento da Embrapa Algodão detém um largo número de linhagens em processos de seleção para esse caráter, com perspectiva de síntese de cultivares (CARVALHO et al., 2014).

Alguns autores relacionam a pigmentação das fibras de algodão colorido à síntese de flavonoides (HUA et al., 2007; XIAO et al., 2007; LI et al., 2012; FENG et al., 2013), embora as propriedades químicas e estruturais dos pigmentos e a base molecular da síntese do pigmento sejam pouco conhecidas (KOHTEL, 1985; XIAO et al., 2007). Isso impulsiona a diversificação de estudos nessa área, não apenas dos genes estruturais envolvendo os eventos em cascata para cor das fibras bem como sua regulação.

Estudos de caracterização da diversidade genética também podem promover a obtenção de acessos desejáveis por suas características *per se* e/ou por meio de hibridação de características desejáveis. A diversidade genética é a capacidade de uma espécie, população

ou progênie expressar diferentes fenótipos em função da composição genética dos indivíduos, como resultado da ação dos diferentes alelos em um determinado ambiente (ARRIEL, 2004). Ressalta-se que o conhecimento da diversidade genética de populações é importante para se direcionar as diferentes estratégias de conservação do germoplasma e uso do recurso genético disponível em programas de melhoramento da espécie.

Embora o intercâmbio de acessos entre diferentes países seja uma prática regular para alimentar as fontes de recursos genéticos para os cruzamentos, a limitação das fontes genéticas e a incompatibilidade cromossomal de algumas espécies constituem barreiras que retardam a obtenção de novas cores para atender o mercado têxtil mundial.

Apesar desses esforços, outras estratégias devem ser estabelecidas para manter o melhoramento da cultura e, para tanto, o conhecimento da variabilidade genética de espécies de *Gossypium*, bem como o aprofundamento de investigações sobre genes relacionados com a biossíntese de flavonoides nas fibras coloridas de acessos de algodão, constituem-se em um suporte de grande contribuição para posterior uso nos programas de melhoramento da cultura.

O presente trabalho se insere nessa linha de pesquisa, tendo como objetivo caracterizar acessos divergentes por meio de marcadores ISSR e analisar a expressão de genes relacionados com a biossíntese de flavonoides que possam ser utilizados como ferramentas para auxiliar na seleção de acessos para uso nos trabalhos de melhoramento.

1. OBJETIVOS

1.1. Geral

Analisar a divergência genética entre acessos de algodão do BAG e investigar a expressão gênica em fibras de algodão colorido.

1.2. Específicos

- Entender as interrelações entre os acessos de algodão colorido e branco selecionados no estudo;
- Investigar a expressão semiquantitativa dos genes *PP2A1*, *C4H*, *DFR*, *ANR* e *ANS* durante a fenologia das fibras em diferentes acessos de algodão colorido.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Origem e histórico do algodão colorido

O algodão colorido foi identificado pelos incas e astecas há 4.500 anos e por outros povos antigos das Américas, Ásia, África e Austrália. Até o momento, já foram identificadas 39 espécies silvestres de algodão com fibras coloridas na tonalidade marrom (ENDRIZZI et al., 1984), e também com tonalidade verde (Carvalho et al., 2011). Tais materiais, por longos períodos foram descartados pela indústria têxtil por serem considerados como contaminação indesejável nas cultivares com tonalidade branca natural.

Os algodões coloridos foram preservados pelos povos nativos e nas coleções de algodão em muitos países. No Brasil foram coletadas plantas de algodão selvagem com coloração creme e marrom (Figura 1), em misturas com algodão branco, das espécies *G. barbadense* L. e *G. hirsutum* L. raça *marie galante* Hutch., conhecido popularmente como algodão arbóreo (FREIRE, 1999).

O interesse por cultivares de fibra colorida está relacionado ao fato de que estes dispensam o tingimento do fio, reduzindo os custos e os problemas ambientais acarretados pela deposição dos seus resíduos tóxicos, sendo caracterizado como um produto ecológico. De acordo com Daniel et al. (2011) por meio do programa de melhoramento genético desenvolvido pela Embrapa, várias cultivares de fibra colorida têm surgido com qualidade idêntica ou superior a fibra do algodão branco.



Figura 1. Capulhos de algodão colorido nas tonalidades variando de creme a marrom. Foto: Sergio Cobel (Embrapa Algodão), 2014.

2.2. Importância econômica e social do algodão colorido

O algodão colorido é uma alternativa ecológica e saudável para os agricultores, especialmente os de base familiar. Segundo Batista (2008), as cultivares de algodão colorido são adaptadas às fiações modernas, diminuem os custos de produção para a indústria têxtil e o lançamento de efluentes químicos e tóxicos, por não utilizar corantes.

O Nordeste brasileiro possui condições edafoclimáticas favoráveis para o cultivo do algodoeiro de fibras coloridas e poderá se tornar um grande centro produtor, principalmente por meio da agricultura familiar, cuja produção detém um dos mais baixos custos do país (QUEIROGA et al., 2008).

Até o ano de 2005, a Embrapa Algodão havia desenvolvido as cultivares coloridas, herbáceas e anuais BRS 200 (marrom), BRS Verde (fibra verde), BRS Rubi (fibra marrom avermelhado) e BRS Safira (fibra marrom telha) (CARVALHO et al., 2005). Contudo, a equipe da Embrapa Algodão responsável pelo melhoramento genético do algodão colorido prosseguiu trabalhando no sentido de aperfeiçoar as características economicamente importantes do material existente no seu BAG, com a finalidade de elevar a estabilidade, uniformidade, resistência e impedir a perda de coloração das fibras, principalmente nas fibras de coloração creme e marrom, além de aumentar sua produtividade, desempenho nos testes de avaliação agrícola, objetivando atingir a aceitação da indústria têxtil. A pesquisa voltada para o melhoramento do algodão colorido foi expandida para incluir o cruzamento dos algodões de cor creme, marrom e verde, visando à obtenção de novas colorações (CAVALCANTI FILHO e MOUTINHO, 2007).

Em 2010 foi lançada a cultivar BRS Topázio resultado do cruzamento entre as cultivares Suregrow 31 e Delta Opal. De acordo Carvalho et al. (2011), esta nova cultivar possui alto rendimento de fibra de boa qualidade e alto rendimento de algodão em caroço, superando as demais cultivares coloridas e comparando-se a muitas de fibra branca.

Ainda segundo Carvalho et al. (2011), o algodão colorido é visto como um produto diferenciado e, portanto, de maior valor agregado em função da associação a cultivos orgânicos ou agroecológicos, onde o uso de agrotóxicos não é permitido. A cotonicultura colorida pode se tornar um negócio bastante promissor para os diferentes elos de sua cadeia produtiva, caracterizando-se como um produto ecologicamente limpo, sem prejudicar o homem e o meio ambiente (CARVALHO et al., 2011). Além disso, a adaptabilidade das cultivares BRS 200, BRS Verde, BRS Safira, BRS Rubi e BRS Topázio às condições de

semiárido do Nordeste brasileiro permite ser explorada principalmente por pequenos produtores organizados em cooperativas (CAVALCANTI, 2012).

O melhoramento do algodão de fibra colorida se torna fundamental como ferramenta para a viabilização de sua produção na agricultura familiar. Essa forma de organização de agricultura vem se posicionando como um importante setor na economia de regiões menos desenvolvidas. A produção de vestimentas com o algodão colorido se tornou uma fonte de renda para esses agricultores de baixa renda. Mas a viabilidade deste sistema produtivo é de certa forma afetada, em função da pouca produtividade e da qualidade inferior das fibras. É neste sentido que o melhoramento poderá contribuir para o desenvolvimento de cultivares de algodoeiro colorido com características agrônômicas e de fibras melhores, aumentando assim a rentabilidade desses agricultores (BATISTA, 2008).

2.3. Marcadores moleculares

Os marcadores moleculares são ferramentas úteis nos estudos de detecção de variabilidade genética entre acessos de germoplasma e populações intra e interespecíficas (CRUZ et al., 2011). A grande vantagem de seu uso reside na detecção de polimorfismos diretamente no DNA, não sofrer influência ambiental e serem independentes do estágio de desenvolvimento da planta (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998). Estes marcadores são fundamentados na amplificação de fragmentos de DNA por PCR, sendo utilizados, no monitoramento da variabilidade genética, identificação de indivíduos ou famílias divergentes, construção de mapas genéticos e identificação de locos relacionados aos caracteres quantitativos (PIGATO e LOPES, 2001).

Segundo Ferreira e Grattapaglia (1998), os marcadores moleculares são definidos como todo e qualquer fenótipo molecular proveniente de um gene expresso ou de um segmento específico de DNA. Estes são segmentos de DNA que estão ligados a locos que determinam características de interesse (ALZATE-MARIN et al., 2005).

Existe um grande número de usos e aplicações para marcadores moleculares, mas a maioria está associada com a variação genética, caracterização quantitativa de características multigênicas, análise de diversidade genética e evolução (KANTETY et al., 2002).

Diversos trabalhos mostram a contribuição do uso dos marcadores no auxílio de programas de melhoramento genético de plantas, a partir da Seleção Assistida por Marcadores – SAM (ALZATE-MARIN et al., 2005; ENDER et al., 2008; RABEL et al., 2010; TOPPA e JADOSKI, 2013; WAMSER et al., 2014), pois permitem que a seleção e novos cruzamentos

sejam realizados em uma mesma geração (ALMEIDA et al., 2009; MELO et al., 2011; CAVALCANTI et al., 2012, SANTOS et al., 2013). Os marcadores podem ser associados a um gene, a uma região cromossômica ou a um fenótipo, desde que possam ser seguidos em gerações subsequentes, comprovando sua natureza genética (MELO et al., 2008; MILACH, 1998). O uso desses marcadores tem auxiliado na identificação de genes de resistência a doenças, insetos e pragas; avaliação e caracterização de germoplasma, melhoramento dos pais de híbridos, introgressão gênica e seleção auxiliada por marcadores, desenvolvimento de mapas genéticos, determinação de grupos heteróticos e associação com regiões genômicas que afetam a heterose, reconstituição de pedigrees, testes de pureza genética, seleção de resistência a patógenos exóticos ainda não existentes em determinada região, associação com caracteres quantitativos, estudos de interação genótipo ambiente, proteção de cultivares, entre outros (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1996, MILACH, 1998).

Dentre os marcadores que permitem diferenciar os acessos com maior exatidão e confiabilidade citam-se os seguintes: ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*), RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), SSR (*Simple Sequence Repeats or microsatellite*) e VNTR (*Variable Number of Tandem Repeats*) (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998; MELO et al., 2001; RODRIGUES et al., 2007; BARAKAT et al., 2010). Atualmente, os do tipo ISSR tem sido largamente adotados por pesquisadores, gerando diversas informações que tem contribuído para nortear os programas de melhoramento, que seja nas fases iniciais dos processos de seleção indo até as identificações (*fingerprint*) da cultivares comerciais.

Os marcadores ISSR têm sido amplamente utilizados pelos melhoristas de plantas por ser de fácil operação, não exigir uso de enzimas de restrição e serem de grande utilidade nos estudos que visam determinar a distância genética entre parentais e o desempenho dos híbridos para construção de mapas genéticos de ligação (SANTOS et al., 2013).

Os marcadores ISSR são considerados úteis na identificação de cultivares, na avaliação das relações filogenéticas, estudos de mapeamento do genoma e de população, entre outras coisas. Esta técnica vem sendo utilizada em diversas culturas, como milho (KANTETY et al., 1995), algodão (LIU e WENDEL, 2001), maçã (GOULÃO e OLIVEIRA, 2001), arroz (SARLA et al., 2003), café (RUAS et al., 2003), cana de açúcar (ALMEIDA et al., 2009), coentro (MELO et al., 2011), maracujá amarelo (COSTA et al., 2012), amendoim (SANTOS et al., 2013), entre outras culturas.

Segundo Rodrigues (2010), os marcadores ISSR são recomendados para análises de espécies relacionadas evolutivamente, obtendo-se resultados confiáveis, devido sua

abundância e dispersão no genoma, sendo marcadores de alta reprodutibilidade, locos polimórficos em quantidades satisfatórias e por apresentarem rapidez em seus resultados com custos razoavelmente menores em comparação aos outros marcadores.

2.4. Diversidade genética

Na caracterização de Banco de Germoplasma a estimativa da diversidade genética é de grande utilidade por permitir auxiliar na detecção de redundâncias e deficiências da base genética disponível, fornecendo recursos úteis para identificação de genitores que, quando cruzados, poderão fornecer maior efeito heterótico nas progênes, além de fornecer informações sobre descritores úteis para auxiliar nos processos de seleção (CRUZ e CARNEIRO, 2003).

Estudos sobre diversidade genética tem sido utilizados em várias culturas de grande importância econômica, como algodão (RESENDE et al., 2014), feijão carioca (PERSEGUINI et al., 2011), mandioca (VIEIRA et al., 2008), café (FONSECA et al., 2006), milho (MIRANDA et al., 2003), feijão (RODRIGUES et al., 2002), entre outras.

Para Fonseca et al. (2006), a alta variabilidade genética possibilita a identificação de acessos divergentes, permitindo em suas gerações segregantes o desenvolvimento de acessos superiores. Sendo assim, na seleção de genitores para cruzamentos, procura-se sempre aliar o bom desempenho dos acessos com a divergência genética.

Na literatura, há várias metodologias para estimar a divergência genética, dentre essas citam-se os agrupamentos pelo método de otimização de Tocher, método hierárquico e Projeção 2D, que reúne acessos baseando-se em algum critério que apresente similaridade no padrão de comportamento em relação a um conjunto de características.

O método de otimização de Tocher requer a obtenção da matriz de similaridade, sobre a qual será identificado o par de indivíduos mais similares. Estes indivíduos formarão o grupo inicial e a partir daí avalia-se a possibilidade de inclusão de novos indivíduos ao grupo, adotando o critério de que a média das medidas de dissimilaridade dentro de cada grupo seja menor que as distâncias médias entre quaisquer grupos, no qual é realizado a partição do conjunto de indivíduos em sub-grupos não vazios e mutuamente exclusivos (CRUZ e CARNEIRO, 2003).

Vários trabalhos utilizaram o método de otimização de Tocher no estudo da divergência genética entre acessos das seguintes culturas: aveia (MARCHIORO et al., 2003), alface (OLIVEIRA et al., 2004), cana de açúcar (SILVA et al., 2005), tomate (KARASAWA

et al., 2005), permitindo indicação de potenciais genitores para a utilização em programas de melhoramento.

O método hierárquico tem como objetivo principal, a obtenção de um dendograma, onde se torna possível a formação de uma árvore de ramos conectados entre si, sendo o método UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*) um dos mais utilizados no melhoramento vegetal, que tem por base a ligação média não ponderada entre os grupos (RESENDE, 2007; CRUZ et al., 2012).

Para Arriel et al. (2006) o método hierárquico UPGMA é o mais adequado por apresentar dendogramas com coeficiente de correlação cofenético máximo, que é uma medida de concordância entre os valores originais de dissimilaridade e aqueles apresentados no dendograma.

A Projeção 2D tem por objetivo avaliar a similaridades em eixos cartesianos (CRUZ, 2006; RESENDE, 2007; CRUZ et al., 2012).

2.5. Biossíntese de flavonoides

Conforme Taiz e Zeiger (2004), os flavonoides constituem a maior classe de fenólicos vegetais. A estrutura química dos flavonoides é constituída de 15 carbonos organizados em dois anéis aromáticos, ligados por uma cadeia de três carbonos (Figura 2 e 3).

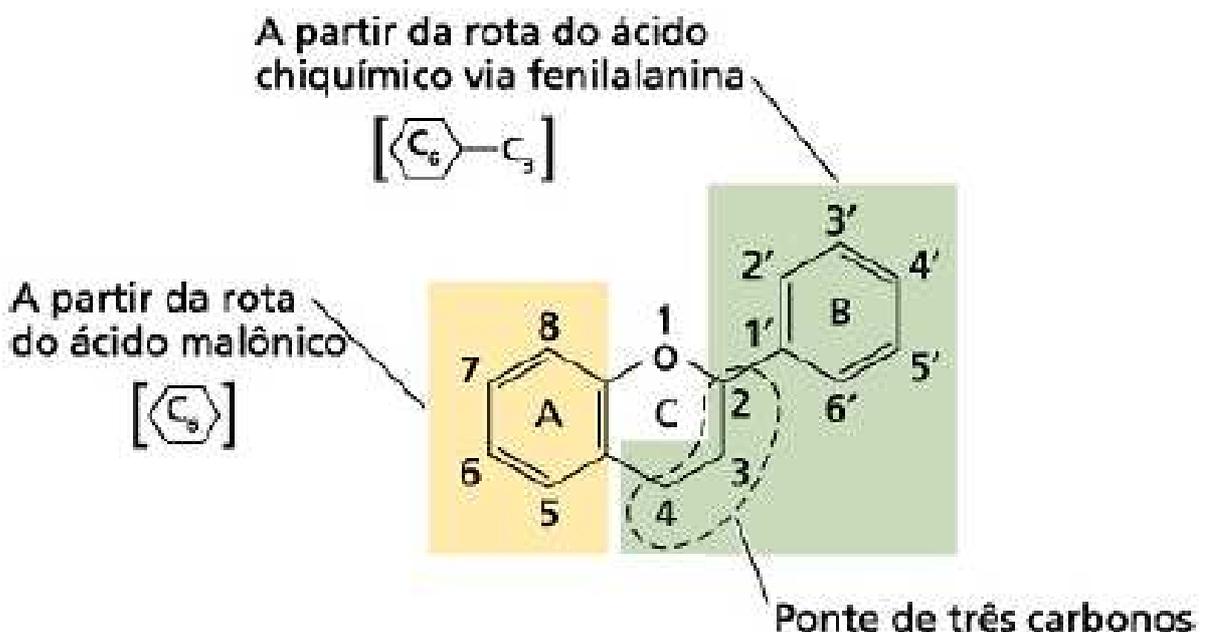


Figura 2. A estrutura química dos flavonoides. Fonte: Taiz e Zeiger (2004).

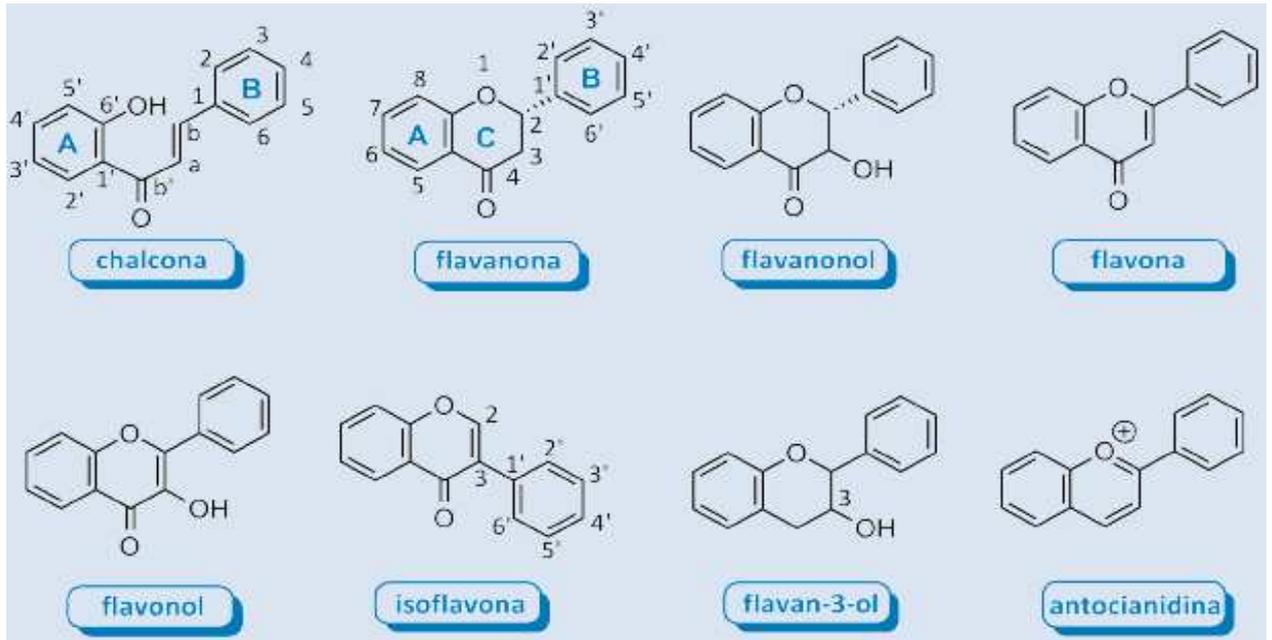


Figura 3. Estruturas básicas de algumas classes de flavonoides. Fonte: Coutinho et al. (2009).

Os flavonoides constituem uma família relativamente grande de moléculas aromáticas que são derivadas de fenilalanina e malonil-coenzimaA. Na cascata biossintética dos flavonoides (Figura 4) estão incluídos compostos organizados em seis subgrupos principais, encontrados em muitas plantas superiores: chalconas, flavonas, flavonóis, flavandiois, antocianinas e taninos ou proantocianidinas; um sétimo grupo, as auronas; e por último, os isoflavonoides, sintetizados por algumas espécies de leguminosas e um pequeno número de plantas não leguminosas (WINKEL-SHIRLEY, 2001).

Os flavonoides possuem diversas atividades biológicas, vários trabalhos relacionados com a bioquímica e a genética da biossíntese de flavonoides foram realizados (HOLTON e CORNISH, 1995; DIXON e STEELE, 1999; WINKEL-SHIRLEY, 2001).

Nas plantas, três classes principais de flavonoides (antocianinas, proantocianidinas e flavonóis) são sintetizadas através da via biossintética dos flavonoides (HOLTON e CORNISH, 1995; JAAKOLA, 2002). As antocianinas (do grego, anthos = flor e kianos = azul) são os pigmentos mais importantes de plantas vasculares e conferem coloração laranja, rosa, vermelha, violeta e azul a flores e frutos (CASTAÑEDA-OVANDO et al., 2009).

Esses metabólitos secundários contribuem para a pigmentação colorida de flores, frutos, sementes e estão envolvidas em vários processos fisiológicos e bioquímicos, incluindo a proteção UV, atração de insetos, defesa a herbívoros e simbiose (KOES et al., 2005). Os flavonoides são muitas vezes produzidos em tecidos vegetativos, sob condições de estresse,

como a alta intensidade de luz, frio, deficiência de nutrientes, ataque de patógenos ou senescência. Em função da importância, a genética e a bioquímica da via biossintética de flavonoides têm sido estudadas em várias espécies de plantas (XIAO et al., 2007, FENG et al., 2013; KARAM et al., 2013).

Os primeiros modelos experimentais utilizados no estudo da biossíntese dos flavonoides foram o milho (*Zea mays* L.), boca de leão (*Antirrhinum majus* L.), sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) e petúnia (*Petunia hybrida*), levando ao isolamento de muitos genes estruturais e reguladores de flavonoides (HOLTON et al., 1993; MOL et al., 1998). Evidências sugerem que enzimas envolvidas no metabolismo de flavonoides e fenilpropanóides pertencem a um ou mais complexos multienzimáticos associados à membrana. Este tipo de organização tem importantes implicações na eficiência, especificidade e regulação das vias de formação destes produtos (WINKEL-SHIRLEY, 1999; 2001). Vários desses genes envolvidos na biossíntese dos flavonoides têm sido caracterizados em uma grande variedade de espécies vegetais, como *BANYULS*, que codifica uma *leucoantocianidina redutase (LCR)* que catalisa a biossíntese de tanino em *Arabidopsis* (DEVIC et al., 1999); *Isoflavona sintase (IFS)* que catalisa a biossíntese de isoflavona em soja (STEELE et al., 1999); e *antocianidina redutase (ANR)* e *dihidroflavonol 4-redutase (DFR)* que catalisa a biossíntese de antocianidinas e flavonóis em algodão (XIAO et al., 2007).

A enzima *cinamato 4-hidroxilase (C4H)* é uma proteína associada à membrana, que junto com outras enzimas, formam a unidade reguladora do metabolismo dos fenilpropanóides (CHEN et al., 2006). A Cinamato 4-hidroxilase é a segunda enzima da via fenilpropanóide que participa na síntese de inúmeros compostos, como os flavonoides fenilpropanóides, ligninas, suberinas e outros (PINA et al., 2012). Esta enzima desempenha uma função enzimática fundamental, catalisando a hidroxilação do cinamato a p-cumarato. Após esta etapa, a p-cumarato é transformado em a p-cumaril CoA, pela enzima *4CL*, este precursor pode seguir pela via de síntese dos flavonoides, taninos e estilbenos.

Antocianidina sintetase (ANS) é uma enzima da via biossintética de antocianina, catalisa a reação a partir das leucoantocianidinas para antocianidinas (ZHICHANG et al., 2014). Alguns autores relacionaram essa enzima com a presença de antocianinas em frutos. Honda et al. (2002) confirmaram, em casca de maçã, a ocorrência da expressão sincronizada dos genes da *chalcona sintase (CHS)*, *flavona 3-hidroxilase (F3H)*, *dihidroflavonol 4-redutase (DFH)* e a *antocianina sintase (ANS)*. Almeida et al. (2007) e Severo et al. (2011), analisando frutos de morangos, também notaram um aumento da expressão do gene *ANS* à medida que avançavam os estádios de amadurecimento.

Segundo Yan et al. (2008), *dihidroxi flavonol 4-redutase (DFR)* é uma enzima chave da via biossintética de proantocianidinas e de revestimento de sementes de *Arabidopsis thaliana*. Na via dos flavonoides, *DFR* encontra-se no centro, podendo direcionar a rota metabólica para a proantocianidina (WINKEL-SHIRLEY, 2001).

Antocianidina redutase (ANR) foi inicialmente identificada em *Arabidopsis*, é codificada pelo gene das BANYULS (*BAN*) (XIE et al., 2003; 2004) e utiliza cianidina como substrato (ABRAHAMS et al., 2003).

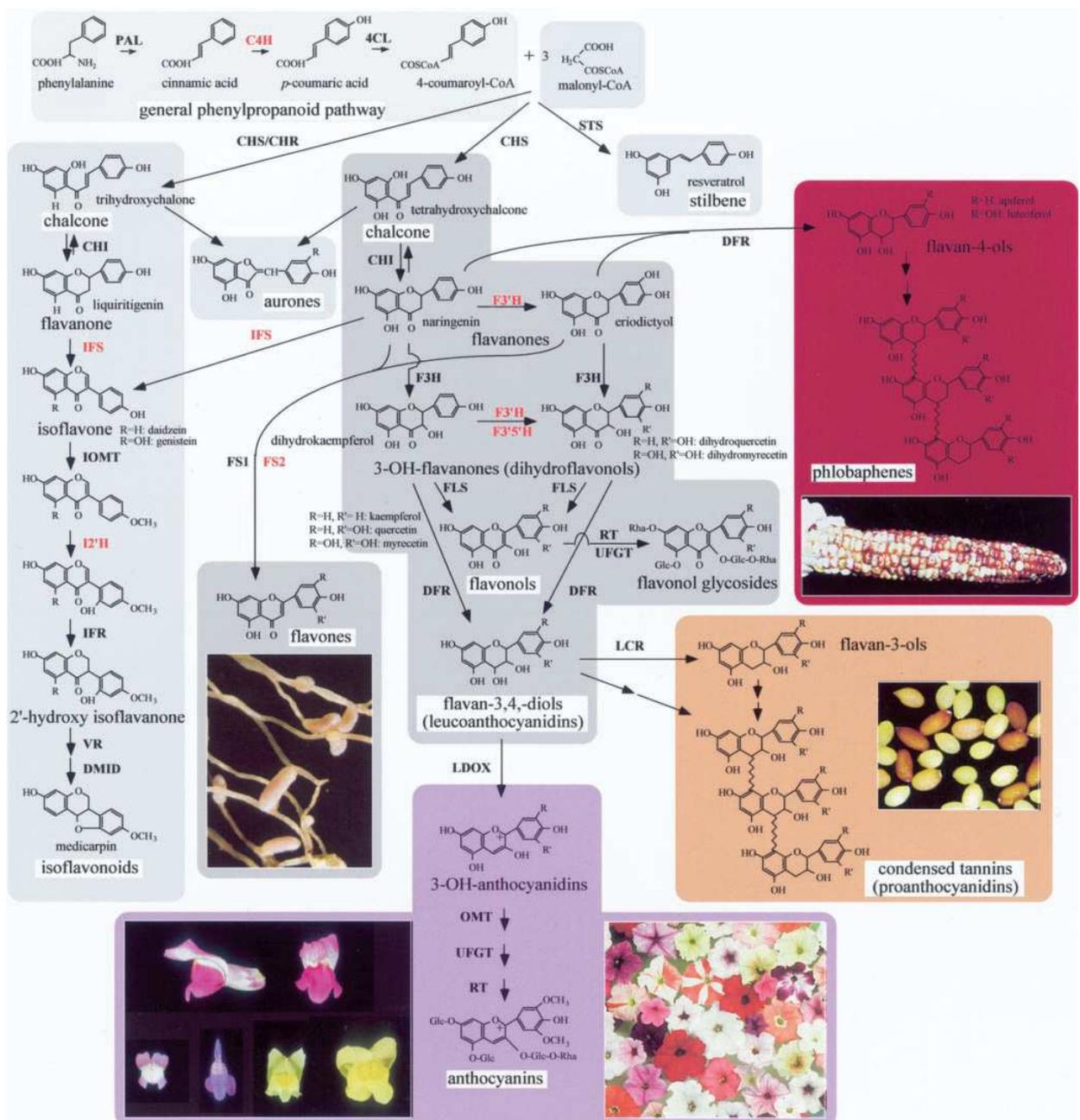


Figura 4. Esquema das principais vias da biossíntese dos flavonoides. Fonte: Winkel-Shirley (2001).

Na literatura, encontram-se poucos trabalhos relacionados a atuação dos genes envolvidos na biossíntese de flavonoides. Neste contexto, é importante a investigação dos genes envolvidos na coloração das fibras de algodão naturalmente colorido visando elucidar a cascata biosintética dos flavonoides nas fibras e por sua vez auxiliar o programa de melhoramento genético da espécie.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Análise da divergência genética entre acessos de algodão colorido

3.1.1. Recursos genéticos de algodão

Nove acessos de algodão colorido e três de fibra branca, pertencentes ao Banco Ativo de Germoplasma (BAG) da Embrapa foram usados para o estudo de divergência genética. A genealogia e origem dos acessos se encontram na Tabela 1.

Tabela 1. Genealogia e origem dos acessos de algodão utilizados no estudo.

Acessos	Genealogia	Origem	Cor da fibra
PI 608.352	<i>Wild/comensal</i>	<i>GRIN*</i>	Marrom alaranjada
BRS Topázio	Cultivar	Paraíba, Brasil	Bege
BRS 336	Cultivar	Goiás, Brasil	Branca
BRS 200	Cultivar	Paraíba, Brasil	Marrom
PI 435.250	<i>Wild/comensal</i>	<i>GRIN*</i>	Marrom escura
PI 435.259	<i>Wild/comensal</i>	<i>GRIN*</i>	Marrom púrpura
PI 528.086	<i>Wild/comensal</i>	<i>GRIN*</i>	Marrom amarelada
BRS Verde	Cultivar	Paraíba, Brasil	Verde
BRS Rubi	Cultivar	Paraíba, Brasil	Marrom avermelhada
BRS 286	Cultivar	Goiás, Brasil	Branca
MO	<i>Wild/commensal</i>	Peru	Marrom escura
V3	<i>Land race</i>	Paraíba, Brasil	Branca

**Germplasm Resources Information Network*

As cultivares BRS Topázio, BRS 336, BRS 200, BRS Verde, BRS Rubi e BRS 286 foram lançadas pela Embrapa Algodão. Os materiais com a sigla PI são provenientes do BAG de algodão dos Estados Unidos, porém coletados no Peru. Enquanto que o MO foi introduzido diretamente do Peru e o V3 é um acesso do BAG da Embrapa Algodão.

3.1.2. Extração de DNA genômico e reações de PCR-ISSR

Foi realizada a extração de DNA genômico de sementes de algodão de acordo com o método de Dellaporta et al. (1983), com modificações. Uma semente foi inicialmente submersa em 350 µL de tampão de extração (2 mL Tris-HCl 1 mM, pH 7,5; 575 µL de NaCl

5 M; 500 μL de EDTA 0,5 M, pH 8,0; 500 μL de SDS 10%; e completado o volume com H_2O MilliQ para 10 mL) em microtubos de 2 mL por um período de 24 horas e maceradas utilizando-se um *Minibead* (marca *BioSpec Products* e modelo LWY). Ao tecido macerado foi adicionado mais 350 μL de tampão de extração. O material foi homogeneizado e centrifugado a 13000 x g por 10 minutos, a 4 °C. O sobrenadante foi removido para outro microtubo de 1,5 mL, com os cuidados necessários para evitar contaminação entre as fases. Acrescentou-se 10 μL de proteinase K (10 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) e 10 μL CaCl_2 1 mM, o material foi misturado por inversão e incubado em banho-maria à 37 °C por 30 minutos, sob agitação periódica. Em seguida, acrescentou-se 500 μL de isopropanol gelado e aguardou-se a precipitação por 2 minutos. Os tubos foram centrifugados nas mesmas condições anteriores. Novamente, removeu-se o sobrenadante para a recuperação do precipitado e este foi lavado por duas vezes com 500 μL de etanol 70% gelado, descartando-se sempre o sobrenadante, e uma vez com 500 μL de etanol absoluto gelado. Os microtubos contendo os precipitados permaneceram em fluxo laminar até a completa secagem dos mesmos. Posteriormente, o precipitado foi ressuscitado com 300 μL de H_2O ultrapura autoclavada. A solução permaneceu em temperatura ambiente até a dissolução do DNA e em seguida foi armazenada e mantida à -20 °C.

As reações foram conduzidas utilizando-se 3,0 μL DNA genômico (10 ηg); 2,0 μL tampão da reação (10X); 1,0 μL MgCl_2 (50 $\text{mMol}\cdot\text{L}^{-1}$); 0,5 μL dNTPs (10 $\mu\text{Mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 1,0 μL oligonucleotídeo (Tabela 2) (10 $\text{mMol}\cdot\text{L}^{-1}$) e 0,3 μL Taq DNA polimerase (5 $\text{U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) completando-se para um volume final de 20,0 μL com água ultrapura autoclavada. As reações foram conduzidas em um termociclador (marca *Amplitherm Thermal Cyclers*) com o seguinte programa: desnaturação inicial a 96 °C/5 min.; 30 ciclos de 96 °C/45 seg., 40 °C/45 seg. e 72 °C/1 min. Uma extensão final foi adicionada a 72 °C/5 min. Ao término das reações, as amostras foram mantidas a 4 °C para posterior uso.

Aos produtos das reações foram adicionados 2,5 μL de tampão de amostra (azul de bromofenol 0,25% e sacarose 40%) e 2,5 μL de SYBR[®] *Gold* (Invitrogen), sendo posteriormente separados em eletroforese de gel de agarose (1,5%), usando o marcador Leader (1 Kb, *Ludwig Biotec*) como padrão e fotodocumentados. Todas as amplificações foram conduzidas em triplicata.

Tabela 2. Sequência dos oligonucleotídeos ISSR desenvolvidos pelo Laboratório de Biotecnologia da Universidade da Columbia Britânica (UCB).

Iniciador	Sequência (5'→3')
UBC 812	GAGAGAGAGAGAGAGAA
UBC 813	CTCTCTCTCTCTCTT
UBC 820	GTGTGTGTGTGTGTGTC
UBC 824	TCTCTCTCTCTCTCTCG
UBC 827	ACACACACACACACACG
UBC 834	AGAGAGAGAGAGAGAGYT
UBC 853	TCTCTCTCTCTCTCTCRT
UBC 866	CTCCTCCTCCTCCTCCTC
UBC 868	GAAGAAGAAGAAGAAGAA
UBC 872	GATAGATAGATAGATA
UBC 884	HBHAGAGAGAGAGAGAG
UBC 892	TAGATCTGATATCTGAATTCCC

3.1.3. Análise genética dos acessos

Para as avaliações dos géis, cada banda foi considerada uma variável qualitativa, atribuindo-se o valor 1 na presença e 0 na ausência. Assim sendo, quando dois acessos diferiram no mínimo em uma banda, foram considerados diferentes. De posse desses dados foi construída uma matriz de 0 a 1 e a estimativa de similaridade genética (S_{ij}) entre cada par de acessos foi calculada pelo coeficiente de Jaccard (J).

O coeficiente de Jaccard é definido pela seguinte expressão:

$$S_{ij} = \frac{a}{a + b + c}$$

Em que:

sij: similaridade genética entre o par de acessos i e j.

a: presença da banda em ambos os acessos (número de contagens de concordância do tipo 1 1);

b: presença da banda em i e ausência em j (número de discordância do tipo 1 0);

c: ausência da banda em i e presença em j (número de contagens de discordância do tipo 0 1).

Este coeficiente foi escolhido por atribuir diferentes pesos à presença conjunta de bandas e, ainda, em função das suas propriedades matemáticas, em que desconsidera a

ausência de bandas como sinônimo de similaridade genética (DIAS, 1998; CRUZ e CARNEIRO, 2003).

A fim de facilitar a identidade entre os acessos de acordo com o grau de (dis) similaridade, os acessos foram agrupados pelo método hierárquico aglomerativo da média aritmética entre pares não ponderados (UPGMA) e a representação simplificada das distâncias genéticas foi feita por meio de um dendograma a partir da matriz de dissimilaridade estimada pelo coeficiente de Jaccard (CRUZ, 2008).

Para representação dos grupos de acessos utilizou-se o agrupamento pelo método de otimização de Tocher e o método hierárquico UPGMA. As análises de diversidade foram feitas com base nas estimativas de distância genética de complemento aritmético do coeficiente de Jaccard.

As análises estatísticas foram processadas pelo programa GENES, versão 2013.5.1 (CRUZ, 2006).

3.2. Análise de expressão com genes específicos

Para a análise de expressão, duas sementes de cada acesso (Tabela 1) foram cultivadas em casa de vegetação, em vasos (20 L) contendo solo previamente corrigido e fertilizado em função das necessidades da cultura.

3.2.1. Extração de RNA total e síntese de cDNA

Fibras dos acessos de algodão colorido BRS Rubi, BRS Topázio, BRS 200 e do acesso branco V3 foram coletadas durante as fases de 8, 10 e 18 DPA (dias pós antese). Esses acessos foram escolhidos em função da disponibilidade dos botões florais. As fibras coletadas foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e mantidas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para extração do RNA, utilizando-se o kit *Invisorb Spin Plant RNA Mini* (Invitec), seguindo as recomendações do fabricante. A integridade do RNA foi analisada por eletroforese em gel de agarose 0,8% e a concentração e pureza por espectrofotometria.

Para excluir a presença de falsos positivos que poderiam resultar da amplificação de fragmentos de DNA genômico, 1 μg de RNA total extraído de cada amostra foi tratado com 1 U/ μL da DNase I (BioLab), de acordo com as recomendações do fabricante, para digestão de qualquer DNA genômico presente na amostra.

A síntese de cDNA foi feita a partir de 1 µg de RNA total das fibras de 8, 10 e 18 DPA, utilizando oligo (dT)₁₅ e o kit *ImProm-II™ Reverse Transcription System* (Promega), seguindo as recomendações do fabricante. O cDNA foi armazenado a -20 °C para as análises de expressão.

3.2.2. RT-PCR semiquantitativa

As reações foram conduzidas utilizando-se oligonucleotídeos específicos dos genes *C4H*, *DFR*, *ANR* e *ANS* e *PP2A1* (subunidade catalítica de *fosfatase 2A*), como constitutivo. As temperaturas de anelamento e os tamanhos das combinações esperadas para os pares de oligonucleotídeos encontram-se na Tabela 3. As condições adotadas foram as seguintes: 2,0 µL de cada cDNA; 1,0 µL de cada par de oligonucleotídeo (10 µM/L); 0,5 µL de Taq Polimerase (5 U/µL); 0,5 µL de dNTP (10 mM/L); 1,0 µL de MgCl₂ (50 mM/L) e 2,5 µL de tampão (10X), para um volume final de 25 µL. As condições das PCRs foram: pré-desnaturação a 96 °C/1 min, seguido de 40 ciclos de desnaturação a 95 °C/1 min, anelamento por 1 min e temperaturas descritas na Tabela 3, extensão à 72 °C/2 min e extensão final a 72 °C/5 min. Em seguida as reações foram analisadas em gel de agarose (0,8%) utilizando-se marcador de 100 pb (Ludwig), como referencial.

Tabela 3. Sequência dos oligonucleotídeos de *G. hirsutum*, tamanho esperado dos fragmentos e temperatura de anelamento.

Gene	Sequência (5' → 3')	Fragmento (pb)	Tm	Referência
<i>PP2A1</i>	F- GATCCTTGTGGAGGAGTGGA	200	60 °C	Artico et al. (2014)
	R- GCGAAACAGTTCGACGAGAT			
<i>C4H</i>	F- GGACCCACCAGTTTATTG	290	52 °C	Feng et al. (2013)
	R- ACCAGATTACGCTGTCCC			
<i>DFR</i>	F- GGTCTTTCTTTATGCCAACT	1100	54 °C	Xiao et al. (2007)
	R- AGACATGGGTAGGCACTCAA			
<i>ANR</i>	F- AAGCATGGCCAGCCAGATC	1024	60 °C	Xiao et al. (2007)
	R- CAGAGCGCTTCACTTGAGC			
<i>ANS</i>	F- AAATGGTGACCTCAGTGCTA	1067	58 °C	Xiao et al. (2007)
	R- TCAGTTGGACAGATTATCCTG			

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Análise da divergência genética em acessos de algodão colorido

Todos os oligonucleotídeos utilizados na análise genética geraram perfis de bandas satisfatórios nos acessos selecionados, sendo contudo UBC 853 e UBC 866 os mais contributivos para diferenciação dos acessos devido a elevada taxa de polimorfismo detectada, acima de 70% (Tabela 4). Em comum, esses oligonucleotídeos são compostos de repetições ricas em CT e portanto, mais contributivos para diferenciação de espécies com base genética mais diversa, como é o caso de *Gossypium*.

Uma síntese do padrão de bandas conseguidas via ISSR é apresentada na Figura 5, onde se percebe, pelo menos baseando-se nos dois géis, que os padrões do acesso de origem peruana PI 435.250 difere dos demais.

Tabela 4. Bandas geradas e polimórficas dos 12 iniciadores ISSR utilizados na caracterização dos acessos de algodão colorido.

Oligonucleotídeo	Bandas geradas	Bandas polimórficas	Taxa de polimorfismo (%)
UBC 812	5	3	60
UBC 813	10	4	40
UBC 820	8	1	12
UBC 824	9	6	67
UBC 827	13	7	54
UBC 834	9	4	44
UBC 853	7	5	71
UBC 866	4	3	75
UBC 868	9	4	44
UBC 872	9	6	67
UBC 884	14	2	14
UBC 892	9	5	56
Total	106	50	

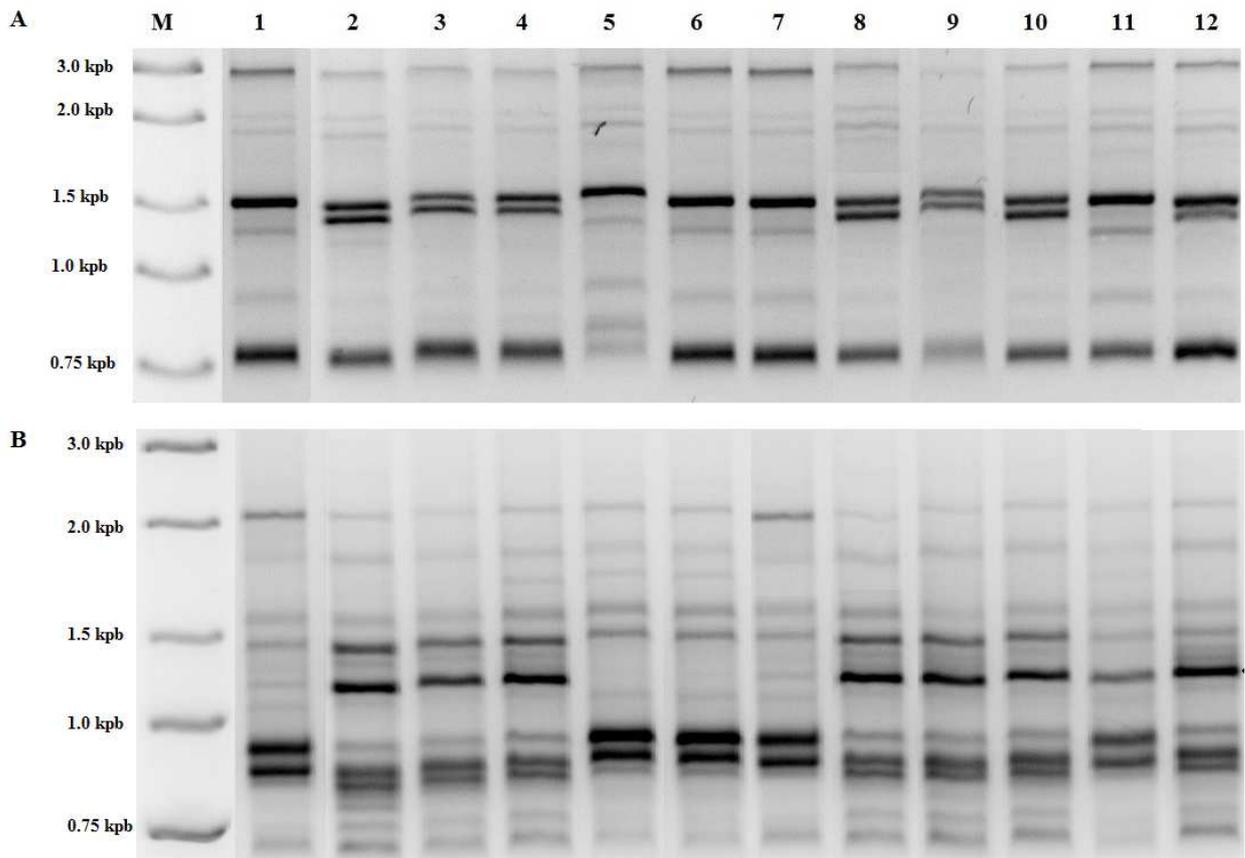


Figura 5. Padrão de bandas obtidos com os oligonucleotídeos UBC 813 (A) e UBC 827 (B). M - marcador 1 Kb (*Ludwig Biotec*); Acessos: 1. PI 608.352, 2. BRS Topázio, 3. BRS 336, 4. BRS 200, 5. PI 435.250, 6. PI 435.259, 7. PI 528.086, 8. BRS Verde, 9. BRS Rubi, 10. BRS 286, 11. MO, 12. V3.

Baseando-se no número de *amplicons* obtidos nas análises de PCR-ISSR, foram procedidos agrupamentos dos acessos por meio das metodologias de Tocher e UPGMA. Pelo método de otimização de Tocher, seis grupos foram formados, sendo o número 6, constituído apenas por um acesso, MO (Peru), o mais divergente (Tabela 5). O grupo 5 aglomerou os acessos de fibra branca, BRS 286 e V3, enquanto que nos demais, os agrupamentos formados não permitiu proceder inferências que possam estar associadas com a distribuição geográfica ou com a base genética dos acessos, o que é esperado considerando-se que os marcadores utilizados são de anelamento arbitrário e os *amplicons* gerados nem sempre se relaciona a caracteres específicos. Por outro lado, nem sempre o método de Tocher permite agrupamento eficiente quando se trata de populações pequenas, como a usada nesse estudo.

Tabela 5. Agrupamento dos doze acessos de algodão pelo método de otimização de Tocher, a partir dos dados obtidos pelos marcadores ISSR.

Grupo	Acesso
1	608.352, BRS Topázio, BRS 200
2	BRS 336, 435.250
3	435.259, BRS Verde
4	BRS Rubi, 528.086
5	BRS 286, V3
6	MO

Pela análise de agrupamento usando a metodologia de UPGMA, contudo, a contribuição da distinção dos acessos pareceu ser mais efetiva, revelada nos cinco grupos (A, B, C, D e E) formados ao se adotar um ponto de corte no percentual de divergência genética em 70% (Figura 6), o qual corresponde à distância genética de 0,17.

O grupo A agregou acessos brasileiros, entre os quais as três cultivares de algodão colorido desenvolvidas pela Embrapa, BRS Topázio (2), BRS Verde (8) e BRS Rubi (9), além da cultivar de fibra branca BRS 286 (10) e a *Land race* V3 (12). Apesar de 60% desse grupo ser composto de acessos coloridos, percebe-se que a maioria dos acessos constituintes tem a característica de ciclo mediano, entre 140-160 dias, e larga adaptação a região Nordeste, como é o caso da BRS 286, gerada via cruzamento entre as cultivares CNPA ITA 90 e CNPA 7H (PEDROSA et al., 2009). Em comum com os demais acessos, essa cultivar detém afinidades com a BRS Rubi, que é resultante de cruzamentos entre BRS Marrom e CNPA 7H. Isso pode justificar o maior agrupamento visto entre esses dois acessos, no dendograma.

Nos demais grupos, os resultados mais relevantes foram vistos em B e D, ambos constituídos de dois acessos de origem Peruana e de fibras marrons, variando em tonalidades de amarelo até a púrpura (Tabela 1). Para um programa de melhoramento que focalize na ampliação da base genética para aquisição de fibras com várias nuances de tonalidade, o uso de acessos desses grupos e do grupo A poderia se constituir em relevantes arranjos, capazes de serem explorados em trabalhos de cruzamentos biparentais ou piramidais, fornecendo recombinantes, com ganhos genéticos expressivos no processo de seleção. A rica base genética dos acessos do grupo A poderia servir de forte embasamento para aquisição de linhagens altamente divergentes, como é o caso das cultivares BRS Topázio e BRS Rubi, originadas por cruzamento com genitores de alta produção e qualidade de fibra (CARVALHO et al., 2011).

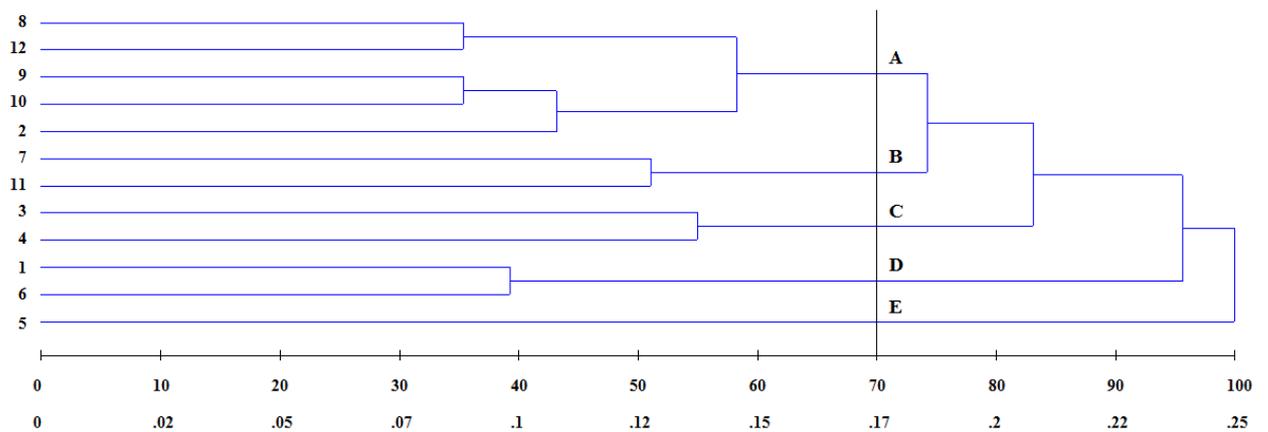


Figura 6. Dendrograma do agrupamento UPGMA construído a partir do complemento aritmético do Coeficiente de Jaccard. Acessos: 1. PI 608.352, 2. BRS Topázio, 3. BRS 336, 4. BRS 200, 5. PI 435.250, 6. PI 435.259, 7. PI 528.086, 8. BRS Verde, 9. BRS Rubi, 10. BRS 286, 11. MO, 12. V3.

As estimativas médias das distâncias genéticas entre os genótipos obtidas a partir do coeficiente de Jaccard variaram de 0,02 a 0,25, refletindo na diversidade genética entre os 12 acessos avaliados.

A adequação do método de agrupamento hierárquico é determinada pelo coeficiente de correlação cofenética (CCC), que avalia a correlação entre os elementos da matriz original e os elementos da matriz cofenética, obtida após a construção do dendrograma. Quanto maior o valor de CCC, menor será a distorção provocada ao se agrupar os genótipos (BUSSAB et al., 1990). O valor da correlação cofenética obtida neste trabalho foi de 0,80, o que indica uma boa representação das matrizes de dissimilaridade na forma de dendrograma. Segundo Cruz e Carneiro (2003), o coeficiente de correlação cofenética pode ser utilizado para avaliar a consistência do padrão de agrupamento, sendo que valores próximos à unidade indicam melhor representação.

De acordo com os resultados obtidos uma possibilidade para obter as colorações marrom alaranjada, marrom púrpura e marrom escura é fazer o cruzamento entre os acessos peruanos PI 608.352, PI 435.259 e PI 435.250, respectivamente com a cultivar de cor branca BRS 286. Para as tonalidades de verde recomenda-se fazer o cruzamento entre as cultivares BRS verde e BRS 336 que segundo Morello et al. (2012) esta cultivar tem adaptabilidade, produtividade e boa qualidade de fibra.

Se desejar aumentar a intensidade do marrom deve-se cruzar os materiais peruanos PI 608.352, PI 435.259 e PI 435.250 com a BRS Rubi ou BRS Topázio (Figura 5), podendo gerar novas tonalidades.

Para comparar os métodos de agrupamentos anteriores e avaliar a eficácia dos agrupamentos, realizou-se um estudo do agrupamento de pontos estrategicamente conhecidos e em um espaço bidimensional (para apenas duas variáveis X e Y).

Na representação gráfica das estimativas de distância num plano bidimensional (Figura 7) constatou-se a formação de 5 grupos, a maior divergência foi observada no grupo E, representado pelo acesso PI 435.250 de coloração marrom escura, idêntico ao resultado obtido com o agrupamento pelo método hierárquico UPGMA. Souza et al. (2013), ao trabalhar com germoplasma de café (*Coffea canéphora*) também obteve resultados no gráfico bidimensional que corroborou com o agrupamento da hierarquização pelo método UPGMA.

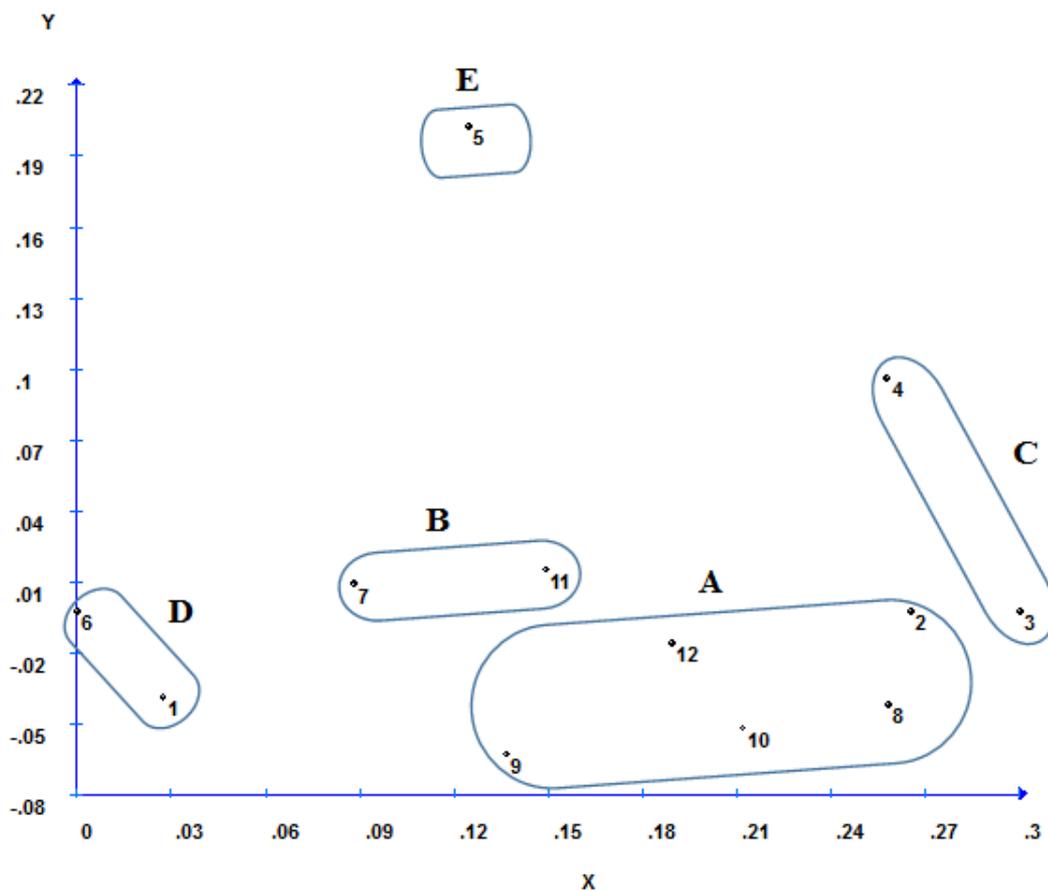


Figura 7. Projeção gráfica das estimativas de distâncias de dissimilaridade de 12 acessos de algodão a partir de marcadores ISSR. Acessos: 1. PI 608.352, 2. BRS Topázio, 3. BRS 336, 4. BRS 200, 5. PI 435.250, 6. PI 435.259, 7. PI 528.086, 8. BRS Verde, 9. BRS Rubi, 10. BRS 286, 11. MO, 12. V3.

Observou-se que o acesso PI 435.250 de coloração marrom escura foi o mais divergente nos dois métodos (agrupamento pelo método hierárquico UPGMA e projeção 2D), sendo assim, estes dois métodos corroboram para esse agrupamento.

4.2. Expressão de genes específicos durante a fenologia das fibras

cDNAs de fibras em três estádios fenológicos foram utilizados para estimar a expressão semiquantitativa de genes específicos, em quatro acessos de algodão, sendo três coloridos e um branco. Verificou-se que os genes *C4H*, *DFR* e *ANR* estiveram presentes em todas as fases das fibras coloridas estudadas, embora com padrão diferenciado de expressão. No acesso de fibra branca, o padrão de expressão foi muito fraco e apenas perceptível no início da alongação da fibra (Figura 8). Isso corrobora com o entendimento epigenético da coloração das fibras, cujas tonalidades podem variar de aspectos edafoclimáticos. Segundo Dickerson et al. (1999), inicialmente todas as fibras de algodão são de coloração branca, assumindo as tonalidades a partir da primeira semana de alongação.

A exceção verificada no padrão de expressão das fibras coloridas foi verificada para o gene *ANS* que apresentou o mesmo nível de expressão em todos os acessos e em todas as fases de desenvolvimento das fibras estudadas. Como esse gene codifica a enzima envolvida na rota da antocianina (ZHICHANG et al., 2014) e está envolvido na ontogenia de alguns frutos (SEVERO et al., 2011; ALMEIDA et al., 2007; HONDA et al., 2002), é possível que este gene possa ter papel relevante na fenologia da fibra, porém, não necessariamente com os eventos associados especificamente a síntese de cores. Alguns eventos pregressos envolvidos na biologia floral do algodão, tais como a produção expressiva de antocianina nas pétalas florais anunciando a fertilização, podem envolver elevada biossíntese de flavonoides, cujos resquícios possam ser perceptíveis em fases mais avançadas da alongação das fibras. Tal premissa se baseia no envolvimento desse gene na biossíntese de flavonoides que conferem os tons amarelo, azul, vermelho, rosa, roxo e marrom aos pigmentos naturais (WINKEL-SHIRLEY, 2001).

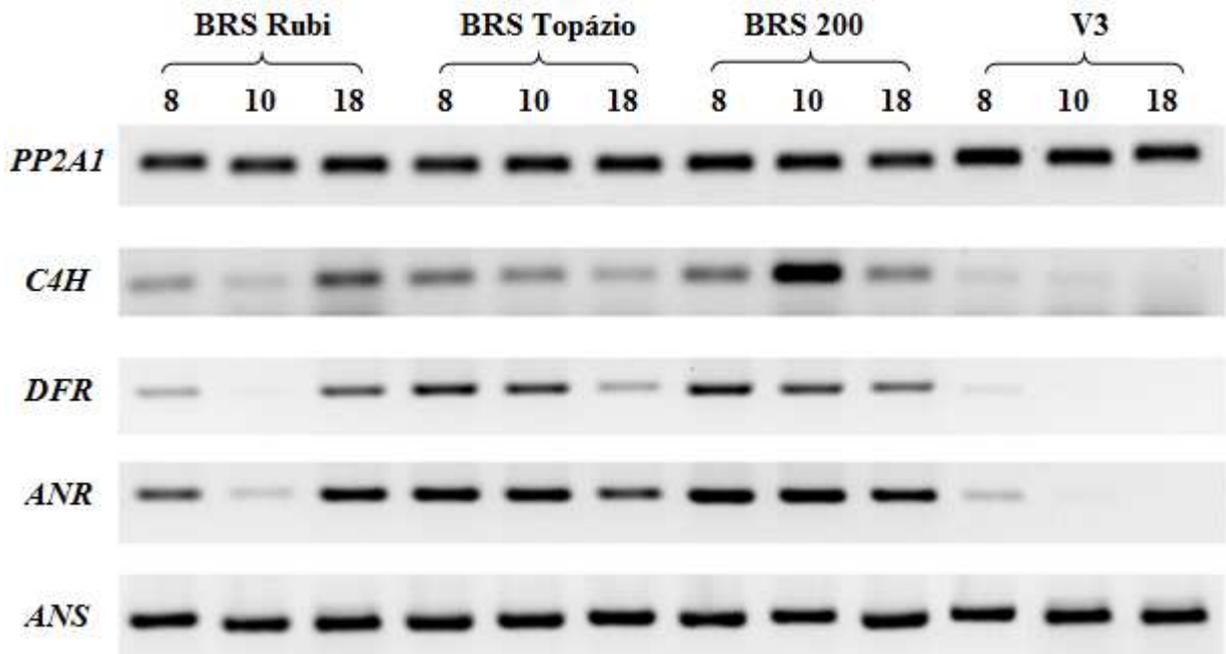


Figura 8. Expressão semiquantitativa de genes específicos e constitutivo (*PP2A1*) em cDNA de algodão, durante três fases fenológicas das fibras.

Os resultados de expressão visualizados nos acessos coloridos desse estudo, para os genes *C4H*, *DFR* e *ANR* também tem sido verificado por outros autores. Conforme citado na Tabela 1, os acessos coloridos utilizados nesse ensaio possuem gradações na tonalidade de marrom, indo desde o bege até o avermelhado. De acordo com Feng et al. (2013), que estudou o acúmulo de flavonoides durante o desenvolvimento de fibras de algodão, o gene *C4H* apresenta maior nível de expressão em acessos de fibras marrom. Outros genes também estiveram associados no estudo dos autores, tais como *CHS*, *F3'H* e *F3'5'H* (*Chalcona sintase*, *Flavonoide-3-hidroxilase* e *Flavonoides 3'5' hidroxilase*, respectivamente).

Xiao et al. (2007) reportam que, além do *DFR*, *ANR*, *ANS* e *F3'H*, outro gene, denominado *CHI* (*Chalcona isomerase*) apresentam elevados níveis de transcrição em acessos de fibra marrom, enquanto que em fibras brancas, a expressão é muito baixa ou indetectável.

Nos ensaios semiquantitativos, considerando-se o padrão de expressão dos genes *C4H*, *DFR* e *ANR* visto nos acessos de algodão colorido com fibra marrom e no de algodão branco (Figura 8), percebe-se elevada coerência com os achados desses autores.

5. CONCLUSÕES

- Os grupos formados entre acessos de algodão colorido brasileiro e peruano apresentam razoável nível de divergência se constituindo em valiosos recursos genéticos para aumentar a base genética de algodões coloridos por meio de hibridação.
- Os genes *C4H*, *DFR* e *ANR* são expressos em acessos de algodão coloridos e se configuram em marcadores para trabalhos de seleção assistida.

REFERÊNCIAS

- ABRAHAMS, S.; LEE, E.; WALKER, A.R.; TANNER, G.J.; LARKIN, P.J.; ASHTON, A.R. The Arabidopsis TDS4 gene encodes leucoanthocyanidin dioxygenase (LDOX) and is essential for proanthocyanidin synthesis and vacuole development. **The Plant Journal**, v.35, n.5, p.624–636. 2003.
- ALMEIDA, C.M.A.; LIMA, S.E.N.; LIMA, G.S.A.; BRITO, J.Z.; DONATO, V.M.T.S.; SILVA, M.V. Caracterização molecular de cultivares de cana-de-açúcar utilizando marcadores ISSR. **Ciência e Agrotecnologia**, v.33, p.1771-1776. 2009.
- ARRIEL, N.H.C. **Diversidade genética em gergelim (*Sesamum indicum* L.) a partir de marcadores moleculares (RAPD) e caracteres morfológicos e agronômicos**. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 2004.
- ARRIEL, N.H.C.; MAURO, A.O.; DI MAURO, S.M.Z.; BAKKE, O.A.; UNÊDATREVISOLI, S.H.; COSTA, M.M.; CAPELATO, A.; CORRADO, A.R. Técnicas multivariadas na determinação da diversidade genética em gergelim usando marcadores RAPD. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, n.5, p.801-809, 2006.
- ARTICO, S.; LAMBRET-FROTTÉ, J.; NARDELI, S.M.; OLIVEIRA-NETO, O.B.; GROSSI-DE-SA, M.F., ALVES-FERREIRA, M. Isolation and Characterization of Three New Promoters from *Gossypium hirsutum* that Show High Activity in Reproductive Tissues. **Plant Molecular Biology Reporter**, v.32, n.3, p.630-643.2014.
- ALZATE-MARIN, A.L., CERVIGNI, G.D.L., MOREIRA, M.A. e BARROS, E.G. Seleção assistida por marcadores moleculares visando ao desenvolvimento de plantas resistentes a doenças, com ênfase em feijoeiro e soja. **Fitopatologia Brasileira**, v.30, n.4, p.333-342, 2005.
- BARAKAT, M.N.; EL-SHAFEI, A.M.; AL-DOSS, A. Molecular mapping of QTLs for resistance to northern corn leaf blight in maize. **International journal of food, agriculture and environment**, v.8, n.2, p.547-552, 2010.
- BATISTA, R.C. **Avaliação emergética da cultura do algodão colorido irrigado com água residuária em ambiente semi-árido**. Tese (Programa Institucional de Doutorado Temático Doutorado em Recursos Naturais) – Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande-PB, 2008.

BUSSAB, W.O.; MIAZAKI, E.S.; ANDRADE, D.F. **Introdução à análise de agrupamentos**. São Paulo: Associação Brasileira de Estatística, 105p, 1990.

CASTAÑEDA-OVANDO, A.; PACHECO-HERNANDEZ, M.L.; PAEZ-HERNANDEZ, E.; RODRIGUEZ, J.A.; GALAN-VIDAL, C.A. Chemical studies of anthocyanins: a review. **Food Chemistry**, v.113, n.4, p.859-871, 2009.

CARVALHO, L.P.; SANTOS, J.W. Respostas correlacionadas do algodoeiro com a seleção para a coloração da fibra. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.38, n.1, p.79-83, 2003.

CARVALHO, L.P.; ANDRADE, F.P.; SILVA FILHO, J.L. Cultivares de algodão colorido no Brasil. **Revista Brasileira de Oleaginosas e fibrosas**, v.15, n.1, p.37-44, 2011.

CARVALHO, L.P.; FARIAS, F.J.C.; LIMA, M.M.A.; RODRIGUES, J.I.S. Inheritance of different fiber colors in cotton (*Gossypium barbadense* L.). **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.14, n.4, p.256-260, 2014.

CAVALCANTI, V.M. Conhecimento como produto social: o desenvolvimento do algodão naturalmente colorido na Paraíba. **Raízes**, v.2, n.2, p.87-108, 2012.

CAVALCANTI, J.J.V.; RESENDE, M.D.V.; SANTOS, F.H.C.; PINHEIRO, C.R. Predição simultânea dos efeitos de marcadores moleculares e seleção genômica ampla em cajueiro. **Revista Brasileira Fruticultura**, v.34, n.3, p.840-846, 2012.

CAVALCANTI FILHO, P.F.D.M.B.; MOUTINHO, L.M.G. Cooperação institucional como estratégia inovativa: o caso do APL de confecções em Campina Grande (PB). **Revista de Economia Contemporânea**, v. 11, p. 475-507, 2007.

CHEN, F.; REDDY, M.S.S.; TEMPLE, S.; JACKSON, L.; SHADLE, G.; DIXON, R.A. Multi-site genetic modulation of monolignol biosynthesis suggests new routes for formation of syringyl lignin and wallbound ferulic acid in alfalfa (*Medicago sativa* L.). **The Plant Journal**, v.48, n.1, p.113-124. 2006.

COSTA, J.L.; JESUS, O.N.; OLIVEIRA, G.A.F.; OLIVEIRA, E.J. Effect of selection on genetic variability in yellow passion fruit. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.12, n.4, p.253-260, 2012.

COUTINHO, M.A.S; MUZITANO, M.F.; COSTA, S.S. Flavonoides: Potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório. **Revista Virtual de Química**. v.1, n.3, p.241-256, 2009.

CRUZ, C.D. **Programa GENES: Biometria**. Editora UFV. Viçosa, MG. 382p. 2006.

CRUZ, C. D. **Programa GENES: Biometria: Versão windows: aplicativo computacional em genética e estatística**. Viçosa: UFV, 2008.

CRUZ, C.D.; CARNEIRO, P.C.S. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. v.2, Viçosa: UFV, Imprensa Universitária, 585p. 2003.

CRUZ, C.D.; FERREIRA, F.M.; PESSONI, L.A. **Biometria aplicada ao estudo da diversidade genética**. 1ª ed. Visconde do Rio Branco, MG: Suprema, 620p. 2011.

CRUZ, C.D.; REGAZZI, A.J.; CARNEIRO, P.C.S.; **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. 4ª ed. Viçosa: UFV. 514 p. 2012.

DANIEL, V.C.; SEVILHA, R.R.; SILVA, F.F.; ZONETTI, P.C. Germinação e crescimento de plântulas de algodão colorido sob condições de estresse salino. **Revista em Agronegócios e Meio Ambiente**, v.4, n.2, p. 321-333. 2011.

DELLAPORTA, S.L.; WOOD, J.; HICKS, J.B. A Plant DNA mini preparation: version II. **Plant Molecular Biology Reporter**, v.1, p.19-21, 1983.

DEVIC, M.; GUILLEMINOT, J.; DEBEAUJON, I.; BECHTOLD, N.; BENSAUDE, E.; KOORNNEEF, M.; PELLETIER, G.; DELSENY, M. The BANYULS gene encodes a DFR-like protein and is a marker of early seed coat development. **The Plant Journal**, v.19, p.387-398, 1999.

DIAS, L.A.S. Análises multidimensionais. In: ALFENAS A.C. **Eletroforese de Isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microorganismos**. Viçosa: UFV, p.405-475. 1998.

DICKERSON, D.K.; LANE, E.F.; RODRIGUES, D.F. **Naturally colored cotton: resistance to changes in color and durability when refurbished with selected laundry aids**. California State University, Agricultural Technology Institute, Fresno, 38p. 1999.

DIXON, R.A.; STEELE, C.L. Flavonoid and isoflavonoids-a gold mine for metabolic engineering. **Trends Plant Sci**, v.4, n.10, p.394-400, 1999.

ENDER, M.; TERPSTRA, K.; KELLY, J.D. Marker assisted selection for white mold resistance in common bean. **Molecular Breed**, v.21, n.2, p.149-157, 2008.

ENDRIZZI, J.E.; TURCOTTE, E.L.; KOHEL, R.J. Quantitative genetics, cytology and cytogenetics. In: KOHEL, R.J.; LEWIS, C.F. ed. **Cotton**. Madison: American Society of Agronomy, p. 82-131, 1984.

FENG, H., TIAN, X., LIU, Y., LI, Y., ZHANG, X., JONES, B. J., SUN, Y., SUN, J. Analysis of Flavonoids and the Flavonoid Structural Genes in Brown Fiber of Upland Cotton. **PLOS ONE**, v.8, n.3, p.e58820, 2013.

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

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 2.ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEM, 1996.

FONSECA, A.F.A.; SEDIYAMA, T.; CRUZ, C.D.; SAKAIYAMA, N.S.; FERRÃO, M.A.G.; FERRÃO, R.G.; BRAGANÇA, S.M. Divergência genética em café conilon. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, n.4. p.599-605, 2006.

FREIRE, E.C. O algodão colorido no Brasil. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v.2, n.9. p. 36-39, 1999.

GOULÃO, L.; OLIVEIRA, C.M. Molecular characterization of cultivars of apple (*Malus x domestica* Borkh.) using microsatellite (SSR and ISSR) markers. **Euphytica**, v.122, p.81-89, 2001.

HOLTON T.A.; BRUGLIERA F.; TANAKA Y. Cloning and expression of flavonol synthase from *Petunia hybrida*. **The Plant Journal**, v.4, n.6, p.1003-1010, 1993.

HOLTON, T. A.; CORNISH, E. C. Genetics and biochemistry of anthocyanin biosynthesis. **The Plant Cell**, v.7, n.7, p.1071-1083, 1995.

HONDA, C.; KOTODA, N.; WADA, M.; KONDO, S.; KOBAYASHI, S.; SOEJIMA, J.; ZHANG, Z.; TSUDA, T.; MORIGUCHI, T. Anthocyanin biosynthetic genes are coordinately expressed during red coloration in apple skin. **Plant Physiology Biochemistry**, v.40, n.11, p. 955-962, 2002.

HUA, S.; WANG, X.; YUAN, S.; SHAO, M.; ZHAO, X.; ZHU, S.; JIANG, L. Characterization of pigmentation and cellulose synthesis in colored cotton fibers. **Crop Science**, v.47, n.4, p. 1540-1546, 2007.

JAAKOLA, L.; MAATTA, K.; PIRTTILA, A. M.; TORRONEN, R.; KARENLAMPI, S.; HOHTOLA, A. Expression of genes involved in anthocyanin biosynthesis in relation to anthocyanin, proanthocyanidin, and flavonol levels during bilberry fruit development. **Plant Physiology**, v.130, n.2, p.729-739, 2002.

KARASAWA, M.; RODRIGUES, R.; SUDRÉ, C.P.; SILVA, M.P.; RIVA, E.M.; AMARAL JÚNIOR, A.T. Aplicação de métodos de agrupamento na quantificação da divergência genética entre acessos de tomateiro. **Horticultura Brasileira**, v.23, n.4, p.1000-1005, 2005.

KARAM, T.K.; DALPOSSO, L.M.; CASA, D.M.; FREITAS, G.B.L. Carqueja (*Baccharis trimera*): utilização terapêutica e biossíntese. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.15, n.2, p.280-286, 2013.

KANTETY, R.V.; ZENG, X.P.; BENNETZEN, J.L.; ZEHR, B.E. Assessment of genetic diversity in dent and popcorn (*Zea mays* L.) inbred lines using inter-simple sequence repeat (ISSR) amplification. **Molecular breeding**, v.1, p.365-373, 1995.

KANTETY, R.V.; ROTA, M.L.; MATTHEWS, D.E.; SORRELLS, M.E. Data mining for simple sequence repeats in expressed sequence tags from barely, maize, rice, sorghum and wheat. **Plant Molecular Biology**, v.48, n.5-6, p.501-510, 2002.

KOES, R.; VERWEIJ, W.; QUATTROCCHIO, F. Flavonoids: a colorful model for the regulation and evolution of biochemical pathways. **Trends Plant Science**, v.10, n.5, p.236-242, 2005.

KOHEL, R.J. Genetic analysis of fiber color variants in cotton, **Crop Science**, v.25, p.793-797, 1985.

LI, T.; FAN, H.; LI, Z.; WEI, J.; LIN, Y.; CAI, Y. The accumulation of pigment in fiber related to proanthocyanidins synthesis for brown cotton. **Acta Physiol Plant**, v.34, n.2, p.813-818, 2012.

LIU, B.; WENDEL, J.F. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphisms as a genetic marker system in cotton. **Molecular Ecology Notes**, v.1, p.205-208, 2001.

MARCHIORO, V.S.; CARVALHO, F.I.F.; OLIVEIRA, A.C.; CRUZ, P.J.; LORENCETTI, C.; BENIN, G.; SILVA, J.A.G.; SCHMIDT, D.A.M. Dissimilaridade genética entre acessos de aveia. **Ciência e Agrotecnologia**, v.27, n.2, p.285-294, 2003.

MELO, R.A.; RESENDE, L.V.; MENEZES, D.; BECK, A.P.A.; COSTA, J.C.; COUTINHO, A.E.; NASCIMENTO, A.V.S. Genetic similarity between coriander genotypes using ISSR markers. **Horticultura Brasileira**, v.29, n.4, p.526-530, 2011.

MELO, W.M.C., PINHO, R.G.V.; SANTOS, J.B.; FERREIRA, D.F. Utilização de caracteres morfoagronômicos e marcadores moleculares para a avaliação da divergência genética entre híbridos de milho. **Revista Ceres**, v.48, n.276, p. 195-207, 2001.

MELO, D.C.; OLIVEIRA, D.A.A.; SEERIG, A.; CARVALHO, D.C. Aplicações práticas de marcadores microssatélites na caracterização genética e identificação de plantéis de tilapia. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, v.32, n.4, p.220-224, 2008.

MILACH, S.C.K. Marcadores de DNA. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v.5, p.14-17, 1998.

MIRANDA, G.V.; COIMBRA, R.R.; GODOY, C.L.; SOUZA, L.V.; GUIMARÃES, L.J.M.; MELO, A.V. Potencial de melhoramento e divergência genética de cultivares de milho-pipoca. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.38, n.6, p.681-688, 2003.

MOL, J.; GROTEWOLD, E.; KOES, R. How genes paint flowers and seeds. **Trends in Plant Science**, v.3, n.6, p.212-217, 1998.

MORELLO, C.L.; PEDROSA, M.B.; SUASSUNA, N.D.; LAMAS, F.M.; CHITARRA, L.G.; SILVA FILHO, J.L.; ANDRADE, F.P.; BARROSO, P.A.V.; RIBEIRO, J.L.; GODINHO, V.P.C.; LANZA, M.A. BRS 336: A high-quality fiber upland cotton cultivar for Brazilian savanna and semi-arid conditions. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.12, n.1, p.92-95, 2012.

OLIVEIRA, A.C.B.; SEDIYAMA, M.A.N.; PEDROSA, M.W.; GARCIA, N.C.P.; GARCIA, S.L.R. Divergência genética e descarte de variáveis em alface cultivada sob sistema hidropônico. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v.26, n.2, p.211-217, 2004.

PEDROSA, M.B.; SILVA, J.L.; MORELLO, C.L.; FREIRE, E.C.; ALENCAR, A.R.; ANDRADE, F.P.; CHITARRA, L.G.; FARIAS, F.J.C.; VIDAL NETO, F.C. BRS 286: cultivar de algodão com alta produtividade de pluma e de porte baixo, para cultivo no estado da Bahia. In: Congresso Brasileiro do Algodão, 7., 2009, Foz do Iguaçu. Sustentabilidade da cotonicultura Brasileira e Expansão dos Mercados: **Anais...** Campina grande: Embrapa Algodão, 2009.

PERSEGUINI, J.M.C.; CHIORATTO, A.F.; ZUCCHI, M.I.; COLOMBO, C.A.; CARBONELL, S.A.M.; MONDEGO, J.M.C.; GAZAFFI, R.; GARCIA, A.A.F.; CAMPOS, T.; SOUZA, A.P.; RUBIANO, L.B. Genetic diversity in cultivated carioca common beans based on molecular marker analysis. **Genetics and Molecular Biology**, v.34, n.1, p.88-102, 2011.

PIGATO, S.M.P.C.; LOPES, C.R. Caracterização silvicultural, botânica e avaliação da variabilidade genética por meio do marcador molecular RAPD em um teste de progênies de *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake. **SCIENTIA FORESTALIS**, n.60. p.135-148, 2001.

PINA, A.; ZHEBENTYAYEVA, T.; ERREA, P.; ABBOTT, A. Isolation and molecular characterization of cinnamate 4-hydroxylase from apricot and plum. **Biologia Plantarum**, v.56, n. 3 p.441-450, 2012.

QUEIROGA, V.P.; CARVALHO L.P.; CARDOSO G.D. Cultivo do Algodão Colorido Orgânico na Região Semi-Árida do Nordeste Brasileiro. Campina Grande. Embrapa Algodão. **Documentos**, 204. p.49, 2008.

RABEL, M.; VIEIRA, E.S.N.; LANA, U.G.P; PAIVA, E., SEHNEM, M.A.S., SCHUSTER, I. Marcadores moleculares microssatélites na avaliação de sementes de soja com variação na coloração do hilo. **Revista Brasileira de Sementes**, v.32, n.2, p.19-25, 2010.

RESENDE, M.D.V. **Matemática e Estatística na Análise de Experimentos e no Melhoramento Genético**. Colombo: Embrapa Florestas, 561 p. 2007.

RESENDE, M.A.V.; FREITAS, J.A.; LANZA, M.A.; RESENDE, M.D.V.; AZEVEDO, C.F. Divergência genética e índice de seleção via BLUP em acessos de algodoeiro para características tecnológicas da fibra. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.44, n.3, p.334-340, 2014.

RODRIGUES, J.F. **Delimitação de espécies e diversidade genética no complexo *Cattleya coccínea* Lindl. e *C. Mantiqueirae* (Flowie) Van der Berg (*Orchidaceae*) baseada em marcadores moleculares ISSR**. Dissertação de Mestrado, ESALQ/USP. Piracicaba, 2010.

RODRIGUES, T.B.; SANTOS, J.B; RAMALHO, M.A.P.; AMORIM, E.P.; SILVA, N.O. QTLs identification in common bean through SSR markers affected by natural selection. **Ciência e Agrotecnologia**, v.31, n.5, p.1351-1357, 2007.

RODRIGUES, L.S.; ANTUNES, I.F.; TEIXEIRA, M.G.; SILVA, J.B. Divergência genética entre cultivares locais e cultivares melhoradas de feijão. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.37, n.9, p.1275-1284, 2002.

RUAS, P.M.; RUAS, C.F.; RAMPIM, L.; CARVALHO, V.P.; RUAS, E.A.; SERA, T. Genetic relationship in coffee species and parentage determination of interspecific hybrids using ISSR (Inter-Simple Sequence Repeat) markers. **Genetics and Molecular Biology**, v.26, p.319-327. 2003.

SANTOS, R.C.; QUEIROZ, C.M.; BATISTA, V.G.L.; SILVA, C.R.C.; PINHEIRO, M.P.N.; GALVÃO FILHO, A.L.A.; MELO FILHO, P.A.; LIMA, L.M. Variability of F2 peanut progenies generated through the selection of ISSR-divergent genitors. **Revista Ciência Agronômica**, v.44, n.3, p.578-586, 2013.

SARLA, N.; BOBBA, S.; SIDDIQ, E.A. ISSR and SSR markers based on AG and GA repeats delineate geographically diverse *Oryza nivara* accessions and reveal rare alleles. **Current Science**, v.84, n.5, p.683-690. 2003.

SEVERO, J.; TIECHER, A.; CHAVES, F.C.; SILVA, J.A.; ROMBALDI, C. V. Gene transcript accumulation associated with physiological and chemical changes during developmental stages of strawberry cv. Camarosa. **Food Chemistry**, v. 126, n.3, p.995-1000, 2011.

SILVA, C.M.; GONÇALVES-VIDIGAL, M.C.; VIDIGAL FILHO, P.S.; SCAPIM, C.A.; DAROS, E.; SILVÉRIO, L. Genetic diversity among sugarcane clones (*Saccharum* spp.). **Acta Scientiarum. Agronomy**, v.27, n.2, p.315-319, 2005.

SOUZA, F.F.; CAIXETA, E.T.; FERRÃO, L.F.V.; PENA, G.F.; SAKIYAMA, N.S.; ZAMBOLIM, E.M.; ZAMBOLIM, L.; CRUZ, C.D. Molecular diversity in *Coffea canephora* germplasm conserved and cultivated in Brazil. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.13, n.4, p.221-227, 2013.

STEELE, C.L.; GIJZEN, M.; QUTOB, D.; DIXON, R.A. Molecular characterization of the enzyme catalyzing the aryl migration reaction of isoflavonoid biosynthesis in soybean. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.367, n.1, p.146-150, 1999.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 2004.

TOPPA, E.V.B.; JADOSKI, C.J. O uso dos marcadores moleculares no melhoramento genético de plantas. **Scientia Agraria Paranaensis**, v.12, n.1, p.1-5, 2013.

VIEIRA, E.A.; FIALHO, J.F.; FALEIRO, F.G.; BELLON, G.; FONSECA, K.G.; CARVALHO, L.J.C.B.; SILVA, M.S.; MORAES, S.V.P.; SANTOS FILHO, M.O.S.; SILVA, K.N. Divergência genética entre acessos açucarados e não açucarados de mandioca. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.45, n.12, p.1707-1715, 2008.

WAMSER, G.H.; COIMBRA, J.L.M.; GUIDOLIN, A.F.; LANNES, S.D.; DALAGNOL, G.L. Caracterização de acessos de cebola com a utilização de marcadores moleculares RAPD. **Revista Ciência Agronômica**, v. 45, n.3, p.573-580, 2014.

WINKEL-SHIRLEY, B. Evidence for enzyme complexes in the phenylpropanoid and flavonoid pathways. **Physiologia Plantarum**, v.107, n.1, p.142-149, 1999.

WINKEL-SHIRLEY, B. Flavonoid biosynthesis: a colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. **Plant Physiol**, v.126, n.2, p.485-493, 2001.

XIAO, Y.-H.; ZHANG, Z.-S.; YIN, M.-H.; LUO, M.; LI, X.-B.; HOU, L.; PEI, Y. Cotton flavonoid structural genes related to the pigmentation in brown fibers. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.358, n.1, p.73-78, 2007.

XIE, D.Y.; SHARMA, S.B.; PAIVA, N.L.; FERREIRA, D.; DIXON, R.A. Role of anthocyanidin reductase, encoded by BANYULS in plant flavonoid biosynthesis. **Science**, v.299, n.5605, p.396-399. 2003.

XIE, D.Y.; SHARMA, S.B.; DIXON, R.A. Anthocyanidin reductases from *Medicago truncatula* and *Arabidopsis thaliana*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.422, n.1, p.91-102. 2004.

YAN, M.L.; LIU, X.J.; LIU, Z.S.; GUAN, C.Y.; YUAN, M.Z.; XIONG, X.H. Cloning and expression analysis of dihydroflavonol 4-reductase gene in *Brassica juncea*. **Acta Agronômica Sinica**, v.34, n.1, p.1-7, 2008.

ZHICHANG, Z.; YEYUAN, C.; AIPING, G.; JIANFENG, H.; ZHIGUO, D. Cloning and expression of anthocyanidin synthase (ANS) gene homolog from peel of mango (*Mangifera indica* Linn). **African Journal of Plant Science**, v.8, n.3, p.147-152, 2014.