

Caracterização Molecular de Acessos de Coqueiro-Gigante via Marcadores SSR.

Alinne Oliveira Nunes¹; Semíramis Rabelo Ramalho Ramos²; Carina Mendes Loiola³; Leandro Eugênio Diniz²; Messias Gonzaga Pereira⁴; Carlos Diego de Oliveira Azevedo⁵; Pedro Henrique Araújo Diniz Santos⁶; Rejane do Couto Silva¹; Elian Suelen de Jesus Santos¹.

RESUMO

O Brasil sedia o Banco Internacional de Germoplasma de Coco para a América Latina e Caribe (ICG-LAC), o qual é vinculado a Rede Internacional de Recursos Genéticos de Coco (COGENT). Diante da necessidade de inferir sobre a estrutura genética de alguns acessos de coqueiro, esse trabalho objetivou caracterizar acessos de coqueiro-gigante via marcadores moleculares microssatélites. Para tanto, os acessos foram submetidos a reações de polimerase em cadeia para cinco *primers* de SSR. Quatro *primers* foram analisados gerando 37 marcas polimórficas. Com base na análise preliminar das marcas obtidas, constatou-se que há variabilidade genética nos diferentes acessos analisados.

Introdução

O Banco Ativo de Germoplasma de Coco da Embrapa Tabuleiros Costeiros foi implantado em 1982 e desde 2006, integra a Rede Internacional de Recursos Genéticos de Coco (COGENT), sendo a base para a América Latina e Caribe (ICG-LAC). Os acessos estão implantados em duas bases físicas, uma no Campo Experimental de Itaporanga - CEI, município de Itaporanga d'Ajuda, SE e a outra no Campo Experimental do Betume - CEB, município de Neópolis, SE. Os acessos de coqueiro-anão e gigante foram introduzidos e coletados, respectivamente, do Banco Internacional de Coco da Costa do Marfim (ICG-AIO) e da costa nordestina do Brasil. As coletas de coqueiro-gigante foram realizadas em diversas épocas e seguindo diferentes estratégias amostrais. Diante dessa situação existe a necessidade de melhor entender e inferir sobre a estrutura genética de alguns acessos de coqueiro-gigante existentes no ICG-LAC.

Esse trabalho objetivou caracterizar e avaliar, por meio de marcadores moleculares microssatélites (SSR), acessos de coqueiro-gigante do Banco Ativo de Germoplasma de Coco, a fim de detectar o nível de polimorfismo existente dentro deles.

Materiais e Métodos

Foram avaliados sete acessos de coqueiro-gigante-do-Brasil pertencentes ao ICG-LAC, sediados na Embrapa Tabuleiros Costeiros. Três acessos estão implantados no Campo Experimental de Betume, o qual localiza-se no Platô de Neópolis, em Sergipe, a 140km de Aracaju, ocupando uma área de 100ha com coordenadas 10°26'05" de latitude Sul, 36°52'21" de longitude à Oeste e 28m de altitude. São eles: GBrBF-CEB (Gigante-do-Brasil-Baía-Formosa), GBrPC-CEB (Gigante-do-Brasil-de-Pacatuba) e GBrSR-CEB (Gigante-do-Brasil-Santa-Rita). Os outros quatro acessos estão implantados no Campo Experimental de Itaporanga, SE, situado no município de Itaporanga d'Ajuda, distante cerca de 28 km de Aracaju e são eles: GBrBF-CEI (Gigante-do-Brasil-Baía-Formosa), GBrOC-CEI (Gigante-do-Brasil-Olho-de-Cravo), GBrSR (Gigante-do-Brasil-Santa-Rita) e GBrTR-CEI (Gigante-do-Brasil-Terra-do-Rei).

A caracterização molecular foi realizada no segundo semestre de 2012 e constituiu-se de quatro etapas: 1) Extração de DNA; 2) Quantificação e Padronização de DNA; 3) Reações de PCR e 4) Eletroforese. As etapas foram desenvolvidas em parceria entre a Embrapa Tabuleiros Costeiros e a Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), Campos dos Goitacazes, RJ, especificamente pelo Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal (LMGV).

Para a extração do DNA foram coletados folíolos da folha **número** um, com aproximadamente 20cm de comprimento, de todas as plantas de cada acesso (Tabela 1), totalizando 264 amostras. Após esta etapa, prosseguiu-se com o protocolo de extração de Doyle e Doyle (1987), com algumas modificações. As concentrações de DNA nas amostras foram quantificadas por meio do espectrofotômetro NanoDrop 2000c e, posteriormente, padronizadas na concentração de 5ng. µl⁻¹.

Tabela 1 – Acessos avaliados e conservados no Banco Ativo de Germoplasma de Coco. Embrapa Tabuleiros Costeiros (CPATC). Aracaju, 2013.

Nome do acesso	Instituição ¹	Local de conservação ²	Origem	Procedência	Ano Plantio	Nº de plantas
Gigante-do-Brasil--Olho-de-Cravo	CPATC	CEI	Itaporanga-SE	Coleta	2005	9
Gigante-do-Brasil-de-Pacatuba	CPATC	CEB	Pacatuba-SE	Coleta	1995	44
Gigante-do-Brasil-da-Baía-Formosa	CPATC	CEI	Baía Formosa-RN	Coleta	2004	9
Gigante-do-Brasil-da-Baía-Formosa	CPATC	CEB	Baía Formosa-RN	Coleta	1995	49
Gigante-do-Brasil-Terra-do-Rei).	CPATC	CEI	Igarassu - PE	Coleta	2009	89
Gigante-do-Brasil-Santa-Rita	CPATC	CEI	Igarassu - PE	Coleta	2004	28
Gigante-do-Brasil-Santa-Rita	CPATC	CEB	Igarassu - PE	Coleta	1995	36

¹ CPATC – EMBRAPA Tabuleiros Costeiros;

² CEI - Campo Experimental de Itaporanga; CEB - Campo Experimental do Betume

As reações de amplificação de DNA foram efetuadas conforme Baudouin (2009), num volume final de 20 µl contendo os reagentes nas seguintes concentrações: 2,50 µL de Tampão 10X (500 mM (NH₄)₂SO₄, 100mM Tris-HCl pH 8,4, 1% de Triton X-100), 1,60 µL de 25 mM MgCl₂, 2,0 µL de 0,2 mM dNTPs, 1,60 µL de 0,5 mM de *primer* (*Forward e Reverse*), 2,0 µL de Taq DNA polimerase Fermentas e 2µL de DNA genômico, completando o volume final com água ultrapura (10,1µL). As reações foram realizadas no termociclador GeneAmp – PCR System 9700 (PE Applied Biosystems) com o seguinte programa: um ciclo de desnaturação inicial a 94 °C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos de amplificação de 94° por 30 segundos, 51 °C por 1 minuto (anelamento), 72 °C por 1 minuto (extensão), e uma extensão final a 72 °C por 30 minutos.

Inicialmente foram selecionados cinco *primers* que foram aplicados para a análise molecular dos acessos em reações individuais. Desses *primers* foram selecionados aqueles que geraram marcas nítidas e polimórficas para análise dos dados. A Tabela 2 exibe a sequência e a temperatura de anelamento testada para cada *primer*.

Tabela 2 – Relação da sequência dos *primers* selecionados e temperatura de anelamento.

Nome dos <i>Primers</i>	<i>Forward primer</i>	<i>Reverse primer</i>	T.A.
CnCir B6	GAGTGTGTGAGCCAGCAT	ATTGTTACAGTCCTTCCA	58
CnCir C3 [†]	AGAAAGCTGAGAGGGAGATT	GTGGGGCATGAAAAGTAAC	58
CnCir C7	ATAGCAIATGGTTTTTCCT	TGCTCCAGCGTTCATCTA	58
CNZ44	CATCAGTTCCTCCTCATTTC	CAACAAAAGACATAGGTGGTC	54
CNZ01	ATGATGATCTCTGGTTAGGCT	AAATGAGGGTTTGGGAAGGATT	NI

[†] Temperatura de anelamento não informada nos artigos consultados.

Os produtos de PCR foram submetidos ao sistema de eletroforese capilar sob fluorescência através do aparelho AdvanCE FS96, na qual foram separados os pares de bases em fragmentos numa margem de 35 a 500 pares de bases e uma sensibilidade de 2 bp para diferir cada alelo encontrado. Para análise dos dados moleculares foi utilizado o programa POPGENE que proporcionou a estimação de parâmetros como polimorfismo do loco, número de alelos, número de alelos efetivos, distância genética e índices de Shannon e de Nei (Ramos, 2011), possibilitando a realização de inferências mais acuradas sobre a diversidade das

populações avaliadas.

Resultados e Discussão

Quatro dos cinco *primers* testados amplificaram e apresentaram marcas polimórficas para as 264 amostras individuais analisadas. A combinação dos quatro locos SSR gerou um total de 37 alelos, com uma média de 9.25 alelos por locos. Esse número mostrou-se superior ao número médio de alelos por locos encontrado em outros estudos de populações de coqueiro-gigante por meio de marcadores microsatélites, o que indica o alto nível de polimorfismo encontrado dentre os acessos. Ribeiro et al. (2010) obteve uma média de 5.2 alelos por locos num total de 68 alelos para 8 locos SSR e Dasanayaka et al. (2009) obteve uma média de 4.9 alelos por locos num total de 79 alelos gerados por 16 locos SSR.

A partir da análise dos locos SSR, verificou-se que a heterozigidade esperada (H_e) na população variou de 0,49 a 0,86, com média de 0,72, enquanto que a heterozigose observada (H_o) variou de 0,00 a 0,67, com média 0,26 (Tabela 3). Portanto, nota-se que a heterozigidade esperada mostrou-se mais alta do que a heterozigidade observada. A incongruência entre os valores esperados e observados de heterozigose pode estar relacionada com a falha de alelos (drop-out) durante a amplificação na reação de PCR (Fukunaga et al. 2005). Entretanto, considerando que as reações de polimerase em cadeia foram realizadas rigorosamente com base no protocolo proposto por Baudouin (2009), convém acreditar que o uso de outros *primers* possa contribuir para um melhor resultado, uma vez que esses que sofreram falha de alelos podem ser eliminados das análises. Outros estudos com populações de coqueiro-gigante apresentaram valores superiores ao encontrado de heterozigidade observada (0,26) como aquele realizado por Ribeiro et al. (2010), que obtiveram média de 0,443 para esse parâmetro, e Perera et al. (2001) que encontraram média de 0.682.

Tabela 3 - Diversidade Genética representada pelo Índice de Shannon, Heterozigose observada (H_o), esperada (H_e) e média (H_m) para todos os Locos estudados.

Locus	Índice de Shannon	H_o	H_e	H_m	Nei ¹
CnCir B6	2.12	0.28	0.86	0.65	0.86
CnCir C3'	1.73	0.67	0.78	0.61	0.77
CNZ44	1.66	0.10	0.76	0.68	0.75
CNZ01	0.00	0.00	0.49	0.49	0.49
Média	1.57	0.26	0.72	0.61	0.72
¹ Heterozigose esperada (Nei, 1973)					

O Índice de Shannon tem sido empregado em estudos genéticos como medida de diversidade dentro de populações, assemelhando-se a um índice de riqueza genotípica (Ramos, 2011). Ele define que a diversidade genética será tanto maior quanto mais altos forem os valores estimados. Considerando todos os acessos analisados, os valores desse índice variaram de 0,00 a 2,12. O valor médio de 1,57 revelou a existência de alta variabilidade dentro dos acessos avaliados (Tabela 3).

O número de alelos encontrados para cada acesso variou de 2.25 (GBrOC-CEI) a 7.5 (GBrTR-CEI) alelos encontrados, com uma média 1.92 alelos efetivos para o GBrOC-CEI e uma média 4.39 alelos efetivos para o GBrTR (Tabela 4). O índice de Shannon apresentou maior valor médio para o acesso GBrTR (1.5) revelando a existência de alta variabilidade dentro desse acesso. O índice de diversidade genética de Nei também apresentou valor mais alto para a população GBrTR (0.71), entretanto todos os valores apresentados para os respectivos índices de diversidade apresentaram-se muito próximos uns dos outros (Tabela 4).

Tabela 4 - Parâmetros de variabilidade genética gerados pelos acessos de coqueiro-gigante com base em marcadores moleculares SSR.

Acesso	NA ¹	NE ²	I ³	H ⁴	Locos polimórficos	Locos polimórficos (%)
GBrOC-CEI	2.25	1.92	0.00	0.43	4	100%
GBrBF-CEI	4.00	2.41	1.06	0.57	4	100%
GBrSR-CEI	4.50	2.72	1.11	0.60	4	100%
GBrTR-CEI	7.50	4.39	1.50	0.71	4	100%
GBrPC-CEB	6.25	3.38	1.35	0.65	4	100%
GBrSR-CEB 5.00		3.22	1.25	0.66	4	100%
GBrBF-CEB	5.75	3.12	1.30	0.65	4	100%

¹NA – Número de alelos observados; ²NE – Número de alelos efetivos (polimórficos); ³I – Índice de Shannon; ⁴H – Diversidade Genética de Nei (1973).

Conclusão

Detectou-se alto nível de polimorfismo e diversidade genética dentro dos acessos de coqueiro-gigante do Banco Ativo de Germoplasma de Coco. Posteriormente um conjunto maior de primers SSR serão utilizados visando ampliar a segurança das conclusões, além de permitir inferências mais precisas quanto à variabilidade genética intra populacional.

Referências

- BAUDOIN L. (2009) **Consolidate microsatellite data on coconut diversity: Appendices**. Montpellier: CIRAD.
- DASANAYAKA PN, EVERARD JMDT, KARUNANAYAKA EH, NANDADASA G (2009) Analysis of coconut (*Cocos nucifera* L.) diversity using microsatellite markers with emphasis on management and utilisation of genetic resources. **Journal of Natural Science Foundation of Sri Lanka** **37**: 99–109.
- DOYLE JJ, DOYLE JL, HORTORIUM LHB (1987) Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus** **12**: 13-15.
- FUKUNAGA K, HILL J, VIGOUROUX Y, MATSUOKA Y, SANCHEZ JG, LIU K, BUCKLER E, DOEBLEY J (2005) Genetic diversity and population structure of teosinte. **Genetics** **169**: 2241-2254.
- RAMOS HCC (2011) **Retrocruzamento em mamoeiro: avanço de gerações e seleção de linhagens via procedimentos clássicos e moleculares**. Tese de Doutorado – Genética e Melhoramento de Plantas. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. Campos dos Goytacazes, RJ.
- RIBEIRO FE, BAUDOIN L, LEBRUN P, CHAVES LJ, BRONDANI C, ZUCCHI MI and VENCOVSKY R (2010) Population structures of Brazilian tall coconut (*Cocos nucifera* L.) by microsatellite markers. **Genetics and Molecular Biology** **33**: 696-702.
- PERERA L, RUSSEL JR, PROVAN J and POWEL W (2001) Level and distribution of genetic diversity of coconut (*Cocos nucifera* L. var. *Typica* form typical) from Sri Lanka assessed by microsatellite markers. **Euphytica** **122**: 381-389.