

Análise da diversidade e estrutura genética de acessos de coqueiro-anão

Carlos Thailan de Jesus Santos¹, Quezia Cristina S. Correia², Renata Santos Archimínio³, Tatiana Santos Costa⁴, Semíramis Rabelo Ramalho Ramos⁵, Leandro Eugenio Cardamone Diniz⁶

Resumo - O Brasil é o quarto maior produtor mundial de coco, espécie de grande importância na indústria alimentícia. A Embrapa Tabuleiros Costeiros sedia o Banco Ativo de Germoplasma (BAG) de coqueiro para América Latina e Caribe, importante para a conservação da espécie. Diante da necessidade de conhecer a estrutura genética das populações presentes neste BAG, este trabalho buscou caracterizar seis populações de coqueiro-anão presentes no Campo Experimental de Itaporanga (CEI), da Embrapa Tabuleiros Costeiros, situado no município de Itaporanga d'Ajuda, SE. Para a realização deste trabalho foram utilizados sete marcadores SSR que possibilitaram avaliar a diversidade e estrutura genética com acurácia de 190 plantas pertencentes as seis populações. A partir dos 21 loci obtidos foi alcançado alto grau de polimorfismo (95,24%). Com base na análise dos resultados obtidos para a Análise de Variância Molecular (AMOVA) (constatou-se que há alta variabilidade genética entre as seis populações analisadas, sendo esta maior entre indivíduos (69%). Apesar de serem das mesmas regiões geográficas, os dois acessos mais distantes geneticamente, segundo o gráfico de coordenadas principais (ACoP) foram Anão Vermelho de Gramame (AVG) e Anão Amarelo de Gramame (AAG). As populações analisadas apresentaram um alto grau de riqueza genotípica, representadas pelos altos valores do índice de Shannon (I), sendo as populações Anão Vermelho de Camarões (AVC) e Anão Amarelo de Gramame (AAM) as que apresentaram maiores e menores valores, respectivamente (1,56 e 1,25). Os resultados aqui apresentados indicam que entre as seis populações analisadas há alta diversidade genética, indicando boa representatividade genética entre os indivíduos avaliados.

Termos para indexação: diversidade genética, SSR, *cocos nucifera*, BAG.

Introdução

O coqueiro é uma planta originária da Ásia e é muito difundida no Brasil. O país é o quarto maior produtor mundial possuindo em 2012 uma área colhida de 287 mil ha de coqueiros. O consumo da fruta é geralmente ligado ao uso da polpa e água que é vendida in natura ou processada. Da casca do coco é possível se extrair a fibra que é utilizada para produção de produtos de baixo valor agregado, como tapeçarias e cordoaria, além de estofamentos de carros. Cerca de 70% da produção de coco no Brasil encontra-se no Nordeste, onde se destacam a Bahia com 29,4% da produção nacional, Sergipe contando com 12,5% e o Pará com 11,2%. O estado de Sergipe ocupa a segunda colocação como maior produtor de coco no país e o terceiro em área plantada ocupando aproximadamente 38.000 ha, dos quais 80% estão localizados na área de baixa litorânea e Tabuleiros Costeiros (Jesus Junior, 2015).

Embora ocorra a expansão da cococultura para diferentes regiões não tradicionais de plantio no Brasil, observa-se o predomínio de regiões litorâneas. Apresentando assim um problema, pois coqueiro, assim como outras culturas, vem sofrendo erosão genética devido à ação do homem que retira as plantas do ambiente dando espaço à indústria hoteleira e construção de estradas (Siqueira; Aragão; Tupinambá, 2002). Como alternativa de conservação da espécie, em 1982 é criado o Banco Ativo de germoplasma (BAG) de coco que é de responsabilidade da Embrapa Tabuleiros Costeiros. O Banco mantém a variabilidade genética por meio de conservação in vivo de cerca de dois mil indivíduos, correspondentes a 29 acessos de coqueiro gigante e anão (Ramos et al., 2015). Em 2006, o Banco de Germoplasma foi associado à Rede Internacional de Recursos Genéticos de coco (COGENT) e foi rebatizada como Banco de germoplasma de coco para a América Latina e o Caribe (ICG-LAC) (Loiola et al., 2016).

A caracterização do germoplasma é uma importante atividade, pois possibilita que novos materiais de interesse sejam incluídos em programas de melhoramento genético e serve como base estratégica de conservação. Marcadores moleculares do tipo Simple Sequence Repeats (SSR) são amplamente utilizados na análise de estrutura de populações, eles são compostos de sequências simples

¹Graduando em Ciências Biológicas, bolsista CNPq, Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

²Graduanda em Ciências Biológicas, bolsista Fapitec/SE, Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

³Graduanda em Biomedicina, Aracaju, SE.

⁴Bióloga, doutora em Biotecnologia Vegetal, pesquisadora DCR Fapitec/CNPq, pesquisadora visitante da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

⁵Engenheira-agrônoma, doutora em Genética e Melhoramento de Plantas, pesquisadora da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

⁶Biólogo, doutor em Genética e Melhoramento, pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

repetidas de dois a cinco nucleotídeos na sequência de DNA. O polimorfismo nestes locus é resultado de variações do número de repetições das sequências de nucleotídeos (Loiola, 2014). O uso de tecnologias mais apuradas se torna útil na caracterização do BAG como o uso da eletroforese capilar, que é uma ótima alternativa para fracionamento de moléculas que possuem carga, por ser rápida, por oferecer boa resolução e eficiência, além de necessitar de uma pequena quantidade de amostra favorecendo a eficiência das análises. Este trabalho objetivou caracterizar e avaliar, por meio de marcadores moleculares microsatélites (SSR), acessos de coqueiro-anão do Banco Ativo de Germoplasma de Coco, a fim de detectar a diversidade e estrutura genética deles.

Material e Métodos

Folículos de 190 plantas pertencentes a seis acessos de coqueiro-anão: Anão Verde de Jequi (AVJ), Anão Vermelho de Camarões (AVC), Anão Vermelho da Malásia (AVM), Anão Vermelho de Gramame (AVG), Anão Amarelo de Gramame (AAG) e Anão Amarelo da Malásia (AVM) foram coletados no Banco Ativo de Germoplasma (BAG) da Embrapa Tabuleiros Costeiros (CEI-Itaporanga d'Ajuda, SE). Após a coleta, estes folículos foram higienizados com etanol (70%), transportados ao Laboratório de Biologia Molecular e armazenados em ultrafreezer -80 °C até o momento da extração.

A caracterização molecular foi realizada seguindo quatro etapas: 1º extração do DNA; 2º quantificação e padronização das amostras; 3º PCR (primers CAC02, CAC03, CAC04, CAC06, CAC10, CNZ1 e CNZ2); 4º eletroforese capilar e análise dos dados. Para a extração de DNA foram utilizadas aproximadamente 300 mg de tecido foliar seguindo o protocolo de LOIOLA et al. (2016). Em seguida, as amostras foram quantificadas em espectrofotômetro (Nanodrop 2000c) e diluídas para a concentração padrão de 15 ng.µL⁻¹. Com todas as amostras de DNA padronizadas, foram feitas as reações de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), onde o mix foi preparado em um volume final de 20 µL contendo: 1X de Tampão (10X), 1,5 mM de MgCl₂ (50mM), 0,2 mM de cada dNTP (2,5 mM), 0,5 µM de cada primer (25 pmol), 2,5 unidades de Taq DNA polimerase (5 U/ µL), 30 ng de DNA molde e água milliQ estéril (q.s.p.). Estas reações de PCR foram feitas no Termociclador 96 Fast (Applied Biosystems/USA) nas seguintes condições: uma etapa inicial de desnaturação por 5 min. à 94 °C, seguida de 35 ciclos de 30 seg. a 94 °C para desnaturação; 1 min. a 53 °C - 57 °C (temperatura variável em função do marcador utilizado) para anelamento e 1 minuto à 72 °C para extensão, ao final uma extensão final por 5 min. à 72 °C.

A validação dos produtos de PCR foi feita em gel de agarose 3% e tampão TBE 1X, submetido a eletroforese, corado com brometo de etídio (0,5 µg.mL⁻¹) e visualizado sob luz ultravioleta. A eletroforese capilar foi realizada com o equipamento Fragment Analyzer (Advanced Analytical Technologies, EUA). Para a análise foram utilizados 20 µL de produto de PCR e 4 µL de solução de tamponamento utilizando o kit DNF 905-K1000 (Advanced Analytical/Fragment Analyzer, AATI/USA). Os resultados dos perfis eletroforéticos de cada marcador SSR possibilitou a construção de uma matriz de dados, que foi utilizada para as estimativas de diversidade genética. Utilizando o software GeneALEX 6.5 (Peakall; Smouse, 2012) foram realizadas análises de riqueza genética, matrizes de distância genética, análises de coordenadas principais (ACoP) e Análise de Variância Molecular (AMOVA).

Resultados e Discussão

A partir dos sete marcadores SSR utilizados, foram gerados 21 loci, os quais obtiveram alto grau de polimorfismo entre os acessos (94,24%). Os seis acessos de coqueiro-anão apresentaram a seguinte porcentagem de polimorfismo: AVG (100%), AVJ, AVC, AVM e AAG (95,24%), e por fim o acesso AAM (90,48%) com a menor porcentagem de polimorfismo.

As estimativas de riqueza genotípica (Tabela 1) indicam que as populações analisadas apresentaram alto valor para o índice de Diversidade Genética de Shannon (I), com valores acima de 1 (média de 1,43). As populações com maior e menor valor foram AVC (1,56) e AAM (1,25), respectivamente. As altas riquezas genotípicas entre os acessos de coqueiro já foram apresentadas em outros trabalhos: Loiola (2014) encontraram resultados semelhantes aos apresentados neste trabalho, com elevada média entre os valores de I (1,01), o que reforça a alta variação genotípica nos indivíduos. Estes resultados indicam que para os acessos de coqueiro conservados no Banco Ativo de Germoplasma de Coco, há uma boa representatividade de riqueza genotípica. Estes resultados podem ser reforçados ao observar os valores de heterozigosidade esperada (He) e a heterozigosidade observada (Ho). Estes valores medem a proporção de alelos heterozigotos e homozigotos em cada loco analisado. Os valores de He foram maiores que os de Ho em todas as populações analisadas, 0,65 e 0,12, respectivamente, indicando uma maior proporção de alelos homozigotos. Os valores de He variaram entre 0,59 (AAM) e 0,70 (AVC), enquanto os valores de Ho variaram entre 0,09 (AAM) e 0,17 (AVG). A proporção de He maior que Ho condizem com resultados publicados por Loiola et al. (2016); estes dados podem indicar predominância de panmixia, isto é, a ocorrência de cruzamentos aleatórios nas populações. Assim, os acessos se encontram em equilíbrio de Hardy-Weinberg e, conseqüentemente, o coeficiente de endogamia (F) não foi maior que o valor unitário atingindo maior valor na população AAM (0,88) e menor em AVG (0,80).

Tabela 1: Estimativas de riqueza genotípica entre os acessos de coqueiro-anão do Banco Ativo de Germoplasma de Coco para América Latina e Caribe (ICG-LAC).

Acesso	N	Na	Ne	I	Ho	He	F
AVJ ⁽¹⁾	28,52	7,52	4,25	1,51	0,15	0,68	0,81
AVC ⁽²⁾	28,95	7,76	4,10	1,56	0,12	0,70	0,83
AVM ⁽³⁾	27,09	5,95	3,58	1,33	0,11	0,63	0,86
AVG ⁽⁴⁾	28,28	7,62	4,61	1,55	0,17	0,68	0,80
AAG ⁽⁵⁾	31,1	7,05	3,80	1,36	0,11	0,61	0,86
AAM ⁽⁶⁾	29,43	6,00	3,32	1,25	0,09	0,59	0,88
Média	28,91	6,98	3,94	1,43	0,12	0,65	0,83

⁽¹⁾AVJ = Anão Verde de Jequi. ⁽²⁾AVC = Anão Vermelho de Camarões. ⁽³⁾AVM = Anão Vermelho da Malásia. ⁽⁴⁾AVG = Anão Vermelho de Gramame. ⁽⁵⁾AAG = Anão Amarelo de Gramame. ⁽⁶⁾AAM = Anão Amarelo da Malásia.

O índice de fixação ou índice de endogamia (F) (Tabela 1) resulta em redução da variabilidade genética e aumento da homoziguidade dentro dos diferentes acessos. Os valores analisados mostram-se positivos e significativamente acima de 0, sendo os maiores valores encontrados no acesso AAM (0,878) e o menor, mas ainda acima do valor unitário, no acesso AVG (0,80). Apesar de positivos, valores como estes são considerados baixos. Loiola et al. (2016) encontraram em seus estudos valores semelhantes com estes para acessos de coqueiro gigante também pertencentes ao Banco Internacional de Coco para América Latina e Caribe (ICG-LAC). Este fato, segundo a mesma, se deve ao processo de origem e disseminação das populações. Presume-se que as populações tenham sofrido cruzamentos preferenciais com indivíduos aparentados por estarem geograficamente próximos e isolados de outros indivíduos.

O índice de fixação populacional (entre acessos) (FIT) foi de 0,86 ($p < 0,0001$) e o índice de fixação entre indivíduos (FIS) foi de 0,83 ($p < 0,0001$), e pode implicar em alto grau de endogamia, valores positivos e acima de zero indicam um possível déficit de heterozigotos dentro dos acessos. O valor encontrado para FST foi de 0,166 indicando um fluxo gênico moderado entre os acessos. Este dado reflete na AMOVA, onde se vê (Tabela 2) que a maior porcentagem de diversidade genética é observada entre os acessos (69%) e a menor diversidade entre indivíduos (14%).

Tabela 2. Análise de Variância Molecular (AMOVA) de dados SSR realizada entre 190 indivíduos pertencentes a 6 acessos de coqueiro-anão presentes ICG-LAC. Grau de Liberdade (GL), Soma dos Quadrados (SQ), Quadrado Médio (QM), Porcentagem de Variação (V), Coeficiente de Variação (CV), Probabilidade de ter um componente de variação maior que os valores observados ao acaso (P). As probabilidades foram calculadas por 1.000 permutações ao acaso.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	CV	V (%)	P
Entre indivíduos	5	515,83	103,16	1,44	17%	<0,0001
Entre acessos	181	2398,44	13,25	6,02	69%	<0,0001
Dentro de indivíduos	187	225,50	1,20	1,20	14%	<0,0001
Total	373	3139,78	117,62	8,67	100%	
Fst						0,166

Com base na matriz gerada a partir do coeficiente de dissimilaridade de Nei (Tabela 3) foi possível avaliar a diversidade genética entre os seis acessos analisados. Isto permitiu inferir que os acessos AVJ e AVM são mais similares geneticamente (0,221) enquanto AVC e AAG são as mais distantes entre si (1,193) mesmo estando presentes no mesmo campo experimental. O coeficiente de dissimilaridade também permitiu agrupar esses acessos em quatro distintos, com base na análise de coordenadas principais (PCoA) apresentada (Figura 1). Assim, os acessos com maior similaridade genética foram separados em grupos.

Tabela 3. Matriz de distância genética de NEI, calculada entre os 06 acessos de coqueiro-anão.

AVJ ⁽¹⁾	AVC ⁽²⁾	AVM ⁽³⁾	AVG ⁽⁴⁾	AAG ⁽⁵⁾	AAM ⁽⁶⁾	
0,000						AVJ ⁽¹⁾
0,368	0,000					AVC ⁽²⁾
0,221	0,533	0,000				AVM ⁽³⁾
0,612	0,619	0,613	0,000			AVG ⁽⁴⁾
0,949	1,193	0,706	1,095	0,000		AAG ⁽⁵⁾
0,798	1,117	0,740	0,733	0,339	0,000	AAM ⁽⁶⁾

⁽¹⁾AVJ = Anão Verde de Jequi. ⁽²⁾AVC = Anão Vermelho de Camarões. ⁽³⁾AVM = Anão Vermelho da Malásia. ⁽⁴⁾AVG = Anão Vermelho de Gramame. ⁽⁵⁾AAG = Anão Amarelo de Gramame. ⁽⁶⁾AAM = Anão Amarelo da Malásia.

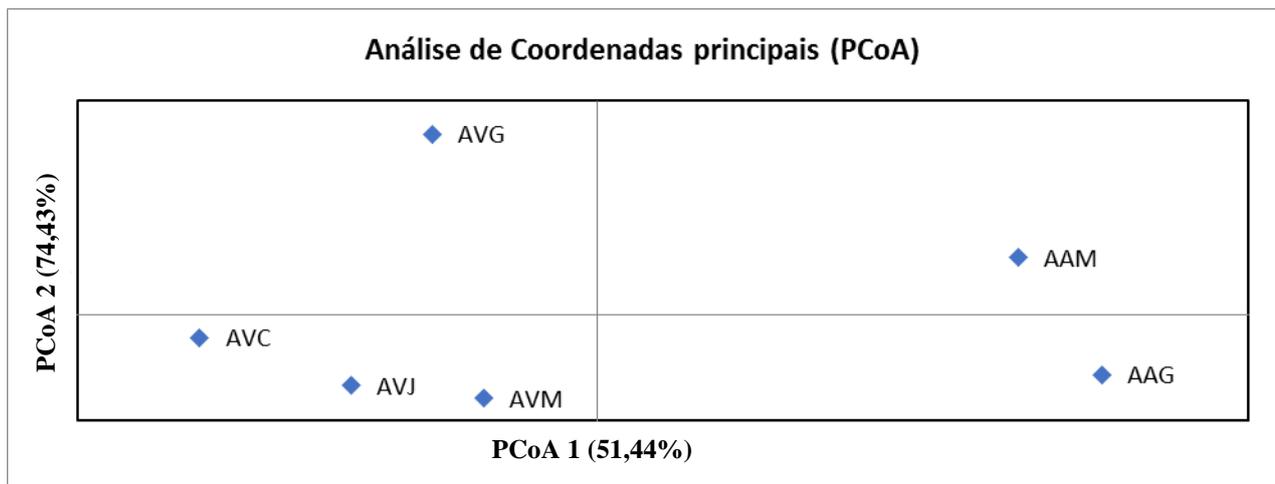


Figura 3. Análise de coordenadas principais PCoA da diversidade genética de 06 acessos de coqueiro-anão, estimadas a partir da distância genética de Nei, sendo AVJ - Anão Verde de Jequi, AVC - Anão Vermelho de Camarões, AVM - Anão Vermelho da Malásia, AVG - Anão Vermelho de Gramame, AAG - Anão Amarelo de Gramame e AAM - Anão Amarelo da Malásia.

A partir dos dados obtidos para os 190 indivíduos analisados, foi elaborada uma matriz de dissimilaridade considerando o índice de média ponderada, essa matriz possibilitou elaborar um gráfico pelo método de agrupamento UPGMA que permitiu formar x grupos distintos separados de acordo com a similaridade: No grupo 1, os pares de indivíduos mais próximos geneticamente são AAG 3 X AAM 23 pertencentes a acessos diferentes, AAG 17 X AAG 8 pertencentes ao mesmo acesso; No grupo 2, os pares de indivíduos AVG 7 X AVG 19 pertencentes ao mesmo acesso são os mais similares geneticamente; No grupo 3 os pares de indivíduos AVG 22 X AVG 23, AVG 25 X AVG 8 são os mais similares geneticamente e pertencem aos mesmo acesso. No grupo 4 os pares de indivíduos AVJ 6 X AVJ 7, AVM 26 X AVM 6 são os mais similares geneticamente; No grupo 5 os pares de indivíduos AVC 14 X AVC 21 e AVJ 18 X AVJ19 pertencentes ao mesmo acesso e o par AVM 4 X AVJ 29 pertencente a acessos diferentes são os mais similares geneticamente. Os pares de indivíduos mais distantes geneticamente são AVC 6 X AAM 21.

Conclusões

Através desse trabalho foi possível verificar uma alta taxa de polimorfismo nas populações presentes no Banco Ativo de Germoplasma (BAG) da Embrapa Tabuleiros Costeiros (CEI - Itaporanga d'Ajuda, SE) podendo ser útil para futuros estudos de melhoramento e conservação. Os acessos de coqueiro-anão mais distantes geneticamente foram Anão Vermelho de Camarões e Anão Amarelo de Gramame.

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa Pibic e à Fapitec/SE pela bolsa DCR.

Referências

- JESUS JUNIOR, L. A. Análise da produção da cultura do coco no Brasil, **Nordeste E**. v. 3, n. esp., p. 317–324, 2015.
- LOIOLA, C. M. **Diversidade genética em coqueiro-gigante (*Cocos nucifera* L.) por meio de marcadores microssatélites e características morfoagronômicas**. 2014. 100 f. Dissertação (Doutorado em Fitotecnia: Área de Concentração em Agricultura Tropical) - Universidade Federal Rural do Semiárido, Mossoró, 2014.
- LOIOLA, C. M. et al. Genetic relationships among tall coconut palm (*Cocos nucifera* L.) accessions of the international coconut genebank for Latin America and the Caribbean (ICG-LAC), evaluated using microsatellite markers (SSRs). **PLoS ONE**, v. 11, n. 3, p. 1–11, 2016.
- RAMOS, S. R. R.; FERREIRA, J. M. S.; LEDO, A. da S.; TALAMINI, V.; SOBRAL, K. M. B.; ANDRADE, J. B.; SANTOS, D. N.; PINTO, M. dos S. Banco ativo de germoplasma de coco da Embrapa: histórico, manejo e utilização dos acessos no período de 2012 a 2014. In: SIMPÓSIO DA REDE DE RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS DO NORDESTE, 2., 2015, Fortaleza. **Valorização e uso da plantas Caatinga**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical: Universidade Federal do Ceará, 2015.
- SIQUEIRA, L. A.; ARAGÃO, W. M.; TUPINAMBÁ, E. A. **A introdução do coqueiro no Brasil**: importância histórica e agrônômica. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2002. 24 p. (Embrapa Tabuleiros Costeiros. Documentos, 47).