



## CARACTERIZAÇÃO PRELIMINAR DE ACESSOS DE COQUEIRO GIGANTE UTILIZANDO-SE MARCADORES MICROSSATÉLITES

JULIE ANNE ESPÍNDOLA AMORIM<sup>1</sup>; LEANDRO EUGENIO CARDAMONE DINIZ<sup>2</sup>; ANA VERUSKA CRUZ DA SILVA<sup>3</sup>;  
SEMÍRAMIS RABELO RAMALHO RAMOS<sup>4</sup>; MICHELLE MUHLERT FERREIRA TAVARES<sup>5</sup>; PAULO MANOEL PONTES  
LINS<sup>6</sup>; WILSON MENEZES ARAGÃO<sup>7</sup>;

1,5.UFS, ARACAJU, SE, BRASIL; 2,3,4,7.EMBRAPA TABULEIRO COSTEIRO, ARACAJU, SE, BRASIL; 6.SOCOCO S.A.  
AGROINDÚSTRIA DA AMAZÔNIA, MOJU, PA, BRASIL;

[julie\\_anne@hotmail.com](mailto:julie_anne@hotmail.com)

**Resumo:** As técnicas de marcadores de DNA estão entre as mais adequadas aos estudos de variabilidade genética em coqueiro, por serem independentes das variações ambientais e cobrirem todo o genoma. Este estudo objetivou caracterizar dois acessos de coqueiro gigante por meio de marcadores microssatélites (SSR), visando-se ao estudo da diversidade genética com fins de auxiliar o estabelecimento de parâmetros para a regeneração do germoplasma. Foram avaliadas 101 amostras provenientes dos acessos Gigante do Oeste Africano (GOA) e 100 do Gigante do Brasil da Praia do Forte (GBrPF). Os quatro primers utilizados para a avaliação do acesso GOA mostraram-se polimórficos (92%), com variação de 2 a 4 alelos por loco. Dos cinco primers utilizados para o acesso GBrPF, quatro apresentaram polimorfismo (82%), com variação de 2 a 3 alelos por loco. Foi possível detectar a presença de 42 indivíduos geneticamente divergentes no acesso GOA e de 58, no acesso GBrPF. Há necessidade de se realizar estudos adicionais incluindo-se novos e diferentes marcadores, a fim de confirmar os indivíduos ou grupos geneticamente divergentes.

**Palavras-chave:** *Cocos nucifera*, diversidade genética, regeneração de germoplasma, SSR

### Introdução

O coqueiro (*Cocos nucifera* L.), uma das mais importantes espécies tropicais utilizadas pelo homem, é composta por duas variedades principais: gigante e anã. Acessos de coqueiro gigante são mantidos em poucas coleções no Brasil, estabelecidas na década de 80 e que, em função da idade e altura das plantas, precisam ser regeneradas. Contudo, por ser uma planta perene e alógama, há necessidade de conhecimento aprofundado sobre a divergência e estrutura genética dos acessos mantidos em coleções para estabelecer as estratégias de amostragem da população a ser regenerada. As técnicas de marcadores de DNA têm sido indicadas como as mais adequadas nos estudos de variabilidade genética em coqueiro, por serem independentes das variações ambientais e por cobrirem todo o genoma, e não apenas as regiões codominantes, fornecendo um número ilimitado de marcadores



(TANKSLEY et al., 1989). O presente estudo objetivou avaliar a diversidade genética de acessos de coqueiro gigante por meio de marcadores microssatélites (SSR), visando-se ao estudo da diversidade genética com fins de auxiliar o estabelecimento de parâmetros para a regeneração do germoplasma.

### **Material e Métodos**

Amostras provenientes de plantas individuais das populações de coqueiro Gigante do Oeste Africano (GOA) e Gigante do Brasil da Praia do Forte (GBrPF), respectivamente 101 e 100, foram coletadas na coleção de trabalho da Fazenda Sococo, em Moju, PA, e acondicionadas em sacos de papel Kraft, as quais foram identificadas e transportadas em gelo até o Laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE. O processo de extração de DNA seguiu o protocolo de Doyle & Doyle (1990), com modificações. A concentração do DNA extraído foi determinada por meio de espectrofotômetro. Todas as amostras seguiram um padrão de diluição de 25 ng/ $\mu$ L. A análise do polimorfismo foi feita por meio de marcadores moleculares microssatélites (SSR), utilizando-se cinco pares de primers Forward e Reverse de microssatélites (CAC2, CAC6, CAC8, CAC10, CAC13), desenvolvidos por Perera et al. (1999). As reações de PCR foram preparadas para volume final de 10  $\mu$ L, constituído por: água ultrapura, dNTPs (10mM), tampão (10x), primers (5mM), Taq DNA polimerase Promega® (5u/ $\mu$ L) e DNA(25ng/ $\mu$ L). Os produtos da reação foram aplicados em gel de agarose a 3,5%, corado com brometo de etídeo e corridos em eletroforese horizontal a 100 V por 3 h. Os géis foram visualizados em transiluminador de luz ultravioleta e as imagens foram armazenadas digitalmente. Foram geradas matrizes binárias, em que os indivíduos foram genotipados quanto à presença (1) e ausência de bandas (0). O cálculo da similaridade genética ( $S_{ij}$ ) entre cada par de indivíduos foi realizada por meio do programa XLSTAT (ADDINSOFT, 2011), empregando-se os coeficientes de Jaccard. A partir da matriz de similaridade de Jaccard, foi gerado um dendrograma por UPGMA (SNEATH & SOKAL, 1973), utilizando-se o programa XLSTAT (ADDINSOFT, 2011).

### **Resultados e Discussão**

Os quatro primers utilizados na avaliação da população GOA (CAC2, CAC8, CAC10, CAC13) mostraram-se polimórficos (92%), com variação de 2 a 4 alelos por loco (Tabela 1). O primer CAC-10 revelou o maior número de bandas (quatro); enquanto o CAC-13 apresentou o menor (uma). Entretanto, dos cinco primers utilizados na avaliação da população GBrPF (CAC2, CAC6, CAC8,



CAC10, CAC13), observa-se que quatro apresentaram polimorfismo (82%), com variação de 2 a 3 alelos por loco (Tabela 2). Verifica-se ainda que os primers CAC-2 e CAC-8 revelaram o maior número de bandas, ambos com três marcas. O primer CAC-13 foi o único que apresentou monomorfismo. Os resultados encontrados podem ser explicados pela diversidade dos ecótipos e pela utilização de um primer de SSR diferente. Com base na análise do dendrograma gerado pelo software XLSTAT (ADDINSOFT, 2011) para os 101 indivíduos da população GOA, constatou-se a presença de 42 materiais geneticamente divergentes, identificados a partir da formação de grupos de materiais similares. Já para a população GBrPF, encontraram-se 58 materiais geneticamente divergentes em relação ao total de 100 avaliados. Apenas os materiais divergentes foram considerados, em função da caracterização da variabilidade genética, para se inferir sobre a metodologia de regeneração. No entanto, há ainda necessidade de se realizar estudos adicionais e mais aprofundados, que incluam novos e diferentes marcadores, a fim confirmar o número de indivíduos ou grupos geneticamente divergentes, para que seja possível se estabelecer a metodologia de regeneração do germoplasma.

Tabela 1. Número de bandas geradas pelos quatro primers de SSR utilizados na avaliação da população GOA.

Primers	Número de bandas	Número de bandas polimórficas
CAC-2	3	3
CAC-8	3	3
CAC-10	4	4
CAC-13	2	1
Total	12	11

Tabela 2. Número de bandas geradas pelos cinco primers de SSR utilizados na avaliação da população GBrPF.

Primer	Número de bandas	Número de bandas polimórficas
CAC-2	3	3
CAC-6	2	1
CAC-8	3	3
CAC-10	2	1
CAC-13	1	0
Total	11	8

### Conclusões

Há 42 materiais geneticamente divergentes na população Gigante do Oeste Africano (GOA) e 58 na Gigante do Brasil da Praia do Forte (GBrPF). Faz-se necessário realizar estudos adicionais e mais



aprofundados, incluindo-se novos e diferentes marcadores, a fim confirmar o número de indivíduos ou grupos geneticamente divergentes, para que seja possível se estabelecer a metodologia de regeneração do germoplasma.

### **Agradecimentos**

À Embrapa Tabuleiros Costeiros pela oportunidade de estágio; à Fazenda Sococo pela parceria e aporte financeiro para as atividades de campo; e à Fundação de Amparo à Pesquisa e à Inovação Tecnológica do Estado de Sergipe (FAPITEC/SE), pela concessão da bolsa PIBITI de iniciação científica.

### **Referências Bibliográficas**

ADDINSOFT. **XLSTAT**: your data analysis solution. Paris: Addinsoft, 2010. Disponível em: <<http://www.xlstat.com/>>. Acesso em: 5 dez. 2011.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v. 12, p. 13-15, 1990.

PERERA, L.; RUSSELL, J. R.; PROVAN, J.; POWELL, W. Identification and characterization of microsatellites in coconut (*Cocos nucifera* L.) and the analysis of coconut populations in Sri Lanka. **Molecular Ecology**, v. 8, n. 2, p. 344-346, 1999.

SNEATH, P. H.; SOKAL, R. R. **Numerical taxonomy**: the principles and practice of numerical classification. San Francisco: W. H. Freeman, 1973. 573 p.

TANKSLEY, S. D; YOUNG, N. D; PATERSON, A. H; BONIERBAL, M. W. RFLP mapping in plant breeding: new tools for an old science. **Bio/Technology**, v. 7, p. 257-264, 1989.