

FOL 05440
2001
FL-05440

**Desenvolvimento e uso de marcadores
microssatélites na análise da
variabilidade genética de ecótipos
de coqueiro (*Cocos nucifera* L.)**

República Federativa do Brasil

Fernando Henrique Cardoso
Presidente

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Marcus Vinicius Pratini de Moraes
Ministro

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

Conselho de Administração

Márcio Fortes de Almeida
Presidente

Alberto Duque Portugal
Vice-Presidente

Dietrich Gerhard Quast
José Honório Accarini
Sérgio Fausto
Urbano Campos Ribeiral
Membros

Diretoria-Executiva da Embrapa

Alberto Duque Portugal
Diretor-Presidente

Dante Daniel Giacomelli Scolari
Bonifacio Hideyuki Nakasu
José Roberto Rodrigues Peres
Diretores-Executivos

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Luiz Antonio Barreto de Castro
Chefe-Geral

Arthur da Silva Mariante
Chefe-Adjunto de Administração

Clara Oliveira Goedert
Chefe-Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento

José Manuel Cabral Sousa Dias
Chefe-Adjunto de Comunicação, Negócios e Apoio

FOL
5440

Embrapa

ISSN 1676 - 1340

Dezembro, 2001

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro Nacional de Pesquisa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

**Boletim de Pesquisa
e Desenvolvimento 16**

**Desenvolvimento e uso de
marcadores microssatélites na
análise da variabilidade genética
de ecótipos de coqueiro (*Cocos
nucifera* L.)**

Márcio de Carvalho Moretzsohn
Paulo Jorge Araújo Coelho
Zilneide Pedrosa de Souza Amaral
Alexandre Pucci Hercos
Evandro Almeida Tupinambá

Brasília, DF
2001

19288

Sumário

Resumo	7
Abstract	9
Introdução	11
Material e Métodos	13
Material experimental e extração de DNA	13
Cõnstrução de biblioteca genômica enriquecida para SSR	14
Seqüenciamento dos clones positivos e desenho de primers	15
Triagem de primers polimórficos e PCR dos locos SSR	15
Análise dos dados	16
Resultados e Discussão	16
Desenvolvimento de microssatélites e triagem de primers	16
Caracterização dos marcadores microssatélites	17
Variabilidade genética de ecótipos de <i>Cocos nucifera</i>	19
Conclusão	22
Referências Bibliográficas	22

Desenvolvimento e uso de marcadores microssatélites na análise da variabilidade genética de ecótipos de coqueiro (*Cocos nucifera* L.)

Resumo

O coqueiro (*Cocos nucifera* L.) é uma planta de grande importância nas regiões tropicais úmidas, onde é cultivada tanto comercialmente como para subsistência. No entanto, pouco se sabe sobre a quantidade e distribuição da variabilidade genética entre e dentro os diversos ecótipos existentes, principalmente, os brasileiros. Marcadores microssatélites ou SSR (Simple Sequence Repeats) constituem uma das técnicas mais indicadas para estudos desta natureza, por serem codominantes, abundantes, aparentemente distribuídos por todo o genoma, multi-alélicos, dependentes de pequena quantidade de DNA e baseados em PCR. Os objetivos deste trabalho foram: (1) desenvolver e caracterizar marcadores microssatélites em ecótipos de coqueiro e (2) analisar a variabilidade genética entre e dentro ecótipos de coqueiro gigante e anão, mantidos no Banco Ativo de Germoplasma de Coco, da Embrapa Tabuleiros Costeiros, através de marcadores microssatélites. Foram analisadas de 9 a 10 plantas de cada um de 7 ecótipos de gigante e 3, de coqueiro anão. Dezesesseis primers SSR, desenvolvidos no Laboratório de Genética Vegetal da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, foram incluídos nestas análises. Desses, 3 mostraram-se monomórficos e 3 não apresentaram resoluções de bandas satisfatórias. Para os demais 10 primers, de 2 a 14 alelos por loco foram detectados, com uma média de 8,25. A heterozigosidade variou de 0,472 a 0,867, com uma média de 0,686 entre os ecótipos de gigante (alógamos), enquanto a diversidade gênica variou de 0,000 a 0,771, com uma média de

0,371 entre os ecótipos de anão (autógamos). Bandas específicas para cada variedade e para determinados ecótipos foram observadas nesta análise.

No entanto, quase todos os alelos encontrados nos ecótipos anões foram também detectados nos gigantes, sugerindo que os anões originaram-se a partir de populações de gigantes. A análise de agrupamento (UPGMA) evidenciou a formação de três grupos principais, um contendo os ecótipos da variedade anão, o outro com ecótipos asiáticos da variedade gigante, e o terceiro, com os ecótipos brasileiros e africanos da variedade gigante. Ecótipos da variedade anão, provenientes do Brasil e da Ásia, mostraram maior similaridade com ecótipos gigantes da Ásia, do que com os ecótipos gigantes brasileiros. Esses resultados corroboram a hipótese de que o coqueiro anão originou-se na Ásia. Apesar dos ecótipos gigantes brasileiros estarem num nível de caracterização genética e agrônômica inferior, em relação aos ecótipos asiáticos, seria estratégico para o melhoramento, planejar cruzamentos entre os genótipos anões com gigantes brasileiros, geneticamente mais distantes, para obtenção de maiores ganhos genéticos.

Termos para indexação: *Cocos nucifera*, Microsatélites, Variabilidade genética, Germoplasma.

Development and use of microsatellite markers for genetic variability analysis of coconut ecotypes (*Cocos nucifera* L.).

Abstract

Coconut (*Cocos nucifera* L.) is an important crop in humid tropical regions, where it is cultivated for both commercial oil production and as a subsistence crop. However, little is known about the quantity and distribution of the genetic variability among and within the several coconut ecotypes, specially the Brazilian ones. Microsatellite markers or SSR (Simple Sequence Repeats) are ideal tools for such studies, as they are co-dominant, abundant, uniformly dispersed throughout plant genomes, multiallelic, dependent on low DNA amount, and PCR-based markers. The objectives of the present work were to: (1) develop and characterize microsatellite markers for coconut, and (2) analyze the genetic variability among and within Tall and Dwarf coconut ecotypes, maintained at the Coconut Active Germplasm Bank, of Embrapa Tabuleiros Costeiros, using microsatellite markers. Nine to 10 plants were analyzed from each of 7 Tall and 3 Dwarf ecotypes. Sixteen SSR primers, developed at Plant Genetics Laboratory, of Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, were included in the analysis. Of these, 3 primers showed to be monomorphic and 3 did not amplify clear fragments. For the other 10 primers, between 2 to 14 alleles per locus were detected, with an average of 8.25. Heterozygosity ranged from 0.472 to 0.867, with an average of 0.686 for the Tall ecotypes (allogamous), while gene diversity (h) ranged from 0.000 to 0.771, with an average of 0.371 for the Dwarf ecotypes (autogamous). Specific alleles were found for each variety and for some ecotypes. However, almost all alleles detected on Dwarf ecotypes were

also detected on Tall ecotypes, suggesting that Dwarf ecotypes were originated from Tall populations. Cluster analysis (UPGMA) evidenced three main groups: one containing the Dwarf ecotype samples, one with the Asian Tall samples, and a third group formed by the Brazilian and African Tall ecotypes. Brazilian and Asian Dwarf ecotypes showed higher similarity values to Asian Tall ecotypes than they did to Brazilian Tall ecotypes. These results corroborate the hypothesis of an Asian origin for the Dwarf variety. Despite of the fact that the Brazilian Tall ecotypes are not genetically and agronomically so well characterized as the Asian ecotypes, it should be fundamental for breeding programs the planning of crosses between the Dwarf genotypes and Brazilian Tall genotypes, genetically distant, in order to obtain higher genetic gains.

Introdução

O coqueiro (*Cocos nucifera* L.) é uma cultura de grande importância nas regiões tropicais úmidas, onde é utilizada tanto comercialmente, como para subsistência. Neste particular, o coqueiro oferece uma rica fonte alimentar, onde outros cultivos são inviáveis, além de uma grande diversidade de usos artesanais. Dentre os produtos explorados da planta, a copra (albúmen desidratado) apresenta o maior valor comercial no mercado externo (Cuenca, 1994). No Brasil, o coqueiro é cultivado numa área de aproximadamente 250.000 ha, produzindo 1.822.479 toneladas (FAO, 2000). Isso equivale a cerca de 10% da produção de países como a Indonésia, Filipinas e Índia, que são os maiores produtores mundiais. Com isso, o Brasil, apesar do grande potencial para o cultivo do coco, mostra-se pouco competitivo no mercado internacional. Os produtos mais importantes, comercializados nacionalmente, são o coco "in natura", o coco ralado e a água de coco.

Cocos nucifera é uma monocotiledônea, pertencente à família Arecaceae (Palmae), sendo a única espécie do gênero. O sudoeste asiático é considerado o centro de origem da espécie, por ser onde ocorre a maior variabilidade morfológica e molecular e se observa a maior diversidade no uso da planta (Harries, 1978; Lebrun et al., 1998b). A disseminação da espécie ocorreu pela flutuação de frutos em correntes oceânicas e/ou pela dispersão humana, por diversas regiões, incluindo a Ásia Ocidental, ilhas do Pacífico, África e Américas Central e do Sul (Harries, 1978; Ohler, 1984). A disseminação para a costa atlântica da África e América ocorreu após a descoberta do Cabo da Boa Esperança, como consequência das navegações mercantis do século XVI (Persley, 1992). Purseglove (1985) sugere uma teoria alternativa para a evolução do coqueiro, a partir de um ancestral proveniente da América do Sul e posterior dispersão para a Polinésia, através de correntes marinhas. As prováveis causas da diferenciação de populações de coqueiro foram o isolamento geográfico, hibridação introgressiva, mutação e seleção (Perera et al., 2000). Além disto, o modelo de dispersão do coco, provavelmente, resultou em efeitos de fundador, que influenciaram na diferenciação de populações (N'Cho et al., 1993).

C. nucifera apresenta mais de 300 variedades populacionais (Coconut Genetic Resources Network Database, v. 2.2 - COGENT/IPGRI), denominadas ecótipos, que podem ser agrupados em dois tipos principais, o gigante e o anão.

O gigante possui rápido crescimento, alta produtividade, com frutos variando de tamanho médio a grande, florescimento tardio e é preferencialmente alógamo. O anão apresenta crescimento mais lento, produz muitos frutos de tamanho pequeno, com menor produtividade para copra, é mais precoce e geralmente autógamo (Siqueira et al., 1994). No Brasil, as pesquisas com coqueiro são conduzidas, principalmente, pela Embrapa Tabuleiros Costeiros (CPATC), em Sergipe, onde se encontra o Banco Ativo de Germoplasma de Coco (BAG-Coco). Nessa coleção são mantidos treze ecótipos de coqueiro gigante e seis do tipo anão, constituindo a principal fonte de recursos genéticos para o programa de melhoramento genético de coco. Esse programa objetiva selecionar genótipos mais produtivos e com resistência a pragas e doenças. Dentro deste objetivo, esforços estão sendo direcionados para a obtenção de híbridos gigante x gigante (entre ecótipos) e gigante x anão, principalmente para obter genótipos que combinem a precocidade do anão e as características de produção do tipo gigante. Informações sobre a variabilidade genética entre e dentro ecótipos são fundamentais para a identificação de redundâncias e para a seleção de parentais que irão constituir as populações de melhoramento.

A caracterização de variedades de coco tem sido executada, principalmente, com base em características morfológicas e reprodutivas (Fernando et al., 1995; Ashburner et al., 1997a). No entanto, essas características são influenciadas por variações ambientais. Além disso, diagnósticos obtidos com esse tipo de análise consomem muito tempo e trabalho, e mostram apenas uma visão simplificada da variabilidade genética (Sugimura et al., 1997). Variações isoenzimáticas (Carpio, 1982), em flavonóides (Jay et al., 1989), em proteína total (Cardeña et al., 1998) e em carotenóides (Fernando et al., 1997) foram também utilizadas, mas mostraram pouca capacidade discriminativa. Mais recentemente, estudos de variabilidade genética de germoplasma de coco têm sido realizados com marcadores moleculares, tais como RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) (Lebrun et al., 1998a; b), RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) (Ashburner et al., 1997b; Hercos et al., 2001) e AFLP (Perera et al., 1998). No entanto RFLP é uma técnica bastante trabalhosa e de custo elevado, o que pode muitas vezes limitar o seu uso. Marcadores RAPD e AFLP são, em geral, bastante polimórficos, distribuídos por todo o genoma do organismo e envolvem menor custo e maior rapidez na geração de informação. A principal desvantagem é que a herança destes marcadores é tipicamente dominante, fazendo com que indivíduos homozigotos e heterozigotos não sejam diferenciados.

Microsatélites ou SSRs ("Simple Sequence Repeats") constituem, atualmente, o sistema de marcadores polimórficos mais informativo. Esta técnica detecta variações em locos de seqüências repetitivas, constituídas de 1 a 5 nucleotídeos, dispersas por todo o genoma de organismos eucariotos. SSR são marcadores baseados em PCR, altamente polimórficos, mesmo a nível intraespecífico, são multialélicos e apresentam herança codominante. Quanto à acessibilidade, marcadores SSR apresentam limitações no que se refere ao custo final de obtenção de primers informativos (incluindo biblioteca genômica, seleção de clones, seqüenciamento, desenho e teste de primers). No entanto, uma vez obtidos os primers informativos para uma espécie, os custos e a demanda de mão-de-obra são reduzidos drasticamente e os ensaios laboratoriais são rápidos, aumentando a acessibilidade da técnica. Essas características fazem dos microsatélites os marcadores mais indicados para estudos de genética de populações, sistemas de cruzamento, mapas de ligação, entre outros, tendo sido utilizados para diversas espécies de plantas, nos últimos anos (revisado por Gupta & Varshney, 2000), incluindo o coco (Rivera et al., 1999; Teulat et al., 2000). Neste último trabalho, 14 populações de coco, provenientes de várias regiões da área de distribuição da espécie, foram analisadas com marcadores AFLP e SSR. Apesar de ambos mostrarem-se eficientes na avaliação da diversidade genética de coco, marcadores SSR foram mais indicados para esse tipo de estudo, por apresentarem uma melhor transferibilidade entre diferentes grupos, e serem mais acessíveis para uso em banco de dados (Teulat et al., 2000).

Os objetivos deste trabalho foram: (1) desenvolver e caracterizar marcadores microsatélites em ecótipos de coqueiro e (2) analisar a variabilidade genética entre e dentro ecótipos de coqueiro gigante e anão, mantidos no Banco Ativo de Germoplasma de Coco, da Embrapa Tabuleiros Costeiros, através de marcadores microsatélites.

Material e Métodos

Material experimental e extração de DNA

Para o desenvolvimento de marcadores microsatélites, foi utilizada uma planta F_1 resultante de um cruzamento gigante x anão, para possibilitar a amplificação dos locos SSR nessas duas variedades. Para a triagem dos primers polimórficos, foram testadas 8 plantas, sendo 4 da variedade gigante e 4 da anão. Para a análise da variabilidade genética, foram utilizadas de 9 a 10 plantas de cada um de 7 ecótipos de gigante e 3, de coqueiro anão (Tabela 1). Essas plantas foram

coletadas no Banco Ativo de Germoplasma de Coco, mantido na Embrapa Tabuleiros Costeiros. DNA genômico total foi extraído após maceração de folíolos, sob nitrogênio líquido, de acordo com protocolo descrito por Ferreira & Grattapaglia (1998), com algumas modificações: proteinase K (20 mg/ml) foi adicionada ao tampão de extração e uma precipitação de polissacarídeos com NaCl 2M foi incluída.

Tabela 1 – Ecótipos e siglas de *Cocos nucifera*, com os respectivos números de plantas utilizados nas análises de variabilidade genética.

Ecótipo	Abrev. do ecótipo	Nº de plantas por ecótipo
Anão Amarelo de Gramame-PB	AAG	09
Anão Vermelho de Gramame-PB	AVG	10
Anão Vermelho da Malásia	AVG	09
Gigante da Baía Formosa	GBRB	09
Gigante de Pacatuba-SE	GBRP	10
Gigante de Santa Rita-PE	GBRS	10
Gigante do Oeste-Africano	GOA	10
Gigante da Polinésia	GPY	09
Gigante de Tonga	GTG	10
Gigante de Vanuatu	GVT	10

Construção de biblioteca genômica enriquecida para SSR

Foi utilizado o protocolo desenvolvido por Rafalski et al. (1996). DNA genômico de um único indivíduo foi digerido com Sau3AI, MseI e Tsp509I, de acordo com instruções do fabricante. Após eletroforese, em gel de agarose a 1,5%, os fragmentos entre 200 e 800 pares de bases foram transferidos para membranas de celulose (S&S NA 45 DEAE) e ligados a adaptadores de Sau3AI. Fragmentos contendo seqüências SSR foram selecionados por hibridização com dinucleotídeos (TC)₁₃ ligados a biotina e recuperados por contas magnéticas ligadas a estreptavidina. Essa fração enriquecida foi amplificada por PCR, usando primers complementares aos adaptadores; purificada em sistemas de purificação Wizard PCR Preps DNA (Promega); clonada em plasmídeo pGEM-T e, então, transformada em *E. coli*, cepa XL1-Blue, por choque térmico. As células

transformadas foram crescidas em placas LB-Amp (50 mg de ampicilina/ml) a 37° C e, em seguida, transferidas para membranas de nitrocelulose. Sondas TC/AG marcadas com digoxigenina, foram então desnaturadas e hibridizadas às membranas. Clones positivos (que continham SSRs) foram identificados por autorradiografia e submetidos a PCR-ancorado (Rafalski et al., 1996), para verificação da presença, da orientação e do tamanho dos insertos.

Seqüenciamento dos clones positivos e desenho de primers

DNA plasmidial foi extraído dos clones selecionados por “mini-prep” e seqüenciados em um seqüenciador automático ABI 377 (Perkin Elmer), usando-se kits de Dye-Terminator (Perkin Elmer). Primers complementares às regiões flangeadoras das seqüências SSR foram desenhados, utilizando-se o programa Primer 3 (Whitehead Institute of Biomedical Research). Para reduzir problemas de amplificação de bandas inespecíficas, alguns critérios estridentes foram utilizados: (1) temperatura de anelamento (T_m) entre 55°C e 70°C; (2) diferença de T_m entre pares de primers menor que 3°C e (3) conteúdo de GC entre 40% e 60%.

Triagem de primers polimórficos e PCR dos locos SSR

Os 16 pares de primers foram inicialmente testados com 8 amostras de *C. nucifera*, sendo 4 gigantes e 4 anões, para seleção dos primers polimórficos e com boa resolução de bandas. As PCRs foram realizadas em volumes de

13- μ l, contendo tampão de PCR 1X (Tris-HCl 10mM pH8,3, KCl 50mM, MgCl₂ 1,5mM), 0,2 mM de cada dNTP, 1 unidade de *Taq* DNA polimerase, DMSO 0% (1,3 μ l), 5 pmol de cada primer e 10 ng de DNA genômico. As amplificações foram realizadas em termociclador PTC-100 (MJ Research), com as seguintes condições: 96°C por 2 min (1 ciclo), 94°C por 1 min, 55-66°C por 1 min, 72°C por 1 min (30 ciclos); e 72°C por 7 min (1 ciclo). As temperaturas de anelamento foram otimizadas para cada primer. Os fragmentos amplificados na triagem e na otimização dos primers foram visualizados em géis de agarose Metaphor a 3,5% de concentração (FMC Bioproducts), corados com brometo de etídio. Para a determinação genotípica das 96 amostras, foram utilizados géis de poliácrilamida a 4%, corados com nitrato de prata (Bassam et al., 1991). Os tamanhos dos fragmentos foram estimados por comparação com padrões obtidos com DNA ladder 10-bp (Gibco BRL).

Análise dos dados

Dez locos SSR foram caracterizados quanto ao número de alelos por loco e heteroziguidade ou diversidade gênica (Gene diversity – Nei, 1973), usando-se 96 amostras de coco. O programa GDA (Lewis & Zaykin, 2001) foi utilizado para essas análises. Para a determinação das relações genéticas entre as 96 amostras de coco, cada fragmento foi analisado quanto à presença (1) ou ausência (0) em cada uma das amostras. Essa matriz foi utilizada para calcular os coeficientes de similaridade de Jaccard. Um dendrograma foi construído, em seguida, pelo método UPGMA (unweighted pair-group method analysis). Essas análises foram realizadas usando-se o programa NTSYS 2.0 (Rohlf, 1993).

Resultados e Discussão

Desenvolvimento de microsatélites e triagem de primers

A digestão do DNA de *Cocos nucifera* com diferentes enzimas de restrição mostrou que Sau3AI produziu um perfil de restrição mais adequado para a construção de bibliotecas genômicas, com fragmentos variando de 200 a 800 pares de bases. Uma biblioteca, enriquecida para repetições AG, foi construída. Após enriquecimento, 115 clones foram selecionados, de um total de 200 (57,5%). A eficiência do enriquecimento e seleção por hibridização evidenciou a abundância de elementos repetitivos AG no genoma de *C. nucifera*. Os 115 clones selecionados foram submetidos a PCR-ancorado. Os resultados mostraram que 98 clones apresentavam SSR (85%) e, destes, 76 apresentavam SSR em tamanhos e posições adequados (66%). Os 76 clones, selecionados por PCR-ancorado, foram seqüenciados, resultando em 16 seqüências (14%) adequadas para o desenho de primers. Um exemplo de seqüenciamento é apresentado na Fig. 1. Não foram detectados SSR em 12 clones, sugerindo que alguns clones positivos foram erroneamente identificados.

Em 23 seqüências, os microsatélites estavam localizados muito próximos ao final do inserto, não sendo possível o desenho de primers. As demais 37 seqüências incluíram 16 redundantes e 21 que não apresentaram seqüências de DNA de boa qualidade.

O seqüenciamento de DNA dos insertos mostrou 3 tipos de microsatélites, de acordo com a classificação proposta por Weber (1990). Um total de 12 seqüências continha repetições "perfeitas" (sem interrupções) e 3 eram imperfeitas (com inserções de bases entre as repetições). Apenas um

microsatélite apresentou repetições compostas, com diferentes repetições "in tandem". Os primers foram nomeados com as iniciais CnE, para *Cocos nucifera* – Embrapa, seguidas de um número referente ao clone utilizado.

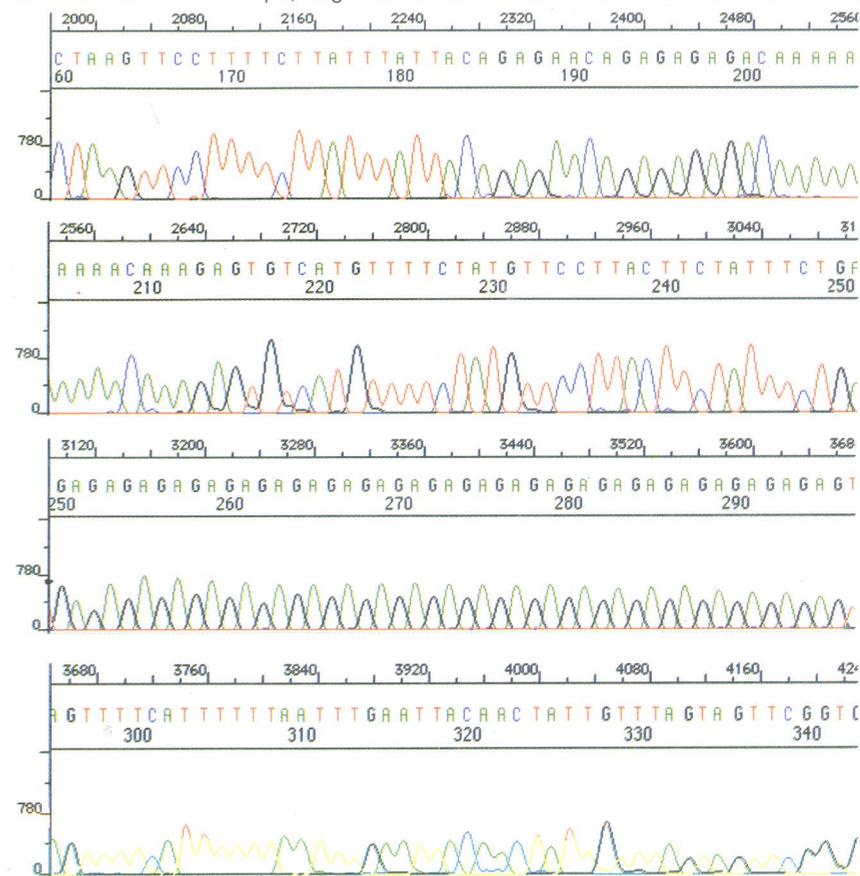


Fig. 1. Resultado do seqüenciamento, usando o kit "Dye Terminator", em um seqüenciador ABI Prism 377 (Perkin Elmer). Este clone apresentou uma repetição $(GA)_{23}$.

Caracterização dos marcadores microsatélites

Dos 16 primers SSR testados, 3 mostraram-se monomórficos e 3 não apresentaram resoluções de bandas satisfatórias. Para os demais 10 primers, de 2 a 14 alelos por loco foram detectados, com uma média de 8,25 (Tabela 2). A heteroziguidade variou de 0,472 a 0,867, com uma média de 0,686, entre os ecótipos de gigante (alógamos), enquanto a diversidade gênica variou de

0,000 a 0,771, com uma média de 0,371 entre os ecótipos de anões (autógamos). Esses valores são consideravelmente maiores do que os detectados para coco com outros marcadores (Lebrun et al., 1998) e demonstram a grande utilidade dos marcadores microssatélites em estudos de diversidade genética. Um exemplo de amplificação, obtida com o primer Cn-51 é mostrado na Fig. 2.

Tabela 2 – Pares de primers, repetições, amplitude de tamanhos de fragmentos, número total de alelos (A), e diversidade gênica (*h*) para os 10 marcadores SSR polimórficos.

Identificação	Repetições	Tamanhos dos fragmentos (bp)	A	<i>h</i>
Cn1-05	(GA) ₂₅	260-292	14	0,873
Cn1-09	(GA) ₂₃	250-276	07	0,583
Cn1-23	(CT) ₉ + (CT) ₁₁	270-274	02	0,498
Cn1-26	(GA) ₃₁	336-352	06	0,623
Cn1-33	(GA) ₂₂	280-310	07	0,644
Cn1-34	(CT) ₂₄	202-224	11	0,832
Cn1-45	(CT) ₂₀	236-264	04	0,591
Cn1-51	(CT) ₃₃	252-296	08	0,614
Cn1-60	(CT) ₄₀	308-342	09	0,710
Cn2-37	(GA) ₃₆ imperfeito	312-328	07	0,679



Fig. 2. Polimorfismo de microssatélites em coco, obtido com o primer CnE-51, visualizando em gel desnaturante de poliacrilamida a 4%, corado com nitrato de prata.

Variabilidade genética de ecótipos de *Cocos nucifera*

As relações genéticas entre os indivíduos dos 10 ecótipos analisados são mostradas na Fig. 3. Três grandes grupos foram formados, um contendo os ecótipos da variedade anão, o outro com ecótipos asiáticos da variedade gigante, e o terceiro, um grupo diferenciado, com os ecótipos brasileiros e africanos da variedade gigante. Dentro do agrupamento dos ecótipos anões, o caráter cor do fruto foi um fator de agrupamento mais significativo do que a procedência geográfica. Por serem predominantemente autógamas, características como a cor do fruto tendem a se fixar mais rapidamente. O Anão Vermelho de Gramame (PB), por exemplo, ficou mais próximo do Anão Vermelho da Malásia, do que do Anão Amarelo de Gramame. Ecótipos da variedade gigante não apresentaram o mesmo tipo de comportamento. Por serem predominantemente alógamos, é possível a troca de genes entre populações geograficamente próximas, dificultando a fixação de características de origem genética. Ecótipos da variedade anão mostraram maior similaridade com ecótipos gigantes da Ásia, do que com os ecótipos gigantes brasileiros. Esses resultados corroboram a hipótese de que a variedade anão tenha surgido na Ásia.

Apesar dos ecótipos gigantes brasileiros estarem num nível de caracterização genética e agrônômica inferior, em relação aos ecótipos asiáticos, seria estratégico para o melhoramento, planejar cruzamentos entre os genótipos anões com genótipos gigantes brasileiros, geneticamente mais distantes, para obtenção de maiores ganhos genéticos.

Essa análise, utilizando marcadores SSR, mostrou que bandas específicas foram encontradas para as variedades gigante e anão, bem como para determinados ecótipos. Esses resultados demonstram o potencial dessa técnica para a caracterização molecular do coqueiro e para o uso de SSR na obtenção de marcadores associados ao(s) gene(s) que controla(m) o porte da planta.

Conclusão

- 1- Marcadores microssatélites mostraram-se mais polimórficos em ecótipos de coco que outros marcadores moleculares, sendo, portanto, a ferramenta ideal para análises genéticas de *C. nucifera*.
- 2- A coleção de germoplasma de coco mantida na Embrapa Tabuleiros Costeiros apresenta altos níveis de variabilidade genética. Além disso, grupos de similaridade entre ecótipos foram estabelecidos, mostrando a necessidade de inclusão imediata de ecótipos gigantes brasileiros em programas de melhoramento genético, visando ao uso mais eficiente da variabilidade existente.
- 3- O método utilizado, no presente trabalho, para desenvolvimento de marcadores microssatélites mostrou-se eficiente, produzindo um grande número de primers desenhados, em relação ao número de clones seqüenciados

Referências Bibliográficas

- ASHBURNER, G. R.; THOMPSON, W. K.; HALLORAN, G. M. RAPD analysis of South Pacific coconut palm populations. **Crop Science**, v.37, p.992-997, 1997a.
- ASHBURNER, G. R.; THOMPSON, W. K.; HALLORAN, G. M.; FOALE, M. A. Fruit component analysis of South Pacific coconut palm populations. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v.44, p.327-335, 1997b.
- BASSAM, B. J.; CAETANO-ANOLLES, G.; GRESSHOFF, P. M. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrilamide gels. **Analytical Biochemical**, v.196, p.80-83, 1991.
- CARDEÑA, R.; OROPEZA, C.; ZIZUMBO, D. Leaf protein as markers useful in the genetic improvement of coconut palms. **Euphytica**, v.102, p.81-86, 1998.
- CARPIO, C. B. Biochemical studies of *Cocos nucifera* L. **Journal of Biology**, v.11, p.319-338, 1982.

- CUENCA, M. A. G. Importância econômica do coqueiro. In: FERREIRA, J. M. S.; WARWICK, D. R. N.; SIQUEIRA, L. A., (Ed.). **A cultura do coqueiro no Brasil**. Aracaju, SE: EMBRAPA-CPATC, 1994. p.1-65.
- FAO. <http://apps.fao.org/cgi-bin/nph-db.pl?subset=agriculture>, 1997.
- FERNANDO, W. M. U.; FERNANDO, S.; VIDANAARACHCHI, V.; PERIES, R. R. A.; EVERARD, J. M. D. T.; PERIAPPERUMA, K.; KARUNARATNE, S. Coconut biotechnology research with emphasis on tissue culture - the Sri Lankan experience. In: INTERNATIONAL PLANT TISSUE CULTURE CONFERENCE, 2., 1995, Bangladesh. **Proceedings...** Bangladesh: University of Dhaka, 1995.
- FERNANDO, W. M. U.; PERERA, L.; PERIES, R. R. A. An overview of breeding research in coconut - the Sri Lankan experience. **Outlook Agric**, v.26, p.191-198, 1997.
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. 220p.
- GUPTA, P. K.; VARSHNEY, R. K. The development and use of microsatellite markers for genetic analysis and plant breeding with emphasis on bread wheat. **Euphytica**, v.113, p.163-185, 2000.
- HARRIES, H. C. The evolution, dissemination and classification of *Cocos nucifera* L. **Botany Review**, v.44, p.265-319, 1978.
- HERCOS, A. P.; COELHO, P. J. A.; PASTORE, J. F. B.; TUPINAMBÁ, E. A.; MORETZSOHN, M. C. Estudo de relações genéticas entre ecótipos de coqueiro das variedades anão e gigante (*Cocos nucifera* L.), através de marcadores RAPD. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS, 1., 2001, Goiânia. **Anais...** [S.l.: s.n.], 2001.
- JAY, M.; BOURDEIX, R.; POTIER, F.; SANSLAVILLE, C. Premiers resultats de l'étude du polymorphisme des polyphenols foliaires du cocotier. **Oléagineux**, v.44, p.151-157, 1989.

LEBRUN, P.; GRIVET, L.; BAUDOIN, L. Dissémination et domestication du cocotier à la lumière des marqueurs RFLP. **Plantations, Recherche, Développement**, v.5, p.233-245, 1998a.

LEBRUN, P.; N'CHO, Y. P.; SEGUIN, M.; GRIVET, L.; BAUDOIN, L. Genetic diversity in coconut (*Cocos nucifera* L.) revealed by restriction fragment length polymorphism (RFLP) markers. **Euphytica**, v.101, p.103-108, 1998b.

LEWIS, P. O.; ZAYKIN, D. **Genetic Data Analysis**: computer program for the analysis of allelic data. Version 1.0 (d16c). Free program distributed by the authors over the internet from <<http://lewis.eeb.uconn.edu/lewishome/software.html>> 2001.

N'CHO, Y. P.; SANGARE, N.; BOURDEIX, R.; BONNOT, F.; BOUDOUN, L. Assessment of a few coconut ecotypes: a biometrics approach 1. Study of tall populations. **Olleagineux**, v.48, p.121-132, 1993.

NEI, M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. **Proceedings National Academic Science of USA**, v.70, p.3321-3323, 1973.

OHLEH, J. G. **Coconut, tree of life**. Rome: FAO, 1984. (Plant production and protection paper, 57).

PERERA, L.; RUSSEL, J. R.; PROVAN, J.; POWEL, W. Use of microsatellite DNA to investigate the level of genetic diversity and population genetic structure of coconut (*Cocos nucifera* L.). **Genome**, v.43, p.15-21, 2000.

PERSLEY, G. J. **Replanting the tree of life**. Wallingford: CAB International, 1992. Towards an International Agenda for Coconut Palm Research.

PURSEGLOVE, J. W. **Tropical crops: monocotyledones**. 5th. ed. London; New York: Longman, 1985. p.440-450.

RAFALSKI, J. A.; VOGEL, J. M.; MORGANTE, M.; POWELL, W. ANDRE, C.; TINGEY, S. V. Generating and using DNA markers in plants. In: BIRREN, B.; LAI, E., (Ed.). **Analysis of non-mammalian genomes – a practical guide**. New York: Academic Press, 1996.

RIVERA, R.; EDWARDS, K. J.; BARKER, J. H. A.; ARNOLD, G. M.; AYAD, G.; HODGKIN, T.; KARP, A. Isolation and characterization of polymorphic microsatellites in *Cocos nucifera* L. **Genome**, v.42, p.668-675, 1999.

ROHLF, F.J. **NTSYS-pc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System**. Version 2.0. New York: Applied Biostatistics, 1993.

SIQUEIRA, E. R.; RIBEIRO, F. E.; ARAGÃO, W. M. Melhoramento genético do coqueiro. In: FERREIRA, J. M. S.; WARWICK, D. R. N.; SIQUEIRA, L. A., (Ed.). **A cultura do coqueiro no Brasil**. Aracaju, SE: EMBRAPA-CPATC, 1994. p.87-120.

SUGIMURA, Y.; ITANO, M.; SALUD, C. D.; OTSUJI, K.; YAMAGUCHI, H. Biometric analysis on diversity of coconut palm: cultivar classification by botanical and agronomical traits. **Euphytica**, v.98, p.29-35, 1997.

TEULAT, B.; ALDAM, C.; TREHIN, R.; LEBRUN, P.; BARKER, J. H. A.; ARNOLD, G. M.; KARP, A.; BAUDOIN, L.; ROGNON, F. An analysis of genetic diversity in coconut (*Cocos nucifera*) populations from across the geographic range using sequence-tagged microsatellites (SSRs) and AFLPs. **Theoretical Applied Genetics**, v.100, p.764-771, 2000.

WEBER, J. L. Informativeness of human (dC-dA)_n (dG-dT)_n polymorphisms. **Genomics**, v.7, p.524-530, 1990.



*Recursos Genéticos
e Biotecnologia*

Desenvolvimento e uso de ...

2001

FL-05440



CENARGEN- 19288-1