



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA



FERNANDO DOS SANTOS ARAÚJO

**DESENVOLVIMENTO DE MODELOS BASEADOS EM MEDIDAS
HIPERESPECTRAIS NIR PARA ANÁLISE DE SEMENTES E
CARACTERIZAÇÃO DE ALGODOEIROS ARBÓREOS**

AREIA

2019

FERNANDO DOS SANTOS ARAÚJO

**DESENVOLVIMENTO DE MODELOS BASEADOS EM MEDIDAS
HIPERESPECTRAIS NIR PARA ANÁLISE DE SEMENTES E
CARACTERIZAÇÃO DE ALGODOEIROS ARBÓREOS**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia do Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Paraíba, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Agronomia - Área de concentração em Agricultura Tropical.

ORIENTADORA:

Dra. Riselane De Lucena Alcântara Bruno

COORIENTAÇÃO:

Dra. Nair Helena Castro Arriel

Dr. Everaldo Paulo De Medeiros

AREIA

2019

**Catálogo na publicação Seção de
Catálogo e Classificação**

A663d Araujo, Fernando Dos Santos.

Desenvolvimento de modelos baseados em medidas hiperespectrais NIR para análise de sementes e caracterização de algodoeiros arbóreos / Fernando Dos Santos Araujo. - AREIA, 2019.

73 f. : il.

Orientação: Riselane de Lucena Alcântara Bruno Bruno.

Coorientação: Nair Helena de Castro Arriel, Everaldo Paulo de Medeiros.

Tese (Doutorado) - UFPB/CCA.

1. Gossypium L. 2. Qualidade de sementes. 3. Fibra natural. 4. Diversidade genética. 5. Potencial forrageiro. I. Bruno, Riselane de Lucena Alcântara Bruno. II. Título.

UFPB/CCA-AREIA

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE

DESENVOLVIMENTO DE MODELOS BASEADOS EM MEDIDAS HIPERESPECTRAIS
NIR PARA ANÁLISE DE SEMENTES E CARACTERIZAÇÃO DE ALGODOEIROS
ARBÓREOS

DOUTORANDO

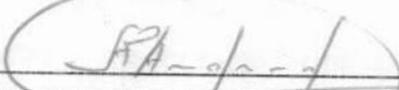
FERNANDO DOS SANTOS ARAÚJO

Tese de doutorado aprovada em 28 de fevereiro de 2019 como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Agronomia pelo Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Federal da Paraíba.

COMISSÃO EXAMINADORA



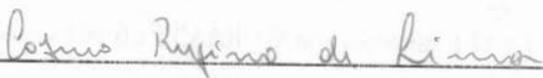
DRa. RISELANE DE LUCENA ALCÂNTARA BRUNO - UFPB
ORIENTADORA -- PRESIDENTE



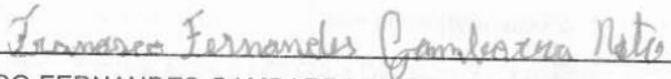
DR. ALBERÍCIO PEREIRA DE ANDRADE - UFRPE
EXAMINADOR INTERNO



DRa LIZIANE MARIA DE LIMA - EMBRAPA ALGODÃO
EXAMINADOR EXTERNO



DR. COSMO RUFINO DE LIMA - IFPE
EXAMINADOR EXTERNO



DR. FRANCISCO FERNANDES GAMBARRA NETO – BOLSISTA PNP/EMBRAPA ALGODÃO
EXAMINADOR EXTERNO

AREIA, PARAÍBA, 28 DE FEVEREIRO DE 2019

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Maria José dos Santos Araújo e Antônio Manoel dos Santos Araújo com todo meu amor e respeito, à minha orientadora Dra Riselane de Lucena Alcântara Bruno e aos meus ex-orientadores Dr. Mauro Vasconcelos Pacheco e Dra. Cibele dos Santos Ferrari que acreditaram no meu potencial para seguir a carreira acadêmica e hoje compartilham este importante momento comigo.

AGRADECIMENTOS

Ao senhor Deus por ter me dado sabedoria, sensibilidade e serenidade para enfrentar os desafios cotidianos, transformando-os em aprendizado para minha vida pessoal e profissional.

Ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia (PPGA) pela oportunidade e à Coordenação de Aperfeiçoamento Profissional de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de estudos.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Unidade Embrapa Algodão pelo apoio técnico e financeiro para execução das pesquisas.

À minha orientadora Dra Riselane de Lucena Alcântara Bruno pela sua orientação, amizade, paciência e confiança em mim depositada desde o tempo da graduação.

Aos meus coorientadores Dra Nair Helena de Castro Arriel e Dr. Everaldo Paulo de Medeiros da Embrapa Algodão pela orientação e apoio técnico.

Aos membros da minha banca de qualificação e defesa de tese pelas correções e sugestões.

Aos meus ex-orientadores Dra. Cibele dos Santos Ferrari e Dr. Mauro Vasconcelos Pacheco e pela amizade e incentivo à carreira acadêmica.

Às equipes dos laboratórios de Tecnologia Química e Biotecnologia da Embrapa Algodão, a quem quero agradecer em especial aos à Joabson Borges de Araújo, Edijane Valeria Araujo dos Anjos Teixeira, Fábila Suelly Lima Costa e Terezinha Fernandes Duarte pelo apoio técnico.

À equipe do Laboratório de Sementes, Laboratório de Fitopatologia e do Campo experimental de chá de jardim do CCA/UFPB em especial a Dra Edna Ursulino Alves, Dr Ademar Pereira, Dra Luciana Cordeiro do Nascimento e Rui Barbosa da Silva.

Aos funcionários da Embrapa Algodão Chicão de Patos, Elenilson Saulo Batista Dantas, Jose Joênio Braga, Dra Marleide Magalhães de Andrade Lima pelo auxílio.

Aos professores e funcionários do PPGA e DFCA do CCA/UFPB.

Aos amigos Givanildo Zildo, Shara Borges e Richeliel Albert pelo suporte estatístico.

Aos meus amigos Anderson Rodrigo, Alexandre Cruz, Ramon Fagner, Ernani Jr., Antônio, Wênia Figueiredo e Jadye pelo companheirismo e apoio em Campina Grande.

Aos colegas bolsistas do projeto Diversificação e Uso do Algodoeiro no Semiárido Brasileiro, em especial à Dra Mayara Andrade, Adeilson Freire, Emanuel Costa, Otília Farias, José Demétrio, Thales Alexandre, Dr. Breno Oliveira (*in memoriam*) e Dr. Francisco Gambarra.

Às equipes dos Laboratórios de Análise de Sementes e Laboratório de Fitopatologia do CCA/UFPB.

Aos colegas da turma de doutorado e mestrado 2015 do PPGA, em especial a Jean Pierre, Isaias Vitorino, Otília Farias, Rosinaldo, Valério, Giliane, Wênia Figueiredo, Welisson e Nelto Almeida pelo companheirismo.

Aos meus colegas de profissão e amigos Shara Borges, Rafaela Pereira, Karialane Belarmino, Anderson Rodrigo, Francival Félix (Eng. Florestal), Ewerton Torres e Givanildo Zildo pela amizade sincera, companheirismo, paciência e amor.

Aos meus familiares Antonio Manoel (pai), Maria José (mãe), Damiana Gino dos Santos (Avó) e irmãos Francisca, Flávia, Fábio, Fátima, Fernanda e Felipe pelo amor familiar e as doces palavras de incentivo e orgulho.

RESUMO

A cotonicultura no Brasil é caracterizada por uma grande diversidade de sistemas de produção, incluindo áreas com modernização intensa praticada em bases empresariais como na Região dos Cerrados, até pequenos núcleos de produção direcionados ao atendimento de nichos de mercado ligados à agricultura de base familiar que se encontra em processo de expansão e estruturação na Região Semiárida. Dessa forma, este estudo objetivou desenvolver modelos baseados em medidas hiperespectrais NIR para análise de sementes e caracterizar formas locais de algodoeiro quanto à diversidade e estruturação genética, qualidade tecnológica da fibra e potencial de uso da folhagem para fins forrageiros. Usando a técnica de imagens hiperespectrais no infravermelho próximo associada à análise quimiométrica foi possível desenvolver novos métodos capazes de classificar sementes de algodoeiro imaturas e sadias e sementes viáveis e não viáveis de forma rápida, segura e não destrutiva. O uso do marcador genético-molecular baseado em PCR *Inter Simple Sequence Repeat* foi capaz de revelar padrões de diversidade e estruturação genética intra e interespecífica de formas perenes de algodão alotetraplóide domesticado (*Gossypium hirsutum* L. r. marie-galante e *Gossypium barbadense* L.) sendo, portanto, promissores para caracterização genética. A caracterização genética de quatro populações do algodoeiro *G. hirsutum* L. r. marie-galante, usando esse marcador genético-molecular, indicou que as mesmas apresentam baixos níveis de diversidade genética total e intrapopulacional, alta diferenciação genética, baixo fluxo gênico e estão estruturadas em dois grupos genéticos espacialmente estruturados. A avaliação da pluma de algodão das quatro populações demonstrou que a maioria das características tecnológicas de fibra está dentro do esperado para cultivares modernas. As características agrônômicas variam entre essas quatro populações e são influenciadas pela fenofase de desenvolvimento. Sua folhagem apresenta perfil químico-bromatológico potencialmente apropriado para alimentação de ruminantes em todas as fenofases, mas sua quantidade e qualidade químico-bromatológica são maiores nas fenofases de florescimento e pós-frutificação.

Palavras-chave: *Gossypium* L. Qualidade de sementes. Fibra natural. Diversidade genética. Potencial forrageiro.

ABSTRACT

Cotton growing in Brazil is characterized by a great diversity of production systems, including modernization intense based in agribusiness from Cerrado region, beside small production centers directed to niche markets linked to family-based agriculture that is expansion process and structuring in the Semiarid Region. Thus, this study aimed to develop models based on NIR hyperspectral measurements for seed analysis and to characterize local forms of cotton in terms of diversity and genetic structure, technological quality of fiber and potential use of leaf biomass for forage purposes. Using the near infrared hyperspectral imaging technique associated with chemometric analysis it was possible to develop new methods capable of classifying immature and healthy cotton seeds and viable and non-viable seeds in a fast, safe and non destructive manner. The genetic marker of the PCR-based Inter Simple Sequence Repet used was able to reveal patterns of diversity and intraspecific genetic structuring of perennial cotton (*Gossypium hirsutum* L. marie-galante and *Gossypium barbadense* L.), and therefore, promising for genetic characterization. Genetic characterization the populations *G. hirsutum* L. r. marie-galante using this genetic-molecular marker indicated low levels of total and intrapopulation genetic diversity, high genetic differentiation, low gene flow and are structured into two spatially structured genetic groups. The cotton plume evaluation of the 4 populations showed that most fiber technological characteristics are within the expected range for modern cultivars. Agronomic characteristics vary among these populations and are influenced by the developmental phenophase. Its leaf biomass presents a chemical-bromatological profile potentially suitable for ruminant feeding in all phenophases, but its quantity and chemical-bromatological quality are higher in flowering and post-fruiting phenophases.

Keywords: *Gossypium* L. Seed quality. Natural fiber. Genetic diversity. Forage potential.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	10
OBJETIVOS	13
CAPÍTULO 1. Automatic detection and classification of immature cottonseeds based on NIR hyperspectral imaging	14
Resumo	14
Introdução.....	14
Material e Métodos.....	16
Resultados e Discussão.....	18
Conclusões	22
Agradecimentos	22
Referências bibliográficas	23
CAPÍTULO 2. Classificação de sementes de algodão viáveis e não viáveis usando imagens hiperespectrais no infravermelho próximo e análise quimiométrica.....	25
Resumo	25
Introdução.....	25
Material e métodos.....	26
Resultados e Discussão.....	28
Conclusões	32
Agradecimentos	32
Referências bibliográficas	32
CAPÍTULO 3. Diversidade genética intra e interespecífica em formas perenes de algodão alotetraplóide domesticado (<i>Gossypium</i> ssp.) acessada por marcadores moleculares ISSR	35
Resumo	35
Introdução.....	35
Material e métodos.....	37
Resultados.....	40
Discussão	42
Conclusões	44
Agradecimentos	44
Referências bibliográficas	44
CAPÍTULO 4. Caracterização genética e qualidade tecnológica da fibra de populações remanescentes de algodoeiro arbóreo (<i>Gossypium hirsutum</i> L. r. <i>marie-galante</i> Hutch) do Estado da Paraíba, Brasil.....	48
Resumo	48

Introdução.....	48
Material e métodos.....	49
Resultados e discussão	52
Conclusões	59
Agradecimentos	59
Referências bibliográficas	59
CAPÍTULO 5. A biomassa foliar do algodoeiro perene (<i>Gossypium hirsutum</i> r. mariegalante Hutch) possui potencial para uso forrageiro?.....	63
Resumo	63
Introdução.....	63
Material e Métodos.....	64
Resultados e Discussão.....	66
Conclusões	70
Agradecimentos	71
Referências bibliográficas	71

INTRODUÇÃO

A cultura do algodão (*Gossypium* L.) produz a fibra natural mais importante do mundo para a indústria têxtil, enquanto suas sementes são utilizadas como matéria-prima para fabricação de óleo vegetal, ração animal e fertilizante orgânico.

O Brasil é um dos principais produtores e exportadores de fibra de algodão do mundo, contribuindo com 6% do total (Conab, 2017). No passado, a cotonicultura brasileira era praticada, principalmente, na Região Semiárida que ocupava o status de maior produtora do país (Freire, Costa e Andrade, 1997), mas atualmente esse posto é ocupado pela Região dos Cerrados que é responsável por 93,7% do total do algodão produzido (Conab, 2017).

A cotonicultura que é atualmente praticada na Região Semiárida está direcionada ao atendimento de nichos de mercado, como o algodão colorido, orgânico e agroecológico, que embora não possua a mesma expressão econômica da cotonicultura empresarial da Região dos Cerrados, gera ocupação e renda para pequenos agricultores de base familiar (Coelho, 2017).

Existe um estoque razoável de tecnologias que contribuem com a cotonicultura da Região Semiárida tais como cultivares tolerantes à seca e que produzem fibras com características diferenciadas (fibras de comprimento longo e extralongo e naturalmente coloridas), além de tecnologias de cultivo que possibilitam a produção de fibras mais sustentáveis como o manejo orgânico e agroecológico. Entretanto, para que essas tecnologias continuem sendo disponibilizadas de forma contínua, as pesquisas nesse setor necessitam ser priorizadas.

Este estudo contempla duas áreas de pesquisa importantes que poderão contribuir com o desenvolvimento da cotonicultura da Região Semiárida, tais como desenvolvimento de novas metodologias para análise de atributos de qualidade de sementes e a caracterização dos recursos genéticos de algodão domesticado de origem local.

O desenvolvimento de novas metodologias para análise dos atributos de qualidade de sementes de algodão se justifica pela necessidade do setor por metodologias mais eficientes, pois embora existam testes padronizados (testes de germinação e vigor), nenhum deles corresponde aos requisitos de precisão e a rapidez desejada. Neste estudo, foram desenvolvidos modelos preditivos de atributos de qualidade de sementes baseados na técnica de imagens hiperespectrais (HSI) na região do infravermelho próximo (NIR). Essa técnica vem sendo aplicada a vários segmentos do setor de sementes agrícolas, incluindo determinação da viabilidade de sementes, detecção de patógenos associados, classificação de sementes com danos físicos, entre outras aplicações (Rahman e Cho, 2016) cujos benefícios em relação aos métodos tradicionais atualmente em uso incluem maior

velocidade analítica, facilidade de operação, a não destruição da amostra e possibilidade de analisar várias características simultaneamente (Cozzolino e Roberts, 2016).

Outra demanda da cotonicultura na Região Semiárida é a necessidade de caracterizar os recursos genéticos de algodão domesticado de origem local (*G. barbadense* L. e *G. hirsutum* L. r. *marie-galante*) que, apesar de serem considerados obsoletos para exploração econômica, são importantes para comunidades agrícolas locais e uma fonte potencial de variabilidade genética para programas de melhoramento. Por essa razão, caracterizaram-se neste estudo algumas formas locais de algodoeiros foram caracterizadas quanto à diversidade e estruturação genética, qualidade tecnológica da fibra e potencial de uso da biomassa foliar para fins forrageiros.

A caracterização genética de algodoeiros de origem local é importante para delinear estratégias de conservação, pois sua manutenção *in situ* esta frequentemente ameaçada por mudanças nos hábitos culturais e uso da terra (Menezes et al., 2017). Essa é a realidade de muitas outras formas locais de algodão domesticado em todo mundo, e se não for contornada, poderá vir a comprometer a sustentabilidade da produção de fibras de algodão em longo prazo, uma vez que a perda de variação genética devido à erosão genética pode diminuir a capacidade dos programas de melhoramento de criarem novas cultivares adaptadas às mudanças ambientais bióticas e abióticas em longo prazo (Boopathi e Hoffmann, 2016).

A fibra dos algodoeiros de origem local como *G. hirsutum* L. r. *marie-galante*, é conhecida por apresentar qualidade tecnológica superior à de algodoeiros herbáceos (*G. hirsutum* L. r. *latifolium*), mais especificamente quanto ao seu comprimento (Delhom et al. 2017), entretanto, os materiais mantidos por agricultores ou até mesmo aqueles conservados em bancos de germoplasma não são caracterizadas o suficiente para atrair o interesse de produtores, da indústria e dos programas de melhoramento. Verificar se as mesmas atendem aos padrões de qualidade estabelecidos pela indústria têxtil e pelos programas de melhoramento pode viabilizar o aproveitamento deste recurso genético nestes setores (Beltrão e Azevedo, 2008).

Além da produção de fibra, as lavouras de algodão na Região Semiárida também fornecem uma grande quantidade de biomassa foliar que pode ser útil como recurso forrageiro para ruminantes, tendo visto que nessa região há escassez de forragem para os rebanhos na estação seca. Esta hipótese é sustentada pelo fato de que as lavouras de algodão perene eram consideradas um importante subsistema de produção de forragem para ruminantes no passado (Moreira, 1989). Nesse sentido, estudar os caracteres agrônômicos relacionados com a produção de biomassa foliar bem como a sua composição químico-bromatológica poderá dar suporte à utilização do algodoeiro perene como uma opção forrageira para ruminantes no Semiárido brasileiro.

Os estudos que compõe este trabalho estão apresentados em capítulos em formato de artigo científico cujo destino final será a publicação em periódicos nacionais e internacionais de acesso aberto.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BELTRÃO, N.E.M.; AZEVEDO, D.M.P. **O Agronegócio do Algodão no Brasil**. 2 ed. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2 ed. 2008, 742p.
2. BOOPATHI, N.M.; HOFFMANN, L.V. **Genetic diversity, erosion, and population structure in cotton genetic resources**. In: AHUJA, M.R.; JAIN; S.M. (Eds.) Genetic diversity and erosion in plants. New York: Springer, p.409-438, 2016.
3. COÊLHO, J. D. Produção de algodão. **Caderno setorial ETENE**, v. 2, n.3, 2017.
4. CONAB- Companhia Nacional de Abastecimento. **Compêndio de Estudos Conab**. v. 8. Brasília: Conab, 2017.
5. COZZOLINO, D.; ROBERTS, J. Applications and developments on the use of vibrational spectroscopy imaging for the analysis, monitoring and characterization of crops and plants. **Molecules**, v. 21, p.755, 2016.
6. DELHOM, C.D.; ARMIJO, C.B.; HUGHS, S.E. High quality yarns produced via high-speed roller ginning of upland cotton. **The Journal of Cotton Science**, v. 21, p.81-93, 2017.
7. FREIRE, E.C.; COSTA, J.N.; ANDRADE, F.P. Recursos genéticos e melhoramento do algodão no Nordeste do Brasil. In: Simpósio sobre recursos genéticos no Nordeste. Petrolina, 1997. Disponível em: <http://www.cpatsa.embrapa.br:8080/catalogo/livrorg/algodao.pdf>. Acesso em: 10 de Jan. de 2019.
8. MENEZES, I.P.P.; HOFFMANN, L.V.; LIMA, T.H.; SILVA A.R.; LUCENA, V.S.; BARROSO, P.A.V. Genetic diversity of arboreal cotton populations of the Brazilian semiarid: a remnant primary gene pool for cotton cultivars. **Genetics and Molecular Research**, v.16, 2017.
9. MOREIRA, J.A.N. **Algodoeiro mocó: uma lavoura ameaçada de extinção**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 1989.
10. RAHMAN, A.; CHO, B. Assessment of seed quality using non-destructive measurement techniques: a review. **Seed Science and Research**, v.26, n.4, p.285-305, 2016.

OBJETIVOS

1. OBJETIVO GERAL

Desenvolver modelos baseados em medidas hiperespectrais NIR para análise de sementes e caracterizar formas locais de algodoeiro quanto à diversidade e estruturação genética, qualidade tecnológica da fibra e potencial de uso da folhagem para fins forrageiros.

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Obter um modelo para a classificação de sementes de algodão imaturas a partir de imagens hiperespectrais no infravermelho próximo associadas à análise quimiométrica.
2. Desenvolver um método rápido, não destrutivo e um procedimento analítico eficaz para classificar sementes viáveis e não viáveis de algodão utilizando imagens hiperespectrais no infravermelho próximo associada à análise quimiométrica.
3. Acessar a diversidade genética intra e interespecífica, de formas perenes de algodão alotetraplóide domesticado das espécies *Gossypium hirsutum* L. r. marie-galante e *Gossypium barbadense* L., por meio de marcadores moleculares.
4. Avaliar a qualidade tecnológica da fibra e determinar os níveis de diversidade e estruturação genética de populações de algodoeiro arbóreo do Estado da Paraíba, Brasil.
5. Avaliar as características agronômicas e a composição químico-bromatológica da folhagem do algodoeiro *Gossypium hirsutum* L. r. marie-galante, analisando suas implicações para fins forrageiros.

CAPÍTULO 1

AUTOMATIC DETECTION AND CLASSIFICATION OF IMMATURE COTTONSEEDS BASED ON NIR HYPERSPECTRAL IMAGING

ABSTRACT: In commercial cottonseed lots, undesirable external contaminants and defective seeds must be removed during the processing operation because they may damage the final quality. The fast and automatic identification of defective seeds in commercial lots is desirable for both the industry and the producer. The present paper aims to obtain a model to classify immature cottonseeds through the near-infrared hyperspectral imaging (NIR-HSI) associated with chemometric data analysis. The samples were obtained by considering a spectral camera (Specim, Filand) in the range from 1.000 to 2450 nm. For exploratory purposes, the resulting data were then preprocessed by the Standard Normal Variate (SNV) correction, and by the Principal Component Analysis (PCA). Thereafter, we constructed models for healthy and immature seeds classification through the minimum partial least squares discriminant analysis (PLS-DA). The results using the NIR-HSI model gave the possibility to classify immature from different genotypes cottonseeds with high-precision (prediction accuracy was 100%). The PLS-DA classification models gave acceptable results by the use of the spectral profile of each pixel and the pixels of the cottonseed area, but the model using the pixels of the cottonseed area has shown as the most suitable model for application in seed analysis due to its provision of similar results compared to the reference method, but it has the advantage of being quicker and automatically performed. From the PLS-DA model, its prediction map allows detecting immature seeds in a set of samples that may be useful for the development of an automated sorting system and internal quality control purposes.

KEYWORDS: Spectroscopy. near-infrared. seed technology. non-destructive methods. *Gossypium*.

1. INTRODUCTION

Cotton is an important agricultural product for the world economy (Ali et al., 2016). The cotton harvest is destined to fiber production, but its seed, which is a byproduct of fiber processing, is an important raw material for the edible oil industry and biodiesel production (Gondim-Tomaz et al., 2016).

The technology employed in the cotton production field has raised harvest productivity levels worldwide (Norman et al., 2016). This is due to the development of genetically modified cultivars particularly, which is a key factor for high harvest yields (Soares

et al., 2016). As the seed is the transfer vector of this technology, the development of technological solutions for the seed agricultural sector needs to be prioritized.

Several seed quality analyses can be performed using analytical methods based on classical spectroscopy and near-infrared hyperspectral imaging (NIR-HSI) associated with the chemometric data analysis (Rahman and Cho, 2016). The benefits of these instrumental methods over traditional ones are the analytical speed, their facility, and the non-destruction sample (Cozzolino and Roberts, 2016).

The HSI-NIR technique combines and integrates the image and spectroscopy in order to acquire spectral and spatial information about the sample at the same time (Piqueras et al., 2014; Cozzolino & Roberts, 2016). This is important because the properties and characteristics of plant samples, such as fruits and seeds, often vary spatially (Gowen et al., 2010; Agelet & Hurburgh, 2014).

This technique has been applied to several segments of the agricultural sector (Dale et al., 2013), including seeds, which has been widely studied as a non-destructive analytical method (Rahman and Cho, 2016). Some of the available studies show this technique is efficient for non-destructive classification of viable and non-viable seeds of Capsicum pepper (Mo et al., 2014), and beetroot (Ahn et al., 2012), and for detecting watermelon infected by bacteria (Lee et al., 2017) and wheat infected by fungi (Williams et al., 2012), for discriminating different geographical origins of *Jatropha curcas* L. seeds (Gao et al., 2013), among other applications.

Focus on cottonseed technology, this technique has been used only for varietal classification (Soares et al., 2016). However, the technique also has the potential to analyze other important aspects related to physical and physiological quality, such as detection and classification of defective seeds in processed seed lots.

During the cottonseed processing operation, we realized external contaminants and defective seeds are harmful to the lot quality and, therefore, they were removed with the assistance of processing machines, which were classified by its density and size (Queiroga and Cavalcanti-Mata, 2016). Immature, malformed, insect-attacked seeds, which are physically damaged, among others, may be considered as defective. Since these are usually poor quality, such inefficient classifications on the processing machines may compromise the final quality of the seed lot.

An alternative to overcome this inconvenience may be the use of some internal quality control that aims to ensure the obtaining of high-quality seeds with minor losses and costs. For that purpose, it is required highly qualified operators and the most advanced technologies in the field of processing seeds (Olesen et al., 2014).

Considering that speed, accuracy, and costs of processing are important aspects for industry, related to the production of high-quality seeds (Olesen et al., 2014), the use of techniques that allow quicker and automatic identification of immature seeds in commercial

lots would be highly desirable and beneficial. Thus, the aim of this paper is to obtain models for the detection and classification of immature cottonseeds using NIR-HSI data.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Obtaining samples

We used seeds from three cotton genotypes: two upland genotype cotton (*Gossypium hirsutum* L. r. *Latifolium* Hutch), and one arboreal cotton (*Gossypium hirsutum* L. r. *marie-galante* Hutch). The upland BRS Aroeira and BRS 286 cotton are cultivars developed by the Brazilian Agricultural Research Agency (Embrapa Cotton) located in the city of Campina Grande, State of Paraíba, in Brazil. The genotype of arboreal cotton (mocó cotton) is an access that belongs to the germplasm bank of Embrapa Cotton.

In addition, we performed a visual classification from the standard sample that contains 350 g of seeds of each genotype into two classes. Those that show an external surface without deformations, but uniform brown stain, were classified by healthy, and those that show a deformed surface, but yellowish stain, were classified by immature (see Figure 1). This classification shall be used as the reference method to validate classification models.

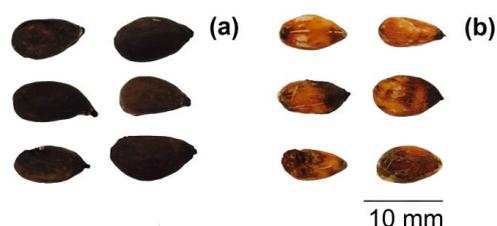


Figure 1. Visually classified Healthy (a) and immature (b) cottonseeds.

2.2. NIR-HSI acquisition

The acquisition was performed by SisuCHEMA spectral imaging camera (Specim Spectral Imaging Ltd. - Finland). The seeds were spatially distributed on a Teflon plate accommodated on the camera sample-holder (Fig. 1). Besides, we used a 200 mm lens (50-31 mm diameter) and a line scanning system operating in a wavelength range of 900-2493.75 nm with 6.25 nm intervals. This wavelength range was segmented into 255 slices, resulting in a NIR-HSI image cube with 255 images (one image per wavelength slice). The spectra were then acquired in-line and converted in pseudo-absorbance, in where we disregarded reflectance values greater than one unit, and regions with more than one peak were replaced by the median value.

2.3. NIR-HSI treatment

We performed an image treatment to separate the region of interest (seeds) from the background region (Teflon plate). For that purpose, we grouped pixels based on their spectral information by using the Principal Component Analysis (PCA). When we observe the principal components from PC1 x PC2 projection (Fig. 2.a), it can be verified that pixels

referring to the interest and background regions (Fig.2) were separated into distinct groups, which allowed the delimitation and exclusion of background pixels, leaving only the region of interest.

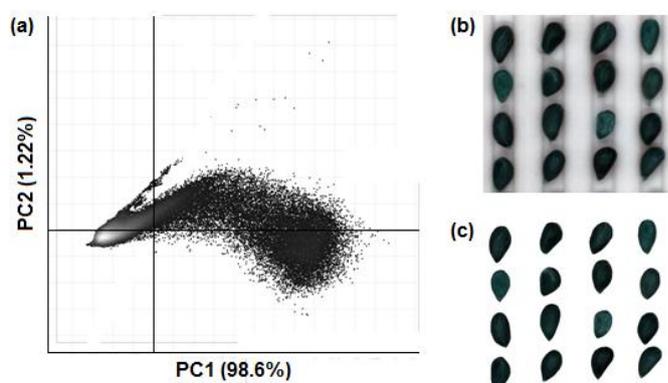


Figure 2. Principal component analysis (a) and NIR-HSI technique of cottonseeds before (b) and after the background removal (c).

2.4. Data pre-processing

In the data pre-processing, we use Standard Normal Variate (SNV) correction to remove scattering effects and particle size from the samples (Ferreira, 2015). The crude (a) and post-pretreatment (b) spectra with SNV correction are shown in Figure 3. In addition, we discarded variables out of the range from 1.000 to 2450 nm due to their high noise (Fig. 3b).

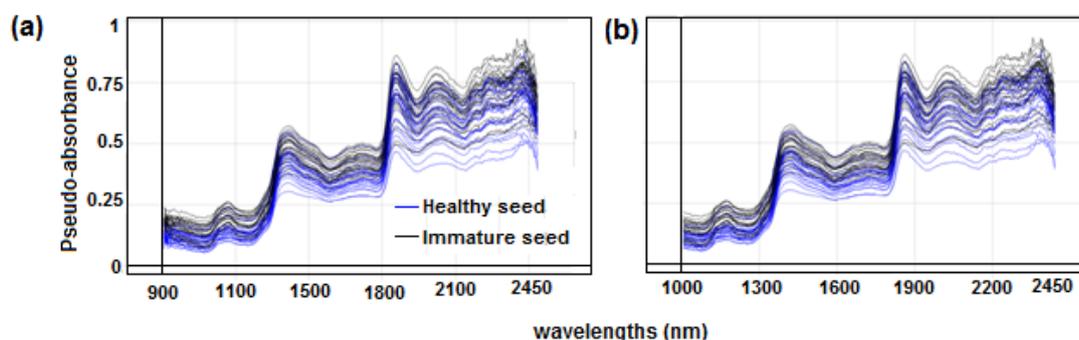


Figure 3. Crude (a) and post-pretreated spectra with SNV correction (b).

2.5. Classification model adjustment

Initially, we performed an exploratory analysis of the spectral data by using PCA. Later, by using the Partial Least Squares - Discriminate Analysis (PLS-DA) algorithm we classify the seeds. In addition, we adjusted two PLS-DA classification models: first, a spectral profile of each pixel (pixel-wise spectral), and second, a spectral profile pixel from the cottonseed area (object-wise spectral).

From each cotton genotype, we separated 75 seeds of each class into the training set (150 seeds), and 25 seeds of each class for the validation set (50 seeds). For each

genotype, the test set consists of five samples containing 400 seeds (2,000 seeds). Each sample contains a different ratio of immature seeds, ranging from 0.5 to 6.0%. Samples containing a low immature seeds ratio relating to healthy seeds were chosen because the occurring rate of immature seeds in the seed lots has varied from 1 to 3%.

2.6. Modeling environment

By using the Evince Image Multivariate Analysis Software (Evince), we performed a classification model for the image processing, preprocessing, exploratory analysis, and adjustment stages.

2.7. Classification model evaluation

When all samples of validation set have been predicted and assigned to a class, and the total number of True Negatives (TN), False Positives (FP), False Negatives (FN), and True Positives (TP) were computed to create a confusion matrix. The diagnostic statistics used to validate PLS-DA models are: specificity and sensitivity, which are calculated from the confusion matrix.

The *specificity* (Sp) and the *sensitivity* (Se) are calculated, respectively, by:

$$Sp = \frac{TN}{TN+FP} \quad (1)$$

$$Se = \frac{TP}{TP+FN} \quad (2)$$

The NMC is the most intuitive diagnostic statistics from all. It indicates the number of samples that are wrongly classified by the model. The sensitivity is a measure of how well the model is able to correctly classify the samples of the class of cases, while the specificity measures how well the model can predict samples from the class of controls (Szymańska et al., 2012).

The resulting PLS-DA models were employed in order to classify the samples in the test set. The absolute error was calculated through the difference between the measured value from the reference method and the predicted value from the model.

3. RESULTS AND DISCUSSION

The data exploratory analysis revealed grouping differences among seed classes, which means that the obtained spectral information from NIR-HSI has discriminatory power. It has also been verified in the PCA the total data variation contained in the components (PC1 and PC2) was 74% for the analysis by using pixel-wise spectral (Fig. 4 a) and 82% for the analysis by using objects-wise spectral (Fig. 4 b), which is the most information contained in the first component (53.3 and 57.5%, respectively).

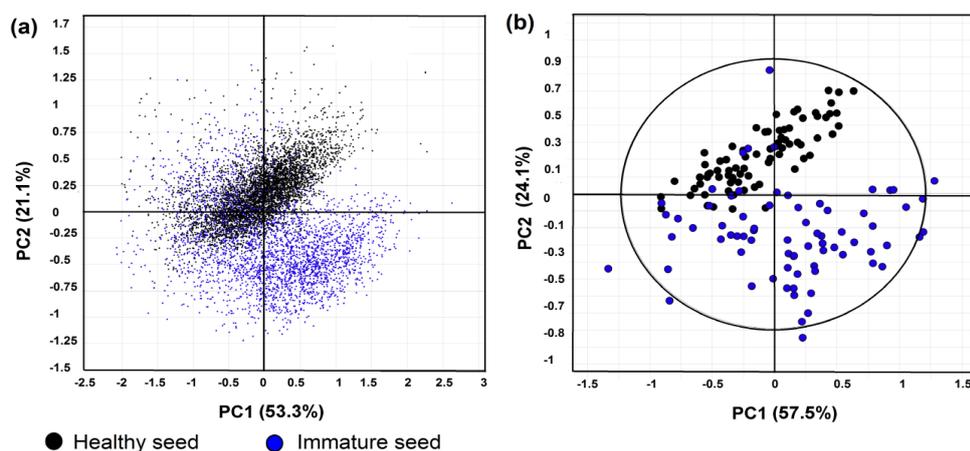


Figure 4. PCA scores (PC1 x PC2) for a set of healthy and immature cottonseeds spectral data considering pixel-wise spectral (a) and object-wise spectral (b).

Analyzing the scores in the projections of the two principal components (PC1 x PC2), it can be observed, based on their spectral information, that the samples referring to the two cottonseed classes tend to form distinct groups. However, it can be also observed the existence of outliers that we believed to be inherent to the variability of population elements and, therefore, they were included in the adjustment of the PLS-DA models. When analyzing the mean spectra of the two cottonseed classes (Fig. 5), we observed they differ in almost the entire spectral range.

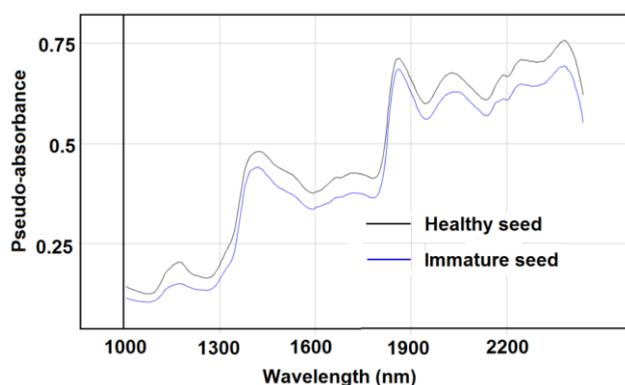


Figure 5. Mean spectrum of healthy and immature cottonseeds in the range of the near-infrared region from 1.000 to 2.450 nm.

This is caused by the differences in the seeds' chemical composition from each class due to the existence of a clear separation of the spectra in the wavelength regions. The associated vibration bands to several chemical compounds abundant in the cottonseed, such as water, proteins, lipids, and carbohydrates can be found in Table 1.

Table 1. Interpretation of spectral bands of some compounds present in cottonseeds abundance.

Wavelength (nm)	Associated structure	Vibration bond	Chemical compost
1430	H ₂ O	O–H second overtone	Water
1450	ROH	O–H first overtone	Carbohydrate
1500	RNH ₂	N–H first overtone	Protein
1900	RCO ₂ H	C=O second overtone	Lipid
1930	ROH	O–H second overtone	Carbohydrate
1970	H ₂ O	O–H first overtone	Water
1980	RCO ₂ R	C=O first overtone	Lipid
2180	RNH ₂	Combination band	Protein
2240	H ₂ O	Combination band	Water

When analyzing the mean spectra, it can be found that the immature class has lower pseudo-absorbance values in all regions of the vibration bands highlighted previously in Table 2. This suggests the content of the chemical compounds corresponding to these regions may be lower in immature seeds than in healthy ones.

Some previous soybean studies have shown this difference is common in the chemical composition between physiologically mature and immature seeds (Obatolu and Osho, 2006), where immature seeds present lower contents of reserve compounds probably for not having completed the reserve accumulation stage during the maturation process.

This lower content of reserve compounds seems to influence physical characteristics, such as size, weight, and staining of seeds (Fig. 1). These characteristics are generally used for the recognition of immature seeds by analytical methods. However, in a universe with large volumes sample and low laboratory operating capacity, the classification by this method can be time-consuming and costly due to the need for specialized staff.

Therefore, we believe, based on chemical information provided by NIR-HSI, that classification of immature seeds may be promising for cottonseed industry. This occurs due to NIR-HSI technology has potential to replace conventional analytical methodologies to the agricultural seed industry, as demonstrated by Chelladurai et al. (2014) which used NIR-HSI associated with the chemometric data analysis to detect insect attack damages in soybean seeds. Similarly, McGoverin et al. (2011) has also predicted the viability of barley, wheat, and sorghum seeds and Huang et al. (2016) the varietal classification of maize seeds.

By analyzing the classification results of the samples from the validation set (Table 2), it can be verified that the PLS-DA model by object-wise spectral allowed to obtain a higher correct classification rate and hence with greater accuracy. This indicates the classification model that uses object-wise spectral provides closer results to those from the reference method. It should be also emphasized that it has provided high accuracy in the classification of immature seeds from the three cotton cultivars, with the high specificity and sensitivity values for detecting seeds from this class.

Table 2. Healthy and immature cottonseeds classification from PLS-DA models.

Genotype	PLS-DA Model	Class	Classification (%)		Se	Sp
			Correct	Incorrect		
BRS Aroeira	Pixel-wise spectral	Healthy seed	92.2	7.8	0.922	0.963
		Immature seed	96.3	3.7		
	Object-wise spectral	Healthy seed	100.0	0.0	1.000	1.000
		Immature seed	100.0	0.0		
BRS 286	Pixel-wise spectral	Healthy seed	98.1	1.9	0.999	0.973
		Immature seed	99.8	0.2		
	Object-wise spectral	Healthy seed	96.0	4.0	1.000	0.960
		Immature seed	100.0	0.0		
Mocó cotton	Pixel-wise spectral	Healthy seed	96.3	3.7	0.979	0.951
		Immature seed	97.1	2.9		
	Object-wise spectral	Healthy seed	96.0	4.0	1.000	0.960
		Immature seed	100.0	0.0		

Sensitivity (*Se*) and specificity (*Sp*).

In addition, it was also verified existing discrepancies between the classification rate of immature seeds obtained by the reference method and the PLS-DA models in most samples from the test set (Table 3).

Table 3. Reference analysis (%), model classification (%), and absolute error from PLS-DA models used for immature cottonseeds classification in the test set

Genotype	PLS-DA model	Sample	Reference analysis (%)	Model rating (%)	Error
BRS Aroeira	Pixel-wise spectral	1	0.5	1.8	1.3
		2	1.0	1.8	0.8
		3	2.0	2.8	0.8
		4	4.0	3.8	0.2
		5	6.0	5.7	0.3
	Object-wise spectral	1	0.5	0.5	0.0
		2	1.0	1.0	0.0
		3	1.5	1.5	0.5
		4	3.5	3.5	0.5
		5	5.7	5.7	0.3
BRS 286	Pixel-wise spectral	1	0.5	0.5	0.0
		2	0.6	0.6	0.4
		3	1.4	1.4	0.6
		4	2.1	2.1	1.9
		5	3.5	3.5	2.5
	Object-wise spectral	1	0.5	0.5	0.0
		2	0.7	0.7	0.3
		3	2.2	2.2	0.2
		4	4.0	4.0	0.0
		5	6.0	6.0	0.0
Mocó cotton	Pixel-wise spectral	1	1.1	1.1	0.6
		2	1.2	1.2	0.2
		3	1.9	1.9	0.1
		4	2.8	2.8	1.2
		5	4.5	4.5	1.5
	Object-wise spectral	1	0.5	0.5	0.0
		2	1.2	1.2	0.2
		3	2.0	2.0	0.0
		4	4.0	4.0	0.0
		5	5.5	5.5	0.5

However, the absolute error of the samples classified by the PLS-DA model by object-wise spectral was lower compared to the PLS-DA model by pixel-wise spectral. Besides the low absolute error, the number of incorrectly classified samples by the PLS-DA model by object-wise spectral was also lower (Table 3), revealing a low classification difference performed by this model and the reference method. In addition, it shows the information provided by this model is almost similar to the reference method.

In Figure 5, it is plotted the seed classification of the PLS-DA model by using the object-wise spectral. It can be verified the pixels classification by staining (a) is in full agreement to the reference analysis (b).

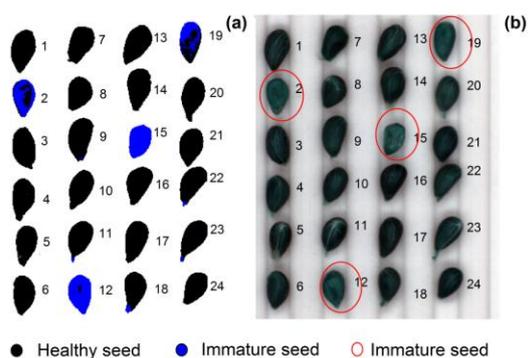


Figure 5. Prediction map for healthy and immature cottonseeds of the PLS-DA model by using object-wise spectral.

These results demonstrate the model makes spatial detection of immature seed possible in a representative sample set (400 seeds). Besides, in seeds that were classified as immaturely, there is the occurrence of healthy class pixels, as shown by the second and 19th seeds (Figure 5a), suggesting the existence of possible different degrees of immaturity in seeds. However, it can only be detected by the HSI-NIR technology associated with the chemometric data analysis.

4. CONCLUSIONS

By using the spectral profile pixels of cottonseed area (object-wise spectral), the PLS-DA classification model is shown as the most suitable for application in seed analysis due to its provision of similar results as the reference method, but with the advantage of being quicker and automatically performed. The prediction map allows detecting immature seeds in a set of samples that might be useful for the development of an automated sorting system and internal quality control purposes.

5. ACKNOWLEDGEMENTS

This study was financed by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Finance Code 001 and by Brazilian Agricultural Research Corporation - A Embrapa.

6. BIBLIOGRAPHIC REFERENCES

1. AGELET, L.E.; HURBURGH, J.R.C.R. Limitations and current applications of near infrared spectroscopy for single seed analysis. **Talanta**, v.121, p.288-299, 2014.
2. AHN, C.K.; MO, C.Y.; KANG, J.; CHO, B. Nondestructive classification of viable and non-viable radish (*Raphanus sativus* L) seeds using hyperspectral reflectance imaging. **Journal of Biosystems Engineering**, v.37, p.411-419, 2012.
3. ALI, I.; SHAKEEL, A.; ALI, A.; SADIA, B. Genetic basis of variation for within-boll yield components in cotton. **Turkish Journal of Agriculture and Forestry**, v.40, p.18-24, 2016.
4. BRAGA, J.W.B.; POPPI, R.J. Validação de modelos de calibração multivariada: uma aplicação na determinação de pureza polimórfica de carbamazepina por espectroscopia no infravermelho próximo. **Química Nova**, v.27, p.1004-1011, 2004.
5. CHELLADURAIA, V.; KARUPPIAHA K.; JAYASA, D.S.; FIELDSB P.G.; WHITEB, N.D.G. Detection of *Callosobruchus maculatus* (F.) infestation in soybean using soft X-ray and NIR hyperspectral imaging techniques. **Journal of Stored Products Research**, v.57, p.43-48, 2014.
6. COZZOLINO, D.; ROBERTS, J. Applications and developments on the use of vibrational spectroscopy imaging for the analysis, monitoring and characterisation of crops and plants. **Molecules**, v.21, p.755, 2016.
7. DALE, L.M.; THEWIS, A.; BOUDRY, C.; ROTAR, I.; DARDENNE, P.; BAETEN, V.; PIERNA, J.A.F. Hyperspectral Imaging Applications in Agriculture and Agro-Food Product Quality and Safety Control: A Review. **Applied Spectroscopy Reviews**, v.48, p.142-159, 2013.
8. FERREIRA, M.M.C. **Quimiometria: conceitos, métodos e aplicações**. São Paulo: Editora Unicamp, 2015. 496p.
9. GAO, J.; LI, X.; ZHU F.; HE Y. Application of hyperspectral imaging technology to discriminate different geographical origins of *Jatropha curcas* L. seeds. **Computers and Electronics in Agriculture**. v.99, p.186-193, 2013.
10. GONDIM-TOMAZ, R.M.A.; ERISMANN, N.M.; CIA, E.; KONDO, J.I.; FUZATTO, M.G.; CARVALHO, C.R.L. Oil content and fatty acid composition of cottonseeds from different genotypes. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.19, 2016.
11. HUANG M.; TANG, J.; YANG B.; ZHUA, Q. Classification of maize seeds of different years based on hyperspectral imaging and model updating. **Computers and Electronics in Agriculture**, v.122, p.139-145. 2016.
12. Lee, H.; Kim, M.S.; Song, Y.; Oh, C.; Lim, H.; Lee, W.; Kange, J.; Choa, B. Non-destructive evaluation of bacteria-infected watermelon seeds using visible/near-infrared hyperspectral imaging. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.97, p.1084-1092, 2017.

13. MATSIMBE, S.F.S.; MOTOIKE, S.Y.; PINTO, F.A.C.; LEITE, H.G.; MARCATTI, G. E. Prediction of oil content in the mesocarp of fruit from the macauba palm using spectrometry. **Revista Ciência Agrônômica**, n.46, p.21-28, 2015.
14. MCGOVERIN, C.M.; ENGELBRECHT, P.; GELADI, P.; MANLEY, M. Characterisation of non-viable whole barley, wheat and sorghum grains using near-infrared hyperspectral data and chemometrics. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.401, p.2283-2289, 2011.
15. MO, C.; KIM, G.; LEE, K.; KIM, M.S.; CHO, B.; LIM, J.; KANG, S. Non-destructive quality evaluation of pepper (*Capsicum annuum* L.) seeds using led-induced hyperspectral reflectance imaging. **Sensors**, v.14, p.7489-7504, 2014.
16. Noman, A.; Bashir R.; Aqeel, M.; Anwer, S.; Iftikhar, W.; Zainab, M.; Zafar, S.; Khan, S.; Islam, W.; Adnan, M. Success of transgenic cotton (*Gossypium hirsutum* L.): Fiction or reality? **Cogent Food & Agriculture**, v.2, p.1207844, 2016.
17. OBATOLU, V.; OSHO, S.M. Chemical and physical characteristics of five Nigerian varieties of fresh green immature soybean [*Glycine max* (L.) Merrill]. **British Food Journal**, v.108, p.440-450, 2006.
18. OLESEN, M.H.; DUIJN, B.V.; BOELT, B. Introduction of new methods: spectral imaging. **Seed Testing International**, v.147, p.10-13, 2014.
19. PIQUERAS, S.; DUPONCHEL, L.; OFFROY, M.; JAMME, F.; TAULER, R.; JUAN, A. Chemometric strategies to unmix information and increase the spatial description of hyperspectral images: A single-cell case study. **Analytical Chemistry**, v.85, p.6303–6311, 2013.
20. QUEIROGA, V.P.; CAVALCANTI-MATA, M.E.R.M. Sistema integrado de produção, beneficiamento e deslintamento químico para sementes de algodão. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v.18, p.207-225, 2016.
21. RAHMAN, A.; CHO, B. Assessment of seed quality using non-destructive measurement techniques: a review. **Seed Science Research**, v.26, p.285-305, 2016.
22. SOARES, S.F.C.; MEDEIROS, E.P.; PASQUINI, P.M.C.; MORELLO, C.L.; GALVÃO, R.K.H.; ARAÚJO, M.C.U. Classification of individual cotton seeds with respect to variety using near-infrared hyperspectral imaging. **Analytical Methods**, v.8, p.8498-8505, 2016.
23. SZYMAŃSKA, E.; SACCENTI, E.; SMILDE, A.K.; WESTERHUIS, J.A. Double-check: validation of diagnostic statistics for PLS-DA models in metabolomics studies. **Metabolomics**, v.8, p.3-16, 2012.
24. WILLIAMS, P.J.; GELADI, P.; BRITZ, T. J.; MANLEY M. Investigation of fungal development in maize kernels using NIR hyperspectral imaging and multivariate data analysis. **Journal of Cereal Science**, v.55, p.272-2278, 2012.

CAPÍTULO 2

CLASSIFICAÇÃO DE SEMENTES DE ALGODÃO VIÁVEIS E NÃO VIÁVEIS USANDO IMAGENS HIPERESPECTRAIS NO INFRAVERMELHO PRÓXIMO

RESUMO: A germinação é uma variável importante na análise da qualidade de lotes de sementes comerciais e para gestão dos estoques de sementes armazenadas. Neste estudo, objetivou-se classificar sementes de algodão viáveis e não viáveis usando a técnica de imagens hiperespectrais na região do infravermelho próximo (HSI-NIR). Para tanto, foram examinados dados de HSI-NIR de sementes viáveis e não viáveis obtidas na faixa de 1000-2.500 nm. A análise de componentes principais (PCA) foi utilizada para fins exploratórios e análise discriminante de mínimos quadrados parciais (PLS-DA) para construir um modelo de classificação das sementes conforme seu status de viabilidade. Sementes viáveis e não viáveis foram discriminadas na PCA e uma excelente classificação usando o modelo PLS-DA foi alcançada, sobretudo, quando aplicado pré-processamento espectral SNV aos dados, atingindo taxa de classificação correta de 97% para ambas as classes. Os resultados de predição usando PLS-DA apresentaram alta concordância com os valores fornecidos pelo teste de germinação (erro <10). Mapas de previsão gerados a partir da classificação individual dos pixels da imagem pelo modelo PLS-DA possibilitaram visualizar espacialmente a distribuição das sementes de cada classe na imagem. Este estudo mostrou que a técnica HSI-NIR associada à análise quimiométrica mostrou-se de fato viável para determinação rápida e não destrutiva da viabilidade das sementes de algodão.

PALAVRAS-CHAVE: *Gossypium hirsutum*. discriminação. análise não-destrutiva. indústria de sementes. germinação.

1. INTRODUÇÃO

O algodão (*Gossypium* L.) é uma cultura agrícola de importância global cultivada em mais de 60 países para produção de fibra têxtil e sementes para extração de óleo comestível, fabricação de ração animal e fertilizante orgânico (Abrapa, 2018).

A cultura tem prosperado em países e regiões com condições climáticas favoráveis e que dispõe de áreas passíveis de mecanização e irrigação (Constable et al., 2015). Contudo, a melhoria no rendimento e na qualidade de fibra tem sido atribuída, principalmente, ao trabalho de melhoramento genético da cultura que tem criado cultivares de alto rendimento e melhor qualidade de fibra (Boopathi e Hoffmann, 2016).

A multiplicação e distribuição dos novos cultivares de algodão são realizadas pelo setor de produção de sementes, obedecendo aos padrões nacionais e internacionais (Queiroga e Cavalcanti-Malta, 2016). Antes da distribuição, os lotes de sementes precisam

ser submetidos a uma série de testes, incluindo a determinação da viabilidade. Embora o teste padrão de germinação seja o mais difundido para avaliar a viabilidade das sementes de algodão, também existem alguns métodos alternativos como a análise de imagem de raios-X e coloração com sal de tetrazólio (Na et al., 2014; Sawarkar, 2017).

Cada um desses métodos possuem vantagens e desvantagens, mas nenhum corresponde aos requisitos de precisão e a rapidez desejada pelos laboratórios de análise de sementes. Outro aspecto a ser considerado é que o teste de germinação é destrutivo, ocasionando uma preocupação particular aos bancos de germoplasma, uma vez que os estoques de sementes de alguns genótipos podem ser pequenos.

Para contornar esses inconvenientes, várias técnicas baseadas em óptica têm sido estudadas para aplicação na determinação da viabilidade de sementes agrícolas, tais como análise de imagens digitais, espectroscopia convencional, imagem hiperespectral, imagem de raios-X e imagem térmica, cujos benefícios em relação aos métodos tradicionais são a maior velocidade analítica, facilidade de operação e não destroem a amostra (Rahman e Cho, 2016). Destes, a técnica de imagem hiperespectral (HSI) é de longe, a que tem despertado mais interesse para diagnosticar a viabilidade de sementes agrícolas e, se devidamente otimizada, tem grande potencial para ser incorporada à linha de produção da indústria de sementes.

A técnica HSI combina espectroscopia convencional e imagens digitais simultaneamente para adquirir informação espectral e espacial (Gao et al., 2013). As HSI formam uma estrutura tridimensional (hipercubo) consistindo de duas dimensões espaciais (x e y) e uma dimensão de comprimento de onda espectral (λ) (Kandpal et al., 2013; Grusche, 2014) do qual são extraídas as informações para detectar ou quantificar o analito de interesse, mas, devido ao grande número de variáveis de dados, uma análise multivariada é, portanto, necessária para extrair e interpretar a informação contida nos espectros (Kamruzzaman e Sun, 2016).

Considerando as inúmeras limitações que métodos convencionais para determinação da viabilidade de sementes de algodão apresentam, no presente trabalho objetivou-se desenvolver um método rápido, não destrutivo e um procedimento analítico eficaz para classificar sementes viáveis e não viáveis de algodão utilizando imagens hiperespectrais no infravermelho próximo associada à análise quimiométrica.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Obtenção e preparo das amostras

As amostras utilizadas foram provenientes de um lote de sementes comercial de algodão herbáceo (upland cotton) do cultivar BRS Aroeira cedido pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Unidade Embrapa Algodão. Como esse lote de sementes apresentava alta porcentagem de sementes viáveis (98%), aplicou-se um tratamento de

envelhecimento artificial acelerado para gerar sementes não viáveis. Para tanto, adaptou-se a metodologia sugerida pela AOSA (1983) que consistiu na distribuição de uma camada única de sementes sobre uma bandeja de tela de malha metálica suspensa sobre 40 mL de água no interior de uma minicâmara (caixa plástica do tipo “gerbox” 11x11x3,5 cm). Esta foi incubada à temperatura de 45 °C e aproximadamente 100% de umidade relativa. As sementes foram retiradas após 72, 120, 150 e 200 horas de incubação e colocadas para secar numa estufa com circulação forçada de ar ($30\pm 5^{\circ}\text{C}$) até atingirem o grau de umidade inicial (12,5%).

Em seguida, uma amostra de cada foi submetida ao teste de germinação conforme as Regras para Análise de Sementes (Brasil, 2009) adotada no Brasil. Verificou-se que a viabilidade diminuiu com o tempo de envelhecimento de modo que foram formados grupos de amostras com diferentes porcentagens de sementes viáveis e não viáveis. Além disso, nenhuma diferença visual foi detectada entre sementes viáveis e não viáveis após a aplicação do tratamento de envelhecimento artificial acelerado.

2.2. Amostragem e aquisição das imagens hiperespectrais

As amostras utilizadas foram acondicionadas a temperatura de $21\pm 2^{\circ}\text{C}$ e 55% de umidade relativa durante 36 horas antes da aquisição das imagens. As imagens foram adquiridas usando um Espectrômetro de Imagens Hiperespectrais SisuCHEMA (Specim, Spectral Imaging Ltd., Oulu, Finlândia) com o software ChemaDaq, versão 3.621.992.6-R no Laboratório de Tecnologia química da Embrapa Algodão.

As amostras foram identificadas individualmente e distribuídas espacialmente sobre o suporte de amostras da câmara. Para captura das imagens foi usada uma lente de ampliação de 50 mm ($0,156\text{mm} = 156$ micrômetros) com uma resolução espectral de 6,5 nm a uma exposição de 1,6 ms com um alcance espectral de 900–2500 nm. Esta faixa de comprimento de onda foi segmentada em 255 fatias, resultando em um cubo com 255 imagens (uma imagem por fatia de comprimento de onda). Os espectros foram adquiridos em linha, sendo desconsiderados os valores maiores que uma unidade e as regiões com spikes foram substituídas pelo valor da mediana. As imagens brutas foram corrigidas automaticamente para referências brancas (100%) e escuras (0%) e convertidas para pseudo-absorbância. Uma varredura de referência foi realizada antes da aquisição das imagens.

Após aquisição das imagens, as sementes foram enviadas ao Laboratório de Análise de Sementes pertencente ao Centro de Ciências Agrárias / Universidade Federal da Paraíba (CCA/UFPB) para determinação da viabilidade por meio do teste de germinação conforme as Regras para Análise de Sementes (Brasil, 2009). Assim foi possível associar diretamente o perfil espectral de cada semente com seu status de viabilidade (viável = 1 ou não viável = 0).

2.3. Pré-processamento do conjunto de dados

A análise de componentes principais (PCA) foi aplicada em toda a imagem. Os pixels referentes ao plano de fundo e as amostras foram claramente separados no gráfico dos escores (Figura 1 a) exibindo também um padrão de coloração distintos no gráfico de imagem Contour 2D (Figura 1 b). Isso permitiu remover manualmente os pixels correspondentes ao plano de fundo deixando apenas os pixels das amostras (Figura 1 c).

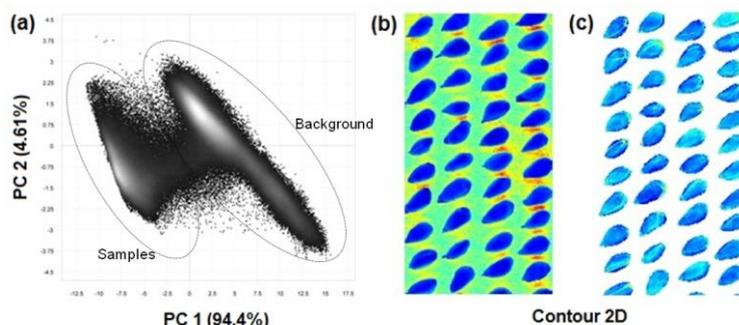


Figura 1. Análise de componentes principais (a) e imagens Contour 2D antes (b) e após exclusão do plano de fundo (c).

2.4. Desenvolvimento do modelo de classificação

Neste estudo, os pixels correspondentes à área de cada semente foram considerados como um objeto para análise, sendo designados 200 objetos de cada classe para o conjunto de treinamento e 100 objetos de cada classe para o conjunto de teste. Para análise exploratória utilizou-se a PCA e para classificação foram desenvolvidos modelos baseados na Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA) usando espectros brutos e pré-processados.

O desempenho do modelo foi avaliado pela precisão da classificação do conjunto de teste. O modelo com melhor desempenho foi utilizado para predição da viabilidade de cinco conjuntos de amostras ($n=100$) com diferentes porcentagens de sementes viáveis (A = 98%, B = 90%, C = 80% D = 70% e E= 20% de sementes viáveis). Os resultados de predição do modelo foram confrontados com os fornecidos pelo método de referência (teste de germinação), sendo calculado o erro absoluto de predição. Além disso, o modelo PLS-DA foi aplicado a cada imagem hiperespectral, sendo cada pixel classificado individualmente o que gerou mapas de previsão coloridos de acordo com sua classe correspondente.

2.5. Softwares utilizados

Todas as etapas foram implementadas utilizando-se o pacote flexível de análise multivariada de imagem hiperespectral Evince 2.0 (UmBio AB, Umeå, Suécia).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Perfil espectral

Na Figura 1 estão apresentados, respectivamente, os espectros completos (a) e o espectro médio (b) de sementes de algodão viáveis e não viáveis, na qual se pode verificar

diferenças no perfil dos espectros médios, sendo os valores de pseudo-absorbância dos espectros das sementes viáveis superior à das sementes não viáveis. Provavelmente isso decorre de diferenças entre os teores de alguns componentes químicos encontrados nas sementes de algodão como lipídeos e proteínas.

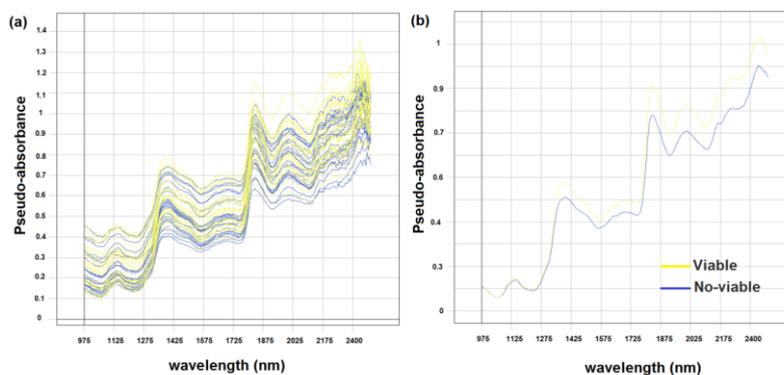


Figura 2. Espectros completos (a) e espectros médios pré-processados (b) de sementes de algodão viáveis (amarelo) e não viáveis (azul).

De fato, o envelhecimento natural ou artificial das sementes de algodão leva a redução dos teores de constituintes químicos como proteína e lipídeos e estão diretamente relacionados com a perda da viabilidade (Freitas et al., 2016). Nesta pesquisa, os espectros médios mostram a presença de alguns picos de absorção importantes ligados a esses compostos. A proteína na semente de algodão correlaciona-se positivamente com as frequências do grupo C = O e N-H, enquanto o teor de óleo está associado ao grupo funcional C-H, os quais podem ser avaliados nas bandas de comprimento de onda NIR de 1.510 nm e 2.470 nm e 1.206nm e 1.394 nm, respectivamente (Kumarvelu e Gopal, 2017).

3.2. Análise exploratória de dados

A análise exploratória realizada por PCA foi empregada para examinar as diferenças qualitativas entre sementes viáveis e não viáveis (Figura 3). A variação total dos dados nos componentes foi de 75,6%, sendo a maior parte da informação contida no primeiro componente (60,9%).

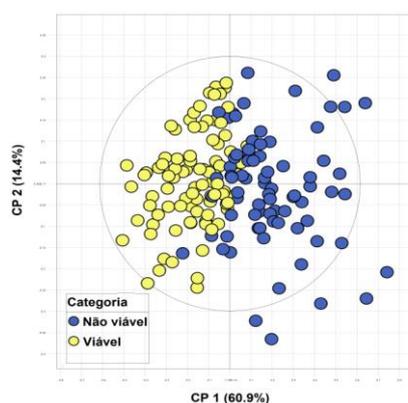


Figura 3. Gráfico dos scores (PC1 x PC2) referente a um conjunto de dados hiperespectrais de sementes de algodão viáveis e não viáveis.

A distribuição das amostras no espaço das PCs mostra que há uma distinção clara entre as classes com pouca sobreposição entre elas, o que indica que o perfil espectral das amostras carrega informações com alto poder discriminatório.

3.3. Análise de classificação

Os resultados de classificação dos modelos PLS-DA desenvolvido com espectros brutos e pré-processados são mostrados na Tabela 1. O algoritmo PLS-DA apresentou os melhores resultados de classificação quando os espectros foram pré-processados, aumentando a classificação correta da classe viável de 90,9% para 97,1% e da classe não viável de 95,7% para 97,4%.

Tabela 1. Resultados de classificação para o conjunto de teste de sementes de algodão viáveis e não viáveis usando o modelo PLSDA com espectros brutos e pré-tratados com SNV

Pré- processamento	Classe	Classificação (%)	
		Correta	Incorreta
Espectros brutos (900-2.500 nm)	Não viável	95,7	4,3
	Viável	90,9	9,1
Correção SNV (1.000-2.500 nm)	Não viável	97,4	2,6
	Viável	97,1	2,9

A razão para isso pode ser justificada pela eliminação dos comprimentos de onda ruidosos (abaixo de 1000 nm) e a aplicação de pré-processamento SNV remove o efeito de espalhamento e tamanho das partículas da amostra aumentando assim o desempenho da classificação.

Os valores de predição das amostras de validação com diferentes porcentagens de sementes viáveis e não viáveis estão apresentados na Tabela 2. O erro predição foi baixo (<10) para todas as amostras, indicando que o modelo PLS-DA possui um bom desempenho para classificação de grupos de amostras heterogêneos. Isso revela que o modelo possibilita um amplo limite de detecção, apresentando-se de fato confiável para diagnóstico da viabilidade.

Tabela 2. Resultados de predição para as amostras de validação usando o modelo PLS-DA

Amostras de validação	Classe	Classificação (%)		Erro
		Teste de germinação	Modelo PLS-DA	
A	Viável	98	96	2
	Não viável	2	4	2
B	Viável	90	93	3
	Não viável	10	7	3
C	Viável	80	80	0
	Não viável	20	19	1
D	Viável	70	77	7
	Não viável	20	22	2
E	Viável	22	16	6
	Não viável	78	84	6

3.4. Mapas de previsão

A aplicação do modelo PLS-DA à cada pixel da imagem também possibilitou a geração de mapas de previsão (Figura 5). Como os pixels da imagem foram coloridos de acordo com a categoria prevista (viável e não viável) foi possível visualizar espacialmente a distribuição dos objetos pertencentes a cada classe na imagem.

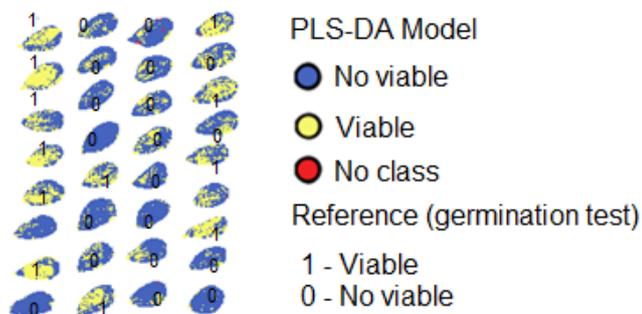


Figura 5. Mapas de previsão de sementes de algodão gerados pelo modelo PLS-DA

Embora a diferença entre sementes viáveis e não viáveis seja imperceptível a olho nu, verifica-se que o modelo PLS-DA foi capaz de prever corretamente o status da semente. Notadamente, alguns pixels foram identificados erroneamente no mapa, no entanto, a forma principal das sementes e suas localizações eram claras (Figura 5) coincidindo com a análise de referência.

3.5. Implicações para o setor de sementes

Embora o teste padrão de germinação seja provavelmente uma das maneiras mais precisas de determinar a viabilidade de sementes de algodão, o mesmo requer trabalho intensivo, é demorado (pode necessitar de várias semanas para obtenção dos resultados), destrutivo e sensível à interpretação subjetiva. Alguns dos métodos alternativos existentes, por sua vez, superam apenas algumas dessas limitações. O teste de tetrazólio pode ser mais rápido, mas requer trabalho intensivo, é destrutivo e sensível à interpretação subjetiva de dados, enquanto a análise de raios-X, apesar de também ser rápido e não destrutivo, indica apenas se as sementes são estruturalmente intactas (má formação do embrião e danos físicos), contudo, não tem capacidade para prever se as sementes estão realmente viáveis.

Usando a técnica de imagem hiperespectral na região NIR (1.000–2.500 nm) acoplada ao processamento quimiométrico de dados é possível diferenciar sementes viáveis e não viáveis de forma rápida, precisa e não destrutiva, superando, assim, várias limitações dos métodos analíticos convencionais, mas, seu principal benefício foi sua capacidade de detectar espacialmente sementes viáveis e não viáveis num mesmo conjunto de amostras baseada na classificação individual dos pixels da imagem.

Essa característica é importante porque permite o diagnóstico visual do status da viabilidade das sementes. Isso pode ser aproveitado para desenvolvimento de um sistema

de discriminação automatizado que, se devidamente otimizado, poderá ser incorporado à linha de produção da indústria de sementes para diagnóstico rápido da viabilidade. Por não ser destrutivo, também tem potencial para determinação da viabilidade de sementes em bancos de germoplasma, sem diminuir os estoques de sementes.

Outro benefício da técnica HSI é o seu caráter multianalítico, permitindo que outras características sejam avaliadas simultaneamente como a composição química (Weinstock et al., 2006; Huang et al., 2014) detecção de patógenos associados às sementes (Shahin et al., 2014; Lee et al., 2017; Williams, 2012), detecção de transgênicos e pureza varietal de sementes (Feng et al., 2017; Kong et al., 2013; Soares et al., 2016).

4. CONCLUSÕES

A técnica de imagens hiperespectrais no infravermelho próximo associada à análise quimiométrica mostra-se promissora para determinação rápida, precisa e não destrutiva da viabilidade das sementes de algodão.

5. AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001 e da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Unidade Embrapa Algodão.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABRAPA - Associação Brasileira dos Produtores de Algodão. **Algodão no mundo**. Disponível em: <http://www.abrapa.com.br/Paginas/dados/algodao-no-mundo.aspx>. Acesso em: 29 de Mar. de 2018.
2. AOSA - Association Official Seed Analysts. **Seed vigour testing handbook**. East Lansing: AOSA, 1983. 93p.
3. BOOPATHI, N.M.; HOFFMANN, L.V. **Genetic diversity, erosion, and population structure in cotton genetic resources**. In: AHUJA, M.R.; JAIN, S.M. (Eds.) Genetic diversity and erosion in plants. New York: Springer, p.409-438, 2016.
4. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento-MAPA. **Regras para análise de sementes**. Brasília: MAPA/ACS, 2009. 399p.
5. CONSTABLE, G.; LLEWELLYN, D.; WALFORD, S.A.; CLEMENT, J.D. Cotton breeding for fiber quality improvement. CRUZ, V.M.V.; DIERIG, D.A. (Eds.) **Industrial crops: Handbook of plant breeding**. New York: Springer, 2015.
6. FENG, X.; ZHAO, Y.; ZHANG, C.; CHENG, P.; HE, Y. Discrimination of transgenic maize kernel using NIR hyperspectral imaging and multivariate data analysis. **Sensors**, v.17, n.8, 2017.

7. FREITAS, R.A.; DIAS, D.C.F.S.; OLIVEIRA, G.A.; DIAS, L.A.S.; JOSÉ, I.C. Physiological and biochemical changes in naturally and artificially aged cotton seeds. **Seed Science and Technology**, v.34, n.2, p.253-264, 2006.
8. GAO J.; LI, X.; ZHU, F.; HE, Y. Application of hyperspectral imaging technology to discriminate different geographical origins of *Jatropha curcas* L. seeds. **Computer and Electronic in Agriculture**, v.99, 186–1932, 2013.
9. GRUSCHE S. Basic slit spectroscope reveals three-dimensional scenes through diagonal slices of hyperspectral cubes. **Applied Optics**, v.53, n.20, p.4594–4603, 2014.
10. HUANG, M.; WANG, Q.; ZHANG, M.; ZHU, Q. Prediction of color and moisture content for vegetable soybean during drying using hyperspectral imaging technology. **Journal of Food Engineering**, v.128, p.24–30, 2014.
11. KAMRUZZAMAN, M.; SUN, D.W. **Introduction to hyperspectral imaging technology**. In: SUN, D.W. (Ed.) Computer vision technology for food quality evaluation. Elsevier: Second Publisher, 2 ed. p.111-139, 2016.
12. KANDPAL, L.M.; LEE, H.; KIM, M.S.; MO C.; CHO, B. Hyperspectral reflectance imaging technique for visualization of moisture distribution in cooked chicken breast. **Sensors**, v.13, n.10, p.13289-13300, 2013.
13. KONG, W.; ZHANG, C.; LIU, F.; NIE, P.; HE, Y. Rice seed cultivar identification using near-infrared hyperspectral imaging and multivariate data analysis. **Sensors**, v.13, n.7, p.8916-8927, 2013.
14. KUMARAVELU C.; GOPAL A. Quality assessment of single cottonseed based on its protein and oil parameters using NIR spectrometer. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Sciences**, v.10, n.1, p.546-549, 2017.
15. LEE, H.; KIM, M.S.; SONG, Y.R.; OH, C.; LIM, H.S.; LEE, W.H.; KANG, J.S.; CHO, B.K. Non-destructive evaluation of bacteria-infected watermelon seeds using Vis/NIR hyperspectral imaging. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.97, n.4, p.1084-1092, 2017.
16. NA, Y.; SHIM, S.; CHUNG, J.; RHO, I.; KIM, S. Comparative studies on cotton seed germinability with tetrazolium viability test and x-ray contrast methods. **Korean Journal of Crop Science**, v.59, p.188-193, 2014.
17. QUEIROGA, V.P.; CAVALCANTI-MATA, M.E.R.M. Sistema integrado de produção, beneficiamento e deslintamento químico para sementes de algodão. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v.18, p.207-225, 2016.
18. RAHMAN, A.; CHO, B. Assessment of seed quality using non-destructive measurement techniques: a review. **Seed Science Research**, v.26, n.4, p.285-305, 2016.

19. SAWARKAR M.R. X-ray based germination test of cotton seed. **International Journal of Advanced Research in Computer Science**, v.8, n.5, p.811-815, 2017.
20. SHAHIN, M.A.; SYMONS, S.J.; HATCHER, D.W.; Quantification of mildew damage in soft red winter wheat based on spectral characteristics of bulk samples: a comparison of visible-near-infrared imaging and near infrared spectroscopy. **Food and Bioprocess Technology**, v.7, n.1, p.224–234, 2014.
21. SOARES, S.F.C; MEDEIROS, E.P.; PASQUINI, P.M.C.; MORELLO, C.L.; GALVÃO, R.K.H.; ARAÚJO, M.C.U. Classification of individual cotton seeds with respect to variety using near-infrared hyperspectral imaging. **Analytical Methods**, v.8, p.8498-8505, 2016.
22. WEINSTOCK, B.A.; JANNI, J.; HAGEN, L.; WRIGHT, S. Prediction of oil and oleic acid concentrations in individual corn (*Zea mays* L.) kernels using near-infrared reflectance hyperspectral imaging and multivariate analysis. **Applied Spectroscopy**, v.60, n.1, p.9-16, 2016.
23. WILLIAMS, P.J.; GELADI, P.; BRITZ, T.J.; MANLEY, M. Investigation of fungal development in maize kernels using NIR hyperspectral imaging and multivariate data analysis. **Journal of Cereal Science**, v.55, n.3, p.272–278, 2012.

CAPÍTULO 3

DIVERSIDADE GENÉTICA INTRA E INTERESPECÍFICA EM FORMAS PERENES DE ALGODÃO ALOTETRAPLÓIDE DOMESTICADO (*Gossypium* ssp.) ACESSADA POR MARCADORES MOLECULARES ISSR

Resumo: O Brasil é um centro de diversidade de formas perenes de algodoeiros alotetraplóides domesticados. Esses recursos genéticos são importantes para comunidades agrícolas locais e uma fonte potencial de variabilidade genética a ser explorada pelos programas de melhoramento. Assim, objetivou-se com este estudo acessar a diversidade genética intra e interespecífica de formas perenes de algodão alotetraplóide domesticado das espécies *Gossypium hirsutum* L. r. marie-galante e *Gossypium barbadense* L.. Um total de 28 genótipos de algodão perene, sendo 16 genótipos de *G. hirsutum* e 12 de *G. barbadense*, foram genotipados por PCR convencional usando 11 primers do marcador molecular dominante *Inter Simple Sequence Repeat* (ISSR). Os primers ISSR revelaram 22 bandas polimórficas e 8 bandas exclusivas em *G. hirsutum*, 18 bandas polimórficas e 10 bandas exclusivas em *G. barbadense* e 48 bandas polimórficas entre as espécies. Reportou-se baixos índices de diversidade genética total ($H_T=0,189$) e intrapopulacional ($H_S= 0,076$), porém a diversidade em *G. hirsutum* ($H_e=0,071$; $I= 0,011$; $P=24,72\%$) foi mais elevada que em *G. barbadense* ($H_e=0,043$; $I=0,071$; $P=17,98\%$) com alta diferenciação genética ($G_{ST}=0,598$) entre elas. A análise de agrupamento hierárquico UPGMA com base na identidade genética de Nei possibilitou a separação dos genótipos quanto à espécie e o seu modo de ocorrência (genótipos de origem local e melhorada). A inferência Bayesiana e o método de Evanno revelaram que os genótipos estão estruturados em dois grupos genéticos segundo a espécie. Os resultados obtidos no presente estudo apoiam a conclusão de que os marcadores ISSR são capazes de revelar padrões de diversidade e estruturação genética intra e interespecífica de formas perenes de algodão alotetraplóide domesticado sendo, portanto, promissores para caracterização das coleções de germoplasma brasileiro.

PALAVRAS-CHAVE: Malvaceae. Conservação genética. Melhoramento. Estrutura genética.

1. INTRODUÇÃO

Quase toda a fibra de algodão (*Gossypium* L.) consumida pela indústria têxtil no Brasil provém de cultivares modernas de *G. hirsutum* L. de ciclo anual, mas no passado essa matéria prima era obtida principalmente a partir de formas perenes das espécies *G. hirsutum* L. r. marie-galante e, também, da espécie *G. barbadense* L.

Embora não sejam nativas do Brasil, essas espécies são amplamente distribuídas e adaptadas no país que é considerado um centro secundário de diversidade (Borém et al., 2003; Almeida et al., 2009; Menezes et al., 2017). Atualmente, são consideradas obsoletas para exploração comercial no Brasil, mas alguns tipos locais como os algodoeiros quebradinho e rim-de-boi da espécie *G. barbadense* L. e o algodoeiro mocó ou arbóreo da espécie *G. hirsutum* L. r. marie-galante ainda ocorrem na forma de lavoura de subsistência, população ferais e como planta de jardins e quintais domésticos (Menezes et al., 2017; Hoffmann et al., 2018).

Ambas as espécies possuem características agronômicas relevantes para utilização em programas de melhoramento, sendo a alta qualidade da fibra de *G. barbadense* L. (Rodrigues et al., 2016) e a tolerância à seca de *G. hirsutum* L. r. marie-galante (Vasconcelos et al. 2018) algumas das características que fomentam sua conservação. No entanto as populações mantidas *in situ* estão ameaçadas, pois sua continuidade está frequentemente sujeita a mudanças de hábitos culturais e no uso da terra (Castro et al., 2016; Menezes et al., 2017).

Diante disto, a estratégia para conservar esses recursos genéticos tem sido a *ex situ*, a qual é coordenada no Brasil pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) a partir de sua unidade descentralizada Embrapa Algodão que reúne quase 1700 acessos “brasileiros” de *G. hirsutum* L. r. marie-galante e *G. barbadense* L. em seu banco de germoplasma (Albrana, 2019).

A caracterização genética da coleção da Embrapa Algodão tem sido realizada regularmente por meio de marcadores genético-moleculares baseados em PCR do tipo *Simple Sequence Repeat* (SSR) (Menezes et al., 2010; Menezes et al., 2015; Hofmann et al., 2018). Os marcadores SSR são os mais utilizados para caracterização genética de algodão em todo o mundo (Boopathi e Hoffmann 2016) em decorrência da existência de primers específicos para *Gossypium* L. (Liu et al. 2000) mas, por outro lado, existem outros tipos de marcadores moleculares contemporâneos baseados em PCR que também são capazes de detectar polimorfismo genético em *Gossypium* L. tais como os *Inter Simple Sequence Repeats* (ISSR) (Liu e Wendel, 2001).

Os ISSR's pertencem à classe dos marcadores dominantes, os quais amplificam segmentos do DNA situados entre duas sequencias SSR idênticas orientadas em direções opostas usando somente um *primer* com 16 a 20 pares de base (Gupta et al., 1994; Zietkiewicz et al., 1994). Em contraste com outros marcadores dominantes como *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD), são mais abundantes ao longo do genoma eucariótico e evoluem rapidamente e, conseqüentemente, ajudam a revelar maior polimorfismo genético (Ansari et al., 2012), além de apresentarem melhor reprodutibilidade devido ao maior tamanho dos primers (Silva et al., 2018).

genótipo melhorado (Pima S7) oriundo de um programa de melhoramento estrangeiro (EUA).

2.2. Extração e quantificação do DNA genômico

O DNA genômico utilizado nos ensaios de PCR-ISSR foi extraído de tecido embrionário de sementes secas (1/4 da semente) utilizando-se o protocolo de Doyle e Doyle (1987) com adaptações. A concentração de DNA nas amostras foi estimada por eletroforese horizontal em gel, comparando-se o tamanho dos fragmentos gerados com fragmentos de DNA de tamanho conhecido (DNA do fago Lambda com 50, 100 e 200 ng.µl⁻¹). A concentração de DNA das amostras variou de 100 a 200 ng.µl⁻¹, então foram ajustadas para a concentração 10 ng.µl⁻¹.

2.4. Reações de amplificação do DNA via PCR-ISSR

A amplificação de DNA foi realizada por PCR convencional usando os 11 primers ISSR selecionados dentre 30 primers do conjunto #9 da Nucleic Acid-Protein Service Unit (University of British, Columbia, EUA) (Tabela 1) por gerarem fragmentos com alta resolução e com maior número.

Tabela 1. Relação dos primers ISSR selecionados para análise genética intra e interespecífica em formas perenes de algodoeiro alotetraplóide domesticado das espécies *G. hirsutum* L. r. *marie-galante* e *G. barbadense* L.

Código	Sequência de nucleotídeos (5'– 3')
808	AGA GAG AGA GAG AGA GC
812	GAG AGA GAG AGA GAG AA
814	CTC TCT CTC TCT CTC TA
823	TCT CTC TCT CTC TCT CC
827	ACA CAC ACA CAC ACA CG
828	TGT GTG TGT GTG TGT GA
834	AGA GAG AGA GAG AGA GYT
866	CTC CTC CTC CTC CTC CTC
872	GAT AGA TAG ATA GAT A
884	HBH AGA GAG AGA GAG AG
892	TAG ATC TGA TAT CTG AAT TCC C

Y = (C, T); B = (C, G, T); H = (A, G, T).

As reações de PCR foram preparadas com volume final de 25 µl contendo 1,0 mM de primer, 0,25 mM de dNTP's, 2,5 mM de MgCl₂, tampão de PCR [100 mM Tris-HCl (pH 8,5), 500 mM KCl], 1 unidade de *Taq* DNA polimerase (Ludwig Biotec[®]), aproximadamente 20 ng de DNA molde e água ultrapura.

A amplificação do DNA foi realizada em termociclador (PCR Thermal Cyclers, Amplitherm 96-Well). O protocolo utilizado consistiu em uma desnaturação inicial a 94,0 °C durante 5 minutos, 40 ciclos de amplificação (desnaturação a 94,0 °C por 1 minuto, anelamento a 45,0 °C por 1 minuto e extensão a 72,0 °C durante 2 minutos) e uma extensão final a 72,0 °C por 5 minutos. Ao final, as amostras de DNA amplificado foram resfriadas a 4,0 °C e armazenado a -20,0 °C. A temperatura de anelamento de 45,0 °C foi definida com

base em ensaio anterior usando reações em gradiente 40,0 – 47,0 °C. Todas as reações de PCR foram realizadas em duplicata. Reações de PCR preparadas sem o DNA molde foram usadas como controle negativo.

2.5. Separação dos fragmentos de DNA amplificado

A separação dos fragmentos de DNA amplificado foi realizada por eletroforese horizontal em gel. Às amostras de DNA amplificado adicionaram-se os corantes SYBR[®] Gold nucleic acid gel stain (Invitrogen[™]) para colorir os fragmentos de DNA e Azul de Bromofenol (0,01%) para monitorar sua migração no gel.

As amostras foram então aplicadas num gel de agarose (1,5% m.v⁻¹) acoplado em uma cuba de eletroforese horizontal preenchida com tampão de corrida TBE 0,5X (Tris - Ácido bórico - EDTA) até a superfície do gel. A voltagem aplicada foi de 75 v e o tempo de migração dos fragmentos foi de 120 minutos. Um controle negativo e um padrão de peso molecular de 1000 pares de base (pb) (1 Kb Plus Express[®] DNA Ladder) foram utilizados em cada eletroforese. Os fragmentos de DNA no gel (bandas) foram fotografados sob luz ultravioleta usando um sistema de foto-documentação de géis.

2.6. Sistematização e análise dos dados

As bandas geradas por cada primer foram classificadas como monomórficas e polimórficas e sua presença/ausência computada para todos os indivíduos amostrados. Posteriormente calculou-se a porcentagem de bandas polimórficas e o conteúdo de informações polimórficas (PIC) para cada primer que foi calculado e classificado conforme Botstein et al. (1980).

Os dados de presença/ausência das bandas foram organizados em uma matriz binária (1 = presença e 0 = ausência) que foi utilizada para determinar vários índices de diversidade genética implementados pelo software POPGENE (Population Genetic Analysis) versão 1.32 (Yeh et al., 1999) incluindo: índice de Shannon (Lewontin, 1972) diversidade genética de Nei, porcentagem de locos polimórficos, heterozigosidade total, diversidade genética intrapopulacional, diferenciação genética, identidade genética de Nei (Nei, 1972, Nei 1978) e fluxo gênico indireto (McDermott e McDonald, 1972).

Com os valores de identidade genética de Nei foi confeccionado um dendrograma de similaridade baseados no método de agrupamento *Unweighted Pair-Group Method Arithmetic Average* (UPGMA) por meio do programa NTSYS-pc versão 2.1 (Holf, 2000). A estruturação dos grupos foi interpretada considerando-se a espécie e o modo de ocorrência (origem local e melhorada).

Para analisar a estrutura populacional do conjunto de dados foram realizadas simulações baseadas no método Bayesiano implementado no programa Structure v. 2.3.4 (Pritchard et al., 2000). Para as simulações considerou-se um número de grupos K variando de 1 a 4, assumindo o modelo de ancestralidade misturada, frequência de alelos correlacionados com informação prévia da população. O burn-in utilizado foi de 50.000 e a

corrida foi de 150.000 de cadeias de Markov MCMC (Monte Carlo Markov Chain) com cinco repetições por valor de K.

O número ótimo de grupos genéticos (K) para o conjunto de dados foi determinado pelo método de Evanno et al. (2005) implementado no programa Structure Harvester (Earl e VonHoldt, 2012), onde espera-se que o número ótimo de K tenha o menor valor negativo de $\text{Ln}P(K)$ e os maiores valores de $L'(K)$, $\text{Ln}''(K)$ e ΔK .

3. RESULTADOS

3.1. Perfil de amplificação dos primers ISSR

Neste estudo, esse conjunto de primers produziu um total de 85 bandas para cada espécie, sendo 64 bandas monomórficas e 22 polimórficas em *G. hirsutum* e 67 bandas monomórficas e 18 polimórficas em *G. barbadense*. Entre espécies foram produzidas 101 bandas, sendo 53 monomórficas e 48 polimórficas (Tabela 2).

Tabela 2. Perfil de amplificação de 11 primers ISSR entre e dentro das espécies *G. hirsutum* L. r. marie-galante e *G. barbadense* L.

Primer	<i>G. hirsutum</i>					<i>G. barbadense</i>					Total				PIC
	T	M	P	E	P(%)	T	M	P	E	P(%)	T	M	P	P(%)	
808	10	9	1	2	10	10	10	0	2	0	12	7	5	42	0,262
812	11	8	4	2	36	8	8	0	3	0	14	5	9	64	0,452
814	8	7	1	1	12	6	6	0	0	0	8	6	2	25	0,271
823	7	5	2	1	29	7	4	3	0	43	8	3	5	62	0,357
827	5	3	2	0	40	5	3	2	0	40	6	3	3	50	0,328
828	4	4	0	1	0,0	7	7	0	4	0	8	3	5	62	0,451
834	8	6	2	0	25	9	4	5	0	57	9	6	3	33	0,250
866	7	7	0	1	0	7	6	1	1	14	8	5	3	37	0,226
872	8	3	5	0	62	11	5	6	0	54	11	3	8	73	0,397
884	9	6	3	0	33	8	7	1	0	12	9	5	4	44	0,191
892	8	6	2	0	25	7	7	0	0	0	8	7	1	12	0,161
Total	85	64	22	8	-	85	67	18	10	-	101	53	48	-	-
Média	7,7	5,8	2,0	0,7	24,7	7,7	6,0	1,6	0,9	17,9	9,2	4,8	4,4	45,7	0,304

PIC - Conteúdo de informação polimórfica; T- Número total de bandas; M – Número de bandas monomórficas; P - Número de bandas monomórficas; P(%)- porcentagem de bandas polimórficas por primer; E - Número de bandas específicas.

Os primers 808, 812, 892 e 814 produziram bandas polimórficas apenas em *G. hirsutum*; UBC 866 apenas em *G. barbadense*; 823, 827, 884, 834 e 872 nas duas espécies e 828 apenas entre as espécies (Tabela 2). Os primers 808, 812, 814, 823, 828 e 866 produziram um total de oito bandas específicas em *G. hirsutum* e os primers 808, 812, 828 e 866 produziram dez bandas específicas em *G. barbadense* (Tabela 2).

A porcentagem de polimorfismo por primer variou de 0-62% em *G. hirsutum* de 0-57% em *G. barbadense* e de 12-73% entre as espécies. O valor de PIC médio dos primers variou de 0,161 – 0,451, sendo os primers 866, 884 e 892 classificados como pouco informativos (PIC =0-0,250) e os primers 808, 812, 814, 823, 827, 828, 834, 872 como moderadamente informativos (PIC=0,250-0,500).

3.2. Diversidade e diferenciação genética

Neste estudo, a diversidade genética de algodoeiro perene estimada a partir de marcadores ISSR foi baixa tanto entre quanto dentro das espécies (Tabela 4). Entretanto, a diversidade genética foi maior no grupo *G. hirsutum* que no grupo *G. barbadense* com alta diferenciação genética ($G_{ST}=0,598$) entre elas, estando 59,98% da variabilidade distribuída entre as espécies (Tabela 4).

Tabela 4. Índices de diversidade genética intra e interespecífica (média \pm erro padrão) para formas perenes de algodoeiro alotetraplóide domesticado das espécies *G. hirsutum* L. r. marie-galante e *G. barbadense* L. baseada em marcadores moleculares ISSR

Parâmetros de diversidade genética	<i>G. barbadense</i>	<i>G. hirsutum</i>	Total
Porcentagem de polimorfismo (%)	17,98	24,72	45,71
Diversidade genética de Nei (H_e)	0,043 \pm 0,020	0,071 \pm 0,029	-
Índice de Shannon (I)	0,070 \pm 0,033	0,111 \pm 0,015	-
Heterozigosidade total (H_T)	-	-	0,189
Diversidade genética intrapopulacional (H_S)	-	-	0,076
Diferenciação genética (G_{ST})	-	-	0,598
Fluxo gênico indireto (N_m)	-	-	0,338

Além disso, também se verificaram baixos níveis de fluxo gênico indireto ($N_m=0,338$), heterozigosidade total ($H_T=0,189$) e diversidade genética intrapopulacional ($H_S=0,076$) para o conjunto de dados (Tabela 4).

Tomando-se como referência a primeira ramificação como ponto de corte do dendrograma pode-se verificar que os genótipos das duas espécies foram reunidos em grupos distintos, nos quais também ficou evidente a separação entre genótipos de origem melhorada e local para ambas as espécies (Figura 2).

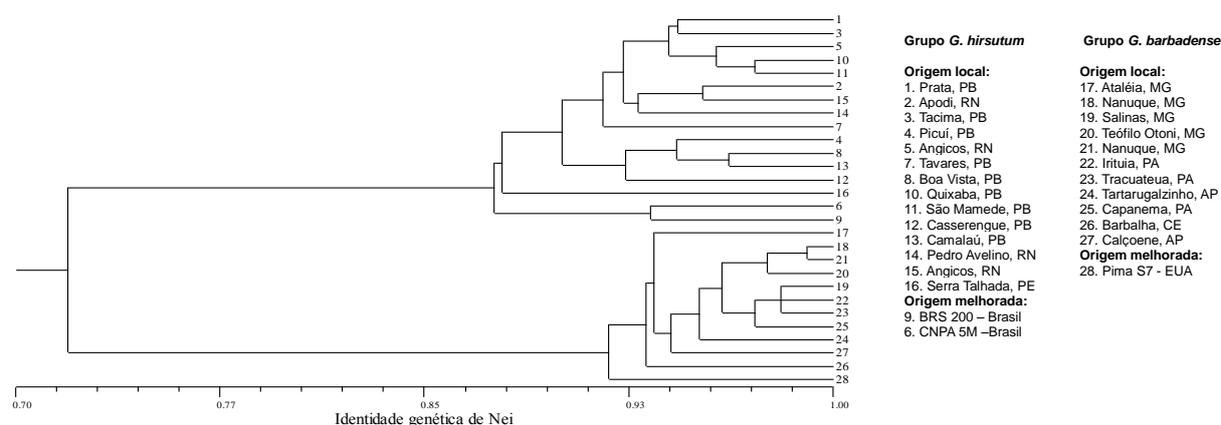


Figura 2. Análise de agrupamento (UPGMA) baseada na identidade genética de Nei para 28 formas perenes de algodoeiro alotetraplóide domesticado das espécies *G. hirsutum* L. r. marie-galante e *G. barbadense* L.

3.3. Estrutura genética

O número mais provável de grupos genéticos para o conjunto de dados de acordo com o método de Evanno foi de $K=2$ (Tabela 5), indicando que as populações estão estruturadas em dois grupos genéticos.

Tabela 5. Estimativas do número mais provável de grupos genéticos (K) para o conjunto de dados pelo método de Evanno

K	LnP médio (K)	L '(K)	Ln '' (K)	ΔK
1	-1327,8200	-	-	-
2	-545,6400	782,1800	783,6600	336,5176
3	-547,1200	-1,4800	0,9800	0,2096
4	-549,5800	-2,4600	0,9600	0,3892

Todos os indivíduos amostrados apresentaram alta probabilidade de pertencerem à sua respectiva espécie (Figura 4), mas em todos os genótipos do grupo *G. hirsutum* foi possível observar contribuição discreta (<5%) de *G. barbadense* L. (Figura 4).

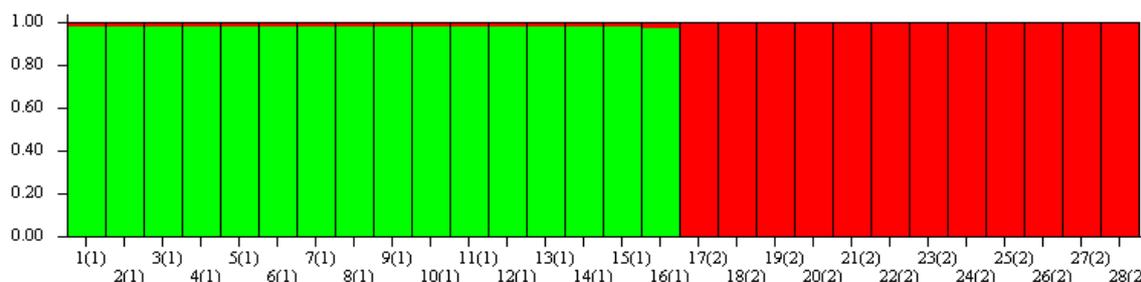


Figura 4. Estrutura genética de formas perenes de algodoeiro alotetraplóide domesticado das espécies *G. hirsutum* L. r. marie-galante e *G. barbadense* L. pela inferência Bayesiana considerando dois grupos genéticos ($K=2$) definidos e o método de Evanno. Os grupos genéticos estão representados por cores específicas (verde e vermelho) e cada barra vertical representa um genótipo (*G. hirsutum* L. r. marie-galante = 1 – 16 e *G. barbadense* L. = 17 – 28). A proporção das cores de preenchimento corresponde a probabilidade de cada indivíduo ser atribuído a cada grupo.

4. DISCUSSÃO

Neste estudo, a capacidade dos primers ISSR em revelar polimorfismo genético em formas perenes de algodoeiro alotetraplóide domesticado foi variável nos níveis intra e interespecíficos, indicando a existência de especificidade entre os primers. A porcentagem média de bandas polimórficas por primer em nível intraespecífico foi menor do que o obtido em nível interespecífico assim como demonstrado em um ensaio semelhante realizado por Liu e Wendel (2001).

A porcentagem de bandas polimórficas e o conteúdo de informação polimórfica dos primers neste estudo também se assemelharam aos ensaios de Dongre et al. (2007); Sheidai et al. (2012); Noormohammadi et al. (2013); Bilwal et al. (2017) usando marcadores

ISSR em *Gossypium* L. As bandas específicas reveladas para cada espécie podem ser úteis para identificação qualitativa de erros de classificação, redundância e introgressão interespecífica em bancos de germoplasma de algodão perene brasileiro.

Quando a diversidade genética, os níveis mais altos verificados no grupo *G. hirsutum* em relação ao grupo *G. barbadense* neste estudo concorda com relatos anteriores para grupos de referência dessas espécies analisados por marcadores SSR (Hinze et al., 2015, Hinze et al., 2016). Os baixos níveis de heterozigosidade total e diversidade genética intraespecífica são indícios de alta endogamia populacional. Esta hipótese apresentou-se de fato compatível com o modo de ocorrência dos genótipos, pois aqueles de origem melhorada são derivados de linhagens puras, enquanto os de origem local são mantidos como planta única em quintais e jardins domésticos ou provém de pequenas lavouras de subsistência derivadas de um ou poucos indivíduos fundadores.

O valor de fluxo gênico indireto entre as espécies foi menor que 1 indicando isolamento reprodutivo (Wright, 1931), que pode ser atribuído ao distanciamento geográfico, pois embora essas duas espécies possam ocorrer em simpatria no Brasil, os genótipos examinados neste estudo encontram-se amplamente dispersos como pode ser verificado em seu mapa de distribuição (Figura 1).

O agrupamento dos genótipos segundo a espécie e modo de ocorrência demonstrado pela análise de agrupamento qualificam o conjunto de marcadores ISSR utilizado neste estudo como seguros para caracterização molecular. A discriminação em nível molecular destas espécies também foi possível a partir de marcadores SSR (Hinze et al., 2015), os quais foram também, capazes de discriminar genótipos melhorados e locais de *G. barbadense* (Rodrigues et al., 2016).

A estruturação em dois grupos genéticos que foi demonstrada pela inferência Bayesiana e o método de Evanno foi congruente com a análise de agrupamento pelo método UPGMA baseada na identidade genética de Nei. A contribuição de *G. barbadense* em todos os genótipos do grupo *G. hirsutum*, mesmo que em baixa probabilidade, pode ser uma evidência de hibridização interespecífica no passado. Embora seja provável, esta hipótese não pôde ser confirmada neste estudo, entretanto, parece ser compatível com a hipótese de Stephens (1973) de que a *G. hirsutum* L r. marie-galante teria se desenvolvido através da introgressão com formas domesticadas de *G. barbadense* L. na Meso-América e Caribe, a qual foi posteriormente confirmada por d'Eeckenbrugge e Lacape (2014) estudando a distribuição das formas perenes de *G. hirsutum* L. incluindo “marie-galante” nesta área de abrangência.

5. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente estudo apoiam a conclusão de que os marcadores ISSR são capazes de revelar padrões de diversidade e estrutura genética, intra e interespecífica, de formas perenes de algodão alotetraplóide domesticado das espécies *G. hirsutum* L. r. *marie-galante* e *G. barbadense* L. sendo, portanto, promissores para caracterização das coleções de germoplasma de origem brasileira.

6. AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001 e da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Unidade Embrapa Algodão.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALBRANA. Algodões brasileiros nativos e naturalizados. Disponível em: <http://www.cnpa.embrapa.br/albrana>. Acesso em: 22 de Jan. de 2019.
2. ALMEIDA, V.C.D.; HOFFMANN, L.V.; YOKOMIZO G.K.I.; COSTA J.N.D.; GIBAND, M.; BARROSO, P.A.V. In situ and genetic characterization of *Gossypium barbadense* populations from the states of Pará and Amapá, Brazil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.44, n.7, p.719-725, 2009.
3. ANSARI S.A.; NARAYANAN, C.; WALI, S.A.; KUMAR, R.; SHUKLA, N.; RAHANGDALE, S.K. ISSR markers for analysis of molecular diversity and genetic structure of Indian teak (*Tectona grandis* L.) populations. **Annals of Forest Research**, v. 55, n.1, p.11-23, 2012.
4. BILWAL, B.B.; VADODARIYA K.V.; RAJKUMAR B.K.; LAHANE, G.R. Genetic diversity of parents using RAPD, ISSR and SSR molecular markers in upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.) **Bulletin of Environment, Pharmacology and Life Sciences**, v.6, n.8, p.54-61, 2017.
5. BOOPATHI, N.M.; HOFFMANN, L.V. **Genetic diversity, erosion, and population structure in cotton genetic resources**. In: AHUJA, M.R.; JAIN; S.M. (Eds.) Genetic diversity and erosion in plants. New York: Springer, p.409-438, 2016.
6. BORÉM, A.; FREIRE, E.C.; PENNA, J.C.V.; BARROSO, P.A.V Considerations about cotton gene escape in Brazil: a review. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.3, n.4, p.315-332, 2003.
7. BOTSTEIN, D.; WHITE, R.L.; SKOLNICK, M.; DAVIS, R.W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **The American Journal of Human Genetics**, v.32, p.314-331, 1980.
8. CASTRO, A.A.; HOFFMANN, L.V.; LIMA, T.H.; OLIVEIRA, A.I.D.; BRITO, R.R.; MENDES, L.M.O.; PEREIRA, C.C.O.; MALAFAIA, G.; MENEZES, I.P.P. *Gossypium*

- barbadense*: an approach for in situ conservation in Cerrado, Brazil. **Journal of Agricultural Science**, v.8, n.8, p.59-67, 2016.
9. COPPENS D'EECKENBRUGGE G.; LACAPE, J.M. Distribution and differentiation of wild, feral, and cultivated populations of perennial upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.) in Mesoamerica and the Caribbean. **PLoS ONE**, v.9, n.9, e107458, 2014.
 10. DONGRE, A.B.; BHANDARKAR, M.; BANERJE S. Genetic diversity in tetraploid and diploid cotton (*Gossypium* spp.) using ISSR and microsatellite DNA markers. **Indian Journal of Biotechnology**, v.6, p.349-353, 2007.
 11. DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolatin of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v.12, p.13-15, 1987.
 12. EARL, D.A.; VONHOLDT, B.M. Structure Harvester: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. **Conservation Genetics Resources**, v. 4, n.2, p. 359-361, 2012.
 13. EVANNO, G.; REGNAUT, S. GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. **Molecular Ecology**, v.14, n.8, p.2611-2620, 2005.
 14. GUPTA, M.; CHYI, Y.S.; ROMERO-SEVERSON J.; OWEN J.L. Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple-sequence repeats. **Theoretical and Applied Genetics**, v.89, p.998-1006, 1994.
 15. HINZE, L.; FANG, D.; GORE, M.; SCHEFFLER, B. Molecular characterization of the *Gossypium* diversity reference set of the US national cotton germplasm collection. **Theoretical and Applied Genetics**, v.128, p.313-327, 2015.
 16. HINZE, L. L., GAZAVE, E., GORE, M. A., FANG, D. D., SCHEFFLER, B. E., YU, J. Z.; PERCY, R. G. Genetic diversity of the two commercial tetraploid cotton species in the *Gossypium* diversity reference set. **The Journal of Heredity**, v.107, n.3, p.274–286, 2016.
 17. HOFFMANN, L.V.; CARDOSO, K.C.M.; ROCHA, A.S.N.C.; OLIVEIRA, A.I.D. Genetic diversity of *Gossypium barbadense* from the central Brazilian Amazon. **Acta Amazonica**, v.48, n.1, p.1-9, 2018.
 18. ROHLF, F.J. **NTSYS-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.1**. New York: Exeter Software, 2000. 83p.
 19. LEWONTIN, R.C. Testing the theory of natural selection. **Nature**, v.236, p.181-182, 1972.
 20. LIU B.; WENDEL, J. F. Intersimple sequence repeat (ISSR) polymorphisms as a genetic marker system in cotton. **Molecular Ecology Resource**, v.1, n.3, p.205-208, 2001.
 21. LIU, S.; SAHA, S.; STELLY, D.; BURR, CANTRELL, R.G. Chromosomal assignment of microsatellite loci in cotton. **Journal of Heredity**, v.91, n.4, p.326-32, 2000.

22. MCDERMOTT, J.M.; MCDONALD, B.A. Gene flow in plant pathosystem. **Annual Review of Phytopathology**, v.31, p.353-373, 1993.
23. MENEZES, I. P. P.; HOFFMANN, L.V.; BARROSO, P.A.V. Genetic characterization of cotton landraces found in the Paraíba and Rio Grande do Norte states. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.15, p.26-32. 2015.
24. MENEZES, I.P.P.; BARROSO, P.A.V.; HOFFMANN, L.V.; LUCENA, V.S. GIBAND, M. Genetic diversity of mocó cotton (*Gossypium hirsutum* race marie galante) from the northeast of Brazil: implications for conservation. **Botany**, v.8, p. 765–773, 2010.
25. MENEZES, I.P.P.; HOFFMANN, L.V.; LIMA, T.H.; SILVA A.R.; LUCENA, V.S.; BARROSO, P.A.V. Genetic diversity of arboreal cotton populations of the Brazilian semiarid: a remnant primary gene pool for cotton cultivars. **Genetics and Molecular Research**, v.16, 2017.
26. NEI, M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.70, n.12, p. 3321-3323, 1973.
27. NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics**, v.89, p.90-583, 1978.
28. NOORMOHAMMADI, Y.; HASHEMINEJAD-AHANGARANI, F.; SHEIDAI, M.; GHASEMZADEH-BARAKI, S. Genetic diversity analysis in opal cotton hybrids based on SSR, ISSR, and RAPD markers. **Genetics and Molecular Research**, v.12, p.256-269, 2013.
29. PRITCHARD, J.K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, v.155, n.2, p.945–959, 2000.
30. ROCHA, G.M.G.; CAVALCANTI, J.J.V.; CARVALHO, L.P.; SANTOS, R.C. Genetic divergence of colored cotton based on inter simple sequence repeat (ISSR) markers. **African Journal of Agriculture Research**, v.11, p.2663-2668, 2016.
31. RODRIGUES, J.I.S.; CARVALHO, L.P.; FARIAS, F.J.C. Comparison of wild accessions of *Gossypium barbadense* L. from Peru and Brazil via microsatellite markers. **Bioscience Journal**, v. 32, n.5. p.1352-1363, 2016.
32. SHEIDAI, M.; NOORMOHAMMADI, Z.; SHOJAEI-JESHVAGHANI F.; GHSEMZADEH-BARAKI, S. Simple sequence repeat (SSR) and inter simple sequence repeat (ISSR) analyses of genetic diversity in tissue culture regenerated plants of cotton. **African Journal of Biotechnology**, v.11, p.894-11900, 2012.
33. SILVA, T.S.S.; FREITAS, J.S.; SANTOS, E.S.L.; CARDOSO T.S.; CERQUEIRA-SILVA, C.B.M. Caracterização e seleção de marcadores moleculares em *Croton linearifolius* Mull. Arg. como subsídio para estudos genéticos. **Multi-Science Journal**, v.1, n.10, p.4-8, 2018.

34. 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: Springer, p. 239–254, 1973.
35. VASCONCELOS, U.A.A.; CAVALCANTI, J.J.V.; FARIAS, F.J.C.; VASCONCELOS, W.S. Diallel analysis in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) for water stress tolerance. **Crop Breeding Applied Biotechnology**, v.18, n.1, 2018.
36. YEH, F.C.; BOYLE, T.Y.Z.; XIYAN, J.M. **POPGENE version 131: Microsoft Window-based freeware for population genetic analysis.** Edmonton: University of Alberta, 1999.

CAPÍTULO 4

CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA E QUALIDADE TECNOLÓGICA DA FIBRA DE POPULAÇÕES REMANESCENTES DE ALGODOEIRO PERENE DO ESTADO DA PARAÍBA, BRASIL

RESUMO: As populações remanescentes do algodoeiro *Gossypium hirsutum* r. marie-galante Hutch. que ocorrem no Nordeste do Brasil fazem parte do pool genético primário para a criação de cultivares modernas de algodão upland. Assim, objetivou-se com este trabalho avaliar as propriedades tecnológicas da fibra e determinar a diversidade e a estruturação genética de quatro populações de *G. hirsutum* r. marie-galante do estado da Paraíba, Brasil. Os dados genéticos foram obtidos a partir da genotipagem de oito indivíduos de cada população (n=32) usando a técnica PCR-ISSR. Enquanto os parâmetros tecnológicos das fibras foram obtidos por meio do sistema analítico High Volume Instrument (HVI). As populações divergiram quanto às propriedades tecnológicas de fibra formando três grupos distintos. Os caracteres comprimento médio, resistência, índice de micronair, índice de maturidade e índice de fiabilidade das populações condizem com os caracteres presentes em cultivares adotados comercialmente. As populações apresentaram baixos níveis de diversidade genética total ($H_T=0,1305$) e intrapopulacional ($H_S=0,0806$), além de alta diferenciação genética ($G_{ST}=0,3824$), baixo fluxo gênico indireto ($Nm=0,875$), estando estruturadas em dois grupos genéticos pela inferência Bayesiana. A relação positiva entre distância genética e distância geográfica pelo teste de Mantel ($r = 0,8364$; $p\text{-valor} = 0,0038$) sugere que a divergência genética entre as populações pode ser explicada pelo isolamento espacial. Estas informações podem dar suporte à conservação genética e a valoração destas populações para programas de melhoramento genético de algodão.

PALAVRAS CHAVE: Algodão. Malvaceae. Conservação. Melhoramento. Estrutura genética.

1. INTRODUÇÃO

Variedades locais de algodoeiro perene da espécie *Gossypium hirsutum* r. marie-galante Hutch conhecidas como algodoeiros arbóreos ou mocós foram amplamente cultivadas no semiárido do Nordeste do Brasil até o final do século XX (Moreira et al., 1997; Giband, Dessauw e Barroso, 2010).

Essas variedades locais de algodoeiro perene distinguem-se das cultivares modernas de algodoeiro upland (*G. hirsutum* r. latifolium) por apresentar ciclo perene, porte arbustivo-arbóreo, sementes pretas e sem línter e fibra de comprimento longo ou extra longo (Freire et al., 1990). Elas tiveram seu ápice de importância econômica e social para a região

Nordeste em 1970 quando foram cultivados mais de 2,5 milhões hectares (Freire, Costa e Andrade, 1997). Os primeiros sinais de declínio dessa cultura começaram a surgir a partir de 1977 em decorrência de problemas econômicos, climáticos, substituição sistemática pelo algodoeiro upland e a disseminação do inseto-praga *Anthonomus grandis* Bohemam (Medeiros et al., 2012), o que culminou com a abertura das importações em 1990 (Coêlho, 2017).

Desde 2013 as variedades locais de algodoeiro perene não são incluídas nas estatísticas oficiais de produção agropecuária brasileira. Atualmente são encontradas como plantas únicas em jardins e quintais domésticos, populações espontâneas e ferais e, excepcionalmente, na forma de lavoura de subsistência em alguns estados do Nordeste (Menezes et al., 2017). Embora vários estudos no campo da genética da conservação tenham sido realizados com algodoeiros *G. hirsutum* L. r. marie-galante (Menezes et al., 2010; Menezes et al., 2015; Menezes et al., 2017), as suas características agrônômicas básicas e os modelos que explicam a diversidade e divergência genética entre as populações remanescentes ainda não foram completamente elucidados.

Assim, objetivou-se com este trabalho avaliar a qualidade tecnológica da fibra e determinar a estruturação genética de populações remanescentes de *G. hirsutum* L. r. marie-galante do estado da Paraíba, Brasil.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Seleção das populações

Foram selecionadas para o presente estudo quatro populações de algodoeiro perene (*G. hirsutum* L. r. marie-galante) oriundas de diferentes localidades do estado da Paraíba, Brasil (Tabela 1).

Tabela 1. Localização geográfica das populações brasileiras de algodoeiro perene (*G. hirsutum* L. r. marie-galante) selecionadas para o estudo.

População	Cidade/Estado	Latitude/longitude ¹
1	Camalaú, Paraíba, Brasil	6°53'5.46"S 37°3'4.14"O
2	Casserengue, Paraíba, Brasil	6°46'58"S 35°49'15.00"O
3	Quixabá, Paraíba, Brasil	7°4'18.84"S 37°4'54.06"O
4	São Mamede, Paraíba, Brasil	6°53'5.34"S 37°3'4.14"O

1 - Global Positioning System (GPS).

Estas populações de algodão são conservadas “on farm” por agricultores familiares e “ex situ” no Banco Ativo de Germoplasma (BAG) da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Unidade Embrapa Algodão, Paraíba, Brasil.

2.2. Caracterização da qualidade tecnológica de fibra de algodão das populações

2.2.1. Ensaio de campo

Os dados de rendimento e as amostras de fibras de algodão foram obtidas por meio da condução de um ensaio de campo na Estação Experimental da Embrapa Algodão no município de Patos, Paraíba, Brasil, no ano de 2016. O delineamento experimental utilizado no ensaio foi o de blocos casualizados, cada parcela composta por 40 plantas dispostas em espaçamento de 1,0 x 1,5 m, sendo as dez plantas centrais consideradas como parcela útil.

O ensaio foi conduzido em sistema de sequeiro com suplementação hídrica de 600 mm distribuídos por meio de sistema de irrigação por aspersão ao longo do ciclo da cultura, devido ao longo período de estiagem que ocorreu na época. Os tratos culturais incluíram três capinas manuais e dois tratamentos fitossanitários para o controle de insetos-praga (aplicação de inseticidas a base de beta-ciflutrina para controle do bicudo-do-algodoeiro e de tiametoxam para controle de mosca-branca). A colheita do algodão em caroço foi realizada manualmente aos 150 dias após a semeadura quando cerca de 80% dos capulhos estavam abertos.

2.2.2. Avaliação do rendimento e das características tecnológicas da fibra

Para o cálculo do rendimento de fibras (%) foram coletados 20 capulhos da parcela útil e utilizado a seguinte fórmula:

$$\frac{\text{Peso da fibra}}{\text{Peso do algodão em caroço}} \times 100 = \% \text{ Fibras}$$

As características tecnológicas de fibra foram determinadas por instrumentação analítica em sistema *High Volume Instrument* (HVI 2000[®] Uster Technologies). As análises incluíram comprimento médio (mm), uniformidade (%), índice de fibras curtas (%), resistência (STR), alongamento à ruptura (g/tex), índice de micronaire (µg/pol), índice de maturidade (gf/tex) e índice de fiabilidade (CSP).

2.2.3. Análise do conjunto de dados

A fibra de algodão de cada população foi classificada de acordo com os parâmetros referenciais de categorias para cada característica de fibra de algodão conforme o Regulamento Técnico do Algodão em Pluma da Instrução normativa nº 24, de 14 de julho de 2016 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Brasil, 2016). As características tecnológicas de fibra do genótipo algodoeiro perene e melhorado cv. CNPA 5M foram utilizadas para comparação (Embrapa, 2001).

A partir dos dados das características tecnológicas de fibra estimou-se a distância de Mahalanobis (Mahalanobis, 1936) entre as populações. Com os valores de distância de Mahalanobis foi construído um dendrograma de dissimilaridade pelo método de agrupamento *Unweighted Pair-Group Method Arithmetic Average* (UPGMA) usando o programa estatístico GENES, versão 2014.6.1 (Cruz, 2013).

2.3. Caracterização genética das populações

2.3.1. Amostragem e extração de DNA

Para caracterização genética foram amostrados, aleatoriamente, oito indivíduos de cada população da área útil da parcela. O DNA genômico dos indivíduos foi extraído a partir de amostras de tecido embrionário de sementes secas (1/4 da semente) utilizando-se o protocolo de Doyle e Doyle (1987), com adaptações. A concentração de DNA nas amostras foi estimada por eletroforese em gel de agarose (0,8%, m.v⁻¹), utilizando-se DNA do fago Lambda (50, 100 e 200 ng µL⁻¹) como padrão.

2.3.2. Reações de amplificação do DNA via PCR-ISSR

A amplificação de DNA foi realizada por PCR convencional usando 12 *primers* do marcador dominante *Inter Simple Sequence Repeat* (ISSR) do conjunto #9 da Nucleic Acid-Protein Service Unit (University of British, Columbia, EUA) (Tabela 2).

Tabela 2. Relação dos *primers* ISSR utilizados para caracterização genética de populações *G. hirsutum* L. r. marie-galante) do estado da Paraíba, Brasil.

Código	Primers (5'– 3')
808	AGA GAG AGA GAG AGA GC
814	CTC TCT CTC TCT CTC TA
823	TCT CTC TCT CTC TCT CC
827	ACA CAC ACA CAC ACA CG
830	TGT GTG TGT GTG TGT GG
834	AGA GAG AGA GAG AGA GYT
851	GTG TGT GTG TGT GTG TYG
853	TCT CTC TCT CTC TCT CRT
868	GAA GAA GAA GAA GAA GAA
872	GAT AGA TAG ATA GAT A
884	HBH AGA GAG AGA GAG AG
892	TAG ATC TGA TAT CTG AAT TCC C

Y = (C, T); B = (C, G, T); H = (A, G, T).

As reações de PCR foram preparadas com volume final de 25 µL contendo 1,0 mM de *primer*, 0,25 mM de dNTP's, 2,5 mM de MgCl₂, 1x de tampão de PCR [100 mM Tris-HCl (pH 8,5), 500 mM KCl], 1 unidade de *Taq* DNA polimerase (Ludwig Biotec®), 20 ng de DNA genômico e água ultrapura.

A amplificação do DNA foi realizada em termociclador (PCR Thermal Cyclers, Amplitherm 96-Well). O protocolo utilizado consistiu em uma desnaturação inicial a 94 °C durante 5 minutos, 40 ciclos de amplificação (desnaturação a 94 °C por 1 minuto, anelamento a 45 °C por 1 minuto e extensão a 72 °C durante 2 minutos) e uma extensão final a 72 °C por 5 minutos. Reações sem DNA molde foram usadas como controle negativo. Ao final, os amplicons foram resfriados a 4 °C e armazenados a -20 °C. Todas as reações de PCR foram realizadas em duplicata. Os amplicons foram analisados em gel de agarose (1,5%, m.v⁻¹) e fotodocumentados no aparelho UltraLum Eletronic UV Transilluminator e Kodak GEL Logic 200 Imaging System.

2.3.3. Sistematização e análise dos dados

As bandas geradas por cada *primer* foram classificadas como monomórficas e polimórficas e sua presença/ausência computada para todos os indivíduos amostrados. Posteriormente, calculou-se a porcentagem de bandas polimórficas e o conteúdo de informações polimórficas (PIC) para cada *primer* de acordo com Botstein et al. (1980).

Os dados de presença/ausência foram organizados em uma matriz binária (1 = presença e 0 = ausência) que foi utilizada para determinar os índices de diversidade genética pelo software POPGENE (Population Genetic Analysis), versão 1.32 (Yeh et al., 1999), incluindo: índice de Shannon (Lewontin, 1972), número de alelos observados, número de alelos efetivos, diversidade genética de Nei, porcentagem de bandas polimórficas, heterozigosidade total, diversidade genética intrapopulacional, diferenciação genética, identidade genética de Nei (Nei, 1972, 1978) e fluxo gênico indireto (McDermott e McDonald, 1993). Com os valores de identidade genética de Nei foi construído um dendrograma de dissimilaridade baseado no método de agrupamento *Unweighted Pair-Group Method Arithmetic Average* (UPGMA) usando o programa estatístico GENES, versão 2014.6.1 (Cruz, 2013).

A estrutura populacional foi analisada a partir de simulações baseadas no método Bayesiano pelo programa Structure, versão 2.3.4 (Pritchard et al., 2000). Para as simulações considerou-se um número de grupos genéticos (K) variando de 1 a 4, assumindo o modelo de ancestralidade misturada, frequência de alelos correlacionados e informação prévia da população. O *burn-in* utilizado foi de 50.000 e a corrida de 100.000 cadeias de Markov MCMC (Monte Carlo Markov Chain) com cinco repetições por valor de K. O número ótimo K para o conjunto de dados foi determinado pelo método de Evanno et al. (2005) usando-se o programa Structure Harvester (Earl e VonHoldt, 2012).

A existência de estruturação genética espacial entre as populações foi investigada por meio da análise de correlação entre as matrizes de distância genética e distância geográfica das populações pelo teste de Mantel (10.000 permutações aleatórias) a partir do programa BioEstat 5.0 (Ayres et al., 2007).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Caracterização tecnológica da fibra de algodão

As populações de algodoeiro perene apresentaram baixo rendimento de fibras (FIB), de baixo a médio comprimento (UHM), alta uniformidade de fibras (UNF), baixo índice de fibras curtas (SFI), fibras resistentes (STR), alongamento à ruptura muito baixo (ELG), índice de fiabilidade muito alto (CSP) e fibras maduras (MAT), diferindo apenas em relação ao comprimento (UHM) e o índice de micronair (MIC) (Tabela 3).

Tabela 3. Classificação da qualidade tecnológica das fibras de quatro populações de *G. hirsutum* L. r. marie-galante) do estado da Paraíba, Brasil.

Caractere	Categoria ¹	Descrição ¹	Classificação das populações (valores médios)
FIB	Baixo	<34%	1 (29,2%); 2 (28,9%); 3 (28,6%); 4 (29,1%)
	Médio	35 -37%	-
	Alto	38 -41%	-
UHM	Curta	<28,0 mm	-
	Média	28,0 -30,6 mm	1 (29,1 mm); 3 (30,5 mm)
	Longa	30,7-34,7 mm	2 (31,7 mm); 4 (31,2 mm)
	Extra Longa	>34,8 mm	-
UNF	Muito alta	>85,5%	-
	Alta	85,4 - 82,5%	1 (82,9%); (82,5%); 3 (83,0%); 4 (83,2%)
	Média	82,4 - 80,0%	-
	Baixa	79,9 - 77,0%	-
SFI	Muito baixa	<6%	-
	Baixa	6,0 - 7,9%	1 (7,2%); 2 (6,8%); 3 (7,0%); 4 (6,9%)
	Regular	8,0 - 10,0%	-
	Alta	10,1 - 13,0 %	-
	Muito alta	>13,0%	-
STR	Muito resistente	>32,0 g/tex	-
	Resistente	31,9 - 29,0 g/tex	1 (29,7); 2 (29,4); 3 (30,0); 4 (30,5)
	Média	28,9 - 27,0 g/tex	-
	Intermediária	26,9 - 25,0 g/tex	-
	Fraca	<24,9 g/tex	-
ELG	Muito baixo	<5,0%	1 (4,4%); 2 (4,0%); 3 (4,3%); 4 (4,1%)
	Baixo	5,0 - 5,8%	-
	Médio	5,9 - 6,7%	-
	Alto	6,8 - 7,6%	-
MIC	Muito alto	>7,7%	-
	Muito fina	<3,0 µg/pol	-
	Fina	3,1 - 3,6 µg/pol	4 (3,5 µg/pol)
	Média	3,7 - 4,7 µg/pol	1 (3,8 µg/pol); 2 (3,8 µg/pol); 3 (3,7 µg/pol)
	Grossa	4,8 - 5,4 µg/pol	-
MAT	Muito grossa	>5,5 µg/pol	-
	Incomum	<0,75 g/tex	-
	Imaturo	0,75 - 0,85 g/tex	-
	Madura	0,86 - 0,95 g/tex	1 (0,86); 2 (0,87); 3 (0,86); 4 (0,86)
CSP	Muito madura	>95 g/tex	-
	Médio	2000 - 2250	-
	Alto	2250 - 2500	-
	Muito Alto	>2500	1 (2683); 2 (2817); 3 (2823); 4 (2924)

Legenda: Rendimento de fibras (FIB), comprimento médio (UHM), uniformidade (UNF), índice de fibras curtas (SFI), resistência (STR), alongamento à ruptura (ELG), índice de micronair (MIC), índice de maturidade (MAT) e índice de fiabilidade (CSP). Parâmetros referenciais de categorias para cada característica de fibra de algodão conforme o Regulamento Técnico do Algodão em Pluma da Instrução normativa nº 24, de 14 de julho de 2016 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

O índice de micronair da fibra de algodão foi médio nas populações 1, 2 e 3 oriundas de Camalaú, Casserengue e Quixadá, respectivamente, e fino na população 4 (São Mamede), enquanto o comprimento médio foi médio para as populações 1 e 3 e longo para as populações 2 e 4 (Tabela 3). Com exceção de alongamento à ruptura, uniformidade, índice de fibras curtas e rendimento de fibras, as demais características tecnológicas de fibra encontram-se dentro do esperado para cultivares modernas de algodão upland de boa

qualidade. Segundo Bachelier e Gourlot (2018) devem apresentar ELG de 6,8 - 7,7%, UNF de 85-87%, SFI menor que 6%, FIB em torno de 40%, UHM com pelo menos 30 mm, MIC de 3,8 - 4,5 $\mu\text{g}/\text{pol}$, STR mínima de 26 g/tex, MAT de 0,86-0,95 e CSP com valor de 2000 a 2500.

A maioria das características tecnológicas das fibras estudadas foi semelhante às da cultivar perene e melhorada CNPA 5M, com exceção do ELG, STR e UHM. A ELG foi classificada como alta em CNPA 5M (ELG = 6,8%) e muito baixa nas populações; STR foi classificado como intermediário em CNPA 5M (STR = 25,4 g/tex) e resistente nas populações; enquanto UHM foi médio em CNPA 5M (UHM = 30,5 mm) e longo na maioria das populações estudadas.

Quanto à análise de agrupamento UPGMA baseada na distância de Mahalanobis (Figura 1) constatou-se que as populações divergiram quanto às características tecnológicas de fibra, as quais podem ser divididas em três grupos de dissimilaridade com base no ponto de corte proposto por Mojena (1977).

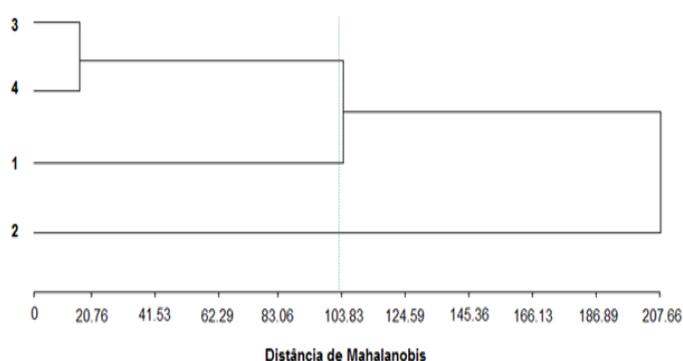


Figura 1. Análise de agrupamento UPGMA baseada na distância de Mahalanobis para quatro populações de *G. hirsutum* L. r. marie-galante do estado da Paraíba, Brasil. Populações: 1 - Camalaú; 2 - Casserengue; 3 – Quixabá ; 4 - São Mamede.

As populações mais similares (Quixabá e São Mamede) foram alocadas em um mesmo grupo, enquanto as populações mais dissimilares (Camalaú e Casserengue) foram alocadas em dois grupos distintos. De acordo com o método proposto por Singh (1981), a maior contribuição relativa para a estruturação dos grupos foi fornecida pelos caracteres ELG (50,19%) e FIB (36,45%), seguidos por UHM (7,63%), MIC (4,46%) e CSP (1,26%), enquanto as contribuições de UNF, SFI, STR e MAT foram irrelevantes (0%). Todavia, várias das características tecnológicas de fibra foram compatíveis com o padrão esperado para cultivares modernas de algodoeiro upland.

3.2. Caracterização genética das populações

3.2.1. Perfil de amplificação e análise descritiva

Os doze primers ISSR utilizados neste estudo amplificaram seqüências de DNA com bandas múltiplas e tamanho variando de 250 a 2500 pb (Figura 2, Tabela 4).

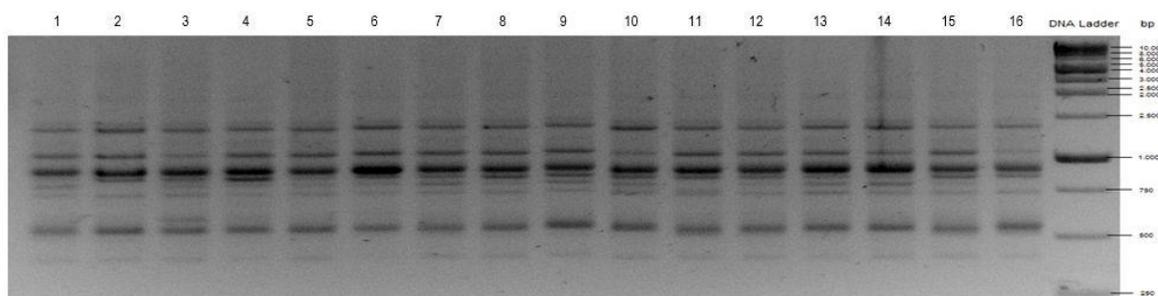


Figura 2. Perfil de amplificação de bandas do primer ISSR 827 em indivíduos de *G. hirsutum* L. r. marie-galante das populações 1- Camalaú (poços de 1-8) e 2 – Casserengue (poços de 9-16).

A capacidade individual de cada *primer* ISSR em revelar polimorfismo genético nas populações de algodoeiro perene foi variável, pois a porcentagem de bandas polimórficas variou de 10 a 85% e o conteúdo de informação polimórfica variou de 0,049 a 0,429.

Tabela 4. Perfil de amplificação de doze *primers* ISSR utilizados para detectar polimorfismo genético em quatro populações de *G. hirsutum* L. r. marie-galante) do estado da Paraíba, Brasil.

Primer	Número de bandas			P (%)	PIC	Faixa de amplificação (pb)
	Monomórfica	Polimórfica	Total			
808	9	1	10	10,0	0,049	250 – 2000
814	6	2	8	25,0	0,222	250 – 2000
823	4	3	7	42,9	0,292	750 – 2000
827	6	2	8	25,0	0,256	250 – 1500
830	7	2	9	22,2	0,368	500 – 1500
834	5	3	8	37,5	0,330	250 – 2500
851	1	6	7	85,7	0,353	250 – 1000
853	3	4	7	57,1	0,256	500 – 3000
868	5	3	8	37,5	0,133	250 – 1000
872	3	5	8	62,5	0,429	250 – 1500
884	6	2	8	25,0	0,084	250 – 1000
892	7	4	11	36,4	0,298	250 – 1500
Média	5,2	3,0	8,2	38,9	0,256	-
Total	62	37	99	-	-	-

P- Porcentagem de polimorfismo; PIC- Conteúdo de informação polimórfica; pb- Pares de bases.

Entretanto, a porcentagem média de bandas polimórficas (38,9%) e a classificação da maioria desses *primers* como moderadamente informativos indica que a capacidade de detectar o polimorfismo genético está dentro do esperado para esse tipo de marcador, com desempenho semelhante aos observados nos estudos de Dongre et al. (2007), Sheidai et al. (2012), Noormohammadi et al. (2013) e Rocha et al. (2016) em algodão upland.

3.2.3. Diversidade genética total e intrapopulacional

A diversidade genética total ($H_T=0,1305$) e a diversidade genética média dentro das populações ($H_S=0,0806$) foram baixas, ratificando a hipótese de que essas populações podem ter sido originadas a partir de poucos genótipos. Entretanto, as variações na porcentagem de bandas polimórficas, diversidade genética de Nei e índice de Shannon sugerem que as populações apresentaram níveis de diversidade genética distintos. Com base nesses resultados, as populações procedentes de Camalaú e Casserengue (1 e 2) apresentaram diversidade genética superior às demais (Tabela 5).

Tabela 5. Valores médios dos índices de diversidade genética (\pm erro padrão) de quatro populações de *G. hirsutum* L. r. marie-galante) do estado da Paraíba, Brasil.

População	P%	Na	Ne	H_E	I
1	28,3	1,2828 \pm 0,046	1,2202 \pm 0,038	0,1199 \pm 0,020	0,1723 \pm 0,029
2	22,2	1,2222 \pm 0,042	1,1579 \pm 0,003	0,0896 \pm 0,017	0,1309 \pm 0,025
3	13,1	1,1313 \pm 0,034	1,1102 \pm 0,029	0,0596 \pm 0,016	0,0848 \pm 0,022
4	11,1	1,1111 \pm 0,032	1,1027 \pm 0,029	0,0533 \pm 0,015	0,0747 \pm 0,021
Média	18,7	1,18685	1,14775	0,0806	0,115675

Legenda: P% - porcentagem de bandas polimórficas, Na – número de alelos observados, Ne – número de alelos efetivos, H_E – diversidade genética de Nei, I – índice de Shannon.

3.2.4. Diferenciação e fluxo gênico entre populações de algodoeiro perene

A diferenciação genética entre populações foi alta ($G_{ST}=0,3824$), estando 38,24% da variabilidade genética distribuída entre as populações. Isso sugere que as populações podem ter sido originadas a partir de fontes de sementes distintas, todavia, a diferenciação devido à deriva genética em função da seleção artificial, bem como de seleção e adaptação natural, de forma independente nos seus locais de origem parece fazer sentido.

A estimativa de fluxo gênico indireto ($Nm= 0,875$) revelou uma baixa proporção de migrantes entre as populações, que se deve, provavelmente, à dispersão de sementes espacialmente restrita e ao distanciamento geográfico, que representa uma barreira à dispersão de pólen mediada por insetos. De fato, a distância geográfica entre estas populações varia de 13,0 a 164,9 km e excede o limite de distância em que prováveis polinizadores costumam forragear em busca de alimento, como por exemplo, abelhas nativas do gênero *Melipona* que percorrem até 4 km de distância de seus ninhos (Rodrigues e Ribeiro, 2014; Silva et al., 2014)

Dessa forma, a entrada ou a saída de alelos entre populações, provavelmente deve acontecer por meio do intercâmbio de sementes por longa distância mediada por humanos. Esse mecanismo facilitador apresenta, atualmente, perspectivas de aumento devido à organização de bancos de sementes comunitários no estado da Paraíba que promovem a troca de sementes de variedades crioulas de várias culturas agrícolas entre agricultores familiares de todo o estado (Paulino e Gomes, 2015).

A análise de agrupamento UPGMA baseada na identidade genética de Nei (Figura 3) revelou que as populações divergiram geneticamente, formando dois grupos de dissimilaridade. As populações mais similares entre si (Camalaú, Quixabá e São Mamede) foram alocadas em um mesmo grupo e a população mais dissimilar (Casserengue) em um grupo distinto.

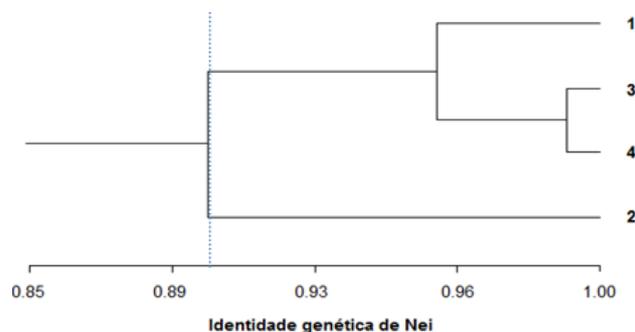


Figura 3. Análise de agrupamento UPGMA baseada na identidade genética de Nei para quatro populações de *G. hirsutum* L. r. marie-galante do estado da Paraíba, Brasil. O ponto de corte foi estabelecido conforme o método proposto por Mojena (1977). Populações: 1 - Camalaú; 2 - Casserengue; 3 – Quixaba ; 4 - São Mamede.

3.2.5. Estruturação genética

De acordo com o método de Evanno as populações estão estruturadas em dois grupos genéticos (Tabela 6).

Tabela 6. Estimativas do número mais provável de grupos genéticos (K) para o conjunto de dados usando o método de Evanno.

K	LnP médio (K)	L '(K)	Ln " (K)	ΔK
1	-1137,6400	-	-	-
2	-1060,5800	77,0600	85,0200	7,5403
3	-1068,5400	-7,9600	38,2200	2,0641
4	-1114,7200	-46,1800	-	-

Pela representação gráfica (Figura 4) constata-se que as populações procedentes de Camalaú, Quixaba e São Mamede (1, 3 e 4) pertencem ao mesmo grupo genético (vermelho) enquanto a população de Casserengue (2) a um grupo genético distinto (verde), sendo esta diferenciação congruente com os resultados da análise de agrupamento UPGMA baseada na identidade genética de Nei (Figura 2).

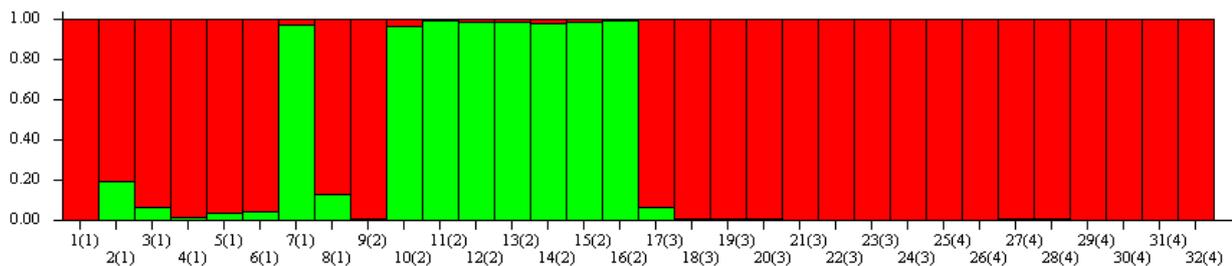


Figura 4. Estrutura genética baseada na inferência Bayesiana ($K=2$) para quatro populações de *G. hirsutum* L. r. marie-galante do estado da Paraíba, Brasil. Os grupos genéticos estão representados por cores específicas (verde e vermelho) e cada barra vertical representa um indivíduo: 1 - Camalaú (1 – 8); 2 - Casserengue (9 – 16); 3 – Quixabá (17 – 24); 4 - São Mamede (25 – 32). A proporção das cores de preenchimento corresponde à probabilidade de cada indivíduo ser atribuído a determinado grupo genético.

A maioria dos indivíduos amostrados apresentou alta probabilidade ($>95\%$) de ser natural de sua população de origem. Contudo, dois indivíduos (indivíduos 7 e 9) podem ser considerados como migrantes de outro grupo genético (Figura 5), sendo esta uma evidência de fluxo gênico entre as populações que também foi constatada pela estimativa de fluxo genético indireto.

O teste de Mantel revelou correlação positiva ($r = 0,8364$; $p\text{-valor} = 0,0038$) entre a distância genética e a distância geográfica das populações (Figura 5), sugerindo que a divergência genética entre elas pode ser explicada pelo isolamento espacial. Esse padrão de estruturação genética também foi verificado por Menezes et al. (2010) com populações de *G. hirsutum* L. r. marie-galante provenientes de diferentes estados do Nordeste do Brasil, as quais formaram agrupamentos consistentes com a sua origem geográfica a qual foi atribuída, em parte, à atuação de diferentes programas de melhoramento.

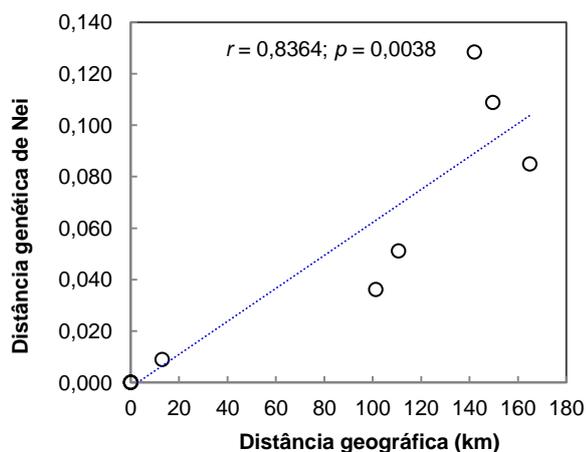


Figura 5. Relação entre distância genética e geográfica de quatro populações de *G. hirsutum* L. r. marie-galante do estado da Paraíba, Brasil.

3.3. Implicações para conservação e melhoramento genético do algodão

Com base nos dados genéticos apresentados neste estudo, as populações dos dois grupos genéticos precisam ser protegidas para que a diversidade genética total seja mantida, mas como as populações de Quixaba e São Mamede são muito similares geneticamente e geograficamente próximas, ambas podem ser consideradas como uma única população a ser conservada.

Embora as sementes de todas as populações estejam preservadas *ex situ* em um banco de germoplasma, esforços especiais devem ser tomados para auxiliar na sua conservação *on farm*, pois este germoplasma representa uma fonte estratégica de sementes/alelos para formação de novos plantios/populações em seus locais de cultivo tradicional. As populações provenientes de Camalaú e Casserengue apresentaram maior diversidade genética e a maioria das suas características tecnológicas de fibra foi compatível com as de cultivares modernas de algodão upland de boa qualidade. Portanto, ao se considerar as características intrínsecas de fibras, provavelmente, estas populações podem ser as mais adequadas para estudos de melhoramento genético com obtenção de resultados em curto prazo.

4. CONCLUSÕES

As populações divergem em relação a várias características tecnológicas de fibra formando três grupos de similaridade, sendo a maioria das características compatíveis com o padrão esperado para cultivares modernas de algodoeiro. As populações exibem uma baixa diversidade genética intrapopulacional, estão reprodutivamente isoladas pela distância geográfica, formando dois grupos genéticos espacialmente estruturados. Estas informações podem dar suporte à conservação genética das populações de algodoeiro arbóreo e a sua valoração para programas de melhoramento genético.

5. AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001 e da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa Algodão.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AYRES, M.; AYRES JUNIOR, M.; AYRES, D.L.; SANTOS A.S. **Bioestat 5.0 - Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biomédicas**. Belém: ONG Mamiraua, 2007. 364p.
2. BACHELIER, B.; GOURLLOT, J. **A fibra do algodão**. In: BELOT J. (Ed). Manual da qualidade de fibra. Cuiabá: IMAmt, p.29-153, 2018.

3. BOTSTEIN, D.; WHITE, R.L.; SKOLNICK, M.; DAVIS, R.W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **The American Journal of Human Genetics**, v.32, p.314-331, 1980.
4. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 24, de 14 de julho de 2016. **Regulamento Técnico do Algodão em Pluma**. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 15 de julho de 2016. Seção 1, Edição 135, p.3.
5. COELHO, J.D. Produção de algodão. **Caderno setorial ETENE**, v. 2, n.3, 2017.
6. CRUZ, C.D. GENES – a software package for analysis in experimental statistic and quantitative genetics. **Acta Scientiarum**, v. 35, n. 3, p. 271 – 276, 2013.
7. DONGRE, A.B.; BHANDARKAR, M.; BANERJE S. Genetic diversity in tetraploid and diploid cotton (*Gossypium* spp.) using ISSR and microsatellite DNA markers. **Indian Journal of Biotechnology**, v.6, p.349-353, 2007.
8. DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolatin of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v.12, p.13-15, 1987.
9. EARL, D.A.; VONHOLDT, B.M. Structure Harvester: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. **Conservation Genetics Resources**, v.4, n.2, p.359-361, 2012.
10. EMBRAPA. **BRS 200 marron: cultivar de algodão de fibra colorida**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2001.
11. EVANNO, G.; REGNAUT, S. GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. **Molecular Ecology**, v.14, n.8, p.2611-2620, 2005.
12. FREIRE, E.C.; COSTA, J.N.; ANDRADE, F.P. Recursos genéticos e melhoramento do algodão no Nordeste do Brasil. In: Simpósio sobre recursos genéticos no Nordeste. Petrolina, 1997. Disponível em: <http://www.cpatsa.embrapa.br:8080/catalogo/livrorg/algodao.pdf>. Acesso em: 10 de Jan. de 2019.
13. FREIRE, E.C.; SANTOS, M.S.S; MEDEIROS, L.C.; ANDRADE, F.P.; SANTOS, E.O. **Avaliação preliminar da coleção de germoplasmas de algodoeiro arbóreo no nordeste do Brasil**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 1990. 59p.
14. GIBAND, M.; DESSAUW, D.; BARROSO, P. A. V. **Cotton: Taxonomy, origin and domestication**. In: WAKELYN, P. J.; CHAUDHRY, M. R. (Eds.). Cotton: Technology for the 21st. Century. Washington: International Cotton Advisory Committee, p.5-15, 2010.
15. LEWONTIN, R.C. Testing the theory of natural selection. **Nature**, v.236, p.181-182, 1972.
16. MAHALANOBIS, P.C. On the generalised distância in statistics. **Proceedings of the National Institute of Sciences of India**. v.2, n.1, p.49–55, 1936.

17. MCDERMOTT, J.M.; MCDONALD, B.A. Gene flow in plant pathosystem. **Annual Review of Phytopathology**, v.31, p.353-373, 1993.
18. MEDEIROS, A.A.; CANAN, B.; FELIPE, M.G.; BACURAU, M.N.V. A cotonicultura no Estado do Rio Grande do Norte: aspectos históricos e perspectivas. **Redige**, v.3, n.2, 2012.
19. MENEZES, I.P.P.; HOFFMANN, L.V.; BARROSO, P.A.V. Genetic characterization of cotton landraces found in the Paraíba and Rio Grande do Norte states. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.15, p.26-32, 2015.
20. MENEZES, I.P.P.; BARROSO, P.A.V.; HOFFMANN, L.V.; LUCENA, V.S. GIBAND, M. Genetic diversity of mocó cotton (*Gossypium hirsutum* race marie galante) from the northeast of Brazil: implications for conservation. **Botany**, v.8, p.765–773, 2010.
21. MENEZES, I.P.P.; HOFFMANN, L.V.; LIMA, T.H.; SILVA A.R.; LUCENA, V.S.; BARROSO, P.A.V. Genetic diversity of arboreal cotton populations of the Brazilian semiarid: a remnant primary gene pool for cotton cultivars. **Genetics and Molecular Research**, v.16, 2017.
22. MOJENA, R. Hierarchical grouping methods and stopping rules: an evaluation. **The Computer Journal**. v.20, p.359-363,1977.
23. MOREIRA, J.A.N.; BELTRAO, N.E.M.; FREIRE, E.C.; NOVAES FILHO, M.B.; SANTOS, R.F.; AMORIM NETO, M.S. **Decadência do algodoeiro Mocó e medidas para o seu soerguimento no Nordeste brasileiro**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 1997. 20p.
24. NEI, M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.70, n.12, p. 3321-3323,1973.
25. NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics**, v.89, p.90-583, 1978.
26. NOORMOHAMMADI, Y.; HASHEMINEJAD-AHANGARANI, F.; SHEIDAI, M.; GHASEMZADEH-BARAKI, S. Genetic diversity analysis in opal cotton hybrids based on SSR, ISSR, and RAPD markers. **Genetics and Molecular Research**, v.12, p.256-269, 2013.
27. PAULINO, J.S.; GOMES, R.A. Sementes da Paixão: agroecologia e resgate da tradição. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, v.53, n.3, 517-528, 2015.
28. PRITCHARD, J.K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, v.155, n.2, p.945-959, 2000.
29. 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.

30. ROCHA, G.M.G.; CAVALCANTI, J.J.V.; CARVALHO, L.P.; SANTOS, R.C. Genetic divergence of colored cotton based on inter simple sequence repeat (ISSR) markers. **African Journal of Agriculture Research**, v.11, p.2663-2668, 2016.
31. RODRIGUES F., RIBEIRO M.F. Influence of experience on homing ability of foragers of *Melipona mandacaia* Smith (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). **Sociobiology**, v.61, n.4, p.523-528, 2014.
32. SHEIDAI, M.; NOORMOHAMMADI, Z.; SHOJAEI-JESHVAGHANI F.; GHSEMZADEH-BARAKI, S. Simple sequence repeat (SSR) and inter simple sequence repeat (ISSR) analyses of genetic diversity in tissue culture regenerated plants of cotton. **African Journal of Biotechnology**, v.11, p.894-11900, 2012.
33. SILVA, A.G.; PINTO R.S.; CONTRERA, F.A.L.; ALBUQUERQUE, P.M.C., RÊGO, M.M.C. Foraging distance of *Melipona subnitida* Ducke (Hymenoptera: Apidae). **Sociobiology**, v.61, n.4, p.494-501, 2014.
34. SINGH, D. The relative importance of characters affecting genetic divergence. **The Indian Journal of Genetics e Plant Breeding**, v.41, p.237-245, 1981.
35. YEH, F.C.; BOYLE, T.Y.Z.; XIYAN, J.M. **POPGENE version 131: Microsoft Window-based freeware for population genetic analysis**. Edmonton: University of Alberta, 1999

CAPÍTULO 5

A BIOMASSA FOLIAR DO ALGODOEIRO PERENE (*Gossypium hirsutum* r. *marie-galante* Hutch) POSSUI POTENCIAL PARA USO FORRAGEIRO?

RESUMO: A biomassa vegetativa do algodoeiro perene foi um importante recurso alimentar para ruminantes no Semiárido do Nordeste do Brasil até o final do século XX quando a cotonicultura entrou em declínio devido a problemas climáticos, econômicos e o ataque severo de uma praga agrícola. Como a cotonicultura tem retornado para essa região, a biomassa vegetativa poderá voltar a ser uma opção forrageira para alimentação de ruminantes. Dessa forma, objetivou-se com este estudo avaliar as características agronômicas e a composição químico-bromatológica foliar de quatro populações base de algodoeiro perene (*Gossypium hirsutum* r. *marie-galante* Hutch), analisando suas implicações para fins forrageiros. Avaliou-se a altura, o número de folhas e o número de ramos vegetativos das plantas, assim como os teores de proteína bruta, fibra de detergente neutro, fibra de detergente ácido, matéria mineral e matéria seca da biomassa foliar nos estádios vegetativo, florescimento e pós-colheita. A resposta dos caracteres agronômicos varia em função da interação entre os fatores população e estágio fenológico. A biomassa foliar do algodoeiro perene apresenta perfil químico-bromatológico potencialmente apropriado para alimentação de ruminantes em todos os estádios fenológicos, todavia apresenta melhor desempenho no florescimento e na pós-colheita, sendo a população Bulk-04 a que reúne as características agronômicas e químico-bromatológicas desejáveis para fins forrageiros. Para o uso seguro da biomassa foliar na alimentação animal ainda são necessários estudos complementares sobre o consumo, digestibilidade e o teor de gossipol.

PALAVRAS-CHAVE: *Gossypium*. Nutrição animal. Planta forrageira. Proteína. Semiárido.

1. INTRODUÇÃO

A cultura do algodoeiro produz a fibra natural mais importante do mundo para a indústria têxtil e suas sementes são utilizadas como matéria-prima para fabricação de óleo vegetal, ração animal e fertilizante orgânico (Conab, 2019). Após a colheita da fibra, ainda permanecem no campo uma grande quantidade de biomassa constituída por caules, ramos laterais, folhas verdes e secas, além de maçãs imaturas e capulhos remanescentes que apresentam grande potencial de aproveitamento (Huang et al., 2011).

No Brasil, a biomassa do algodoeiro é geralmente destruída ou incorporada ao solo logo após a colheita da fibra como medida profilática para combater pragas e doenças (Ribeiro et al., 2015), mas em países como a China e EUA têm se estudado outras aplicações para esse subproduto da cotonicultura. Alguns dos estudos mais recentes

destacaram a utilização da biomassa vegetativa do algodoeiro como alimentos para ruminantes, bioenergia e fonte de outras matérias primas industriais (He et al., 2017).

Com relação à alimentação animal, a biomassa vegetativa do algodoeiro que permanece no campo após a colheita do algodão em caroço possui maior teor de proteína bruta que a palhada de culturas alimentícias, mas também contém níveis relativamente altos de fibra em detergente neutro e fibra em detergente ácido (Rehemujiang et al., 2016), assim como gossipol livre que é um composto polifenólico potencialmente tóxico a ruminantes (Rehemujiang et al., 2019). Essas limitações podem ser superadas com a fermentação da biomassa vegetativa do algodoeiro que promove a redução os teores de fibras e de gossipol livre e aumenta a digestibilidade para ruminantes (Yongjian et al., 2014; Rehemujiang, et al., 2016).

A utilização da biomassa vegetativa do algodoeiro como recurso forrageiro foi uma prática comum na Região Semiárida do Nordeste do Brasil até a segunda metade do século XX, quando se cultivavam variedades tradicionais de algodoeiro de ciclo perene e porte arbóreo da espécie *Gossypium hirsutum* r. *marie galante* (Hutch.) que eram denominadas localmente de algodoeiros perenes, mocós ou arbóreos (Toscano Neto, 1970; Nogueira & Simões, 2009). Nesse período, a lavoura de algodoeiro perene era considerada um subsistema de produção de forragem, pois logo após a colheita da fibra a mesma era destinada ao pastejo do gado, principalmente, bovinos de corte (Moreira & Targino 1997).

Devido ao declínio da cotonicultura no Semiárido brasileiro esse subsistema de produção de forragem foi por muito tempo esquecido, mas com o retorno da cotonicultura nessa região, a biomassa vegetativa do algodoeiro poderá voltar a ser uma opção forrageira para alimentação de ruminantes.

Dessa forma, objetivou-se com este estudo avaliar as características agronômicas e a composição químico-bromatológica foliar de diferentes populações base de algodoeiro perene (*G. hirsutum* r. *marie-galante*) de origem brasileira.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Localização e caracterização do local do ensaio de campo

Os dados analisados foram provenientes de um ensaio de campo conduzido em uma área de experimentação agrícola pertencente ao Centro de Ciências Agrárias (CCA) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB) no município de Areia, Estado da Paraíba, Brasil. O ensaio foi realizado entre os meses de março e novembro de 2017, tendo duração de 240 dias, sendo registrada durante este período a temperatura média de 22 °C, umidade relativa do ar média de 85% e precipitação pluvial acumulada de 1162,4 mm. Esses dados foram gentilmente cedidos pela estação meteorológica da UFPB/CCA localizada que fica há 4 km de distância da estação experimental.

A análise química do solo (camada de 0,0- 20 cm) da área experimental apresentou os seguintes resultados: pH = 6,2, P=146.55 mg.dm⁻³, K⁺ = 109,41 cmol_c.dm⁻³, Na⁺ = 0,08 cmol_c.dm⁻³, H+Al⁺³=0.50 cmol_c.dm⁻³, Al⁺³ = 0,10 cmol_c.dm⁻³, Ca⁺² = 0,88 cmol_c.dm⁻³, Mg⁺² = 0,30 cmol_c.dm⁻³, Matéria orgânica = 11,24 g.kg⁻¹, indicando que o solo apresentava-se adequado para a cultura do algodoeiro.

2.2. Design experimental e gerenciamento do ensaio de campo

O ensaio foi conduzido em esquema fatorial (4x3), sendo o primeiro fator referente a quatro populações base de algodoeiro perene (selecionadas pelo método bulk) e o segundo fator por três estádios fenológicos. Adotou-se o delineamento em blocos casualizados com quatro repetições. As parcelas eram compostas por 30 plantas, sendo a área útil da parcela composta pelas cinco plantas centrais.

O preparo do solo foi realizado por meio de aração e gradagem e as covas de plantio foram abertas manualmente com uso de enxada considerando o espaçamento de 1,0 m entre plantas e 1,5 m entre fileiras. Na semeadura foram utilizadas sementes provenientes de quatro populações base de algodoeiro perene: Bulk Camalaú/2017 (Bulk-01), Bulk São mamede/2017 (Bulk-02), Bulk Quixabá/2017 (Bulk-03) e Bulk Casserengue/2017 (Bulk-04) que foram cedidas pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa Algodão sediada na cidade de Campina Grande, Estado da Paraíba, Brasil. Foram semeadas três sementes por cova, mas apenas uma das plântulas que germinaram foi deixada no estande final.

O ensaio foi conduzido em sistema de sequeiro com o emprego de práticas de manejo clássicas para a cultura incluindo: poda à altura de 70 cm do solo aos 120 dias após a semadura para reduzir o porte e quebrar a dominância apical da planta e eliminação da vegetação espontânea por meio de capina manual.

2.3. Variáveis avaliadas

As avaliações dos caracteres agrônômicos e a coleta de amostras foliares para determinação da composição químico-bromatológica foram realizadas aos 65, 135 e 225 dias após a poda, que corresponderam, respectivamente, aos estádios fenológicos vegetativo, florescimento e pós-colheita. A duração de cada estágio fenológico foi determinada em dias conforme o sistema de referência para algodoeiro elaborado por Marur & Ruano (2001).

Para caracterização agrônômica foi mensurada a altura das plantas (AP) e contabilizado o número de folhas (NF) e o número de ramos vegetativos (NRV) das plantas em cada estágio fenológico. Para determinação da composição químico-bromatológica as amostras de folhas foram secas a 55° por 72 h em estufa de secagem com circulação forçada de ar. Após a secagem, as amostras foram moídas em moinho de facas (Wiley, AH Thomas, Filadélfia, PA, EUA) equipado com uma peneira de 1 mm.

A partir das amostras moídas determinou-se: Matéria seca (MS), Matéria mineral e Proteína bruta (PB) pelos métodos 934,07; 942,05 respectivamente, de acordo com a Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 1995). A Fibra em detergente neutro (FDN) e a Fibra em detergente ácido (FDA) foram determinadas de acordo com a metodologia de Van Soest et al. (1991). As determinações foram realizadas em duplicada e os resultados finais foram expressos em gramas por quilograma de matéria seca (g.kg^{-1}).

2.4. Análise dos dados

Os dados atenderam aos pressupostos para análise paramétrica, então foram submetidos ao teste F ($p < 0,05$) da Análise de Variância (ANOVA) sendo analisados em esquema fatorial (4x3) com parcelas subdivididas (fator população na parcela principal e o fator estágio fenológico nas subparcelas). Quando efeitos significativos foram detectados, aplicou-se o teste de Tukey ($p < 0,05$) para diferenciar as médias. A relação entre as variáveis foram testadas pela correlação simples de Pearson (r), mas apenas as relações significativas ($p < 0,05$) e com coeficientes de alta magnitude ($r = 0,70$ a $1,00$) foram consideradas na discussão dos dados. Essas análises foram realizadas com o programa estatístico AgroEstat versão 1.1.0.711 (Barbosa e Maldonado Junior, 2015).

Para fins exploratórios utilizou-se a Análise de componentes principais (ACP) implementada no software estatístico PAST 4.0 (Hammer et al., 2001).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com a ANOVA (Tabela 1), verificou-se que houve interação ($p < 0,05$) entre os fatores população x estágio fenológico para as variáveis PB, FDA, MM, MS, AP, NF, NRV. Todavia, não houve interação ($p > 0,05$) entre esses fatores para as variáveis FDN e AL.

Tabela 1. Valores de quadrado médio e significância do teste F da ANOVA para caracteres agrônômicos e químico-bromatológicos de algodoeiro perene em função dos fatores população (P), estágio fenológico (E) e a interação população x estágio fenológico (P x E)

FV	GL	PB	FDN	FDA	MM	MS	AP	NF	NRV
Bloco	3	1,94 ^{ns}	4,65 ^{ns}	5,01 ^{**}	0,11 ^{ns}	0,61 ^{ns}	575,78 ^{ns}	1118,22 ^{ns}	36,89 ^{ns}
População	3	1,59 ^{ns}	41,11 ^{**}	9,27 ^{ns}	0,74 ^{ns}	1,31 ^{ns}	824,44 ^{ns}	5837,76	211,24
Resíduo	9	1,53	2,71	0,94	1,04	0,879	1013,11	498,25	7,67
Parcela	15	-	-	-	-	-	-	-	-
Estádio	2	95,65 ^{**}	157,60	59,98 ^{**}	131,10	158,33	15652,05	398099,03	1312,82
P x E	6	3,93 [*]	9,36 ^{ns}	8,63 [*]	8,05 ^{**}	2,13 ^{**}	89,19 ^{ns}	1640,44 ^{**}	88,42 ^{**}
Resíduo	24	1,15	4,03	0,73	1,38	0,38	127,26	163,47	10,07
Total	47	-	-	-	-	-	-	-	-
CV % (P)	-	7,63	5,98	7,38	8,53	1,03	14,99	10,09	7,86
C V % (F)	-	6,63	7,30	6,50	9,83	0,68	8,855	5,78	9,01

ANOVA: não significativo = ns, significativo a 5% = * e significativo a 1% = ** de probabilidade pelo teste F. FV = fonte de variação; GL = grau de liberdade; CV = coeficiente de variação; PB = proteína bruta; FDN = fibra de detergente neutro; FDA = fibra de detergente ácido; MM = matéria mineral; MS = matéria seca, AP = altura de planta; NF = número de folhas; NRV = número ramos vegetativos; NRR = número de ramos reprodutivos.

A altura das plantas não diferiu entre as populações ($p > 0,05$), mas variou entre os estádios fenológicos ($p < 0,05$), tendo as plantas apresentado maior altura na pós-colheita (Tabela 2). Essa resposta era esperada, pois o algodoeiro perene possui hábito de crescimento indeterminado (Silva et al., 2011).

Tabela 2. Valores médios de altura, número de folhas e número de ramos vegetativos das plantas de quatro populações de algodoeiro perene em diferentes estádios fenológicos

Estádio fenológico (F)	População (P)				Média (E)
	Bulk-01	Bulk-02	Bulk-03	Bulk-04	
.....Altura (cm.planta ⁻¹).....					
Vegetativa	93,2	94,9	104,8	99,9	98,2 C
Florescimento	115,8	119,3	133,3	125,5	123,5 B
Pós-colheita	144,2	162,6	175,4	159,5	160,4 A
Média (P)	117,7	125,6	137,8	128,3	
.....Folhas (número.planta ⁻¹).....					
Vegetativa	120,4 bB	126,7 bB	123,5 bB	164,7 aB	133,8
Florescimento	373,2 bA	369,0 bA	449,7 aA	420,6 aA	403,1
Pós-colheita	103,1bB	121,5 abB	134,0 abB	146,1 aB	133,8
Média (P)	198,9	205,7	235,7	243,8	
.....Ramos vegetativos (número.planta ⁻¹).....					
Vegetativa	23,5 cB	31,7 bB	34,2 bB	42,7 aA	33,1
Florescimento	44,8 bA	40,6 bA	43,3 bA	51,8 aA	45,1
Pós-colheita	23,2 bB	26,0 abC	30,2 aB	30,1 aB	27,4
Média (P)	30,5	32,8	38,7	38,7	

Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na linha e maiúscula na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Verificou-se que o número de folhas das populações Bulk-03 e Bulk-04 foram maiores do que nas demais populações no estágio de florescimento. A população Bulk-04 também apresentou número de ramos vegetativos superior às demais populações nos estádios vegetativo e de florescimento (Tabela 2).

Uma maior quantidade de folhas e ramos vegetativos por planta é um atributo desejável em algodoeiro para fins forrageiros, pois esse órgão contém os principais nutrientes exigidos na dieta dos ruminantes (Rehemujiang et al., 2016). Embora a quantidade de folhas no estágio pós-colheita tenha sido menor em relação ao estágio de florescimento, as plantas ainda conservavam cerca de 30% da folhagem que é uma quantidade considerável de biomassa a ser aproveitada como forragem.

Ao analisar os caracteres químico-bromatológicos, constatou-se que o teor de matéria seca (MS) da biomassa foliar de todas as populações foi mais elevado no estágio vegetativo (Tabela 3), pois a MS costuma reduzir na medida em que a planta envelhece. Não houve diferença no teor de MS das populações no estágio de pós-colheita, mas o da população Bulk-01 no estágio de florescimento foi superior ao das demais (Tabela 3). Embora o maior teor de MS tenha sido obtido no estágio vegetativo, estima-se que uma maior produtividade de MS (kg ha⁻¹) poderá ser obtida no estágio de florescimento, pois o número de folhas neste estágio foi cerca de três vezes maior.

Tabela 3. Valores médios dos teores de matéria seca, matéria mineral, proteína bruta, fibra em detergente neutro e fibra em detergente ácido das folhas de quatro populações de algodoeiro perene em diferentes estádios fenológicos

Estádio fenológico (E)	População (P)				Média (E)
	Bulk-01	Bulk-02	Bulk-03	Bulk-04	
.....Matéria seca (g.kg ⁻¹ MF).....					
Vegetativa	125,8 aA	128,9 aA	131,5 aA	134,4 aA	130,2
Florescimento	108,6 aB	90,9 bB	84,4 bB	96,6 bB	95,1
Pós-colheita	62,9 aC	70,4 aC	64,2 aC	71,9 aC	67,4
Média (P)	99,1	96,8	93,4	101	
.....Matéria mineral (g.kg ⁻¹ MS).....					
Vegetativa	100,6 aB	97,1 abB	80,4 abB	78,6 bC	89,0
Florescimento	101,6 bB	127,3 aA	137,8 aA	122,2 bB	122,0
Pós-colheita	149,1 aA	144,0 aA	136,5 aA	155,2 aA	146,0
Média (P)	117,1	122,8	118,2	119,0	
.....Proteína bruta (g.kg ⁻¹ MS).....					
Vegetativa	143,2 aB	149,9 aB	156,1 aB	145,8 aB	148,0
Florescimento	176,9 bA	190,3 abA	199,9 aA	194,0 abA	190,0
Pós-colheita	152,5 abB	156,1 aB	133,2 bC	148,4 abB	147,0
Média (P)	157,0	165,0	163,0	163,0	
.....Fibra em detergente neutro (g.kg ⁻¹ MS).....					
Vegetativa	271,0	257,1	271,8	231,7	258,2 B
Florescimento	309,2	287,4	344,0	303,1	311,0 A
Pós-colheita	248,8	269,8	277,6	225,0	255,3 B
Média (P)	276,3 B	271,4 BC	298,3 A	253,3 C	
.....Fibra em detergente ácido (g.kg ⁻¹ MS).....					
Vegetativa	146,4 aA	135,0 abA	151,7 aB	119,0 bB	138,0
Florescimento	138,0 bA	139,1 bA	173,0 aA	135,4 bA	146,0
Pós-colheita	101,8 bB	125,4 aA	98,0 bC	104,6 bB	109,0
Média (P)	131,0	133,0	140,0	120,0	

MF = matéria fresca; MS = matéria seca. Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na linha e maiúscula na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Os maiores teores de matéria mineral (MM) foliar foram verificados nos estádios de florescimento e pós-colheita para as populações Bulk-02 e Bulk-03 e apenas no estágio de pós-colheita nas populações Bulk-01 e Bulk-04 (Tabela 3) que pode ser explicado pelo acúmulo de minerais nas folhas ao longo do ciclo de vida da planta, atingindo valores máximos geralmente na fase reprodutiva. Em algodoeiro herbáceo, o acúmulo máximo de nutrientes minerais ocorreu entre 120 e 190 dias após a semadura, coincidindo com os estádios de florescimento e frutificação (Vieira et al. 2018), como observado neste estudo para as populações de algodoeiro perene. Todavia, a variação no teor de MM verificada entre as populações, para um mesmo estágio fenológico, sugere que existe divergência genética interpopulacional para este caractere.

O teor de proteína bruta (PB) foliar das populações foi maior no estágio de florescimento (Tabela 3). Embora a população Bulk-01 tenha apresentado teor de PB inferior às demais neste estágio, todas elas apresentaram teor de PB acima de 7,0% (70,0 g.kg⁻¹) que é mínimo recomendado para plantas forrageiras destinadas a alimentação de ruminantes (Souza et al. 2013). Os teores de PB encontrados nas folhas de algodoeiro perene neste estudo (PB = 147,0 – 190,0 g.kg⁻¹) foram mais elevados do que os observados em algodoeiro herbáceo (PB = 112,0 g.kg⁻¹) (Rehemujang et al., 2016) e em plantas forrageiras usadas para alimentação de ruminantes no Semiárido brasileiro incluindo

estilosantes (PB = 118,8 g.kg⁻¹), capim-buffel (PB = 30,04 - 120,0 g.kg⁻¹) e a palma-forrageira (PB = 86,0 g.kg⁻¹) (Monção et al., 2011; Silva et al., 2013; Silva et al., 2015), sugerindo que a biomassa foliar do algodoeiro perene pode entrar na dieta dos rebanhos como fonte proteica.

A fibra em detergente neutro (FDN), que é composta pelos principais constituintes da parede celular (celulose, hemicelulose e lignina) das folhas foi mais elevada na população Bulk-03 no estágio de florescimento e entre as. A fibra em detergente ácido, que engloba apenas os componentes menos digestíveis (celulose e lignina) das folhas, também diferiu entre os estádios fenológicos, com os menores teores verificados nas populações Bulk-03 e Bulk-04 no estágio vegetativo e as populações Bulk-01, Bulk-03 e Bulk-04 na pós-colheita (Tabela 3).

A fibra é um constituinte indispensável no manejo nutricional dos ruminantes, pois está diretamente envolvida no metabolismo energético e na saúde dos animais, pela atuação na manutenção do ambiente ruminal (Alves et al., 2016). Quanto mais alto o teor de FDN maior será o valor energético da forragem e enquanto maior o teor de FDA menor a digestibilidade da forragem, todavia, não deve ultrapassar 21% (210,0 g kg⁻¹) da matéria seca da dieta para ruminantes (Rodrigues, 2010). Os valores médios de FDA nas folhas de algodoeiro perene observados neste estudo (FDA = 119,6 - 140,9 g kg⁻¹) podem ser considerados baixos quando comparados ao de outras forrageiras, incluindo gramíneas (FDA = 311,6 - 469,8 g kg⁻¹) (Fioreli et al., 2018) e leguminosas como amendoim forrageiro (FDA = 242,1 g kg⁻¹), sugerindo que a biomassa foliar de algodoeiro perene apresentou teor de FDA apropriado para alimentação de ruminantes.

Ao analisar a relação entre variáveis verificou-se que os caracteres agronômicos NF e AL se correlacionaram ($p < 0,05$) com caracteres químico-bromatológicos PB, FDN e MS (Tabela 4). Os coeficientes de correlação entre PB x NF ($r = 0,847$), FDN x NF ($r = 0,709$) e MS x AL ($r = 0,807$) foram altos e significativos ($p < 0,01$) e indicam forte correlação positiva entre esses caracteres (Tabela 4). A existência de colinearidade entre esses caracteres indica que os teores de PB, FDN e MS nas folhas do algodoeiro perene possuem forte associação com os caracteres agronômicos NF e AL que pode ser explorada em estudos alométricos futuros.

Tabela 4. Análise de correlação entre caracteres agronômicos e químico-bromatológicos das folhas de algodoeiro perene

	PB	FDN	FDA	MM	MS	NF	NRV	AP
PB	-							
FDN	0,630**	-						
FDA	0,534**	0,652**	-					
MM	-0,145 ^{ns}	-0,114 ^{ns}	-0,301**	-				
MS	0,070 ^{ns}	0,053 ^{ns}	-0,391**	0,878**	-			
NF	0,847**	0,709**	0,489**	0,069 ^{ns}	0,049 ^{ns}	-		
NRV	0,681**	0,480**	0,398**	-0,250 ^{ns}	-0,232 ^{ns}	0,770**	-	
AL	-0,074 ^{ns}	-0,059 ^{ns}	-0,450**	0,657**	0,807**	0,087 ^{ns}	-0,195 ^{ns}	-

Análise de correlação: não significativo = ns, significativo a 1% = ** pelo teste *F*. MM = matéria mineral; PB = proteína bruta; FDN = fibra em detergente neutro; FDA = fibra de detergente ácido; NF = número de folhas, NRR = número de ramos reprodutivos, AP = altura de planta.

As diferenças entre as populações de algodoeiro perene no que se refere aos caracteres agronômicos e químico-bromatológicos sugere que as mesmas apresentam perfis morfo-agronômicos e químico-bromatológicos distintos. De fato, a análise exploratória dos dados usando ACP revelou que as populações de algodoeiro perene foram claramente discriminadas no espaço das PCs com base em suas características agronômicas e químico-bromatológicas, indicando que as variáveis estudadas possuem alto poder discriminatório (Figura 1).

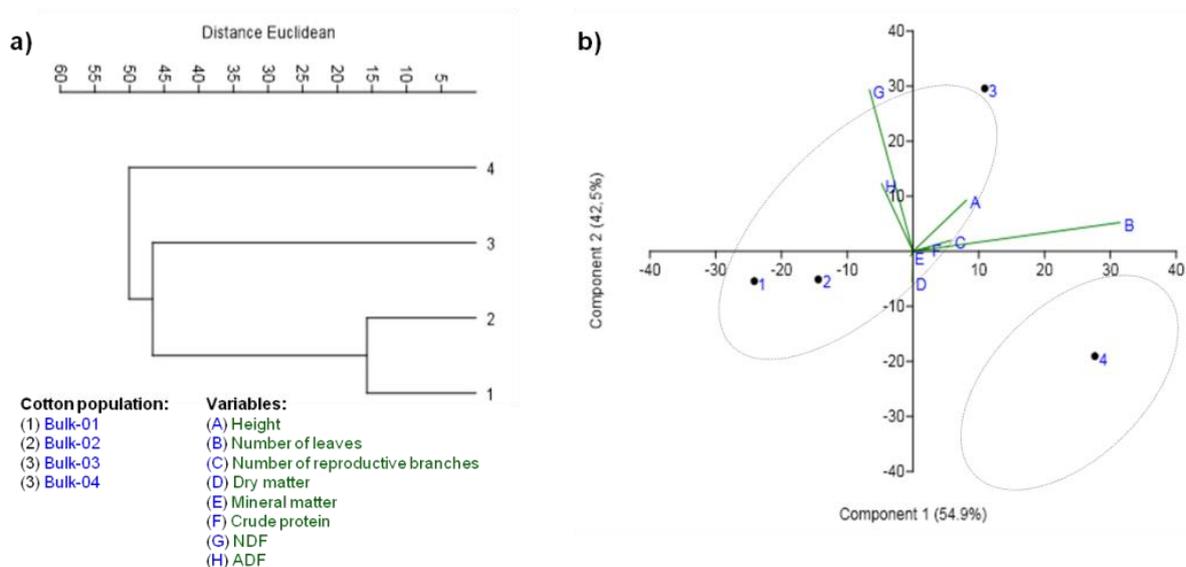


Figura 1. Abordagem estatística multivariada (a - Análise de agrupamento e b - Análise de Componentes Principais) para quatro populações base de algodoeiro perene brasileiro baseada em variáveis agronômicas e químico-bromatológicas.

Ao analisar a distribuição das populações de algodoeiro perene nos espaços das PCs pode-se verificar que os valores mais elevados de NF, MS, MM e PB estavam associados à população Bulk-04 e de FDN e FDA com a população Bulk-03. As variáveis associadas à população Bulk-04 são as mais relevantes, sugerindo que esta população reúne as características agronômicas e químico-bromatológicas mais desejáveis para fins forrageiros.

4. CONCLUSÕES

A resposta dos caracteres agronômicos varia em função da interação entre os fatores população e estágio fenológico. A biomassa foliar do algodoeiro perene apresenta perfil químico-bromatológico potencialmente apropriado para alimentação de ruminantes em todos os estágios fenológicos, todavia o melhor desempenho foi observado no florescimento e pós-colheita. A população Bulk-04 reúne as características mais desejáveis para fins forrageiros. Para determinar o potencial forrageiro do algodoeiro perene ainda são

necessários estudos complementares sobre o consumo, digestibilidade e o teor de gossipol da biomassa foliar.

5. AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio do Programa de Pós-graduação em Agronomia da Universidade Federal da Paraíba e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALVES, A.R.; PASCOAL, L.A.F.; CAMBUÍ, G.B.; TRAJANO, J.S.; SILVA, C.M.; GOIS, G.C. Fibra para ruminantes: aspecto nutricional, metodológico e funcional. **Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.10, n.7, p.568-579, 2016.
2. AOAC - Association of official analytical chemists. **Official methods of analysis of AOAC international**. 16 ed. Washington DC: Virgini, 1995.
3. BARBOSA, J.C.; MALDONADO JÚNIOR, W. **AgroEstat - Sistema para análises estatísticas de ensaios agrônômicos, versão 1.1.0.711**. Jaboticabal: Unesp, 2015.
4. CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. **Perspectivas para a agropecuária**. Brasília: CONAB, 2019. v.7, p.100.
5. FIORELI, A.B.; ZIECH, M.F.; FLUCK, A.C.; GEREI, J.C.; COL, D.; BERNS, L.; HOFFMANN, F., COSTA, O.A.D. Nutritive value of grasses of genus *Cynodon* mixed with forage peanut. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.70, n.6, p.1970-1978, 2018.
6. HAMMER, O.; HARPER, D.A.T.; RYAN, P.D. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. **Palaeontologia Electronica**, v.4, n.1, p.9, 2001.
7. HE, Z.; ZHANG, H.; TEWOLDE, H.; SHANKLE, M. Chemical characterization of cotton plant parts for multiple uses. **Agricultural & Environmental Letters**, v.2, n.1, p.1-5, 2017.
8. HUANG, W.; ZHIHUI, B.; HOEFEL, D.; HU, Q.; XIN, L.V.; ZHUANG, G.; XU, S.; QI, H.; ZHANG, H. Effects of cotton straw amendment on soil fertility and microbial communities. **Frontiers of Environmental Science and Engineering**, v.6, n.3, p.336-349, 2011.
9. MARUR, C.J.; RUANO, O. A reference system for determination of developmental stages of upland cotton. **Revista de oleaginosas e fibrosas**, v.5, n.2, p.313-3-17, 2001
10. MONÇÃO, F.P.; OLIVEIRA, E.R.; TONISSI, R.H.; GOES, B. The buffel. **Revista Agrária**, v.4, n.11, p.258-264, 2011.

11. MOREIRA, E.; TARGINO, I. **Capítulos de geografia agrária da Paraíba**. João Pessoa: Editora universitária, 1996. p.280.
12. NOGUEIRA, F.R.B.; SIMÕES, S.V.D. Uma abordagem sistêmica para a agropecuária e a dinâmica evolutiva dos sistemas de produção no nordeste semiárido. **Revista Caatinga**, v.22, n.2, p.01-06, 2009.
13. REHEMUJIANG, H.; YIMAMU, A.; WANG, Y.L. Effect of dietary cotton stalk on nitrogen and free gossypol metabolism in sheep. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v.32, n.2, p.233-240, 2019.
14. RENEMUJIANG, H.; YIMAMU, A.; MAIMAITI, R. The cotton stalk and its utilization as ruminant feed resource. **Asian Agricultural Research**, v.8, n.9, p.1-5, 2016.
15. RIBEIRO, E.B.; CASTELLANI, M.A.; SILVA, C.A.D.; MELO, T.L.; SILVA, G.S.; VALE, W.S.; SANTOS, A. S. Métodos de destruição de restos de cultura do algodoeiro e sobrevivência do bicudo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.50, n.11, p.993-998, 2015.
16. RODRIGUES, R.C. **Métodos de análises bromatológicas de alimentos: métodos físicos, químicos e bromatológicos**. 1 ed. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2010. 117p.
17. SILVA, A.P.G.; SOUZA, C.C.E.; RIBEIRO, J.E.S.; SANTOS, M.C.G.; PONTES, A.L.S.; MADRUGA, M.S. Características físicas, químicas e bromatológicas de palma gigante (*Opuntia ficus-indica*) e miúda (*Nopalea cochenillifera*) oriundas do estado da Paraíba. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v.9, n.2, p.1810-1820, 2015.
18. SILVA, I.P.F.; JUNIOR, J.F.S.; ARALDI, R.; TANAKA, A.A.; GIROTTO, M.; BOSQUÊ, G.G.; LIMA, F.C.C. Estudo das fases fenológicas do algodão (*Gossypium hirsutum* L.). **Revista Científica Eletrônica de Agronomia**, v.5, n.20, 2011.
19. SILVA, M.S.J.; JOBIM, C.C.; NASCIMENTO, W.G.; FERREIRA, G.D.G.; SILVA, M.S.; TRÊS, T.T. Estimate of production and nutritional value of *Stylosanthes* hay cv. Campo Grande. **Semina: Ciências Agrárias**, v.34, n.3, p.1363-1380, 2013.
20. SOUZA, L.V.S. Qualidade nutricional de plantas forrageiras de ocorrência natural na Catinga. **Enciclopédia Biosfera**, v.9, n.6, p.178-185, 2013.
21. TOSCANO NETO, J. M. **Manutenção e engorda de bovinos para corte em pastagem com algodão moco em bosques densos**. Cruzeta: Estação Experimental do Seridó, 1970. p.24.
22. VAN SOEST, P.J., ROBERTSON, J.B., LEWIS, B.A. Methods for dietary fiber, and nonstarch polysaccharides in relations to animal nutrition. **Journal of Dairy Science**, v.74, n.10, p. 3583-3597, 1991.

23. VIEIRA, J.L.V.; NARDI, K.T.; SILVA, G.R.A.; MOREIRA, L.A.; ZAVASCHI, E.; MOURA, T.A.; OTTO, R. Nutrient uptake by high-yielding cotton crop in Brazil. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.42, 2018.
24. YONGJIAN, Z.; LEILEI, H.; JIAN, D.; LIN, L.; WEIDONG, C.; FAQIANG, Z.; ZHONGSHOU, X. Processing and utilization of cotton stalk fermented feed in Xinjiang. **Agricultural Engeneering**, v.6, p.40-43, 2014.