

**AVALIAÇÃO DE DIVERGÊNCIA GENÉTICA EM COQUEIRO (*Cocos nucifera*
L.) USANDO MARCADORES RAPD EM AMOSTRAS DE PLANTAS
INDIVIDUAIS OU COMPOSTAS**

LÚCIA HELENA DE OLIVEIRA WADT

Tese apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense, como parte das exigências para obtenção do título de **Magister Scientiae** em Produção Vegetal - área de concentração em Melhoramento Genético Vegetal.

CAMPOS DOS GOYTACAZES
RIO DE JANEIRO - BRASIL
JANEIRO - 1997

**AVALIAÇÃO DE DIVERGÊNCIA GENÉTICA EM COQUEIRO (*Cocos nucifera*
L.) USANDO MARCADORES RAPD EM AMOSTRAS DE PLANTAS
INDIVIDUAIS OU COMPOSTAS**

LÚCIA HELENA DE OLIVEIRA WADT

Tese apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense, como parte das exigências para obtenção do título de "**Magister Scientiae**" em Produção Vegetal, área de concentração em Melhoramento Genético Vegetal.

Aprovada em 30 de janeiro de 1997

Prof. NEY SUSSUMU SAKIYAMA, D. Sc.
Orientador

Prof. MESSIAS GONZAGA PEREIRA, Ph. D.
Conselheiro

Prof. ALÚZIO BORÉM DE OLIVEIRA, Ph. D.

Prof. NILTON ROCHA LEAL, Ph. D.

Aos meus pais

José Carlos e Vilma Lúcia,

aos meus filhos

Natália, Patrícia e Lucas

e ao meu esposo

Paulo Guilherme.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por tudo.

A uma pessoa muito especial, Paulo, que sempre me incentivou e me acompanhou em todos os momentos da minha vida acadêmica e científica, especialmente neste trabalho, cuja ajuda foi fundamental.

À UENF e ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, pela oportunidade do trabalho.

Ao professor Ney, pela orientação, ensinamentos e inestimável amizade.

Ao professor Messias, pelas sugestões, valiosas contribuições e amizade.

Ao professor Alfredo Lam-Sánchez, pelas contribuições e ensinamentos.

Ao professor Acelino Couto Alfenas, pela oportunidade da Iniciação Científica em seu laboratório, na UFV, pela amizade e pelo apoio na realização desse trabalho.

Ao colega Eduardo N. Campinhos, da UFV, pela valiosa contribuição e amizade e aos amigos Luciana e Valdo por estarem sempre dispostos a me acolher em seu lar.

Aos professores do curso, aos colegas de disciplina e do laboratório e aos funcionários da UENF, que tornaram a minha passagem pela UENF agradável e recompensadora.

Ao Centro de Pesquisa Agropecuária dos Tabuleiros Costeiros, da EMBRAPA, pelo fornecimento do material vegetal, recursos financeiros e apoio logístico e pela excelente acolhida e disposição de seus pesquisadores e técnicos em colaborar com este trabalho.

À FENORTE, pelo apoio financeiro.

BIOGRAFIA

LÚCIA HELENA DE OLIVEIRA WADT, filha de José Carlos Rebello Wadt e de Vilma Lúcia de Oliveira Wadt, nasceu em São Paulo, SP, em 14 de setembro de 1968.

Iniciou o curso de graduação em Engenharia Florestal na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), em 1988. Foi bolsista de Iniciação Científica, pelo CNPq, no Departamento de Ciências Ambientais do Instituto de Florestas da UFRRJ.

Em 1991, transferiu-se para o curso de Engenharia Florestal da Universidade Federal de Viçosa (UFV), onde graduou-se em 1994. Durante o curso de graduação na UFV foi bolsista da Sociedade de Investigações Florestais (SIF), no Laboratório de Patologia Florestal.

Em 1995 iniciou o curso de mestrado na Universidade Estadual do Norte Fluminense, tendo-o concluído em 1997.

CONTEÚDO

	PÁGINA
ÍNDICE DE QUADROS.....	viii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xi
EXTRATO.....	xiii
ABSTRACT	xv
INTRODUÇÃO.....	1
<i>A cultura do coqueiro.....</i>	<i>1</i>
<i>Caracterização das variedades de coqueiro.....</i>	<i>3</i>
<i>Centro de origem do coqueiro e sua introdução no Brasil.....</i>	<i>6</i>
<i>Melhoramento genético do coqueiro</i>	<i>8</i>
<i>Estudo da variabilidade genética em coqueiros</i>	<i>10</i>
<i>Marcadores moleculares</i>	<i>13</i>
<i>Amostragem de populações geneticamente heterogêneas.....</i>	<i>18</i>
<i>Objetivos.....</i>	<i>22</i>

MATERIAL E MÉTODOS	23
<i>Material genético</i>	23
<i>Extração de DNA</i>	25
<i>Ensaio de Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso (RAPD)</i>	28
<i>Sensibilidade do ensaio de RAPD em amplificar fragmentos de DNA em amostra composta</i>	31
<i>Polimorfismo de DNA: comparação de amostras individuais versus amostras compostas</i>	34
<i>Análises estatísticas</i>	35
a) <i>Análise multivariada</i>	36
b) <i>Análise univariada</i>	37
RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
<i>Divergência genética entre três acessos de coqueiro gigante avaliada por marcadores RAPD em amostras individuais</i>	40
<i>Sensibilidade do ensaio de RAPD em amplificar fragmentos de DNA em amostra composta</i>	49
<i>Polimorfismo de DNA: comparação de amostras individuais versus amostras compostas</i>	54
a) <i>Amostras compostas</i>	55
b) <i>Amostras individuais</i>	59
c) <i>Divergência genética avaliada por amostras compostas e amostras individuais</i>	65
CONCLUSÕES	74
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77
ANEXO	83
<i>Tabulação das leituras de bandas nos ensaios de RAPD</i>	83

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1. Identificação dos acessos de coqueiro gigante amostrados no Banco Ativo de Germoplasma da EMBRAPA/CPATC (RIBEIRO & SIQUEIRA, 1995)	24
Quadro 2. Tampão de extração preparado a partir de soluções estoque.	25
Quadro 3. Coquetel de reagentes para ensaio de RAPD	29
Quadro 4. Misturas de DNA para determinação da diluição máxima de DNA a ser utilizada em ensaio de RAPD.	32
Quadro 5. Frequência, em porcentagem, de fragmentos amplificados em reação de RAPD de 21 amostras de folhas de coqueiro coletadas em cada população dos acessos GBrPF, GOA e GRL, para locos polimórficos entre acessos.	41

Quadro 6. Dimensões das distâncias euclidianas no plano bi- e tridimensional para as 21 plantas individuais dos acessos GBrPF, GOA e GRL.....	44
Quadro 7. Estimativa da proporção mínima de DNA para amplificação em reação de RAPD com amostras compostas, determinada pelo inverso da equação “ $y = -0.9004Ln(x) + 2.9636$ ”, onde y = intensidade da banda considerada como ausência na amostra composta e x = proporção mínima de DNA na amostra composta.	51
Quadro 8. Número de vezes em que ocorre ausência e presença de banda nos locos AB5h, AB5a e AB5e do acesso GBrPF, em amostras compostas de diferentes tamanhos repetidas 11 vezes.....	56
Quadro 9. Frequência da presença de banda em três locos do acesso GBrPF estimada por amostras compostas repetidas 11 vezes e 21 amostras individuais.....	58
Quadro 10. Número de vezes em que ocorre ausência e presença de banda nos locos AB5h, AB5a e AB5e do acesso GBrPF, em amostras individuais repetidas 5, 10, 15 e 20 vezes.....	60
Quadro 11. Frequência da presença de banda em três locos do acesso GBrPF estimada por amostras individuais de diferentes tamanhos e 21 amostras individuais.....	61
Quadro 12. Presença e ausência de banda em amostras compostas de diferentes tamanhos para seis iniciadores, considerando apenas os locos analisados com as 21 plantas individuais de cada acesso.	67
Quadro 13. Dimensões das distâncias euclidianas para solução gráfica no plano bi e tridimensional, de amostras compostas de 3, 5, 10 e 21 plantas dos acessos GBrPF, GOA e GRL.....	70
Quadro 14. Distância euclidiana, distância proporcional entre acessos e número do <i>cluster</i> ao que pertence o acesso para cada amostra.....	70
Quadro 1A. Ausência (0) ou presença (1) de bandas em reações de RAPD em amostras individuais de 21 plantas do acesso GBrPF.	83

Quadro 2A. Ausência (0) ou presença (1) de bandas em reações de RAPD em amostras individuais de 21 plantas do acesso GOA.	85
Quadro 3A. Ausência (0) ou presença (1) de bandas em reações de RAPD em amostras individuais de 21 plantas do acesso GRL.	87
Quadro 4A. Ausência (0) ou presença (1) de bandas em reações de RAPD em amostras compostas pela mistura de 3, 5, 10 e 21 soluções de DNA, dos acessos GBrPF, GOA e GRL. (os locos não correspondem, necessariamente, aos locos lidos para plantas individuais).	89
Quadro 5A. Ausência (0) ou presença (1) de bandas em reações de RAPD em 11 repetições de amostras compostas pela mistura de 2, 3, 5, 7 e 10 soluções de DNA do acesso GBrPF.....	91

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1. Dendrograma da distância euclidiana para o agrupamento de 63 plantas (21 de cada acesso) pelo método da média entre grupos.43
- Figura 2. Distâncias euclidianas, no plano bidimensional, de 63 plantas pertencentes a três ecotipos de coqueiro gigante.46
- Figura 3. Relação entre a intensidade da banda e a proporção de genótipo com banda em mistura de DNA, considerando apenas locos com banda de intensidade inicial média.....52
- Figura 4. Diluição de marcador RAPD em misturas de diferentes proporções.
a) linha 1=GOA; linha 2=GRL e linhas 3 a 16 correspondem às misturas de nº 1 a 14, respectivamente, do Quadro 4. Locos AB5a e AB5d apresentam intensidade de banda igual a 3 e AB5h igual a 2.
b) linha 1=GRL; linha 2=GOA e linhas 3 a 16 correspondem às misturas de nº 15 a 28, respectivamente, do Quadro 4. Loco AB5e apresenta intensidade de banda igual a 4 e AB5g igual a 2.....52
- Figura 5. Dendrograma da distância euclidiana para o agrupamento de 15 plantas (cinco de cada acesso) pelo método da média entre grupos.....62

Figura 6. Dendrograma da distância euclidiana para o agrupamento de 30 plantas (10 de cada acesso) pelo método da média entre grupos.	63
Figura 7. Dendrograma da distância euclidiana para o agrupamento de 45 plantas (15 de cada acesso) pelo método da média entre grupos.	64
Figura 8. Dendrograma da distância euclidiana para o agrupamento de 12 amostras compostas, originárias de 3 acessos (GBrPF, GOA e GRL) e 4 tamanhos (3, 5, 10 e 21 plantas na mistura), pelo método da média entre grupos.....	69
Figura 9. Distâncias euclidianas, no plano bidimensional, de 12 amostras compostas, tendo-se três acessos de coqueiro (GBrPF, GOA e GRL) e 4 tamanhos de amostra (mistura de 3, 5, 10 e 21 plantas).	71
Figura 10. Dendrogramas da distância euclidiana para o agrupamento de 3 amostras compostas, de diferentes tamanhos (3 ou 21 plantas na mistura) e de 3 amostras individuais (frequências dos marcadores de RAPD), de três acessos (GBrPF, GOA e GRL), pelo método da média entre grupos.....	72

EXTRATO

WADT, Lúcia Helena de Oliveira, M.S., Universidade Estadual do Norte Fluminense, 30 de janeiro de 1997. **Avaliação de divergência genética em coqueiro (*Cocos nucifera* L.) usando marcadores RAPD em amostras de plantas individuais ou compostas.** Presidente da banda: Ney Sussumu Sakiyama. Participantes da banca: Messias Gonzaga Pereira, Aluizio Borém de Oliveira e Nilton Rocha Leal.

Avaliou-se a divergência genética entre três ecotipos de coqueiro gigante, por meio de marcadores RAPD em amostras individuais e compostas. Os ecotipos estudados foram representados pelos acessos: Rennell (GRL), Oeste Africano (GOA) e Brasil-Praia do Forte (GBrPF), pertencentes à coleção de germoplasma do Banco Ativo de Germoplasma de Coco, do Centro de Pesquisa Agropecuária dos Tabuleiros Costeiros da EMBRAPA, em Aracaju, SE, sendo amostrado 21 plantas de cada acesso. O ecotipo de Rennell mostrou-se bastante divergente, geneticamente, dos demais, sendo os ecotipos do Oeste Africano e do Brasil-Praia do Forte próximos entre si, porém, distintos. Todos os três ecotipos apresentaram

alta proporção de genes fixados, sendo o ecotipo do Brasil o mais heterogêneo. A proporção mínima de DNA para amplificação de fragmentos RAPD em amostras compostas variou de menos de 6,7% a 25%, em função da intensidade inicial da banda e do genótipo da planta, ou seja, se o loco estava em homozigose ou heterozigose. Considerando locos com mesma intensidade inicial de banda, a proporção foi, em média, de 11%. Repetições de amostras compostas não foram adequadas para estimar a frequência de presença dos marcadores RAPD nos locos, sendo as amostras individuais mais adequadas, mesmo com poucas repetições. O uso de amostras compostas foi recomendado para avaliação de um grande número de populações seja para fazer uma seleção inicial daqueles mais divergentes ou para conhecer a posição relativa dos acessos em banco de germoplasma, com relação à divergência genética. Quando o número de populações a serem testadas for pequeno, o uso de amostras individuais com poucas repetições é mais indicado.

ABSTRACT

WADT, Lúcia Helena de Oliveira, M.S., Universidade Estadual do Norte Fluminense, January 30 of 1997. **Genetic divergence evaluation in coconut (*Cocos nucifera* L.) using RAPD markers with individual and bulk samples** . Adviser: Ney Sussumu Sakyama. Committee members: Messias Gonzaga Pereira, Nilton Rocha Leal and Aluízio Borém de Oliveira.

This research evaluated genetic divergence among three tall coconut populations using RAPD markers with individual and bulk samples. The coconut populations were represented by the accessions Rennell, African East and Brazil-Forte's Beach from the coconut germplasm bank located at Centro de Pesquisa Agropecuária dos Tabuleiros Costeiros-EMBRAPA, Aracaju-SE, Brazil. The Rennell population was the most divergent from the African East and Brazil-Forte's Beach populations, which were genetically close, but distinct. All three populations had a high proportion of fixed genes, with the Brazil-forte's Beach population being the more

heterogeneous. In studies using bulk samples, the minimal percentage of DNA needed for amplification varied from 6.7% to 25%. For loci with average band intensity, the percentage required was 11%. The number of replications used for bulk samples was inadequate for estimating the intrapopulation frequency of RAPD loci; fewer replications were required when individual samples were used. Both individual and bulk samples adequately separated the three populations into genetically distinct groups. The results of this study suggest that bulk sample may be used for studies involving several populations. When the populations size is small, the use of a few individual samples may be more adequate.

INTRODUÇÃO

A cultura do coqueiro

O coqueiro (*Cocos nucifera* L.) é uma espécie tropical amplamente cultivada no mundo, encontrada em todas as regiões intertropicais (RIBEIRO & SIQUEIRA, 1995; CUENCA, 1994). O mesmo é considerado uma espécie de uso múltiplo pela possibilidade de utilização de várias partes da planta, como a raiz, o estipe, a inflorescência, as folhas, o palmito e principalmente o fruto, razão pela qual também tem sido denominada de *árvore da vida*.

Do fruto, principal produto comercializado, podem ser aproveitados (CUENCA, 1994) diversos componentes como:

- subprodutos derivados da matéria albuminosa, para fins alimentícios;
- fibras, na indústria têxtil; e

- diversos outros subprodutos, como o carvão produzido a partir do endocarpo e a torta de coco.

Em termos comerciais, a copra¹ o principal subproduto do coco no mercado externo (CUENCA, 1994). No Brasil, os produtos mais importantes economicamente são o coco “in natura”; o coco ralado e a água de coco. O coco ralado também possui mercado em outros países.

A área plantada com coqueiros no Brasil foi estimada entre 280 mil a 300 mil ha (CUENCA, 1994), ocupando a faixa litorânea do estado do Pará até o estado do Rio de Janeiro (RIBEIRO, 1993). Até a década de 80, o Nordeste foi o principal produtor, respondendo por 95% da produção nacional, principalmente nos estados do Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe e Bahia (RIBEIRO, 1993; CUENCA, 1994). Recentemente, a região Norte tem aumentado sua participação no mercado nacional, principalmente pelo aumento da produção do estado do Pará, que de 1977 a 1992 aumentou sua produção de 2,3% para 14,9% (CUENCA, 1994). A maior parte da produção brasileira destina-se à indústria alimentícia (CUENCA, 1994), sendo que nos estados do Espírito Santo e do Rio de Janeiro, esta é basicamente destinada para o consumo da água de coco.

Até meados deste século os principais países produtores de coco foram a Malásia, Índia, Srilanka e as Ilhas do Oceano Índico (Filipinas e Madagascar) (MENON, 1949). No mercado internacional há uma grande demanda para o óleo de coco e as Filipinas, Indonésia e Índia são os maiores produtores da copra de coco. Atualmente, o continente Asiático detém o maior percentual do mercado, sendo as Filipinas o principal exportador tanto de copra como de óleo de coco, e a

¹ albumen desidratado a 6%, do qual é extraído o óleo de coco.

Indonésia e o Srilanka, juntamente com as Filipinas, são os principais exportadores de coco ralado do mundo (CUENCA, 1994).

Caracterização das variedades de coqueiro

Cocos nucifera possui número somático de cromossomos igual a 32 e número haplóide igual a 16, sendo, portanto, uma espécie diplóide.

Dois grupos principais de coqueiro são distinguidos: coqueiro gigante e coqueiro anão, sendo denominados, na literatura, de variedades (TAMMES & WHITEHEAD, 1969; PURSEGLOVE, 1975; SIQUEIRA et al., 1994; RIBEIRO & SIQUEIRA, 1995).

A divisão da variedade em grupos homogêneos com base em características morfológicas das plantas tem sido denominada de sub-variedades (SIQUEIRA et al., 1994) ou de cultivares (RIBEIRO & SIQUEIRA, 1995); aqui será denominada de grupo, sendo a divisão subsequente denominada de ecotipo¹.

A variedade anão é dividida em três grupos, os quais são distinguidos pela cor do pecíolo, da ráquis da folha e principalmente pela cor do epicarpo do fruto. Esses grupos são denominados de *coqueiro anão verde*, *coqueiro anão amarelo* e *coqueiro anão vermelho* (RIBEIRO, 1993; LIYANAGE, 1949). Dentro do grupo vermelho, ainda existem dois ecotipos distintos, o da Malásia e o dos Camarões (SIQUEIRA et al., 1994; RIBEIRO & SIQUEIRA, 1995), os quais são distinguidos fenotipicamente pela forma e cor dos frutos.

¹ Variedade ou raça adaptada à ação seletiva de um ambiente específico (FERREIRA, 1982).

O coqueiro anão apresenta crescimento lento, atingindo a altura de 8 a 10 m. A primeira floração ocorre entre 3,5 a 4,5 anos (LIYANAGE, 1949; PURSEGLOVE, 1975). Produz de 100 a 120 frutos de tamanho pequeno por planta ao ano; e se mantém produtiva por 30 a 35 anos (LIYANAGE, 1949, 1950; PURSEGLOVE, 1975). É considerada uma planta autógama (reprodução por autofecundação) (LIYANAGE, 1949, 1950; PURSEGLOVE, 1975).

Devido à sua precocidade, o coqueiro anão tem um papel importante no melhoramento genético da cultura, embora no mercado internacional seu produto não seja de importância comercial. Das plantações de coqueiro existentes no mundo, apenas 5% são da variedade anão, sendo distribuídas na zona intertropical (BOURDEIX et al. 1993).

A variedade gigante também apresenta variações em suas características morfológicas, como na cor do fruto e da ráquis, na forma e no tamanho do fruto. Pelo fato de se reproduzir por fecundação cruzada (alógama), há muitas combinações das características fenológicas, dificultando a separação da variedade em grupos distintos (TAMMES & WHITEHEAD, 1969). Portanto, os vários grupos de coqueiros gigantes são considerados ecotipos, sendo identificados pelo nome da região ecofisiográfica na qual a população se desenvolveu ou pelo nome do país ou lugar no qual os exemplares foram encontrados (PURSEGLOVE, 1975). São exemplos: *coqueiro gigante da Polinésia* e *coqueiro gigante da Malásia*.

O coqueiro gigante é de crescimento rápido, atingindo altura de 20 a 30 m (PURSEGLOVE, 1975). Atinge a maturidade aos 6-7 anos de idade, produz de 50 a 80 frutos grandes, por planta ao ano, e permanece produtivo por mais de 70

anos (LIYANAGE, 1949, 1950) podendo atingir a idade de até 100 anos (PURSEGLOVE, 1975).

A variedade gigante é considerada alógama em razão da dicogamia do tipo protandria (LIYANAGE, 1950; PURSEGLOVE, 1975, SIQUEIRA et al. 1994), sendo rara a coincidência na maturação das flores femininas e masculinas entre inflorescências consecutivas na mesma planta (LIYANAGE, 1949); porém a autofecundação da planta por polinização de uma inflorescência pela outra consecutiva pode ocorrer principalmente durante a estação seca, pois nesta época há um maior número de inflorescências e o intervalo de abertura entre estas é curto (CUENCA, 1994). Nenhum impedimento genético, e, ou, fisiológico é conhecido para a autofecundação, conseqüentemente, não há problemas de autoincompatibilidade e a autofecundação forçada produz frutos normais (LIYANAGE, 1950).

As flores do coqueiro são formadas em uma inflorescência paniculada inserida na axila de cada folha e protegida por brácteas grandes denominadas de espata. A inflorescência é formada pelo pedúnculo, espigas e flores. Cada inflorescência apresenta flores masculinas e femininas inseridas em uma ráquis, formando a espiga. Cada espiga apresenta algumas flores femininas, em número variável de acordo com o grupo ou ecotipo e numerosas flores masculinas, de menor tamanho, sendo que as femininas ocupam o terço inferior da espiga e as masculinas, o restante (LIYANAGE, 1950; PASSOS, 1994). O número de flores femininas é fortemente influenciado pelo estado nutricional e hídrico da planta (PASSOS, 1994).

Como a planta emite aproximadamente 12 folhas por ano, tem-se por ano 12 inflorescências abertas, podendo este número variar de 11 a 15 (SIQUEIRA et al. 1994).

Os frutos produzidos pelo coqueiro gigante são indicados para a produção de copra, de coco ralado e consumo “in natura”, enquanto que o fruto do anão é utilizado para o consumo de água de coco, pois sua copra é pouco espessa e de baixa qualidade, e produz água em maior quantidade e melhor qualidade que o gigante (PURSEGLOVE, 1975; CUENCA, 1994).

No Srilanka existe um coqueiro intermediário denominado de “King Coconut”, o qual pode ser considerado como um híbrido natural entre o gigante e o anão. Apresenta características intermediárias às outras duas variedades, como florescimento tardio, autofecundação e produção de frutos com tamanho intermediário e com pouco endosperma (PURSEGLOVE, 1975; LIYANAGE, 1949, 1950).

As variedades gigante e anão podem ser inter cruzadas gerando híbridos. As plantas híbridas são de grande interesse econômico pois apresentam-se com características intermediárias. Apresentam crescimento mais rápido e são mais altas que o anão, produzindo frutos em quantidade e tamanho intermediários às variedades progenitoras. Começam a produzir mais cedo que o gigante e apresentam frutos de boa qualidade, sendo comparados aos frutos do coqueiro gigante. Os frutos produzidos pelo coqueiro híbrido podem ser utilizados tanto para produção de copra como de água de coco.

Centro de origem do coqueiro e sua introdução no Brasil

Até o século XIX acreditava-se que o coqueiro havia se originado no oeste americano. Porém, com o avanço dos estudos, abandonou-se esta idéia

passando ser a região do sudeste asiático como o centro de origem mais provável, principalmente, nas ilhas localizadas entre os oceanos Índico e Pacífico (PURSEGLOVE, 1975). No entanto, o centro de origem preciso não é conhecido, pois não se sabe se sua disseminação ocorreu do Pacífico ou extremo leste do oceano Índico para o oceano Índico e mais tarde para a costa africana (BOURDEIX et al., 1993).

PURSEGLOVE (1975) sugere que a dispersão do coqueiro ocorreu do sudeste asiático para a Índia e depois para o leste africano, sendo levado para o oeste africano somente depois da descoberta do Cabo da Boa Esperança e daí para as américas e toda a região tropical do globo terrestre.

No Brasil, a primeira introdução foi feita em 1553, com plantas de coqueiro gigante originárias da Ilha de Cabo Verde. O coqueiro anão foi introduzido mais tarde, sendo o anão verde o primeiro a ser introduzido, originário de Java (em 1925) e do norte da Malásia (em 1939). Os grupos anão amarelo e anão vermelho foram introduzidos em 1938 e 1939, respectivamente, ambos provenientes do norte da Malásia (DIAS, 1980).

Outras introduções foram feitas pela Comissão Executiva da Lavoura Cacaueira (CEPLAC) e pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), sendo todas provenientes do Instituto de Pesquisas de Óleos e Oleaginosas (IRHO) da Costa do Marfim (RIBEIRO & SIQUEIRA, 1995).

Melhoramento genético do coqueiro

Os objetivos do melhoramento genético do coqueiro são bastante complexos e variam de acordo com o mercado ao qual o produto se destina (BOURDEIX et al., 1993). Apesar dos vários objetivos que um programa de melhoramento do coco pode almejar, o aumento da produção ainda é o seu principal objetivo. A produção do coqueiro é bastante afetada pelos fatores fitossanitários, sendo que inúmeras doenças e pragas são letais ao coqueiro, podendo ocasionar a perda total da produção de um coqueiral. Diante disso, a pesquisa para resistência a pragas e doenças torna-se prioritária (BOURDEIX et al., 1993).

O principal centro de pesquisas em coco localiza-se na França, no *Institut de Recherches pour les Huiles et Oléagineux (IRHO)* que atua em cooperação com o *Institute for Forest Zone Crops (IDEFOR)* e o *Centre Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD)*. O maior banco de germoplasma de coco do mundo é dirigido por estas instituições e localiza-se na estação *Marc Delorme* em *Côte d'Ivoire* - França.

Nos programas de melhoramento do coqueiro dirigidos pelo IRHO (INSTITUT, 1989) e IDEFO/CIRAD-CP (BOURDEIX et al., 1993) os principais objetivos são aumento do rendimento de copra e a precocidade, o que tem sido buscado por meio de hibridações entre o coqueiro anão e o coqueiro gigante e também entre diferentes ecotipos do gigante. No Brasil, o melhoramento genético tem buscado aumentar o número de frutos e melhorar suas características organolépticas, além da resistência à doenças e tolerância à seca (RIBEIRO, 1993).

No Brasil, as pesquisas com coqueiro são conduzidas, principalmente, pela EMBRAPA no Centro de Pesquisa Agropecuária dos Tabuleiros Costeiros (CPATC) em Aracaju-SE. O CPATC dispõe de um banco de germoplasma denominado Banco Ativo de Germoplasma de Coco (BAG-Coco), iniciado em 1984, onde existem 13 acessos¹ de coqueiro gigante: Brasil (GBrPF-Praia do Forte); Brasil (GBrSJM-São José do Mipibu); Brasil (GBrM-Pernambuco); Brasil (GBrBF-Bahia Formosa); Brasil (GBrSR-Santa Rita); Brasil (GBrP-Pacatuba); Oeste Africano (GOA); Rennell (GRL); Polinésia (GPY); Vanuatu (GVT); Malásia (GML); Rotuma (GRT) e Tonga (GTG) e seis acessos de coqueiro anão: Amarelo da Malásia (AAM); Vermelho da Malásia (AVM); Vermelho de Camarões (AVC); Verde do Brasil (AVeB); Amarelo do Brasil (AAB) e Vermelho do Brasil (AVB).

O BAG-Coco tem sua estrutura montada em parcelas experimentais para caracterização e avaliação dos acessos por meio de ensaios de competição dispostos em blocos casualizados com três repetições. Alguns acessos de coqueiro gigante do Brasil (GBrM, GBrSJM, GBrBF, GBrSR, GBrPC) são conservados “in situ” e portanto, não se encontram em ensaios de competição. O número de plantas mantidas em cada população conservada “ex situ” varia de 150 a 448 (RIBEIRO & SIQUEIRA, 1995).

Todos os materiais do BAG-Coco estão em produção e em fase de caracterização morfológica segundo as recomendações do *International Plant Genetic Resources Institut* (IPGRI, ex IBPGR)². O objetivo da caracterização dos acessos existentes em um banco de germoplasma é possibilitar que o máximo da variabilidade genética seja reunida e preservada com o mínimo possível de

¹ Grupo de indivíduos que são coletados ou introduzidos em um banco de germoplasma e que são mantidos como uma população ou unidade genética para caracterização.

² Informação pessoal, Evandro Almeida Tupinambá, EMBRAPA/CPATC, Brasil, 1996.

duplicações, além de promover material genético para a condução de programas de melhoramento.

Os recursos genéticos de coqueiro presentes no BAG-Coco possuem variabilidade genética suficiente para a manutenção de um programa de melhoramento da cultura (RIBEIRO & SIQUEIRA, 1995). Diante da disposição destes recursos genéticos, o CPATC montou um programa de melhoramento do coco, cujo objetivo principal é identificar e selecionar material de alta produção, tanto de copra (gigante) como de água de coco (anão); identificar novos grupos heteróticos para produção de híbridos; e genótipos que sejam resistentes ou tolerantes às pragas e às doenças e tolerantes à seca¹. Atualmente, o programa de melhoramento de coco tem sido conduzido com base em métodos clássicos de seleção fenotípica com e sem teste de progênie, de obtenção e teste de híbridos, e de obtenção de composto (SIQUEIRA et al., 1994).

Estudo da variabilidade genética em coqueiros

A espécie *Cocos nucifera* apresenta diversidade morfológica, principalmente para cor, forma e tamanho do fruto. No entanto, há pouco conhecimento da variabilidade e estrutura genética da espécie.

Devido ao tipo de disseminação ocorrido com as populações de coqueiro, onde as sementes foram disseminadas por flutuação na corrente marítima e pelo transporte por navegantes em expedições marítimas (BAILEY, 1963; PURSEGLOVE, 1975), as populações de coqueiros foram formadas a partir de

poucos indivíduos e isoladas, o que, provavelmente, acentuou a divergência genética entre ecotipos devido à deriva genética, resultando nos diversos ecotipos encontrados atualmente. Segundo BOURDEIX et al. (1993), o fato do coqueiro produzir sementes grandes impede sua disseminação natural a longas distâncias, exceto se esta for via corrente marítima; além disso, o fato de serem produzidos poucos frutos por planta, representou um importante impacto na diversificação da espécie.

A variabilidade genética existente entre os diversos ecotipos de coqueiro é facilmente perceptível com base nas características morfológicas do fruto. Contudo, essa variabilidade não tem sido caracterizada adequadamente, mesmo utilizando-se as mais diversas metodologias.

Medidas de características vegetativas e de produção como morfologia, tempo de germinação da semente, biologia floral, composição física e química do fruto e da semente foram utilizadas em estudos de caracterização genética, sem grande sucesso (BOURDEIX et al., 1993; LEBRUN et al., 1995), pois são influenciadas pelas condições do meio ambiente onde a planta se desenvolve. Ademais, esse tipo de análise não se aplica para comparações entre as variedades gigante e anão.

Apesar dessas limitações, RIBEIRO (1993) avaliando caracteres de fruto por meio de análise estatística multivariada, em cinco populações de coqueiro gigante do Brasil, conseguiu identificar uma população (Gigante do Brasil, de Santa Rita) como sendo mais divergente das demais. Contudo, na quantificação da variabilidade genética a técnica mostrou-se limitada desde que das 19 características avaliadas, somente quatro explicaram a variação observada entre

¹ Informação pessoal, Francisco Elias Ribeiro, EMBRAPA/CPATC, Brasil, 1996.

as populações. AKPAN (1994), trabalhando com 12 populações de coqueiro gigante do banco de germoplasma da Nigéria, e usando maior número de características morfológicas e reprodutivas, como caracteres vegetativos, biologia floral, produção e composição do fruto, não conseguiu separar as populações em qualquer número de grupos distintos e homogêneos, mesmo sabendo que três populações eram originárias de um local bastante distante, geograficamente, das demais.

Outros estudos de variabilidade genética utilizando técnicas mais modernas também não mostraram-se eficientes. BENOIT & GHESQUIERE (1984) avaliaram oito ecotipos, quatro pertencentes à variedade anão e quatro pertencentes à variedade gigante, pela técnica de marcadores moleculares de isoenzimas e obtiveram pouco polimorfismo. A análise de polifenóis da folha, por cromatografia gasosa, mostrou haver um relacionamento entre os ecotipos e a origem da população (JAY et al., 1989). Houve, porém, dificuldades na comparação entre os ecotipos oriundos de diferentes condições ecológicas porque o conteúdo de polifenóis foi afetado pelas variações do ambiente.

As técnicas de marcadores de DNA podem ser usadas como alternativa, visto serem independentes das variações ambientais e fornecerem um número ilimitado de marcadores, por cobrirem todo o genoma e não apenas as regiões codantes (TANKSLEY et al., 1989). Estas características dos marcadores de DNA os fazem superiores às isoenzimas e aos polifenóis de folhas, além de serem apropriados para uso tanto em coqueiros das variedades gigante como anão.

As técnicas de RAPD e de RFLP foram aplicadas em coqueiro (LEBRUN et al., 1995) confirmando a estruturação geográfica encontrada quando se trabalhou com os polifenóis de folhas e com as características morfológicas. A técnica

mostrou-se também adequada para identificar como próximas, populações sabidamente aparentadas. Essas técnicas foram consideradas apropriadas para detectar e quantificar a variabilidade genética na espécie *Cocos nucifera*.

Em outras palmáceas também tem-se feito o uso de marcadores moleculares, como na avaliação de variabilidade genética entre populações, comportamento de híbridos e avaliação da distância genética entre seus pais e na identificação genética da espécie de dendê (*Elaes guinensis* L.) (BAUDOIN, 1992). Marcadores RFLP foram também utilizados com sucesso em dendê para confirmar a identidade de clones, derivados de cultura de tecidos, com a planta original (“fingerprinting”); para a construção de mapas de ligação na identificação de marcadores de características importantes, como a casca fina, a resistência à fusariose, a qualidade do óleo e a produtividade da planta (JACK & MAYES, 1993).

Conclui-se, portanto que estudos utilizando-se marcadores moleculares em coqueiro e espécies relacionadas, embora ainda escassos, mostraram-se bastante promissores, principalmente quando em confronto com as técnicas convencionais.

Marcadores moleculares

São vários os tipos de marcadores moleculares, como proteínas, isoenzimas, RFLPs (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) (BOTSTEIN et al., 1980), RAPDs (*Random Amplified Polymorphic DNA*) (WILLIAMS, et al., 1990); SCAR (*Sequences Characterized Amplified Regions*) (PARAN &

MICHELMORE, 1993), AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) (VOS et al., 1995), entre outros.

Os marcadores mais utilizados, atualmente, são os de DNA: RFLP, RAPD e AFLP. A técnica de RFLP (BOTSTEIN et al., 1980) baseia-se na fragmentação da molécula de DNA pela ação de enzimas de restrição. Os fragmentos assim originados são separados por tamanho em eletroforese com gel de agarose e posteriormente são transferidos do gel para uma membrana de celulose, onde são hibridizados com sondas marcadas radioativamente ou a frio (quimicamente). A visualização dos marcadores RFLPs é feita por autoradiografia, onde um filme de raio X é marcado pela radiação ou emissão de luz pela sonda.

Provavelmente, a principal vantagem do marcador RFLP está na possibilidade de se estudar para cada loco, genótipos homozigotos e heterozigotos, permitindo a análise detalhada da ação gênica e interação entre alelos para fins de mapeamento de características quantitativas.

Como limitações da técnica de RFLP, podem ser citados o processo de obtenção dos marcadores que é muito intensivo e trabalhoso, o que pode muitas vezes limitar o seu uso, e também a necessidade de construção de uma biblioteca de sondas, embora já existam bibliotecas disponíveis para as principais culturas (WILLIAMS et al., 1990)

Outra técnica de marcador de DNA, que se destaca pela capacidade de gerar polimorfismos em quantidades superiores tanto ao RFLP como ao RAPD, é o AFLP (polimorfismo de comprimento de DNA amplificado). Esta técnica é bastante recente, mas já vem tomando espaço nas análises de mapeamento genético e estudos de divergência genética. Sua limitação está na necessidade de obtenção de DNA puro, de exigir etapas para marcação da sonda e da

necessidade de equipamentos mais sofisticados, o que permite que a técnica de RAPD continue sendo, ainda, bastante utilizada. Em relação à técnica de RFLP, o AFLP não necessita da construção de uma biblioteca genômica, pois os iniciadores são de sequências arbitrárias (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1996).

A técnica de AFLP (VOS et al., 1995) baseia-se na amplificação de fragmentos de DNA gerados por enzimas de restrição. O DNA é clivado com duas enzimas, sendo uma de corte raro e outra de corte frequente, e “adapters” são ligados ao final do fragmento gerado além de uma pequena sequência de nucleotídeos seletivos (1 a 3), para que funcionem como sítio de anelamento de iniciadores em reação de amplificação, selecionando com isso fragmentos a serem amplificados. Desta forma, é possível por meio de uma reação de AFLP gerar uma quantidade muito grande de fragmentos polimórficos.

Marcadores de RAPD são utilizados em estudos de caracterização genética de bancos de germoplasma (CIPRIANI et al., 1994; HU & QUIROS, 1991; KAEMMER et al., 1992; MORENO et al., 1995; THOMAS et al., 1993; THORMANN & OSBORN, 1992; TZURI et al., 1991; VIERLING & NGUYEN, 1992; VIRK et al., 1995), em avaliação de variabilidade genética entre e dentro de populações (HALEY et al., 1994; HARVEY & BOTHA, 1996; KONGKIATNGAM et al., 1995; MARGALÉ et al., 1995; YEH et al., 1995;) e mesmo em construção de mapas de ligação (GRATTAPAGLIA & SEDEROFF, 1994; PROMBOON et al., 1995). Os mesmos constituem a classe de marcadores de DNA mais utilizada atualmente.

Estritamente sob o ponto de vista genético, as técnicas de RFLP e AFLP são superiores à técnica de RAPD. Contudo, esta última é de fácil implementação e possibilita resultados rápidos e de grande validade prática.

A técnica de RAPD (WILLIAMS et al., 1990) utiliza-se de uma reação de PCR (*Polymerase Chain Reaction*), a qual baseia-se no anelamento e extensão de um par de iniciadores (“primers”) que são pequenas moléculas de DNA de fita simples, os quais delimitam a sequência alvo da molécula de DNA (WELSH & McCLELLAND, 1990).

Para que haja a amplificação de um fragmento RAPD é necessário que o genoma apresente duas sequências de nucleotídeos complementares ao iniciador, estando estas com distância máxima entre si de 4.000 pares de bases, e com orientação oposta (WILLIAMS et al., 1990; VOS et al., 1995). A amplificação do fragmento é feita de modo exponencial e devido à grande quantidade produzida, o fragmento de DNA pode ser visualizado a olho nu, por meio de corante específico para DNA (brometo de etídio), como uma banda em gel de agarose.

Modificações ocorridas nos sítios de anelamento do iniciador, seja por mutação, inserção, ou deleção, e inserções no genoma que coloquem os dois sítios de iniciação a uma distância superior àquela percorrida pela polimerase, são capazes de gerar polimorfismo em ensaios de RAPD (WILLIAMS et al., 1990). Sendo assim, o polimorfismo genético gerado por marcadores RAPD é de natureza binária, sendo caracterizado pela ausência ou presença do marcador no gel, conferindo-lhe a característica de marcador dominante, sendo, para a maioria dos locos, impossível a distinção entre indivíduos homocigotos dominantes e heterocigotos (WILLIAMS et al., 1990; WELSH & McCLELLAND, 1990).

O polimorfismo de RAPD gerado em função da homologia do iniciador com a sequência de DNA genômico (geralmente 10 nucleotídeos) é sensível a pequenas mudanças nas sequências do sítio de iniciação. WILLIAMS et al. (1990),

trabalhando com fragmentos amplificados como sonda em ensaio de RFLP, verificaram que das onze sondas amplificadas, seis hibridizaram com DNA de cópia única, três hibridizaram com DNA medianamente repetitivo e duas hibridizaram com DNA altamente repetitivo, o que os levou a concluir que os marcadores RAPD detectam uma grande quantidade de polimorfismo distribuída por todo o genoma, amostrando inclusive regiões de DNA repetitivo. Portanto, a técnica de RAPD é eficiente nos estudos de divergência genética em que os indivíduos analisados são geneticamente próximos, ou seja, pertencem a uma mesma espécie (HALEY et al. 1994).

Um dos principais problemas da técnica de RAPD está na padronização das condições de amplificação (PENNER et al., 1993; SKROCK & NIENHUIS, 1995). Na avaliação da repetibilidade de ensaios de RAPD, em termos de fragmentos amplificados, PENNER et al. (1993) verificaram grande variabilidade quando diferentes termocicladores foram utilizados, principalmente, em razão de variações nas temperaturas e observaram que esta variabilidade diminuía com a padronização das condições da reação de amplificação. Contudo, mesmo o coquetel de reagentes tendo sido preparado com os mesmos reagentes, porém em tubos distintos, notaram uma pequena variação na amplificação, demonstrando o alto grau de sensibilidade da técnica às variações nas condições laboratoriais.

No entanto, SKROCK & NIENHUIS (1995) concluíram que diferenças na reprodutibilidade dos resultados e erros de leitura das bandas não afetaram a estimativa da distância genética entre variedades de feijão, pois a distribuição de erros de leitura entre genótipos foi aleatória. Esses autores também verificaram que houve variação entre iniciadores quanto à reprodutibilidade dos resultados e

sugeriram como estratégia para melhorar a reprodutibilidade de dados, uma pré-seleção de iniciadores. Entretanto, outros autores constataram que a variação nas repetições dos ensaios de RAPD tem sido pequenas, desde que sejam mantidas as mesmas condições de amplificação (SWEENEY & DANNEBERGER, 1994, 1995; SAMEC & NASINEC, 1996).

Os marcadores de DNA (RFLP e RAPD) têm sido recomendados para estudos de variabilidade genética (BRUMMER et al., 1991; GRANDO et al., 1995; BUCCI & MENOZZI, 1995). Os marcadores RAPD, por serem rápidos e de fácil detecção, têm sido sugeridos nos estudos de divergência genética entre indivíduos de banco de germoplasma (MARGALÉ et al., 1995) e para a obtenção de informações genéticas em espécies com pouca ou nenhuma informação genética (ECHT et al. 1991). A maior coleção de germoplasma de arroz do mundo tem sido manejada com base em marcadores RAPD, os quais têm sido utilizados para identificar e eliminar duplicatas, além de auxiliar na construção de uma “core collection” (VIRK et al., 1995).

Amostragem de populações geneticamente heterogêneas

Os estudos de divergência genética conduzidos por meio de marcadores de DNA utilizam, comumente, variedades de espécies autógamas (homozigotas), linhagens endogâmicas, ou clones de espécies alógamas. Nessas situações, há uniformidade genética dentro da população, o que possibilita que um único indivíduo represente, geneticamente, a população.

No caso de populações geneticamente heterogêneas, como aquelas mantidas por polinização livre, ou que apresentam elevadas taxas de fecundação cruzada, não há uniformidade genética dentro da população. Nesse caso, o estudo de variabilidade genética com marcadores de DNA pode ser feito por meio de amostras de plantas individuais, em número que possibilite a caracterização da variabilidade genética dentro da população, ou por meio de amostras compostas, que consistem da mistura das amostras individuais¹. As amostras compostas objetivam diminuir o custo da análise (SWEENEY & DANNEBERGER, 1994).

MICHELMORE et al. (1991) desenvolveram uma metodologia, denominada de *Bulk Segregant Analysis (BSA)*, para identificar, em populações segregantes, marcadores de DNA intimamente ligados a genes ou regiões genômicas de interesse. A partir do trabalho desses autores, as amostras compostas passaram a ser utilizadas em reações de RAPD ou RFLP, com vários propósitos: na distinção de variedades (SWEENEY & DANNEBERGER, 1994); na análise de relação genética entre cultivares intimamente relacionadas (LOARCE et al., 1996); na identificação de marcador ligado à resistência a doenças (POULSEN et al., 1995); na saturação de mapas de QTL (CHURCHILL et al., 1993; WANG & PATERSON, 1994); e na caracterização e análise de divergência genética entre populações (SWEENEY & DANNEBERGER, 1994, 1995; MARGALÉ et al., 1995).

A utilização de amostra composta em estudos de diversidade genética por meio de marcadores RAPD tem sido indicada pelo fato de poder-se avaliar grandes quantidades de populações em um curto espaço de tempo. Isso é particularmente relevante em coleções de germoplasma, onde pode ser utilizada para reorganizar e comparar germoplasmas caracterizados por descritores

¹ Esta mistura de indivíduos tem sido denominada de “bulk”.

morfológicos, os quais são muito influenciados pelo ambiente. Por exemplo, a distância genética entre populações de olerícolas (amostras compostas de DNA extraído de 40 sementes de 24 populações de couve-flor, 24 populações de repolho e 48 populações de couve), determinadas por marcadores RAPD em amostras compostas, foi coincidente com os dados morfológicos e com subdivisões dentro da espécie, em função da região de cultivo, da época de colheita e da origem geográfica (MARGALÉ et al., 1995). Além disso, pôde-se ainda caracterizar acessos com informações perdidas ou classificadas erroneamente.

Pode-se esperar que pequenas diferenças entre as frequências gênicas de duas populações analisadas não sejam detectadas em amostras compostas nos ensaios de RAPD. Contudo, mesmo com essa limitação o uso de amostras compostas tem sido útil na identificação da divergência genética, como foi para populações da grama *Poa annua* (SWEENEY & DANNEBERGER, 1995), e para populações de couve-flor (MARGALÉ et al., 1995). É possível que a técnica de RAPD seja eficiente para identificar grupos geneticamente distintos, a partir de amostras compostas, pelo fato de poder ser analisada uma grande quantidade de marcadores moleculares, os quais cobrem o genoma aleatoriamente. Assim, locos raros poderiam ser detectados e serem úteis na identificação de populações geneticamente distintas.

Muitas vezes o tamanho da amostra composta tem sido definido de forma empírica, ou, os critérios utilizados em sua determinação não têm sido explicitados. O tamanho da amostra composta tem variado desde 8 plantas (POULSEN et al., 1995) até 45 plantas (SWEENEY & DANNEBERGER, 1995). O tamanho da amostra composta pode afetar a sensibilidade da técnica de RAPD

em amplificar marcadores presentes na amostra com baixa frequência (MICHELMORE et al., 1991). Por exemplo, esses autores verificaram que em amostras que continham menos de 4% das plantas com o marcador, este não foi detectado, enquanto que, para alguns locos, esse limite foi de 10%. Em função dos resultados de MICHELMORE et al. (1991), outros autores têm atribuído este limite de detecção entre 4% a 5% (WANG & PATERSON, 1994; SWEENEY & DANNEBERGER, 1994, 1995). Contudo, LOARCE et al. (1996) verificaram que nenhum fragmento foi amplificado em amostras compostas contendo menos de 14% de DNA com o marcador na amostra composta, enquanto que os autores POULSEN et al. (1995) não detectaram fragmento amplificado em uma amostra composta contendo 12,5% de marcador (uma planta com fragmento em amostra de oito plantas).

Um fator importante a ser considerado na determinação da diluição máxima de marcador RAPD para que este seja amplificado é a intensidade com que a banda, que identifica o marcador, se apresenta no gel quando a reação de RAPD é feita com a amostra individual. Esta diferença na intensidade da banda, provavelmente, decorre da competição entre sequências de DNA pelo iniciador na reação de amplificação, pois fragmentos cuja sequência de DNA do sítio de anelamento apresenta maior homologia com o iniciador são amplificados mais intensamente (GIBBS et al., 1989). No entanto, amplificação de misturas de DNA pode não gerar os mesmos fragmentos gerados por amostras individuais (SWEENEY & DANNEBERGER 1994).

Objetivos

1. Desenvolver a técnica de marcador RAPD para avaliação da divergência genética entre e dentro de ecotipos de coqueiro.
2. Verificar a sensibilidade da reação de RAPD em amostras compostas de DNA de concentrações conhecidas.
3. Avaliar o efeito de repetições e do tamanho da amostra composta em estudos de divergência genética entre populações de coqueiro e de variabilidade genética intrapopulacional.
4. Comparar o uso de amostras individuais e amostras compostas para avaliação de divergência genética.

MATERIAL E MÉTODOS

Material genético

Três ecotipos de coqueiro gigante foram selecionados com o objetivo de avaliar a utilização da técnica de marcadores RAPD e tipos de amostragem em estudos de divergência genética entre ecotipos de coqueiro.

Os ecotipos utilizados foram representados pelos seguintes acessos: Gigante do Brasil - Praia do Forte (GBrPF), Gigante do Oeste Africano (GOA) e Gigante de Rennell (GRL) (Quadro 1), todos pertencentes à coleção de germoplasma “ex situ” do Banco Ativo de Germoplasma de Coco da EMBRAPA/CPATC (BAG-Coco), localizado em Betume, SE.

A escolha dos acessos foi feita com base na expectativa da divergência genética entre os ecotipos baseada na origem geográfica (RIBEIRO &

SIQUEIRA, 1995) e características morfológicas dos acessos avaliadas no BAG-Coco¹. Neste sentido, o acesso GRL, do ecotipo originário das Ilhas Salomão, seria o mais distante geneticamente dos demais e, os acessos GOA, do ecotipo da Costa do Marfim - África, e GBrPF, do ecotipo da Praia do Forte, BA - Brasil, os mais próximos.

Amostras de tecido foliar com comprimento de aproximadamente 40 cm foram coletadas da folha mais jovem da planta (ainda dentro da espata). As amostras foram embaladas em saco de papel, identificadas e enviadas para o Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal da Universidade Estadual do Norte Fluminense, onde foram subdivididas em quatro ou seis sub-amostras e congeladas em N₂ líquido. Depois de congeladas, as sub-amostras foram mantidas em freezer a - 70°C.

Para cada acesso, coletou-se sete plantas de cada bloco do ensaio de competição do BAG-Coco, totalizando 21 plantas por acesso.

Quadro 1. Identificação dos acessos de coqueiro gigante amostrados no Banco Ativo de Germoplasma da EMBRAPA/CPATC (RIBEIRO & SIQUEIRA, 1995)

Ecotipo de Gigante	Origem	Forma de entrada	Ano
Brasil-Praia do Forte (GBrPF)	Bahia	coleta	1982
Oeste Africano (GOA)	Costa do Marfim	introdução	1983
Rennell (GRL)	Salomão	introdução	1983

¹ Informação pessoal, Francisco Elias Ribeiro, EMBRAPA/CPATC, Brasil, 1996.

Extração de DNA

A extração de moléculas de DNA a partir de folhas de coqueiro foi conduzida com base em protocolo ajustado no Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal (LMGV) do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias (CCTA) da Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF). Este protocolo baseou-se nos de AL-SHAYJI et al. (1994) e de VALLEJOS et al. (1992).

Oito soluções estoque foram preparadas: Tris 1M pH 8,0; EDTA 0,5M pH 8,0; NaCl 5M; CTAB 5%; Dissulfito de potássio 1M; TE pH 8,0; NaOAc 3M e clorofórmio: álcool isoamílico (24:1). As soluções estoques foram mantidas em temperatura ambiente, com exceção do dissulfito de potássio que foi mantido em geladeira.

O tampão de extração (Quadro 2) foi preparado, sempre no início do processo de extração, sendo o β -mercaptoetanol adicionado por último, em capela de exaustão.

Quadro 2. Tampão de extração preparado a partir de soluções estoque.

Solução Estoque	Concentração Final
Tris (1M)	100 mM
EDTA (0,5M)	50 mM
NaCl (5M)	1,4 M
Dis. K (1M)	20 mM
β -Mercapt	1%
CTAB 5%	2%
Água bidestilada autoclavada	q.s.p.

Para a extração das moléculas de DNA, aproximadamente 0,5g de tecido foliar foi macerado em almofariz de porcelana contendo N₂ líquido, até a obtenção de um pó fino. Durante a maceração adicionou-se 0,1g de PVPP (Polivinilpirrolidona) para auxiliar na prevenção de oxidação. Essa quantidade de PVPP utilizada correspondeu a 20% em relação ao peso do tecido foliar, a qual foi menor que a recomendada por AL-SHAYJI et al. (1994) quando da utilização de PVP (polivinilpirrolidona) como anti-oxidante (60% do produto em relação ao peso do tecido vegetal). Esta quantidade de PVPP utilizada pelo LMGV foi obtida após vários ensaios em que se testou a diminuição da quantidade de PVPP na qualidade do produto extraído, avaliada pela coloração do precipitado de DNA. Este anti-oxidante foi adicionado no momento da maceração devido sua difícil solubilização.

Tendo sido concluída a maceração do tecido foliar, o pó obtido foi transferido para tubo de centrífuga de 50 ml, previamente congelado em N₂ líquido. Para evitar a oxidação do tecido, todo o processo de manipulação foi conduzido sob congelamento, até o momento da adição do tampão de extração.

A seguir, o tecido foi ressuspensionado em 4-5 ml de tampão de extração, previamente aquecido a 65°C. A suspensão foi mantida em banho-maria, a 65°C, por 30 minutos, sendo tolerado um período de incubação de no máximo 60 minutos. Durante o processo de incubação, os tubos foram invertidos suavemente a cada 10 minutos para facilitar a homogeneização da solução.

Passado o tempo da incubação, os tubos foram esfriados em água corrente e feita a primeira extração com solvente orgânico. Para isso, adicionou-se igual volume de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) e uma emulsão homogênea foi feita agitando suavemente o tubo. Feita a emulsão, procedeu-se à centrifugação

em centrífuga HERMLE Z 230A, a uma rotação de 3.000 rpm por 6 minutos, com o propósito de eliminar os fragmentos de tecido foliar e fazer uma primeira retirada de lipídios e proteínas.

Após a centrifugação, o sobrenadante foi transferido para outro tubo, utilizando-se ponteira de micropipeta com ponta cortada, com cuidado para não succionar a interface entre as duas fases formadas. À fase aquosa, no novo tubo, foram feitas mais duas extrações com clorofórmio, para eliminação de impurezas.

A precipitação das moléculas de ácidos nucleicos, contidas em solução aquosa recuperada após centrifugação com clorofórmio, foi feita pela adição de isopropanol frio (mantido em freezer a -20°C), na quantidade equivalente a $2/3$ do volume da solução aquosa, invertendo gentilmente o tubo. O tubo foi mantido em geladeira por um período mínimo de duas horas, ou durante a noite, quando não foi possível a continuação da extração no mesmo dia.

Com o auxílio de pipeta Pasteur com ponta curvada, recuperou-se os ácidos nucleicos, transferindo-os para tubo eppendorf de 2,0 ml. Ao precipitado recuperado adicionou-se 1 ml de etanol 80% gelado para lavagem. A lavagem foi feita deixando o precipitado em etanol em geladeira por um período de 10 a 20 minutos e depois descartando-se o solvente. O precipitado foi então secado a vacuo, por um período médio de 2 a 3 horas, dependendo de seu tamanho.

Após secagem, o precipitado foi ressuspendido em 500 μl de tampão TE (10 mM Tris + 1 mM EDTA) mais 3 μl de RNase (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) e incubado a 37°C por 30 minutos para a digestão de RNA.

A seguir, foi feita nova precipitação da molécula de DNA, com o objetivo de eliminar a RNase e outras impurezas ainda presentes no extrato. Para isso,

adicionou-se 55,5 µl de NaOAc 3M (1/9 vol.) e 370 µl de isopropanol (2/3 vol.) invertendo suavemente o tubo até precipitação do DNA.

Depois, o DNA foi transferido para tubo eppendorf de 1,7 ml, onde foi lavado com 1 ml de etanol 80% por centrifugação em microcentrífuga eppendorf na velocidade máxima (18.000 rpm) durante 5 minutos. Após centrifugação descartou-se o etanol e o precipitado foi secado a vácuo e novamente ressuscitado em 500 µl de TE.

A ressuspensão do precipitado não ocorreu facilmente, devido provavelmente à presença de polissacarídeos (LEBRUN et al., 1995). Para a ressuspensão, o DNA em TE foi deixado em temperatura ambiente por mais ou menos 12 horas. A ressuspensão foi completada agitando-se a solução em vortex (50 rpm), pois, mesmo por centrifugação à velocidade máxima (microcentrífuga eppendorf) durante 30 minutos, não foi possível precipitar o “complexo de polissacarídeos”. Este torna a solução viscosa e sempre que foi feita retirada de alíquotas da solução de DNA esta foi agitada em vortex.

A concentração de DNA extraída foi determinada em espectrofotômetro de luz ultravioleta (Spekol UV VIS da Zeiss) a 260 nm de absorbância.

Ensaio de Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso (RAPD)

A obtenção dos polimorfismos de DNA foi feita seguindo-se o protocolo descrito por WILLIAMS et al. (1990), com modificações. Os ensaios de RAPD foram conduzidos em Termociclador Perkin Elmer 9600, utilizando tubos de 200µl

da Perkin Elmer. O coquetel de reagentes (Quadro 3) utilizado para amplificação foi preparado utilizando-se kit de reagentes para PCR - tampão PCR 10X, MgCl₂ (25 mM), dATP, dCTP, dGTP, TTP (todos a 10 mM) e Taq Polimerase (1000 un/ml) - fornecidos pela Perkin Elmer e iniciadores da Operon Technologies.

Quadro 3. Coquetel de reagentes para ensaio de RAPD

Reagentes	Concentração final
Água bidestilada autoclavada(q.s.p.)	25 µl
Tampão PCR (10X)	1X
MgCl ₂ (25mM)	2 mM
dNTPs (2mM cada)	100 µM
Primer (5µM)	0,2 µM
Taq Polimerase (5un/µl)	1 un
DNA (20ng/µl)	50 ng

A solução de dNTP's, contendo os quatro nucleotídeos a uma concentração de 2 mM cada, foi preparada em um volume de 500 µl e estocada em freezer a -20°C. Sempre que necessário, nova solução foi preparada.

O volume final para cada reação de amplificação (PCR) foi de 25µl, e as condições para amplificação foram as seguintes:

- 1 minuto a 92°C para desnaturação da dupla fita de DNA;
- 1 minuto a 35°C para o anelamento do iniciador ;
- 2 minutos a 72°C para extensão da fita complementar de DNA pela Taq Polimerase e incorporação de nucleotídeos.

Estas etapas foram repetidas 40 vezes, além de uma etapa anterior ao primeiro ciclo, de 1 minuto a 95°C. Após os 40 ciclos houve uma etapa final para

extensão e finalização dos produtos amplificados com duração de 7 minutos a 72°C.

Após a amplificação, adicionou-se ao conteúdo dos tubos 5 µl de tampão de carregamento para eletroforese (“Blue Juice” 6X - Corante com azul de bromofenol e sacarose para auxiliar o carregamento das amostras no gel e a visualização da frente de corrida). Quando não foi possível continuar o ensaio de RAPD logo após a amplificação, os tubos foram guardados em geladeira para posterior eletroforese.

Os produtos amplificados foram separados por eletroforese horizontal em gel de agarose a 1,4% e tampão TAE 1X. As dimensões da cuba de eletroforese utilizada foram de 23,0 cm de largura por 47,5 cm de comprimento, com capacidade para 300 ml de gel e três pentes, cada um com 34 poços com capacidade de 25 µl/poço.

O gel de agarose foi carregado com 25 µl da amostra contendo os fragmentos amplificados e o tampão de carregamento, além de um padrão de fragmentos Lambda digerido com PstI, sempre ao lado da primeira amostra da série, para servir como marcador na análise dos fragmentos amplificados.

A corrida de eletroforese foi realizada a uma voltagem de 80V com amperagem variando de 130 a 190 mA por aproximadamente 5 horas. Algumas corridas foram feitas a 30V (~50 mA) durante o período da noite.

Quando a frente de “Blue Juice” atingiu cerca de nove cm de corrida, a voltagem foi desligada e o gel corado em uma solução de brometo de etídio (5 µg/ml) por 15 a 20 minutos. Depois de corado, o gel foi descorado em água bidestilada por aproximadamente duas horas.

Os fragmentos amplificados foram visualizados colocando-se o gel sobre um transiluminador de luz ultra-violeta (U.V.). Para fotodocumentação utilizou-se câmara polaroid com filme preto e branco (polaróide 667), abertura de 5,6 e velocidade de 1 segundo (B1).

A leitura das bandas no gel foi feita pela tabulação dos resultados em 0 ou 1, respectivamente para ausência ou presença de banda. Para cada iniciador foram analisados apenas os locos em que a leitura não era duvidosa. Bandas com diferenças de intensidade muito marcantes, entre acessos diferentes, foram consideradas diferentes.

Na análise dos resultados, cada tamanho de fragmento amplificado foi considerado como sendo um loco, e cada loco foi denominado pelo nome do iniciador seguido de uma letra. Para um mesmo iniciador, as letras foram distribuídas em ordem crescente à medida que o fragmento diminuía de tamanho. Exemplo: A9a corresponde ao loco com fragmento de maior tamanho amplificado pelo iniciador OP-A9.

Sensibilidade do ensaio de RAPD em amplificar fragmentos de DNA em amostra composta

Nesta etapa, determinou-se a sensibilidade da técnica de RAPD na amplificação de DNA em amostra composta com proporções conhecidas. Seu objetivo foi determinar a que limite de diluição das moléculas de DNA pode-se obter amplificação de fragmentos em quantidades detectáveis no gel de agarose.

Para isso, foram feitas misturas de moléculas de DNA extraídos de duas plantas apresentando locos polimórficos.

A escolha de marcadores RAPD polimórficos para a realização deste ensaio foi feita por meio de “screening” realizado com a série AB de iniciadores da Operon Thecnologies (OP-AB1 a OP-AB20) e com os genótipos de coqueiro Anão Amarelo de Gramami (AAG), Gigante do Brasil-Baia Formosa (GBrBF), Gigante do Oeste Africano (GOA) e Gigante de Rennell (GRL).

As misturas de moléculas de DNA foram feitas misturando-se soluções de DNA (21 ng/ μ l) extraídas dos genótipos GOA e GRL. Foram feitas misturas com diferentes proporções de DNA de cada genótipo (Quadro 4). À medida que a proporção de um genótipo, com a presença de um fragmento, diminui na mistura, para um loco específico, a proporção do outro genótipo (com ausência do fragmento) aumenta. A proporção de um genótipo com presença do fragmento analisado variou de 50% - para uma mistura de 2 plantas - a 6,67% - para uma mistura de 15 plantas. Por exemplo: a mistura contendo 1/3 de GOA e 2/3 de GRL (mistura nº 2) simula uma situação onde são amostradas três plantas sendo que uma apresenta o fragmento e as outras duas não; e a mistura com 1/10 de GOA e 9/10 de GRL (mistura nº 9) simula uma amostragem de 10 plantas onde apenas uma apresenta o fragmento.

Quadro 4. Misturas de DNA para determinação da diluição máxima de DNA a ser utilizada em ensaio de RAPD.

Mistura	nº ind ¹	%	nº ind ²	%
nº	GOA		GRL	
1	1/2	50,00	1/2	50,00
2	1/3	33,33	2/3	66,67
3	1/4	25,00	3/4	75,00

4	1/5	20,00	4/5	80,00
5	1/6	16,67	5/6	83,33
6	1/7	14,29	6/7	85,71
7	1/8	12,50	7/8	87,50
8	1/9	11,11	8/9	88,89
9	1/10	10,00	9/10	90,00
10	1/11	9,09	10/11	90,91
11	1/12	8,33	11/12	91,67
12	1/13	7,69	12/13	92,31
13	1/14	7,14	13/14	92,86
14	1/15	6,67	14/15	93,33
		GRL	GOA	
15	1/2	50,00	1/2	50,00
16	1/3	33,33	2/3	66,67
17	1/4	25,00	3/4	75,00
18	1/5	20,00	4/5	80,00
19	1/6	16,67	5/6	83,33
20	1/7	14,29	6/7	85,71
21	1/8	12,50	7/8	87,50
22	1/9	11,11	8/9	88,89
23	1/10	10,00	9/10	90,00
24	1/11	9,09	10/11	90,91
25	1/12	8,33	11/12	91,67
26	1/13	7,69	12/13	92,31
27	1/14	7,14	13/14	92,86
28	1/15	6,67	14/15	93,33

¹ Denominador indica o número de indivíduos utilizados na mistura e numerador indica o número de indivíduos com a presença do fragmento polimórfico.

² Denominador indica o número de indivíduos utilizados na mistura e numerador indica o número de indivíduos com a ausência do fragmento polimórfico.

A leitura das bandas em cada mistura foi feita por notas dadas em função da intensidade da banda. As notas variaram de 0 a 4, sendo 0 dado para ausência de banda; 1 para banda mal definida (sombra); 2 para banda fraca; 3 para banda média e 4 para banda forte.

Polimorfismo de DNA: comparação de amostras individuais versus amostras compostas.

Os ensaios de RAPD conduzidos nesta etapa foram realizados utilizando-se, para cada ecotipo, amostras de DNA provenientes de plantas individuais e de misturas de DNA de várias plantas.

As amostras de plantas individuais serão denominadas de amostras individuais e aquelas onde fez-se a mistura de DNA de duas ou mais plantas, de amostras compostas. Portanto, neste trabalho, as amostras compostas consistiram da mistura de soluções de DNA extraído de dois ou mais indivíduos, sendo que as soluções básicas apresentavam concentração de 20 ng de DNA/ μ l.

Soluções de DNA¹ foram obtidas das 63 plantas individuais, sendo 21 de cada acesso, as quais consistiram das amostras individuais. Essas amostras foram analisadas individualmente pela técnica de RAPD. As reações de RAPD foram realizadas com 15 iniciadores da série A e três da série AB, da Operon Technologies.

As mesmas soluções de DNA foram utilizadas para a obtenção das amostras compostas. Foram sorteadas, com reposição de dados, 2, 3, 5, 7 e 10 soluções de DNA do acesso GBrPF para produzir cinco amostras compostas contendo DNA de até, respectivamente, 2, 3, 5, 7 e 10 plantas, as quais foram repetidas 11 vezes, totalizando 55 amostras compostas. Essas amostras foram utilizadas em ensaios de RAPD com o objetivo de verificar o efeito da repetição e do tamanho da amostra composta na estimativa da frequência genotípica dos

¹ moléculas de DNA suspendidas em solução tampão de TE.

marcadores na população. As reações de RAPD foram realizadas com o iniciador OP-AB5.

Outro sorteio foi feito, porém sem reposição de dados, utilizando as mesmas soluções de DNA. Neste caso, foram sorteadas, para cada acesso, 3, 5, 10 e 21 soluções para formarem 12 amostras compostas pela mistura de, exatamente, 3, 5, 10 e 21 plantas. Para essas amostras compostas não foram feitas repetições. Reações de RAPD foram conduzidas com estas 12 amostras compostas utilizando-se quatro iniciadores da série A (OP-A9, OPA11, OP-A15 e OP-A19) e dois da série AB (OP-AB1 e OP-AB5).

Análises estatísticas

As análises estatísticas foram feitas utilizando-se o programa computacional SPSS 6.0 (pacote de análises estatísticas integrado, desenvolvido por SPSS Inc., 444 N. Michigan Avenue, Chicago, Illinois 60611, U.S.A.).

Foram feitas análises multivariadas para agrupar plantas (amostras individuais), mistura de plantas (amostras compostas) ou acessos (representados por amostras individuais ou compostas) em função de medidas de dissimilaridades; e análises univariadas para determinar a proporção mínima de DNA em amostra composta para haver amplificação e para verificar o efeito da repetição e do tamanho de amostras compostas e amostras simples na estimativa da frequência de marcadores RAPD.

a) *Análise multivariada.*

O agrupamento de casos¹ (amostras individuais ou amostras compostas) foi feito por *análise hierárquica de cluster* e *análise de escalonamento multidimensional*.

A análise de *cluster* foi utilizada para o agrupamento de amostras individuais, de amostras compostas e de acessos, em dois ou até seis grupos. Esta mesma análise também foi utilizada para a construção de dendrogramas.

Este tipo de análise objetiva combinar os *clusters* hierarquicamente e em grupos relativamente homogêneos; os *clusters* são formados pelo agrupamento dos casos em grupos cada vez maiores, até que todos os casos tenham sido agrupados em um único *cluster*.

O agrupamento dos casos foi feito com base em matriz de dissimilaridade calculada pela distância euclidiana ($d_{ii'}$) entre dois casos (i e i'), conforme a seguinte expressão (CRUZ & REGAZZI, 1994):

$$d_{ii'} = \sqrt{\sum_j (x_{ij} - x_{i'j})^2}$$

O método utilizado para o agrupamento dos casos foi o da *média entre grupos*. Esse processo combina os *clusters* minimizando a distância média entre todos os pares de casos, com base nas distâncias de todos os pares e, não somente do vizinho mais próximo ou do vizinho mais distante. Os dendrogramas foram construídos mostrando a forma de combinação dos *clusters*. Na

¹ Casos representam a forma em que os dados foram organizados para a análise. Por exemplo, 21 amostras individuais de um único acesso pode resultar em 21 casos se na análise tiver sido utilizada a informação de

representação gráfica, os valores dos coeficientes em cada passo do processo foram reescalados para uma faixa de 1 a 25.

A análise bidimensional foi utilizada para representar a distância entre os casos no espaço multidimensional. Foram calculadas as coordenadas das distâncias euclidianas entre os casos no espaço bidimensional e tridimensional; porém, somente as coordenadas para o espaço bidimensional foram plotadas em gráfico de dispersão, preparados na planilha eletrônica Excel 5.0, da Microsoft Corporation.

Tanto a análise de *cluster* quanto a análise bidimensional foram baseadas em medidas de dissimilaridade. O cálculo das medidas de dissimilaridade dependeu do tipo de dado. Quando os dados foram binários, utilizou-se a distância euclidiana sem qualquer padronização prévia; quando os dados consistiram de frequência, estes foram previamente padronizados. Neste caso, a padronização consistiu em dividir o valor de cada variável pelo desvio padrão da respectiva variável. Quando o valor do desvio padrão foi zero, os dados permaneceram inalterados para a respectiva variável.

b) Análise univariada.

Para determinação da proporção mínima de DNA em amostra composta para que haja amplificação de fragmentos, ajustou-se uma equação logarítmica a partir de notas dadas na leitura das bandas, nas diversas proporções de mistura de DNA, em função de sua intensidade. O ajuste da equação foi feito na planilha Excel 5.0 da Microsoft Corporation.

cada planta individualmente; contudo, se tiver sido utilizada a frequência da presença de bandas nos locus das 21 plantas, os dados serão então representados como sendo um único caso.

A análise do efeito da repetição e do tamanho da amostra composta ou da amostra individual na estimativa da frequência de marcadores RAPD foi baseada na estatística *R de Pearson* ou coeficiente de correlação de Pearson, a qual é uma medida da associação linear entre duas variáveis. Seu valor varia de -1 (perfeito relacionamento negativo) a +1 (perfeito relacionamento positivo). O valor 0 indica ausência de relacionamento.

A estatística R de Pearson foi utilizada em substituição à análise qui-quadrado, pois seu uso foi restringido pela ocorrência de frequência esperada menor que 5 em mais de 20% das células das tabelas de contingência.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e a discussão serão apresentados em três tópicos. No primeiro será feita a avaliação da divergência genética entre os acessos com base nos dados obtidos das plantas individuais; no segundo, será avaliada a sensibilidade do ensaio de RAPD na amplificação de fragmentos de DNA de amostras compostas; e finalmente, no terceiro tópico serão feitas comparações de polimorfismo de DNA obtidos por amostras individuais e compostas na análise de divergência genética entre ecotipos de coqueiro gigante.

Como a variedade gigante é alógama, sendo, portanto, esperado existir grande variabilidade genética entre os indivíduos de um mesmo ecotipo, a divergência genética entre acessos avaliada pelas amostras individuais (21 plantas de cada acesso) foi considerada como padrão para comparação da divergência genética avaliada pelas amostras compostas ou com número inferior de plantas individuais.

Divergência genética entre três acessos de coqueiro gigante avaliada por marcadores RAPD em amostras individuais

Dos dezoito iniciadores utilizados, apenas seis foram selecionados para análise, por apresentarem polimorfismos e padrão de bandas considerados bons para leitura. Para as 21 plantas individuais de cada acesso, estes seis iniciadores (OP-A9, OP-A11, OP-A15, OP-A19, OP-AB1 e OP-AB5) possibilitaram a leitura de 49 locos, sendo que desses, 43 foram polimórficos entre os três acessos. O loco OP-AB5h foi lido apenas para as plantas do acesso GBrPF, por ser importante na avaliação da estimativa da frequência de marcador RAPD dentro da população quando se utilizam amostras compostas repetidas; e por não apresentar padrão de banda bom para leitura nos demais acessos.

Sendo assim, do total de locos amplificados e analisados, 88% foram polimórficos entre acessos e desses, 86% foram polimórficos dentro de pelo menos um acesso, mas apenas 7% dos locos foram polimórficos entre todas plantas analisadas (Quadro 5). Estes resultados indicam uma grande variabilidade genética entre os acessos mas não dentro destes. Os três ecotipos apresentaram grande proporção de locos fixados¹ (Quadro 5), o que demonstra haver pouca variabilidade genética dentro das populações.

¹ Locos com frequência 0% ou 100%.

Quadro 5. Frequência, em porcentagem, de fragmentos amplificados em reação de RAPD de 21 amostras de folhas de coqueiro coletadas em cada população dos acessos GBrPF, GOA e GRL, para locos polimórficos entre acessos.

Loco	GBrPF	GOA	GRL	Loco	GBrPF	GOA	GRL
A9b	9,52	0,00	100,00	A19a	80,95	52,38	100,00
A9c	85,71	90,48	95,24	A19b	100,00	100,00	95,24
A9d	95,24	100,00	0,00	A19c	0,00	0,00	57,14
A9e	100,00	100,00	47,62	A19d	38,10	33,33	0,00
A9f	0,00	19,05	100,00	A19e	0,00	0,00	4,76
A9g	100,00	100,00	0,00	A19f	100,00	100,00	0,00
A9h	0,00	0,00	42,86	AB1b	0,00	0,00	38,10
A9i	100,00	57,14	95,24	AB1c	0,00	0,00	66,67
A9j	95,24	100,00	100,00	AB1d	14,29	0,00	0,00
A9k	95,24	100,00	100,00	AB1e	0,00	0,00	57,14
A9l	57,14	85,71	0,00	AB1f	100,00	95,24	100,00
A11a	0,00	0,00	100,00	AB1g	76,19	100,00	23,81
A11b	100,00	100,00	0,00	AB1h	80,95	90,48	100,00
A11f	80,95	100,00	0,00	AB1i	19,05	9,52	0,00
A11g	14,29	28,57	100,00	AB5a	42,86	100,00	0,00
A15a	4,76	0,00	100,00	AB5b	0,00	0,00	100,00
A15b	100,00	100,00	0,00	AB5c	61,90	100,00	100,00
A15c	100,00	95,24	0,00	AB5d	85,71	100,00	0,00
A15d	38,10	0,00	0,00	AB5e	28,57	0,00	100,00
A15e	14,29	80,95	95,24	AB5f	95,24	100,00	80,95
A15f	100,00	71,43	76,19	AB5g	0,00	0,00	85,71
A15g	76,19	100,00	100,00	AB5h	66,67	nd ¹	nd
A19f	100,00	100,00	0,00	Locos			
A19a	80,95	52,38	100,00	fixados²	25	35	33
A19b	100,00	100,00	95,24	%	52%	73%	69%
A19c	0,00	0,00	57,14				
A19d	38,10	33,33	0,00				
A19e	0,00	0,00	4,76				

¹nd = não determinado.

²na contagem foram considerados os cinco locos monomórficos não apresentados no quadro.

A divergência genética entre acessos avaliada pela análise de *cluster*, baseada nos 43 locos polimórficos, confirmou serem os acessos representativos de populações homogêneas e distintas de coqueiro gigante (Figuras 1 e 2).

Geneticamente, o acesso GRL foi considerado mais distante dos demais, sendo GOA e GBrPF relativamente próximos entre si, porém distintos (Figura 2). As plantas pertencentes ao acesso GBrPF mostraram-se mais divergentes entre si em relação aos outros dois acessos. A análise da frequência de locos fixados no acesso GBrPF (Quadro 5) também indica ser este o de maior variabilidade, pois 48% dos locos mostraram-se polimórficos, enquanto que para os outros acessos esta porcentagem foi consideravelmente menor, sendo 27% e 31% para GOA e GRL, respectivamente.

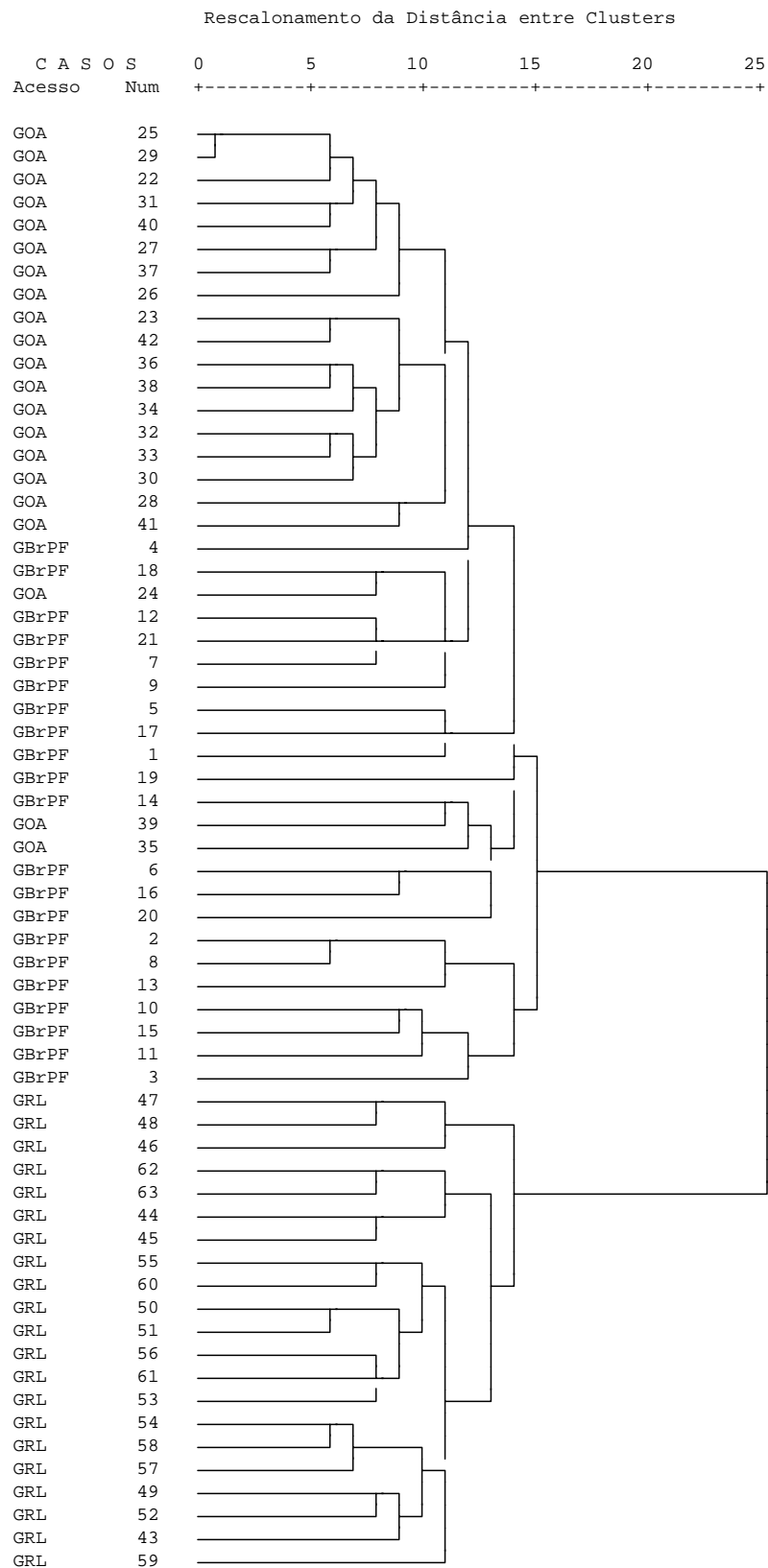


Figura 1. Dendrograma da distância euclidiana para o agrupamento de 63 plantas (21 de cada acesso) pelo método da média entre grupos.

Quadro 6. Dimensões das distâncias euclidianas no plano bi- e tridimensional para as 21 plantas individuais dos acessos GBrPF, GOA e GRL

Acesso	Nº da amostra	Espaço de 3 dimensões			Espaço de 2 dimensões	
		1	2	3	1	2
GBrPF	1	0,990	0,148	0,781	0,881	-0,468
GBrPF	2	0,724	-0,698	-0,766	0,616	0,751
GBrPF	3	0,926	-1,107	-0,786	0,769	1,081
GBrPF	4	0,773	1,104	-0,044	0,677	-0,865
GBrPF	5	0,744	-1,175	0,516	0,598	1,032
GBrPF	6	1,001	-1,201	0,525	0,829	1,038
GBrPF	7	1,177	-0,519	0,603	0,995	0,537
GBrPF	8	0,665	-0,065	-1,003	0,671	-0,523
GBrPF	9	1,160	-0,367	0,960	0,972	0,744
GBrPF	10	0,991	-1,218	-0,637	0,821	1,105
GBrPF	11	0,944	-1,132	-0,641	0,776	1,052
GBrPF	12	1,285	0,001	0,043	1,066	0,023
GBrPF	13	0,262	-1,168	-0,918	0,184	1,195
GBrPF	14	1,221	-0,449	1,045	1,042	0,796
GBrPF	15	0,857	-1,408	-0,449	0,691	1,215
GBrPF	16	1,028	-1,182	0,817	0,836	1,160
GBrPF	17	1,047	-1,356	0,159	0,857	1,112
GBrPF	18	1,101	-0,621	-0,754	0,924	0,736
GBrPF	19	0,961	-0,576	-1,172	0,802	1,009
GBrPF	20	0,878	-1,218	0,438	0,710	1,050
GBrPF	21	1,165	-0,770	0,172	0,971	0,597
GOA	22	1,011	0,758	-0,431	0,882	-0,629
GOA	23	0,989	0,608	-0,256	0,847	-0,466
GOA	24	1,076	-0,257	-0,396	0,902	0,287
GOA	25	1,130	0,590	-0,399	0,974	-0,487
GOA	26	1,323	0,425	-0,252	1,121	-0,309
GOA	27	1,003	0,791	-0,438	0,874	-0,668
GOA	28	1,201	0,792	0,174	1,025	-0,601
GOA	29	1,130	0,590	-0,400	0,974	-0,487
GOA	30	1,061	0,731	0,076	0,902	-0,557

Continua...

Continuação do Quadro 6.

Acesso	Nº da amostra	Espaço de 3 dimensões			Espaço de 2 dimensões	
		1	2	3	1	2
GOA	31	1,187	0,765	-0,708	1,056	-0,723
GOA	32	1,127	0,723	0,349	0,963	-0,593
GOA	33	1,243	0,527	0,320	1,053	-0,438
GOA	34	1,339	0,258	0,635	1,163	-0,326
GOA	35	1,067	0,737	0,862	0,940	-0,836
GOA	36	1,244	0,674	0,462	1,063	-0,600
GOA	37	0,852	0,939	-0,558	0,756	-0,829
GOA	38	1,184	0,707	0,217	1,002	-0,571
GOA	39	1,368	0,001	1,100	1,287	-0,429
GOA	40	1,163	0,647	-0,566	1,018	-0,576
GOA	41	0,880	0,836	0,651	0,772	-0,787
GOA	42	0,994	0,812	-0,179	0,851	-0,635
GRL	43	-2,252	0,050	0,289	-1,889	-0,106
GRL	44	-2,134	0,157	1,038	-1,915	-0,279
GRL	45	-2,088	0,176	0,655	-1,795	-0,241
GRL	46	-1,616	0,667	-1,052	-1,405	-0,856
GRL	47	-2,023	0,451	-0,525	-1,719	-0,397
GRL	48	-1,873	-0,149	-0,931	-1,678	0,262
GRL	49	-2,099	0,021	0,293	-1,763	-0,080
GRL	50	-1,974	0,262	-0,623	-1,696	-0,239
GRL	51	-1,895	0,259	-0,606	-1,628	-0,238
GRL	52	-2,254	0,066	0,249	-1,887	-0,109
GRL	53	-2,188	0,087	0,027	-1,824	-0,120
GRL	54	-2,179	0,036	0,258	-1,827	-0,087
GRL	55	-2,011	0,072	-0,362	-1,694	-0,094
GRL	56	-2,183	0,077	-0,204	-1,824	-0,103
GRL	57	-2,222	0,011	0,499	-1,888	-0,061
GRL	58	-2,103	0,038	0,248	-1,763	-0,088
GRL	59	-2,195	0,023	0,662	-1,891	-0,089
GRL	60	-2,032	0,019	-0,124	-1,696	-0,067
GRL	61	-1,995	0,092	-0,475	-1,692	-0,120
GRL	62	-2,133	-0,084	0,824	-1,877	0,051
GRL	63	-2,024	-0,004	0,711	-1,761	-0,054

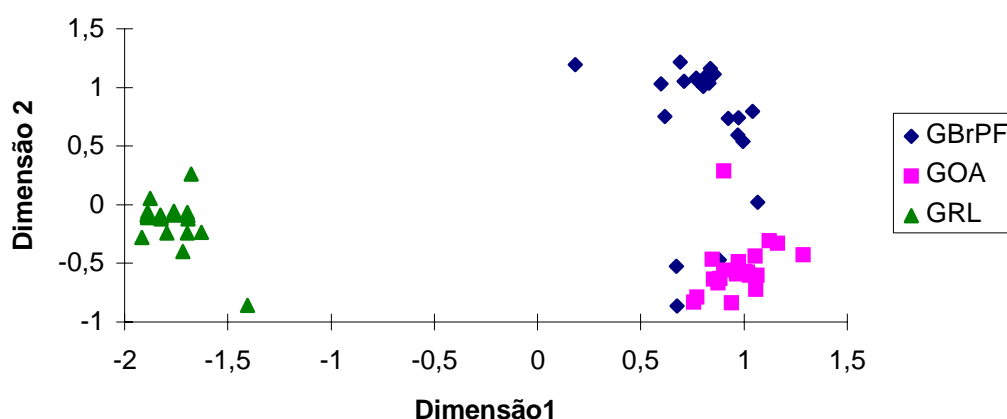


Figura 2. Distâncias euclidianas, no plano bidimensional, de 63 plantas pertencentes a três ecotipos de coqueiro gigante.

A análise bidimensional da distância euclidiana foi eficaz na separação dos acessos em três grupos distintos (Figura 2), sendo desnecessária a análise tridimensional. Tanto para a solução bidimensional como para a solução tridimensional, a dimensão 1 separou adequadamente as plantas pertencentes ao acesso GRL das demais e a dimensão 2 separou as plantas dos acessos GOA e GBrPF nos respectivos grupos (Quadro 6). Consequentemente, a terceira dimensão não contribuiu para a separação dos indivíduos em três *clusters*.

A apresentação dos resultados da análise de *cluster*, na forma de dendrograma, mostrou alguma sobreposição entre as amostras individuais dos acessos GBrPF e GOA (Figura 1), sendo que três plantas pertencentes ao acesso GOA foram agrupadas com as plantas pertencentes ao acesso GBrPF. Por outro lado, com a análise gráfica das distâncias euclidianas no plano bidimensional (Figura 2), o grupo formado pelo acesso GOA foi melhor definido que o grupo do acesso GBrPF, sendo que neste caso, algumas plantas do acesso GBrPF agruparam-se junto com o acesso GOA.

Essas diferenças no agrupamento dos indivíduos podem ser atribuídas ao uso de diferentes algoritmos iterativos nas análises multivariadas (MANLY, 1990). No entanto, a apresentação dos resultados na forma de dendrogramas (Figura 1) ou no espaço bidimensional (Figura 2) possibilitou interpretações bastante próximas; a vantagem do uso de dendrogramas está na facilidade de identificação dos *clusters* e, da análise multidimensional está na fácil visualização espacial da distância entre os indivíduos.

A maior distância genética entre o acesso GRL e os demais pode ser explicada pela origem desse ecotipo, cuja população pode ter sido iniciada a partir de poucos frutos (sementes) disseminados via corrente marítima, e pelo consequente isolamento geográfico, conforme sugerido por TAMMES & WHITEHEAD (1969) para explicar o grande número de ecotipos dessa espécie. A homogeneidade genética dos indivíduos (Figura 2) e a frequência de locos fixados (Quadro 5) tanto do acesso GOA como do GRL reforçam a hipótese de que as populações de coqueiro foram formadas a partir de poucos indivíduos, o que resultou na fixação de genes.

A disseminação dos coqueiros para o oeste africano e o leste sul-americano ocorreu pelas rotas marítimas de navegação, após a descoberta do Cabo da Boa Esperança (PURSEGLOVE, 1975). Essas rotas marítimas foram intensificadas a partir do final do século XV e início do século XVI. A origem das plantas introduzidas nestes continentes não é conhecida; contudo, pode-se supor que sejam originárias de uma mistura de ecotipos asiáticos a partir de populações geograficamente próximas, já que as rotas marítimas eram raras e restritas a poucos pontos do sul do continente asiático e do leste do continente africano (ATLAS, 1995).

A disseminação dessa espécie por meio dos navegantes foi sugerida por BAILEY (1963); TAMMES & WHITEHEAD (1969) e PURSEGLOVE (1975). Esse tipo de disseminação explica a proximidade genética entre os ecotipos do oeste africano (GOA) e costa leste brasileira (GBrPF). No entanto, parece que a população de GOA foi originada a partir de uma base genética mais estreita (poucos indivíduos) que a população de GBrPF, visto aquela apresentar maior porcentagem de locos fixados (Quadro 5), pois a deriva genética em coqueiro gigante deve ter ocorrido pela amostragem de poucos indivíduos, visto ser rara a autofecundação nesta variedade (LIYANAGE, 1949).

O acesso GOA apresentou-se bastante homogêneo geneticamente (Quadro 5), mas com variabilidade genética intrapopulacional (27% dos locos analisados foram polimórficos entre os indivíduos do acesso), concordando em parte com a conclusão de BENOIT & GHESQUIERE (1984) que o consideraram como um ecotipo homogêneo, pois não encontraram nenhum polimorfismo entre plantas desse acesso por meio de marcadores isoenzimáticos em amostras coletadas no banco de germoplasma do IRHO. A diferença entre os resultados deste trabalho com o de BENOIT & GHESQUIERE (1984) podem ser explicadas pelas diferenças entre as técnicas usadas, pois os marcadores de DNA são mais eficientes que as isoenzimas em detectar polimorfismo, visto considerar diferenças genéticas existentes em todo o genoma e não serem influenciados pelo ambiente (TANKSLEY et al., 1989; BOTSTEIN et al., 1980). Portanto, como o ecotipo GOA apresentou-se com elevado grau de endogamia, é possível que a técnica de isoenzimas não detectasse polimorfismo entre os indivíduos da população.

A técnica de RAPD mostrou-se adequada na separação das populações analisando-se 21 amostras individuais de cada acesso. No entanto, o grande número de amostras individuais necessário para avaliação de divergência genética entre e dentro de populações de espécies alógamas torna o método relativamente caro e trabalhoso.

Uma alternativa para o estudo de divergência genética em populações heterozigotas tem sido a utilização de amostra composta (*bullk*), a qual será discutida neste trabalho em duas etapas: primeiramente verificando-se a sensibilidade dos ensaios de RAPD em amostras compostas e depois comparando-se resultados obtidos com amostras individuais versus amostras compostas.

Sensibilidade do ensaio de RAPD em amplificar fragmentos de DNA em amostra composta

O uso de amostra composta não apresenta inconvenientes quanto aos locos monomórficos para marcadores RAPD dentro de uma população (SWEENEY & DANNEBERGER, 1994), já que todos os indivíduos apresentarão *presença* ou *ausência* do fragmento no loco. Em relação aos locos polimórficos dentro da população, em uma amostra composta, a *presença* ou *ausência* de banda depende de inúmeros fatores, como a frequência do loco na população, a frequência do loco na amostra composta (LOARCE et al., 1996; MICHELMORE et al., 1991; SKROCK & NIENHUIS, 1995) e a intensidade da banda visualizada no

gel (WADT et al., 1996), principalmente em função da competição por iniciadores existente numa reação de amplificação.

Para a definição do número de plantas a serem utilizadas numa amostra composta deve-se conhecer a quantidade máxima de plantas que podem compor a amostra de forma que determinado fragmento seja amplificado na reação de RAPD, mesmo quando presente em uma única planta. Se a intensidade da banda do loco polimórfico for baixa, este pode não ser detectado no ensaio de RAPD mesmo numa amostra composta com um pequeno número de plantas; por outro lado, para um loco com intensidade de banda forte e baixa frequência do marcador na população, faz-se necessário amostrar um maior número de plantas para que, aumentando-se a probabilidade de ocorrência do marcador na amostra composta, este venha a ser amplificado, devido sua força competitiva pelo iniciador (banda de intensidade forte).

Desta forma, a diluição máxima de um marcador numa amostra composta de maneira que ocorra sua amplificação e detecção em ensaio de RAPD é definida para locos polimórficos, com frequência de marcador RAPD e intensidade de banda indefinidos e será denominada de proporção mínima de DNA para amplificação.

Os ensaios de RAPD com amostras de folhas de coqueiro gigante mostraram que se “sombra de banda”¹ for considerada como ausência do fragmento, a proporção mínima de DNA para amplificação seria, na média, de 11% (Quadro 7), para a maioria dos locos analisados.

As estimativas da proporção mínima de DNA para amplificação (Quadro 7) foram feitas a partir do inverso de equação logarítmica ajustada entre a média das

¹ Banda mal definida no gel.

notas dadas para os locos que apresentaram banda com intensidade média (nota 3) e a proporção da quantidade de DNA na amostra composta (Figura 3). Embora esta estimativa seja pouco precisa e tendenciosa pelo fato de ser tomado o inverso da equação, pôde-se obter uma proporção média de DNA na amostra composta para que haja amplificação.

Quadro 7. Estimativa da proporção mínima de DNA para amplificação em reação de RAPD com amostras compostas, determinada pelo inverso da equação “ $y = -0.9004Ln(x) + 2.9636$ ”, onde y = intensidade da banda considerada como ausência na amostra composta e x = proporção mínima de DNA na amostra composta.

Intensidade final da Banda na amostra composta	proporção de DNA na amostra composta
0,00	0,037
0.50	0,065
0.75	0,086
1,00	0,113
2,00	0,343

A intensidade da banda na amostra individual (não diluída) mostrou-se importante na definição da proporção mínima de DNA para amplificação. Por exemplo, o loco AB5e apresentou intensidade 4 na amostra individual, e com uma diluição de 6,67% ainda apresentou banda com intensidade 3 (Figura 4); enquanto que o loco AB5h, cuja intensidade de banda foi 2, já a uma diluição de 25% impossibilitou a detecção do marcador (Figura 4). Portanto, não foi possível determinar, com precisão, a proporção mínima de DNA para amplificação.

A intensidade da banda visualizada no gel reflete a força competitiva do sítio de anelamento pelo iniciador durante a reação de amplificação. Esta competição por iniciadores, provavelmente, é influenciada pela homozigose ou heterozigose

do genótipo. A maioria dos locos analisados apresentaram banda com intensidade média; no entanto, foram observados resultados distintos quanto à proporção do genótipo na mistura em que não houve detecção da banda (sombra de banda) (Figura 3), o que pode ser explicado pela homozigose ou heterozigose do loco.

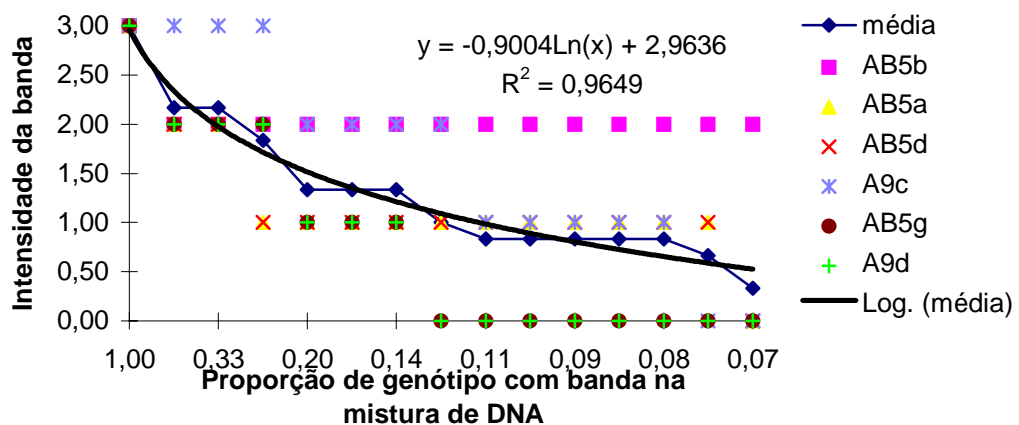


Figura 3. Relação entre a intensidade da banda e a proporção de genótipo com banda em mistura de DNA, considerando apenas locos com banda de intensidade inicial média.

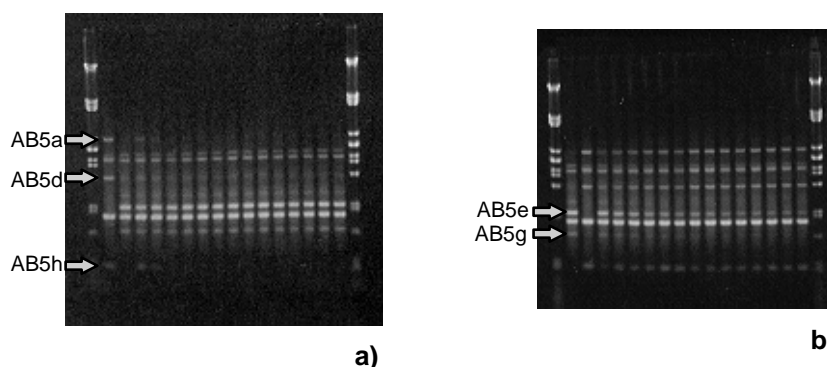


Figura 4. Diluição de marcador RAPD em misturas de diferentes proporções. a) linha 1=GOA; linha 2=GRL e linhas 3 a 16 correspondem às misturas de nº 1 a 14, respectivamente, do Quadro 4. Locos AB5a e AB5d apresentam intensidade de banda igual a 3 e AB5h igual a 2. b) linha 1=GRL; linha 2=GOA e linhas 3 a 16 correspondem às misturas de nº 15 a 28,

respectivamente, do Quadro 4. Loco AB5e apresenta intensidade de banda igual a 4 e AB5g igual a 2

Alguns autores têm encontrado valores de proporção mínima de DNA para amplificação variando de 14% a 10%, dependendo da espécie vegetal (POULSEN et al., 1995; LOARCE et al., 1996). MICHELMORE et al. (1991), tabalhando com alface, não detectaram banda em amostras compostas contendo 4% da mistura de DNA com genótipo que apresentava banda, e em alguns casos esta proporção era de 10%. No entanto, como estes autores não fazem referência às intensidades das bandas por eles analisadas, os resultados não podem ser comparados integralmente, mas sugerem que não há uma proporção mínima de DNA para amplificação fixa, conforme mostrado por este trabalho.

Por causa do efeito da intensidade da banda na determinação da proporção mínima de DNA para amplificação, esta deve ser determinada para cada caso particular, não podendo haver uma padronização da proporção mínima de DNA para amplificação em amostra composta, conforme foi encontrado em alguns trabalhos (SWEENEY & DANNEBERGER, 1994, 1995; WANG & PATERSON, 1994).

No entanto, outros autores (MARGALÉ et al, 1995; SWEENEY & DANNEBERGER 1994,1995) têm utilizado amostra composta em análise de divergência genética com um grande número de plantas: 40, 30 e 45 respectivamente para os autores citados, o que deve eliminar o efeito da intensidade da banda em locos segregantes, pois bandas com baixa ou até média intensidade podem ser eliminadas devido, provavelmente, à competição, predominando, portanto, as bandas fortes que são mais competitivas para

amplificação. Neste caso, o número de polimorfismos detectados entre diferentes amostras compostas diminui, mas devem ser mais informativos que polimorfismos obtidos de amostras compostas de tamanho pequeno, devido à chance destas apresentarem resultados falsos por causa da pequena amostragem (amostra não representativa da população).

Polimorfismo de DNA: comparação de amostras individuais versus amostras compostas

Ensaio de RAPD foram realizados com amostras compostas de diferentes tamanhos, com e sem repetição, para testar o efeito da repetição e do tamanho deste tipo de amostra na estimativa da frequência dos locos na população e o efeito e o tamanho de amostras compostas na determinação de divergência genética entre populações de coqueiro. Amostras individuais de diferentes

tamanhos também foram avaliadas para estimativa da frequência dos locos na população para comparação dos resultados obtidos com amostras compostas. Estas amostras foram tomadas, aleatoriamente, do conjunto de dados das 21 plantas de cada população.

Para as amostras compostas, o tamanho da amostra foi definido como o número de soluções de DNA extraído de diferentes plantas e utilizadas na composição da amostra e, para amostras individuais, o tamanho da amostra foi definido como sendo o número de soluções de DNA analisadas, individualmente, nas reações de RAPD.

a) Amostras compostas

Para testar o efeito do tamanho de amostras compostas repetidas na estimativa da frequência de detecção dos marcadores RAPD foram selecionados três locos do acesso GBrPF (locos AB5h, AB5a e AB5e, respectivamente, com intensidade de banda fraca, média e forte). A frequência da presença dos marcadores RAPD para esses locos na população foi de 66,7%, 48,9% e 28,6%, respectivamente (Quadro 5).

A significância do relacionamento entre o tamanho da amostra e a detecção dos marcadores RAPD variou para cada loco, em função da intensidade da banda e frequência do marcador na população. Nos locos com banda de baixa e de média intensidade, esse relacionamento foi pequeno e não significativo, tanto pela estatística V de Cramer como pela estatística R de Pearson (Quadro 8).

Contudo, no loco AB5h, o qual apresentou banda de baixa intensidade, pode-se observar uma tendência de correlação negativa, ou seja, o aumento no tamanho da amostra composta leva a uma diminuição das vezes em que ocorre a

presença do marcador. Essa tendência é esperada repetir-se em locos segregantes e com banda de baixa intensidade, pois aumentando-se o tamanho da amostra, há provavelmente uma maior competição por iniciadores levando à perda da sensibilidade de detecção deste loco. Por outro lado, se o loco for monomórfico esta competição seria menos intensa e, portanto, não haveria uma rápida perda da sensibilidade de detecção.

Quadro 8. Número de vezes em que ocorre ausência e presença de banda nos locos AB5h, AB5a e AB5e do acesso GBrPF, em amostras compostas de diferentes tamanhos repetidas 11 vezes.

Tamanho amostra	Loco OP-AB5h		Loco OP-AB5a		Loco OP-AB5e	
	Freq. = 66,67		Freq. = 46,86		Freq. = 28,57	
	Intensidade = fraca		Intensidade = média		Intensidade = forte	
	Ausência	Presença	Ausência	Presença	Ausência	Presença
2	1	10	1	10	5	6
3	3	8	0	11	4	7
5	2	9	0	11	2	9
7	3	8	1	10	2	9
10	4	7	0	11	1	10
	Estat.	Sig.	Estat.	Sig.	Estat.	Sig.
R de Pearson	-0,176	0,199	0,061	0,659	0,285	0,035

Para o loco AB5a, com banda de média intensidade, não foi observada nenhuma tendência entre o tamanho da amostra e a frequência de detecção do marcador (Quadro 8). A diferença nos resultados entre o loco AB5h e o loco AB5a pode ser atribuída às frequências dos marcadores RAPD em cada loco na população e, ou, a intensidade da banda na amostra individual. Como as frequências na população não são muito distantes (Quadro 8) e os resultados são bastante dependentes da casualização da amostragem, é provável que a diferença entre a intensidade das bandas explique melhor o resultado.

Com banda de forte intensidade, o relacionamento entre o tamanho da amostra e a estimativa da frequência do marcador RAPD foi mais evidente e significativo a 3,5% de probabilidade para a estatística R de Pearson (Quadro 8), ficando claro que neste caso o tamanho da amostra composta afetou a frequência com que o marcador RAPD foi detectado nas repetições.

Para o loco AB5e, de forma oposta ao loco AB5h, o coeficiente R de Pearson foi positivo, sugerindo que, aumentando-se o número de plantas na amostra composta, aumenta-se a probabilidade de detecção do marcador RAPD. Esta tendência parece estar intimamente relacionada com a baixa frequência do marcador RAPD (loco AB5e) no acesso e com a intensidade da banda. Como o loco AB5e possui banda de intensidade forte, o efeito do aumento do número de plantas na amostra composta, em termos de competição por iniciador na reação de amplificação, pouco afeta a sensibilidade de detecção do marcador nas reações de RAPD (Figura 3); entretanto, como o loco apresenta uma baixa frequência na população, aumentando-se o número de plantas na amostra, maior é a probabilidade de pelo menos uma apresentar o marcador RAPD, e portanto, deste vir a ser detectado na reação de RAPD.

Nos três locos estudados, houve sistematicamente uma superestimativa da frequência dos locos nas amostras compostas em relação à frequência desses mesmos locos quando determinada pela análise de 21 amostras individuais (Quadros 5 e 9). Embora nenhum teste estatístico tenha sido utilizado, devido a restrições pelo pequeno número de observações, pode-se por evidência experimental dizer que em todos locos a frequência estimada pelas amostras compostas não condiz com a real (21 plantas individuais), mesmo para o loco AB5h, no qual os valores estimados foram próximos dos observados nas 21

plantas individuais. O efeito da amostragem juntamente com as variantes de frequência do loco na população e intensidade da banda mascara os resultados tornando-os inválidos para a estimativa da variabilidade genética dentro da população.

A idéia de se estimar a frequência de loco na população com o uso de amostras compostas em reações de RAPD baseou-se na hipótese de que utilizando-se algumas amostras de pequeno tamanho (3 a 5) seria possível detectar com banda de baixa a média intensidade os quais não seriam detectados em amostras compostas de tamanho maior, devido à competição. O uso de amostras compostas de pequeno tamanho simularia a amostra individual de maneira que com o mesmo trabalho fosse possível amostrar maior número de indivíduos da população; por exemplo: cinco amostras compostas de cinco indivíduos (25 indivíduos amostrados) representaria melhor a população que cinco amostras individuais (cinco indivíduos amostrados).

No entanto, verifica-se que os dados revelados por amostra composta de qualquer tamanho (Quadros 9 e 10) em reação de RAPD não são constantes, mas sim variáveis, em função da frequência do marcador na população e da intensidade da banda (poder de competição pelo iniciador na reação de amplificação), sugerindo que amostras compostas não devam ser utilizadas para estimar a frequência de locos dentro de uma população de plantas alógamas, conforme já afirmado por SWEENEY & DANNEBERGER (1994).

Quadro 9. Frequência da presença de banda em três locos do acesso GBrPF estimada por amostras compostas repetidas 11 vezes e 21 amostras individuais

Tam. da Amost.	OP-AB5h		OP-AB5a		OP-AB5e	
	Amostra		Amostra		Amostra	
	composta	individual	composta	individual	composta	individual
2	90,91	66,67	90,91	46,86	54,55	28,57
3	72,73	66,67	100,00	46,86	63,64	28,57
5	81,82	66,67	100,00	46,86	81,82	28,57
7	72,73	66,67	90,91	46,86	81,82	28,57
10	60,00	66,67	100,00	46,86	90,91	28,57

b) Amostras individuais

No t3pico anterior, constatou-se que apenas para loco com banda de intensidade forte e baixa frequ4ncia na popula33o (AB5e) o tamanho da amostra composta influenciou a frequ4ncia em que a banda foi detectada nas repeti33es. Contudo, n3o foi poss3vel estabelecer um tamanho ideal para a amostra composta, pois p3de-se observar a tend4ncia de que para alguns locos o aumento no tamanho da amostra leva a um aumento na probabilidade de detec33o do marcador, enquanto que para outros locos, essa probabilidade diminui. Ademais, nenhum tamanho de amostra mostrou-se indicado para representar a frequ4ncia dos marcadores RAPD dentro do acesso.

Portanto, o uso de amostras individuais pode ser mais indicado. O inconveniente das amostras individuais est3 no n3mero de repeti33es necess3rias para que sejam representativas da popula33o: amostras pequenas s3o incapazes de representar adequadamente uma popula33o.

Aparte da quest3o estat3stica da amostragem, o problema da amostra individual pode ser, hipoteticamente, facilmente exemplificado. Imagine um loco com frequ4ncia para um marcador RAPD de 25%. Com duas amostras individuais, as frequ4ncias para o marcador podem ser 100% (as duas amostras apresentam o marcador), 50% (somente uma amostra apresenta o marcador) ou

0% (nenhuma amostra apresenta o marcador). Portanto, com uma amostra desse tamanho, *na melhor das hipóteses*, o erro da estimativa da frequência do marcador seria de 100%! Aumentando-se o tamanho da amostra, diminui-se esse erro.

Contudo, mesmo ciente dessas limitações, procurou-se testar o efeito de pequenas amostras individuais na detecção do marcador RAPD. Para tanto, foram tomadas 5, 10, 15 e 20 amostras individuais para os locos AB5h , AB5a e AB5e (Quadro 11).

Nos três casos o efeito do tamanho da amostra não foi significativo. Comparando-se os dados observados de frequência da presença da banda nos diferentes tamanhos de amostras individuais em relação à frequência estimada com 21 amostras individuais (Quadro 11), pôde-se observar uma boa concordância entre os resultados obtidos com pequenas amostras individuais e com as 21 plantas individuais, tendo apenas dois casos discrepantes (OP-AB5h com 10 plantas e OP-AB5e com 5 plantas), o que pode perfeitamente ser explicado pelo efeito de amostragem. No entanto, dez plantas foram representativas das 21 iniciais para locos com banda de intensidade média a alta.

Quadro 10. Número de vezes em que ocorre ausência e presença de banda nos locos AB5h, AB5a e AB5e do acesso GBrPF, em amostras individuais repetidas 5, 10, 15 e 20 vezes.

Tamanho amostra	Loco OP-AB5h		Loco OP-AB5a		Loco OP-AB5e		
	Freq. = 66,67		Freq. = 46,86		Freq. = 28,57		
	Intensidade = fraca		Intensidade = média		Intensidade = forte		
	Ausência	Presença	Ausência	Presença	Ausência	Presença	
5	2	3	3	2	3	2	
10	5	5	6	4	8	2	
15	6	9	7	8	11	4	
20	7	13	11	9	14	6	

	Estat.	Sig.	Estat.	Sig.	Estat.	Sig.
R de Pearson	0,082	0,573	0,040	0,782	0,000	1,000

Esses resultados indicam claramente que é preferível trabalhar com um número sub-ótimo de amostras individuais (5 a 10), do que trabalhar com repetições de amostras compostas, principalmente se for importante ter uma idéia inicial da variabilidade genética existente dentro da população. Por outro lado, quanto maior o tamanho da amostra individual, mais acurada será a frequência determinada para o loco.

Quadro 11. Frequência da presença de banda em três locos do acesso GBrPF estimada por amostras individuais de diferentes tamanhos e 21 amostras individuais

Tam. da Amost.	OP-AB5h		OP-AB5a		OP-AB5e	
	Frequência		Frequência		Frequência	
	Obs.	Esp. ¹	Obs.	Esp.	Obs.	Esp.
5	60,00	66,67	40,00	46,86	40,00	28,57
10	50,00	66,67	40,00	46,86	20,00	28,57
15	60,00	66,67	53,33	46,86	26,67	28,57
20	65,00	66,67	45,00	46,86	30,00	28,57

¹ Frequência estimada com as 21 plantas individuais.

As amostras individuais com 5, 10 ou 15 repetições mostraram-se adequadas para separar os acessos com base na divergência genética entre eles, conforme pôde-se constatar na análise dos dendrogramas produzidos para amostras individuais de 5 plantas (Figura 5), 10 plantas (Figura 6) e 15 plantas (Figura 7); além de ser possível recuperar as informações obtidas quando se utilizou 21 amostras individuais, mesmo com cinco amostras individuais, onde o dendrograma evidenciou o acesso GOA como mais homogêneo que o acesso GRL e este mais homogêneo que o GBrPF (Figura 5).

Esta concordância dos resultados obtidos com cinco e 21 plantas individuais, pode ser explicada pelo fato de todas as três populações, representadas pelos acessos estudados, apresentarem uma grande proporção de locos fixados (Quadro 5), o que as torna bastante homogêneas fazendo com que poucos indivíduos sejam representativos da população.

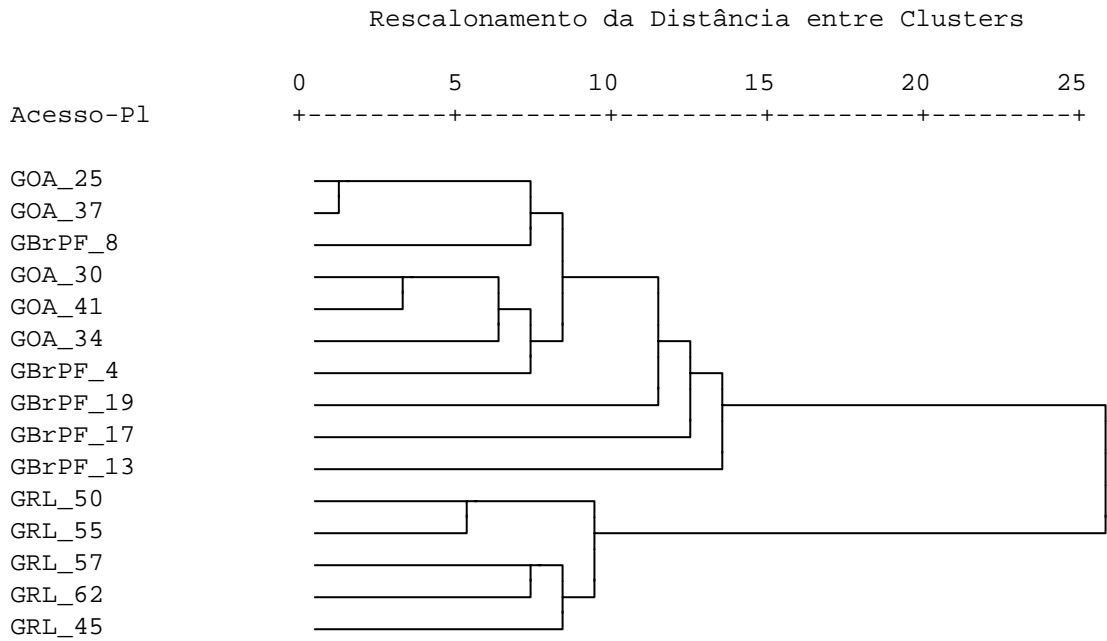


Figura 5. Dendrograma da distância euclidiana para o agrupamento de 15 plantas (cinco de cada acesso) pelo método da média entre grupos.

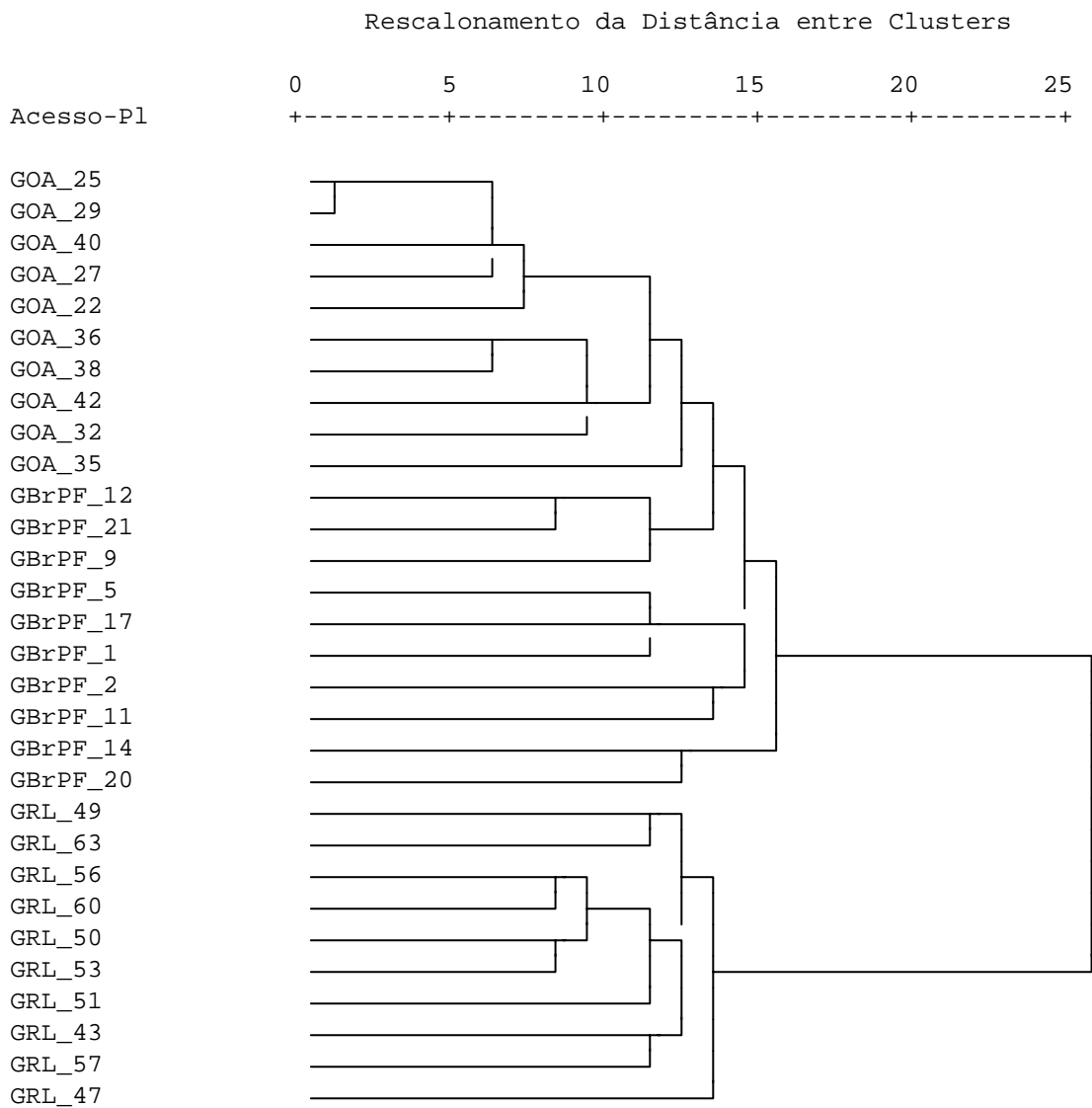


Figura 6. Dendrograma da distância euclidiana para o agrupamento de 30 plantas (10 de cada acesso) pelo método da média entre grupos.

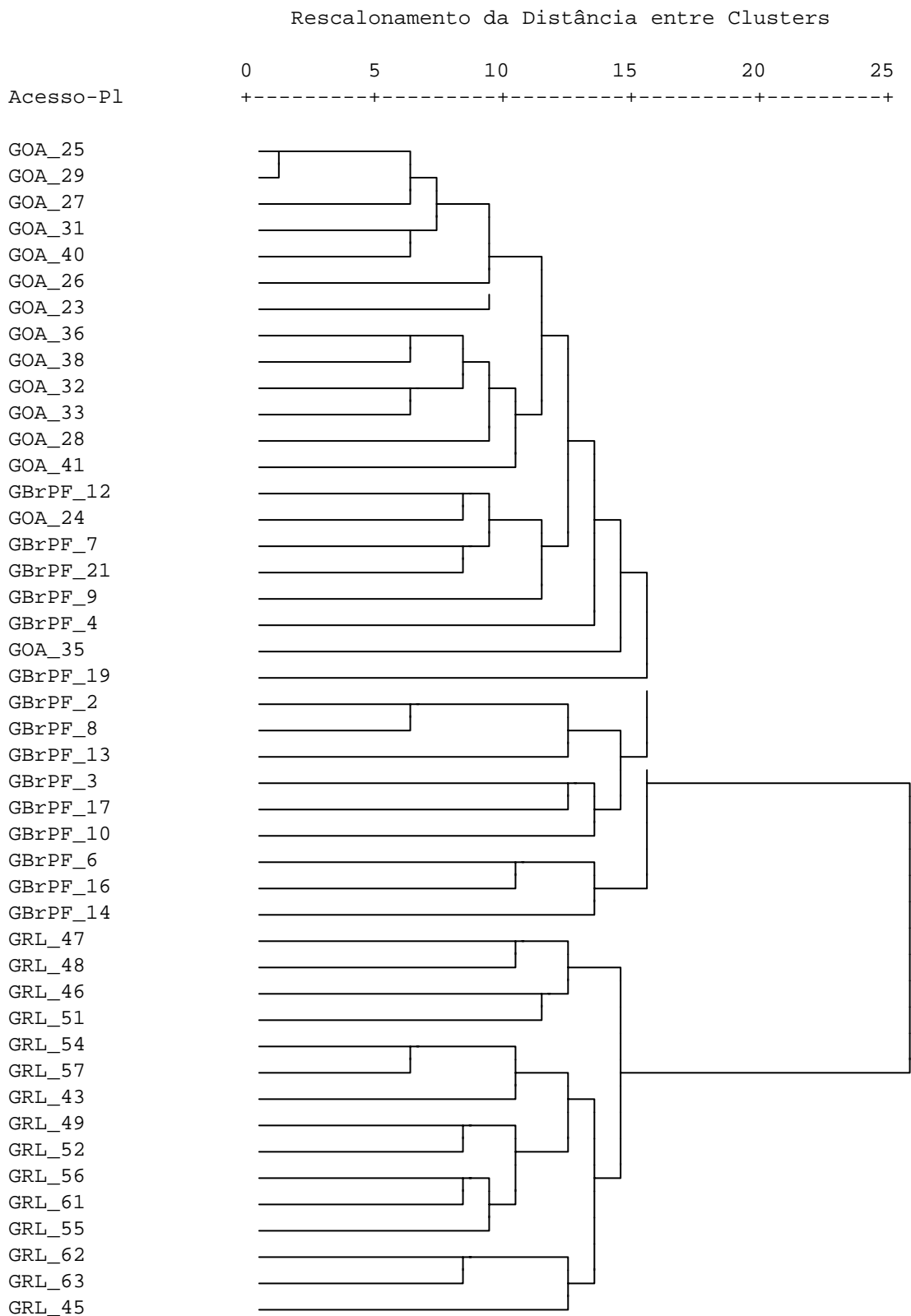


Figura 7. Dendrograma da distância euclidiana para o agrupamento de 45 plantas (15 de cada acesso) pelo método da média entre grupos.

c) Divergência genética avaliada por amostras compostas e amostras individuais

Os resultados anteriores sugerem que o uso de amostras compostas não reflete a diversidade dentro de acessos. Contudo, resta a possibilidade dessas serem úteis na análise de divergência genética entre acessos e na identificação dos mesmos.

Para testar essa hipótese, tomaram-se amostras compostas de 3, 5, 10 e 21 indivíduos de cada acesso, a fim de se avaliar também o tamanho ideal da amostra. Os mesmos iniciadores utilizados com as amostras individuais foram utilizados em reações de RAPD com as diferentes amostras compostas e a leitura das bandas foi feita de maneira independente às amostras individuais.

Os seis iniciadores possibilitaram a detecção de 53 locos, sendo que desses, 33 (62%) foram polimórficos entre acessos. A análise da leitura de bandas nas amostras compostas, considerando apenas os locos analisados com as 21 plantas individuais de cada acesso (Quadro 12), mostra que a maioria dos polimorfismos obtidos com as amostras compostas é resultante da grande divergência genética entre o ecotipo GRL e os demais.

De uma maneira geral, houve maior número de fragmentos amplificados nas amostras individuais do que nas amostras compostas, conforme também observado por LOARCE et al. (1996). Possivelmente, o maior número de locos “analisáveis” nas amostras compostas foi decorrente do menor número de fragmentos amplificados, o que os tornam mais separados e mais fáceis de serem analisados.

Os quatro tamanhos de amostras compostas utilizados proporcionaram resultados semelhantes entre si, para a maioria dos locos (Quadro 12), confirmando mais uma vez a homogeneidade genética entre os indivíduos do mesmo ecotipo.

Comparando-se os quadros 5 e 12, pode-se observar a influência da intensidade da banda na detecção de marcador RAPD em amostra composta, pois para locos com frequência média e banda com baixa intensidade, como por exemplo o loco A9e do ecotipo GRL , nenhuma amostra composta permitiu a detecção da banda, enquanto que outros locos com baixa frequência foram detectados em amostras de maior tamanho, como foi o caso do loco A19e também do ecotipo GRL.

Quadro 12. Presença e ausência de banda em amostras compostas de diferentes tamanhos para seis iniciadores, considerando apenas os locos analisados com as 21 plantas individuais de cada acesso.

Loco	GBrPF				GOA				GRL			
	tamanho da amostra											
	3	5	10	21	3	5	10	21	3	5	10	21
A9b	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1
A9c	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
A9d	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0
A9e	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0
A9f	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1
A9g	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0
A9h	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A9i	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
A9j	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
A9k	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
A9l	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0
A11a	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1
A11b	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0
A11f	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0
A11g	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
A15a	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1
A15b	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0
A15c	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0
A15d	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
A15e	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
A15f	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
A15g	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
A19a	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
A19b	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
A19c	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
A19d	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0
A19e	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
A19f	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0

Continua

Continuação do Quadro 12

Loco	GBrPF				GOA				GRL			
	tamanho da amostra											
	3	5	10	21	3	5	10	21	3	5	10	21
AB1b	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AB1c	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0
AB1d	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AB1e	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1
AB1f	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AB1g	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
AB1h	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AB1i	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0
AB5a	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0
AB5b	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1
AB5c	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AB5d	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0
AB5e	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1
AB5f	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AB5g	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1

O efeito de cada tamanho de amostra composta na identificação dos três acessos não pôde ser avaliado devido ao pequeno número de dados. Portanto, todos os dados obtidos com as doze amostras compostas (quatro tamanhos de cada acesso) foram utilizados a fim de avaliar o agrupamento destas amostras.

Com este tipo de análise, o agrupamento dos acessos em dois *clusters* foi idêntico àquele encontrado quando se analisaram as amostras individuais: o acesso GRL foi classificado como sendo o mais distante dos demais. Foi detectada maior variabilidade entre amostras compostas de diferentes acessos, que entre amostras compostas de diferentes tamanhos dentro de um mesmo acesso (Figura 8), sugerindo que, na identificação de acessos de coqueiro, o tamanho da amostra composta não é muito importante. Provavelmente, este resultado foi obtido devido à grande porcentagem de locos fixados nos acessos.

Pela análise das coordenadas dos valores da distância euclidiana entre amostras compostas dos três acessos, observa-se coincidência nos valores

determinados, tanto para os planos bidimensional como tridimensional (Quadro 13), evidenciando que o tamanho da amostra composta pouco afetou no cálculo das dissimilaridades. Esta análise possibilitou ainda verificar uma relação entre tamanho da amostra e homogeneidade genética dentro da população, pois para o acesso GBrPF (maior variabilidade genética intrapopulacional) não houve coincidência de nenhum ponto (Figura 9), enquanto que para o acesso GRL e GOA houve coincidência, sendo que para o acesso GOA todos os pontos foram idênticos tanto nos planos bidimensional quanto no tridimensional (Quadro 13).

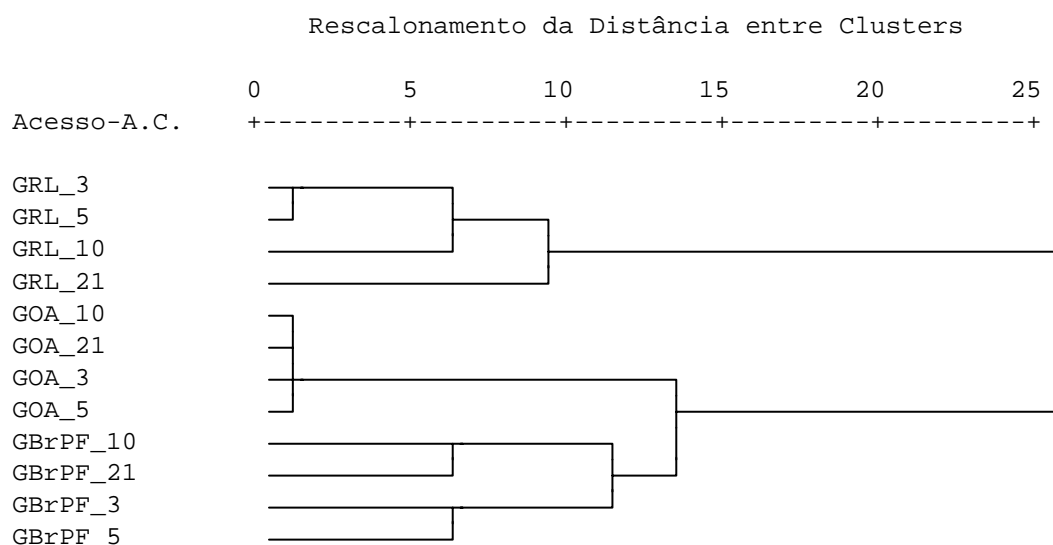


Figura 8. Dendrograma da distância euclidiana para o agrupamento de 12 amostras compostas, originárias de 3 acessos (GBrPF, GOA e GRL) e 4 tamanhos (3, 5, 10 e 21 plantas na mistura), pelo método da média entre grupos.

Os diferentes tamanhos de amostra composta proporcionaram na dimensão 3 (Quadro 13) a evidência de que o acesso GOA foi o mais homogêneo geneticamente, seguido pelo acesso GRL e depois GBrPF, o que está de pleno

acordo com os resultados obtidos com a frequência de locos fixados para estes acessos (Quadro 5). Desta forma, fica claro que quanto maior for a variabilidade genética intrapopulacional maior será o efeito do tamanho da amostra composta na determinação das distâncias genéticas.

Embora haja uma tendência do tamanho da amostra composta em afetar a distância genética entre as populações heterozigotas, a distância euclidiana entre os três acessos de coqueiro gigante estudados, calculada para diferentes tamanhos de amostra composta, foi pouco afetada pelo tamanho da amostra (Quadro 14).

Quadro 13. Dimensões das distâncias euclidianas para solução gráfica no plano bi e tridimensional, de amostras compostas de 3, 5, 10 e 21 plantas dos acessos GBrPF, GOA e GRL

Acesso	Tamanho	3 dimensões			2 dimensões	
		D1	D2	D3	D1	D2
GBrPF	3	1,050	-0,833	-0,630	0,880	-0,699
GBrPF	5	1,157	-0,572	-0,796	0,970	-0,480
GBrPF	10	0,918	-1,058	0,487	0,770	-0,887
GBrPF	21	1,023	-0,822	0,769	0,858	-0,690
GOA	3	1,152	0,789	0,054	0,966	0,662
GOA	5	1,152	0,789	0,054	0,966	0,662
GOA	10	1,152	0,789	0,054	0,966	0,662
GOA	21	1,152	0,789	0,054	0,966	0,662
GRL	3	-2,169	0,031	-0,010	-1,819	0,026
GRL	5	-2,169	0,031	-0,010	-1,819	0,026
GRL	10	-2,251	0,038	-0,017	-1,888	0,032
GRL	21	-2,169	0,031	-0,010	-1,819	0,026

Quadro 14. Distância euclidiana, distância proporcional entre acessos e número do *cluster* ao que pertence o acesso para cada amostra.

		Distancia Euclidiana						Nº Cluster		
		GBrPFxGOA		GBrPFxGRL		GOAxGRL		GBrPF	GOA	GRL
		dist.	%	dist.	%	dist.	%			
mist.	3	2,45	0,21	4,69	0,40	4,69	0,40	1	1	2

mist.	5	2,24	0,19	4,80	0,41	4,69	0,40	1	1	2
mist.	10	2,65	0,22	4,69	0,39	4,80	0,40	1	1	2
mist.	21	2,45	0,20	4,80	0,40	4,80	0,40	1	1	2
indiv.	21	5.41	0,22	9.84	0,39	9.79	0,39	1	1	2

A análise de agrupamento dos acessos, considerando os diferentes tamanhos de amostra composta por acesso como se fossem repetições, mostrou que repetições de amostras compostas, embora não sejam adequadas para estimar a frequência de locos na população, foram adequadas para refletir o grau de variabilidade genética intrapopulacional (Figura 8).

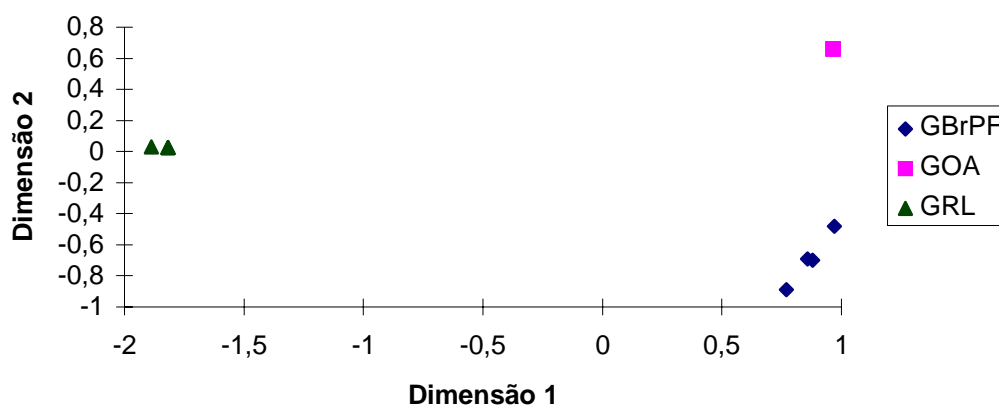


Figura 9. Distâncias euclidianas, no plano bidimensional, de 12 amostras compostas, tendo-se três acessos de coqueiro (GBrPF, GOA e GRL) e 4 tamanhos de amostra (mistura de 3, 5, 10 e 21 plantas).

Considerando apenas a amostra composta por 21 indivíduos, esta não separou o acesso GOA do acesso GBrPF (Figura 10), porém a distinção entre estes dois acessos não seria possível por qualquer método de agrupamento,

independentemente da distância genética entre eles sempre que houver apenas um terceiro acesso com maior grau de dissimilaridade. Essa restrição ocorre devido à falta de repetições, fazendo com que o número de casos analisados pela análise de *cluster* seja restrito a três, limitando, portanto, o número de *cluster* a dois. Com um maior número de casos houve a distinção entre os acessos GOA e GBrPF, conforme ocorreu quando consideraram-se os quatro tamanhos de amostra composta (Figura 8).

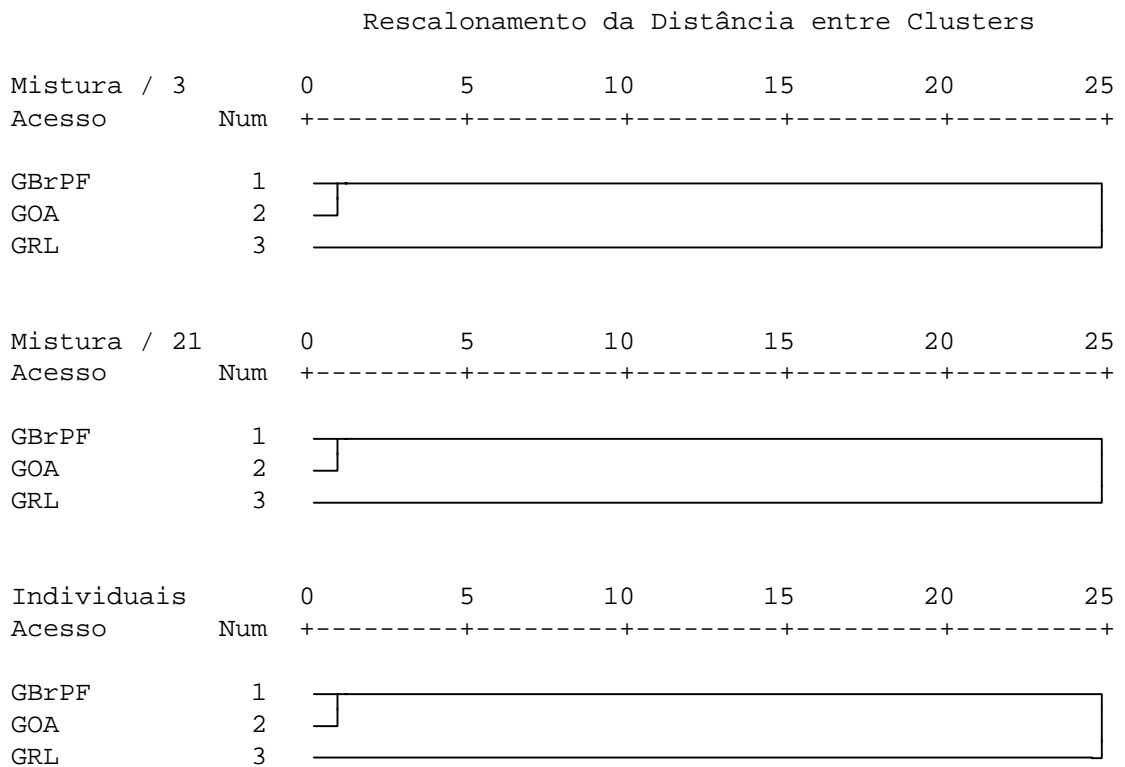


Figura 10. Dendrogramas da distância euclidiana para o agrupamento de 3 amostras compostas, de diferentes tamanhos (3 ou 21 plantas na mistura) e de 3 amostras individuais (frequências dos marcadores de RAPD), de três acessos (GBrPF, GOA e GRL), pelo método da média entre grupos.

Sendo assim, o aumento da probabilidade de identificação de grupos divergentes pode ser feito de duas formas: aumentando-se o número de

repetições, o que é válido tanto para amostras compostas como para amostras individuais; ou aumentando-se o número de populações analisadas. Por exemplo, SWENNEY & DANNEBERGER (1995) conseguiram distinguir duas populações geneticamente muito próximas avaliando oitenta e seis iniciadores; MARGALÉ et al. (1995), trabalhando com um número menor de iniciadores (60), porém com maior número de populações (vinte e oito populações de couve-flor), conseguiram resultados para a construção de uma árvore filogenética, distinguindo três grupos distintos e ainda foi possível a distinção de sub-grupos dentro de cada grupo.

O maior problema do uso de amostras compostas, sem dúvida, está na perda da variabilidade dentro da população. No entanto, elas podem ser recomendadas para estudos de divergência genética entre populações, sendo que o tamanho da amostra composta deve ser determinado em função da homogeneidade da população e do número de marcadores RAPD possíveis de serem obtidos. Portanto, o tamanho da amostra deve ser o maior possível desde que possibilite a presença de um número suficiente de marcadores RAPD.

No caso das populações de coqueiro avaliadas, o tamanho da amostra composta não afetou os resultados de divergência genética entre os acessos. Este resultado reflete a homogeneidade genética dentro das populações, pois para todos os acessos analisados a maioria dos locos mostraram-se fixados.

Em outras populações ou espécies alógamas, torna-se necessário o conhecimento do grau de homogeneidade da população para recomendação do uso de amostras compostas em análise de divergência genética.

CONCLUSÕES

O uso de marcadores RAPD mostrou-se adequado para avaliação de divergência genética entre ecotipos de coqueiro gigante, sendo por isso recomendada sua utilização no Banco Ativo de Germoplasma de Coco da EMBRAPA/CPATC, para a determinação de uma árvore filogenética entre os acessos conservados e também para manutenção e enriquecimento da coleção.

O ecotipo de Rennell (representado pelo acesso GRL) foi geneticamente distante dos demais. O ecotipo do Oeste Africano (acesso GOA) e o ecotipo Brasil - Praia do Forte (acesso GBrPF) foram bastante próximos, porém reconhecidamente distintos. Provavelmente as populações representadas pelos acessos GOA e GBrPF possuem uma mesma origem, sendo esta diferente da origem do ecotipo GRL.

A sensibilidade da reação de RAPD em amostras compostas dependeu da intensidade da banda na amostra individual e do tipo de genótipo, pois a proporção mínima de DNA em uma amostra composta para que haja amplificação de fragmentos de DNA em reação de RAPD variou de menos de 6,7% a 25%,

evidenciando que não há uma padronização desta proporção. No entanto, foi determinado para os locos com banda de intensidade inicial média (nota 3) a proporção média de 11%.

Todos os três ecotipos analisados apresentaram pouca variabilidade genética intrapopulacional, sendo o ecotipo do Brasil - Praia do Forte o mais heterogêneo. Devido a esta característica, amostras compostas de diferentes tamanhos proporcionaram resultados de divergência genética semelhantes. Pelo mesmo motivo, amostras individuais de poucas plantas também foram capazes de refletir a divergência genética entre os ecotipos.

As amostras compostas repetidas não foram eficientes na estimativa da frequência de locos, porém foram capazes de refletir o grau de variabilidade genética de cada ecotipo. No entanto, amostras individuais de poucos indivíduos foram superiores às amostras compostas por proporcionarem também uma boa estimativa da frequência dos locos na população.

O uso de amostras compostas em estudo de divergência genética interpopulacional foi limitado quando se utilizou apenas uma amostra por ecotipo, devido ao pequeno número de ecotipos analisados, sendo assim, esta metodologia somente é recomendada para análise de um grande número de populações. Sendo o número de populações pequeno, devem-se utilizar repetições das amostras compostas, para melhor distinção entre elas.

No entanto, este tipo de amostra é recomendado em ensaios de RAPD para estudos de divergência genética entre populações alógamas, sendo que o tamanho da amostra deve ser o maior possível e deve-se avaliar um grande número de marcadores.

É necessário ponderar, contudo, se o aumento do número de marcadores, obtido com utilização de maior número de iniciadores, não tem o mesmo efeito quanto a custo e tempo, tanto na coleta das amostras como no laboratório, de trabalhar-se com menor número de iniciadores, porém com maior número de repetições em amostras individuais, visto que este tipo de amostra proporciona melhores resultados quanto à variabilidade genética das populações.

Para uma avaliação geral das populações existentes no Banco Ativo de Germoplasma de Coco (BAG-Coco) da EMBRAPA, recomenda-se o uso de amostras compostas (por exemplo, 21 plantas de cada acesso), tanto na variedade anão como na gigante, afim de serem conhecidas as distâncias genéticas entre os diferentes ecotipos ali representados.

Amostras individuais utilizando poucas plantas por acesso, de 5 a 10, devem ser avaliadas em ensaios de RAPD para conhecimento da estrutura gênica das populações existentes no BAG-Coco, podendo, assim, identificar as populações com maior e menor variabilidade intrapopulacional. Caso haja necessidade de se estimar a proporção de locos segregantes na população, esta deve ser avaliada por meio de várias plantas individuais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKPAN, E.E.J. Evaluation of tall coconut (*Cocos nucifera* L.) genotypes within the nigerian coconut germplasm bank. **Oléagineux**, v. 49, p. 13-20, 1994.
- AL-SHAYJI, Y.; SALEEM, M.; AL-AMAD, S.; AL-AWADHI, S. & AL-SALAMEEN, F. Isolation analysis of the total genomic DNA from the date palm (*P. dactylifera* L.) and related species. **Acta Biotechnol**, v. 14, p. 163-168, 1994.
- ATLAS da história do mundo. Empresa Folha da Manhã S.A., São Paulo, p. 152-153, 1995.
- BAILEY, L.H. **The standard cyclopedia of horticulture**. Vol. I, 21ª impress, The Macmillan Company, New York, p. 809-812, 1963.
- BAUDOUIN, L. Utilisation des marqueurs moléculaires pour l'amélioration du palmier á huile. I. - Marqueurs protéiques. **Oléagineux**, v. 47, p. 682-691, 1992.
- BENOIT, H. & GHESQUIERE, M. Electrophorése, compte rendu cocotier. IV. Déterminisme génétique. **Rapport inteme IRHO-CIRAD**, (FAR). 11p, 1984, (citação de BOURDEIX et al., 1993).
- BOTSTEIN, D.; WHITE, R.I.; SKOLNICH, M. & DAVIS, R.W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 32, p. 314-331, 1980.
- BOURDEIX, R.; N'CHO, Y.P.; SANGARE, A. & BAUDOUIN, L. **Coconut genetic improvement, results and prospects**. Montpellier, France, 1993, p. 29-31 (Seminar Proceedings).
- BRUMMER, E.C.; KOCHERT, G. & BOUTON, J.H. RFLP variation in diploid and tetraploid alfalfa. **Theor. Appl. Genet.**, v. 83, p. 89-96, 1991.

- BUCCI, G. & MENOZZI, P. Genetic variation of RAPD markers in *Picea abies* Karst. population. **Heredity**, v. 75, p. 188-197, 1995.
- CHURCHILL, G.A.; GIOVANNONNI, J.J. & TANKSLEY, S.D. Pooled-sampling makes high-resolution mapping practical with DNA markers. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 90, p. 16-20, 1993.
- CIPRIANI, G.; FRAZZA, G.; PETERLUNGER, E. & TESTOLIN, R. Grapevine fingerprinting using microsatellite repeats. **Vitis**, v. 33, p. 211-215, 1994.
- CRUZ, C.D. & REGAZZI, A.J. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. Viçosa-MG, Imprensa Universitária, UFV, 1994, 390 p.
- CUENCA, M.A.G. Importância econômica do coqueiro. In: FERREIRA, J.M.S.; WARWICK, D.R.N. & SIQUEIRA, L.A. (Eds.). **A cultura do coqueiro no Brasil**. Aracaju-SE, EMBRAPA/CPATC, 1994, p. 1-65.
- DIAS, B.C. **Subsídios ao grupo de trabalho para a elaboração da política nacional de coco (*Cocos nucifera* L.)**. Maceió, CEPLAC, 1980, 15p. (Boletim Técnico).
- ECHT, C.S.; ERDAHL, L.A. & McCOY, T.J. Genetic segregation of random amplified polymorphic DNA in diploid cultivated alfalfa. **Genome**, v. 35, p. 84-87, 1991.
- FERREIRA, M. **Terminologia de melhoramento genético florestal**. Curitiba-PR, EMBRAPA-URPFCS, 1982, 91p. (Documentos nº 8)
- FERREIRA, M.E. & GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 2ª ed. Brasília-DF, CENARGEN/EMBRAPA, 1996, 220p.
- GRANDO, M.S.; DE MICHEL, L.; BIASETTO, L. & SCIENZA, A. RAPD markers in wild and cultivated *Vitis vinifera*. **Vitis**, v. 34, n. 1, p. 37-39, 1995.
- GIBBS, R.A.; NGUYEN, P. & CASKEY, C.T. Detection of single DNA base differences by competitive oligonucleotide priming. **Nucleic Acids Res.**, v. 17, p. 2437-2448, 1989.
- GRATTAPAGLIA, D. & SIDEROFF, R. Genetic linkage maps of *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus urophylla* using a pseudo-testcross: mapping strategy and RAPD markers. **Genetics**, v. 137, p. 1121-1137, 1994.
- HALEY, S.D.; MIKLAS, P.N. AFANADOR, L. & KELLY, J.D. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) marker variability between and within gene pools of common bean. **J. Amer. Soc. Hort. Sci.**, v. 119, p. 122-125, 1994.
- HARVEY, M. & BOTHA, F.C. Use of PCR-based methodologies for the determination of DNA diversity between *Saccharum* varieties. **Euphytica**, v. 89, p. 257-265, 1996.

- HU, J. & QUIROS, C.F. Identification of broccoli and cauliflower cultivars with RAPD markers. **Plant Cell Reports**, v. 10, p. 505-511, 1991.
- INSTITUT DE RECHERCHES POUR LES HUILES ET OLÉAGINEUX. Cocotier. **Oléagineux**, v. 44, n. 4, p. 72-77, 1989.
- JACK, P.L. & MAYES, S. Use of molecular markers for oil palm breeding. II. - Use of DNA markers (RFLPs). **Oléagineux**, v. 48, p.1-8, 1993.
- JAY, M.; BOURDEIX, R.; POTIER, F. & SANLAVILLE, C. Premier résultats de l'étude des polyphénols foliaires du cocotier. **Oléagineux**, v. 44, p. 151-161, 1989.
- KAEMMER, D.; AFZA, R.; WEISING, K.; KAHL, G. & NOVAK, F.J. Oligonucleotide and amplification fingerprinting of wild species and cultivars of banana (*Musa* spp.). **Bio/Technology**, v. 10, p. 1030-1935, 1992.
- KONGKIATNGAM, P; WATERWAY, M.J.; FORTIN, M.G. & COULMAN, B.E. Genetic variation within and between two cultivars of red clover (*Trifolium pratense* L.): Comparisons of morphological, isozyme, and RAPD markers. **Euphytica**, v. 84, p. 237-246, 1995.
- LEBRUM, P.; BAUDOUIN, L.; SEGUIN, M.; N'CHO, Y.P. & BOURDEIX, R. étude de la diversité génétique du cocotier par RFLP. **OCL**, v. 2, n. 6, p. 418-421, 1995.
- LYANAGE, D.V. Preliminary studies on the floral biology of the coconut palm. **Acting Botanist Coconut Research Scheme (Ceylon)**, 1949, p. 171-175.
- LYANAGE, D.V. Sex life of the coconut palm. **Ceylon Coconut Quartely**, v. 1, n. 2, p. 33-35, 1950.
- LOARCE, Y.; GALLEGRO, R. & FERRER, E. A comparative analysis of the genetic relationships between rye cultivars using RFLP and RAPD markers. **Euphytica**, v. 88, p. 107-115, 1996.
- MARGALÉ, E. ;HERVÉ, Y.; HU, J. & QUIROS, C.F. Determination of genetic variability by RAPD markers in cauliflower, cabbage and kale local cultivars from France. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 42, p. 281-289, 1995.
- MANLY, B.F.J. **Multivariate statistical methods. A primer**. London, Chapman and Hall, 1990, 159p.
- MENON, H.B. El cocotero enano. P sus grandes posibilidades en la America Tropical. **Agricultor Venezolano**, 13(135):32-34. 1949.
- MICHELMORE, R.W.; PARAN, I. & KESSELI, R.V. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 88, p. 9828-9832, 1991.

- MORENO, S.; GOGORCENA, Y. & ORTIZ, J.M. The use of RAPD markers for identification of cultivated grapevine (*Vitis vinifera* L.). **Scientia Horticulturae**, v. 62, p. 237-243, 1995.
- PARAN, I. & MICHELMORE, R.W. Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. **Theor. Appl. Genet.**, v. 85, p. 985-993, 1993.
- PASSOS, E.E.M. Morfologia do coqueiro. In: FERREIRA, J.M.S.; WARWICK, D.R.N. & SIQUEIRA, L.A. (Eds.). **A cultura do coqueiro no Brasil**. Aracaju-SE, EMBRAPA/CPATC, 1994. p. 66-73.
- PENNER, G.A.; BUSH, A.; WISE, R.; KIM, W. ;DOMIER, L.; KASHA, K.; LAROCHE, A.; SCOLES, G.; MOLNAR, S.J. & FEDAK, G. Reproducibility of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) analysis among laboratories. **Research**, v. 2, p. 341-345, 1993.
- POULSEN, D.M.E.; HENRY, R.J.; JOHNSTON, R.P.; IRWIN, J.A.G. & REES, R.G. The use of bulk segregant analysis to identify a RAPD markers linked to leaf rust resistance in barley. **Theor. Appl. Genet.**, v. 91, p. 270-273, 1995.
- PROMBOON, A.; SHIMADA, T.; FUJIWARA, H. & KOBAYASHI, M. Linkage map of random amplified polymorphic DNAs (RAPDs) in the silkworm, *Bombyx mori*. **Genet. Res.**, v. 66, p. 1-7, 1995.
- PURSEGLOVE, J.W. **Tropical crops monocotyledons**. 2ª Impress, Halsted Press, 1975, 607p.
- RIBEIRO, F.E. **Divergência genética entre populações de coqueiro gigante (*Cocos nucifera* L.) do Brasil**. Lavras-MG: ESAL, 1993. 84p. Tese (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura de Lavras, 1993.
- RIBEIRO, F.E. & SIQUEIRA, E.R. **Introdução, coleta e conservação de coqueiro no Brasil**. Aracaju-SE, EMBRAPA-CPATC, 1995, 14p. (Documentos nº 3).
- SAMEC, P. & NASINEC, V. The use of RAPD technique for the identification and classification of *Pisum sativum* L. genotypes. **Euphytica**, v. 89, p. 229-234. 1996.
- 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. (Eds.). **A cultura do coqueiro no Brasil**. Aracaju-SE, EMBRAPA/CPATC. 1994, p. 87-120.
- SKROCK, P. & NIENHUIS, J. Impact of scoring error reproducibility of RAPD data on RAPD based estimates of genetic distance. **Theor. Appl. Genet.**, v. 91, p. 1086-1091, 1995.
- SWEENEY, P.M. & DANNEBERGER, T.K. Random amplified polymorphic DNA in perennial ryegrass: a comparison of bulk samples vs. individuals. **HortScience**, v. 29, n. 6, p. 624-626, 1994.

- SWEENEY, P.M. & DANNEBERGER, T.K. RAPD characterization of *Poa annua* L. populations in golf course greens and fairways. **Crop. Sci.**, v. 35, p. 1676-1680, 1995.
- TAMMES, P.M.L. & WHITEHEAD, R.A. Coconut (*Cocos nucifera* L.) In: FERWERDA, F.P. & WIT, F. (Eds.). **Outlines of perennial crop breeding in the tropics.**, Wageningen, H. Veenman & Zonen N.V., 1969, 511p.
- TANKSLEY, S.D.; YOUNG, N.D.; PATERSON, A.H. & BONIERBLE, M.W. RFLP mapping in plant breeding: new tools for an old science. **Bio/Technology**, v. 7, p. 257-264, 1989.
- THOMAS, M.R.; MATSUMOTO, S.; CAIN, P. & SCOTT, N.S. Repetitive DNA of grapevine: classes present and sequences suitable for cultivar identification. **Theor. Appl. Genet.**, v. 86, p. 173-180, 1993.
- THORMANN, C.E. & OSBORN, T.C. Use of RAPD and RFLP markers for germplasm evaluation. In: **Applications of RAPD technology to plant breeding.** Minnesota, Joint Plant Breeding Symposia Series, 1992, p. 9-11.
- TZURI, G.; HILLEL, J.; LAVI, U.; HABERFELD, A. & VAINSTEIN, A. DNA fingerprint analysis of ornamental plants. **Plant Science**, v. 76, p. 91-97, 1991.
- VALLEJOS, C.E.; SAKIYAMA, N.S.; CHASE, C.D. A molecular marker-based linkage map of *Phaseolus vulgaris* L. **Genetics**, v. 131, n. 3, p. 733-740, 1992.
- VIERLING, R.A. & NGUYEN, H.T. Use of RAPD markers to determine the genetic diversity of diploid, wheat genotypes. **Theor. Appl. Genet.**, v. 84, p. 835-838, 1992.
- VIRK, P.S.; FORD-LLOYD, B.; JACKSON, M.T. & NEWBURY, J. Use of RAPD for the study of diversity within plant germplasm collections. **Heredity**, v. 74, p. 170-179, 1995.
- VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; LEE, T. van de; HORNES, A.F.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M. & ZABEAU, M. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, v. 23, n. 21, p. 4407-4414, 1995.
- YEH, F.C., CHONG, D.K.X. & YANG, R.C. RAPD variation within and among natural populations of trembling aspen (*Populus tremuloides* Michx.) from Alberta. **Journal of Heredity**, v. 86, p. 454-460, 1995.
- WADT, L.H.O.; SAKIYAMA, N.S.; PEREIRA, M.G.; LAM-SÁNCHEZ, A.; SAKIYAMA, C.C.H.; TUPINAMBÁ, E.A.; RIBEIRO, F.E. & ARAGÃO, W.M. Polimorfismo de DNA em palmáceas: amostragem em *bulk* de *Cocos nucifera* L. **Resumos da 3ª Reunião de Programação de Pesquisa do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias**, 6 e 7 de novembro, 1996, Campos, RJ, CCTA, UENF, p. 42.

- WANG, G.L. & PATERSON, A.H. Assessment of DNA pooling strategies for mapping of QTLs. **Theor. Appl. Genet.**, v. 88, p. 355-361, 1994.
- WELSH, J. & McCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Research**, v. 18, n. 24, p. 7213-7218, 1990.
- WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, J.A. & TINGEY, S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, v. 18, p. 6531-6535, 1990.

ANEXO

Tabulação das leituras de bandas nos ensaios de RAPD.

Quadro 1A. Ausência (0) ou presença (1) de bandas em reações de RAPD em amostras individuais de 21 plantas do acesso GBrPF.

loco	leitura da banda no ensaio de RAPD																			
A9a	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
A9b	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A9c	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1
A9d	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
A9e	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
A9f	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A9g	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
A9h	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A9i	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
A9j	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
A9k	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
A9l	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1
A11a	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A11b	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
A11c	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
A11d	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
A11e	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
A11f	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0
A11g	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
A15a	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A15b	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
A15c	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
A15d	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1
A15e	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A15f	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
A15g	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1

Continua...

Continuação do Quadro 1A.

loco	leitura da banda no ensaio de RAPD																				
A19a	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1
A19b	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
A19c	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A19d	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1
A19e	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A19f	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AB1a	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AB1b	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AB1c	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AB1d	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
AB1e	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AB1f	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AB1g	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1
AB1h	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1
AB1i	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0
AB5a	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0	1
AB5b	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AB5c	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1
AB5d	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
AB5e	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0
AB5f	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AB5g	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Quadro 2A. Ausência (0) ou presença (1) de bandas em reações de RAPD em amostras individuais de 21 plantas do acesso GOA.

loco	leitura da banda no ensaio de RAPD																			
A9a	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
A9b	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A9c	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
A9d	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
A9e	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
A9f	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1
A9g	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
A9h	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A9i	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1
A9j	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
A9k	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
A9l	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
A11a	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A11b	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
A11c	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
A11d	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
A11e	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
A11f	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
A11g	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1
A15a	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A15b	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
A15c	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
A15d	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A15e	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1
A15f	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0
A15g	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

Continua...

Continuação do Quadro 2A.

loco	leitura da banda no ensaio de RAPD																				
A19a	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1
A19b	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
A19c	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A19d	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	1	0	1	0
A19e	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A19f	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AB1a	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AB1b	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AB1c	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AB1d	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AB1e	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AB1f	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AB1g	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AB1h	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1
AB1i	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
AB5a	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AB5b	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AB5c	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AB5d	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AB5e	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AB5f	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AB5g	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Quadro 3A. Ausência (0) ou presença (1) de bandas em reações de RAPD em amostras individuais de 21 plantas do acesso GRL.

Loco	leitura da banda no ensaio de RAPD																			
A9a	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
A9b	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
A9c	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
A9d	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A9e	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1
A9f	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
A9g	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A9h	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0
A9i	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
A9j	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
A9k	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
A9l	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A11a	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
A11b	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A11c	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
A11d	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
A11e	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
A11f	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A11g	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
A15a	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
A15b	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A15c	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A15d	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A15e	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
A15f	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
A15g	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

Continua...

Continuação do Quadro 3A.

Loco	leitura da banda no ensaio de RAPD																			
A19a	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
A19b	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
A19c	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1
A19d	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A19e	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A19f	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AB1a	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AB1b	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1
AB1c	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0
AB1d	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AB1e	1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1
AB1f	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AB1g	0	0	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AB1h	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AB1i	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AB5a	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AB5b	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AB5c	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AB5d	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AB5e	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AB5f	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0
AB5g	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1

Quadro 4A. Ausência (0) ou presença (1) de bandas em reações de RAPD em amostras compostas pela mistura de 3, 5, 10 e 21 soluções de DNA, dos acessos GBrPF, GOA e GRL.

Loco	Acesso											
	GBrPF				GOA				GRL			
	tamanho da amostra composta											
	3	5	10	21	3	5	10	21	3	5	10	21
	leitura da banda no ensaio de RAPD											
A9a	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
A9b	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1
A9c	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
A9d	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
A9e	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
A9f	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1
A9g	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
A9h	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A9i	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
A9j	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
A9k	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
A9l	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0
A11a	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1
A11b	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
A11c	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
A11d	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
A11e	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
A11f	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
A11g	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
A15a	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1
A15b	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
A15c	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
A15d	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
A15e	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
A15f	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
A15g	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

Continua...

Continuação do Quadro 4A.

Loco	Acesso											
	GBrPF				GOA				GRL			
	tamanho da amostra composta											
	3	5	10	21	3	5	10	21	3	5	10	21
	leitura da banda no ensaio de RAPD											
A19a ₀	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
A19a	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
A19b	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
A19c	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
A19d	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0
A19e	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A19f	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
A19g	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0
A19h	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
A19i	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
A19j	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0
AB1a	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AB1d	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
AB1e	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AB1f	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AB1g	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
AB1h	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AB1i	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
AB5a	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
AB5b	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1
AB5c	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AB5d	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
AB5d ₁	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
AB5e	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1
AB5f	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AB5g	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
AB5h	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0

Quadro 5A. Ausência (0) ou presença (1) de bandas em reações de RAPD em 11 repetições de amostras compostas pela mistura de 2, 3, 5, 7 e 10 soluções de DNA do acesso GBrPF.

tamanho da mistura	Locos						
	AB5a	AB5b	AB5c	AB5d	AB5e	AB5f	AB5h
	leitura da banda no ensaio de RAPD						
10	1	0	1	1	1	1	1
10	1	0	1	1	1	1	1
10	1	0	1	1	1	1	1
10	1	0	1	1	1	1	0
10	1	0	1	1	1	1	1
10	1	0	1	1	1	1	0
10	1	0	1	1	1	1	0
10	1	0	1	1	1	1	0
10	1	0	1	1	0	1	1
10	1	0	1	1	1	1	1
10	1	0	1	1	1	1	1
7	1	0	1	1	1	1	0
7	1	0	1	1	0	1	1
7	1	0	1	1	1	1	1
7	1	0	1	1	1	1	1
7	1	0	1	1	1	1	1
7	0	0	1	1	1	1	1
7	1	0	1	1	1	1	1
7	1	0	1	1	1	1	0
7	1	0	1	1	1	1	1
7	1	0	1	1	1	1	1
7	1	0	1	1	1	1	0
7	1	0	1	1	0	1	1
5	1	0	1	1	1	1	1
5	1	0	1	1	0	1	1
5	1	0	1	1	1	1	0
5	1	0	1	1	1	1	0
5	1	0	1	1	1	1	1
5	1	0	1	1	1	1	1

Continua...

Continuação do Quadro 5A.

tamanho da mistura	Locos						
	AB5a	AB5b	AB5c	AB5d	AB5e	AB5f	AB5h
	leitura da banda no ensaio de RAPD						
5	1	0	1	1	1	1	1
5	1	0	1	1	1	1	1
5	1	0	1	1	1	1	1
5	1	0	1	1	0	1	1
5	1	0	1	1	1	1	1
3	1	0	1	1	0	1	1
3	1	0	1	1	1	1	1
3	1	0	1	1	1	1	1
3	1	0	1	1	1	1	1
3	1	0	1	1	1	1	0
3	1	0	1	1	1	1	1
3	1	0	1	1	0	1	1
3	1	0	1	1	0	1	0
3	1	0	1	1	0	1	1
3	1	0	1	1	1	1	1
3	1	0	1	1	1	1	0
2	1	0	1	1	0	1	1
2	1	0	1	1	1	1	1
2	1	0	1	1	1	1	1
2	1	0	1	1	1	1	1
2	1	0	1	1	0	1	1
2	1	0	1	1	0	1	1
2	1	0	1	1	0	1	1
2	1	0	1	1	1	1	1
2	1	0	1	1	1	1	1
2	1	0	1	1	1	1	1
2	1	0	1	1	1	1	1
2	1	0	1	1	1	1	1
2	1	0	1	1	1	1	1
2	1	0	1	1	1	1	1
2	0	0	1	1	1	1	1