

Divergência Genética em Populações de Coqueiro-Anão e Gigante (*Cocos nucifera* L.) Via Marcadores SSR.

Pedro Henrique Araújo Diniz Santos¹, Messias Gonzaga Pereira², Carlos Diego de Oliveira Azevedo¹,
Helaine Christine Cancela Ramos³, Luiz Angelo Mirisola⁴, Semíramis Rabelo Ramalho Ramos⁵
e Wilson Menezes Aragão⁶.

Resumo

O objetivo deste trabalho foi estudar a divergência genética de 17 populações de coqueiro (*Cocos nucifera* L.) a fim de determinar possíveis cruzamentos para obtenção de híbridos com base em suas distâncias genéticas. Foram utilizadas populações provenientes de diferentes regiões produtoras no Brasil, incluindo os estados do Pará (BGD-OLD-PA e BGD-PA), Ceará (TALL-PF-CE, YD-GRAM-CE, RD-GRAM-CE, BGDxCRD-CE, CRD-CE e BGD-PA-CE), Paraíba (BGD-FS-PB e BGD-SOUZA-PB), Sergipe (MYD-SE e MRD-SE), Piauí (BGD-PI), Bahia (BGD-BA) e Rio Grande do Norte (Gigante de Touros e BGD-JIQUI), além de uma população oriunda do México (MEXICAN). Através dos locos microssatélites analisados foram calculadas as distâncias genéticas entre as populações para a obtenção do agrupamento via método hierárquico UPGMA, além da AMOVA para a obtenção das variâncias entre e dentro dessas populações. Observou-se uma clara distância genética entre os anões em relação ao grupo dos gigantes, além de uma diferença considerável na amplitude da variabilidade no que diz respeito a esses dois grupos. Foi observada a formação de cinco grupos englobando as populações de coqueiro anão e a alocação de tais populações segue uma lógica no que se refere a localização geográfica do local de coleta com exceção do MEXICAN e o BGD-JIQUI. A AMOVA mostrou que existe variabilidade tanto dentro (59%) como entre populações (41%) evidenciando a possibilidade na obtenção de híbridos não apenas entre ecótipos gigante versus anão, mas também, entre ecótipos anão e até mesmo entre populações BGD – populações de anão-verde do Brasil.

Introdução

O coqueiro (*Cocos nucifera* L.) é uma palmeira perene cujo centro de origem remonta ao Sudeste Asiático e foi introduzida no Brasil pelos colonizadores portugueses em meados do século XVI (Costa et al., 2005).

É considerado uma planta multiuso, uma vez que praticamente todas as partes da planta são aproveitadas pelo homem, desde o consumo *in natura* dos frutos verdes (água de coco) e dos frutos secos (uso culinário) até a utilização de outras partes como a madeira para construções de móveis, casas e construções rurais.

A variabilidade genética do coqueiro disponível nas atuais coleções de germoplasma apresenta boa amplitude passível de ser explorada por melhoristas em diversos programas de melhoramento, permitindo assim, o desenvolvimento de novas cultivares. Ademais, a variabilidade genética disponível entre populações de coqueiro gigante e anão possibilitam a produção de indivíduos recombinantes, passíveis de serem portadores de características de interesse (Batugal et al., 2005).

O uso de marcadores moleculares podem contribuir para a otimização do uso da diversidade genética do coqueiro (Batugal et al., 2005; Ribeiro et al., 2010). As informações obtidas do uso de marcadores podem auxiliar no estabelecimento de prioridades para os programas de melhoramento, possibilitando aos melhoristas a maximização da distância genética e obtenção de ganhos advindos da heterose (Shuster, 2011).

Ainda em concordância com os marcadores moleculares, Daher et al. (2002) afirmam que a investigação da variabilidade genética entre populações de coqueiro é fundamental para o desenvolvimento de cultivares superiores adaptadas a diferentes condições ambientais, bem como para a seleção de parentais divergentes para potencializar a heterose em hibridações futuras.

¹ Estudantes do Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro-UENF, Campos/RJ. Bolsista FAPERJ. E-mail: phsantos2004@yahoo.com.br

² Professor titular CCTA/LMGV da UENF, Campos/RJ, e-mail: messias@uenf.br

³ Professora Associada CCTA/LMGV da UENF, Campos/RJ, e-mail: helainecr@uenf.br

⁴ COMERCIAL REGON LTDA, Belo Horizonte/MG, e-mail: mirisola@terra.com.br

⁵ Pesquisadora da Embrapa Tabuleiros Costeiros, CPATC, Aracaju/SE, e-mail: semiramis.ramos@embrapa.br

⁶ DSc. em Genética e Melhoramento de Plantas. Pesquisador aposentado da Embrapa Tabuleiros Costeiros, CPATC, Aracaju/SE, e-mail: aragaowm@hotmail.com

Assim, o presente trabalho teve como objetivo estudar a divergência genética de 17 populações de coqueiro a fim de determinar possíveis cruzamentos para obtenção de híbridos com base em suas distâncias genéticas.

Material e Métodos

Foram utilizados no trabalho 17 populações de coqueiro provenientes de diferentes regiões do Brasil, incluindo os estados do Pará (BGD-OLD-PA e BGD-PA), Ceará (TALL-PF-CE, YD-GRAM-CE, RD-GRAM-CE, BGD-XCRD-CE, CRD-CE e BGD-PA-CE), Paraíba (BGD-FS-PB e BGD-SOUZA-PB), Sergipe (MYD-SE e MRD-SE), Piauí (BGD-PI), Bahia (BGD-BA) e Rio Grande do Norte (Gigante de Touros e BGD-JIQUI), além de uma população oriunda do México (MEXICAN). Cada população, exceto as do Rio Grande do Norte com cinco genótipos para o Gigante de touros e oito para o BGD-JIQUI, foram representadas por 10 genótipos, totalizando 163 genótipos analisados através da genotipagem via marcadores SSR.

O procedimento de extração de DNA foi efetuado conforme o protocolo “*mini-prep*” de Doyle e Doyle (1990) contendo alterações e armazenado como solução de trabalho a uma concentração de 5ng/μl.

Ao todo, foram realizadas as reações de amplificação (PCR) envolvendo 15 primers microsatélites (SSR) distintos, sendo estes, extraídos de dados consolidados em estudos de diversidade genética de coqueiro pelo CIRAD (Centro de Cooperação Internacional de Desenvolvimento em Pesquisa Agrônômica) na França.

Os fragmentos de DNA amplificados foram separados por um sistema de gel de agarose de alta resolução (MetaPhor™ Agarose + Agarose D1 HIGH EEO). Após esta etapa foram geradas as matrizes de dados construídas através do *score* das bandas observadas nas imagens dos géis.

Foi utilizado o programa Genalex 6.5 (Peakall and Smouse, 2012) para calcular as distâncias genéticas entre e dentro de populações utilizando a matriz de *scores* das marcas, adotando-se como medida de dissimilaridade a distancia de Nei (1978). Desta maneira, foi gerada uma matriz com valores das distâncias entre as populações, no qual foi adaptada para análise de agrupamento através do método UPGMA (*Unweighted Pair Group Method using Arithmetic Averages*) utilizando o programa Mega versão 5 (Kumar et al., 2009), reunindo os genótipos em grupos homogêneos, maximizado a variação entre os grupos.

Para o estudo da análise molecular de variância (AMOVA), também foi utilizado o programa Genalex 6.5 (Peakall and Smouse, 2012) para obtenção das variâncias entre e dentro das populações estudadas.

Resultados e Discussão

No Dendograma formado através da análise de agrupamento (Figura 1), nota-se que os ecótipos de coqueiro-gigante se alocaram em grupos totalmente distintos dos ecótipos de coqueiro-anão. Observa-se também uma ampla variabilidade genética dentro do grupo dos ecótipos gigantes, ao passo que os ecótipos anões tiveram uma baixa amplitude na variabilidade. Uma possível causa para essa diferença na amplitude da variabilidade pode ser o fato de que estes dois grupos de coqueiro (anão e gigante) possuem sistema de reprodução distinta, com o grupo dos anões sendo constituído por plantas autógamas e o grupo dos gigantes por plantas alógamas.

Dentro do grupo dos anões, fica claro a formação de cinco grupos (1, 2, 3, 4 e 6) e que dentro de tais grupos observa-se que para alguns ecótipos, os materiais se agruparam seguindo uma lógica com base na localização da área de conservação onde os mesmos foram coletados, como é o caso dos ecótipos MYD-SE e MRD-SE, que apesar de serem Anão Amarelo da Malásia e Anão Vermelho da Malásia, respectivamente, foram coletados no banco de germoplasma da EMBRAPA Tabuleiros Costeiros, em Sergipe. O BGD-BA também se alocou no mesmo grupo, talvez pelo fato de serem estados vizinhos, seguindo a lógica da proximidade da área de conservação dos acessos. Vale ressaltar que houve uma tendência das populações se agruparem de acordo com a região onde foram coletadas, uma vez que dentro do grupo 1 temos ecótipos de origens distintas (Bahia, Malásia e México), porém, devido a proximidade da Bahia e Sergipe, esses ecótipos podem ter sido introduzidos. Segundo Gunn et al. (2011), a falta de barreiras fizeram com que o coqueiro se disseminasse por todo mundo. Ainda segundo o autor, os antepassados usavam o fruto como material de troca, o que contribui de forma direta e efetiva para sua disseminação no mundo.

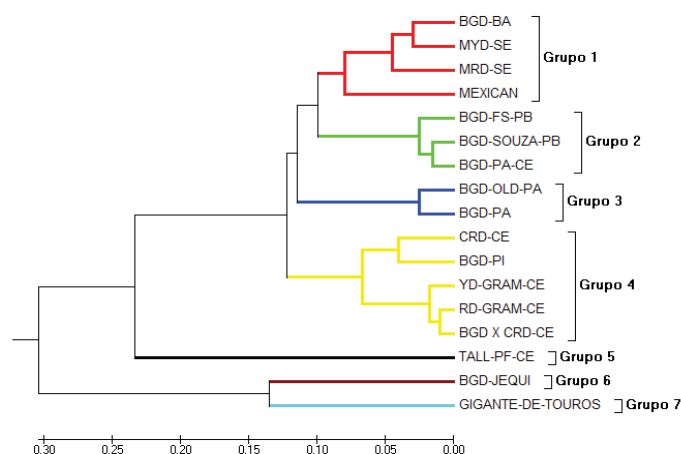


Figura 1 – Dendrograma obtido através do método hierárquico UPGMA, ilustrando a distância genética entre as 17 populações de coqueiro-anão e gigante.

Assim como o gigante, o coqueiro-anão foi introduzido no Brasil, porém não se tem muita certeza acerca de sua origem. Tal fato pode explicar o porquê dos ecótipos terem sido coletados em regiões totalmente distintas, porém do mesmo grupo (anão), e se agruparem tão próximos, como é o caso do MEXICAN (México).

Na tabela 1, nota-se que existe variabilidade tanto dentro de populações (59%) como entre populações (41%). Noël et al. (2011), em estudo de diversidade utilizando microssatélites em populações de anão das Filipinas também encontrou resultados semelhantes como o presente trabalho sendo 49,66% da variância entre populações e 50,34% da variância dentro das populações. Diante deste resultado podemos afirmar que foram observadas diferenças genéticas entre ecótipos de anão, o que corrobora a possibilidade de se obter híbridos não apenas entre ecótipos gigante versus anão, mas também, entre ecótipos anão e até mesmo entre populações BGD – populações de anão verde do Brasil.

Tabela 1 - Análise de variância molecular de 17 populações de coqueiro-anão e gigante.

FV	GL	QM	Variância (%)
Entre	16	67,30	41
Dentro	146	8,87	59
Total	162		100,00

Apoio

A Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro - UENF, a COMERCIAL REGON LTDA, a Embrapa Tabuleiros Costeiros - CPATC e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro - FAPERJ.

Referencias

- Batugal, P.; Rao, V.R.; Oliver, J., editors. 2005. Coconut Genetic Resources. **International Plant Genetic Resources Institute** – Regional Office for Asia, the Pacific and Oceania (IPGRI-APO), Serdang, Selangor DE, Malaysia.
- Costa, R.S.C DA; Nascente, A.S.; Ribeiro, G.D.; Ferreira, M.DAS.G.R. (2005). Cultivo do Coqueiro em Rondônia. **Ed. Téc. NASCENTE, A.S. EMBRAPA Rondônia**. Versão Eletrônica: ISSN 1807-1805. Porto Velho, Rondônia.
- Daher, R.F.; Pereira, M.G.; Tupinambá, E.A.; Amaral Júnior, A.T.; Aragão, W.M; Ribeiro, F.E.; Oliveira, L.O.; Sakiyama, N.S. (2002). Assessment of coconut tree genetic divergence by

compound sample RAPD marker analysis. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 2, n. 3, p. 431-438.

Doyle, J.J. e Doyle, J. L. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v.12:13-15.

Gunn, Bee F.; Baudouin, Luc; Olsen, Kenneth M. Independent origins of cultivated coconut (*Cocos nucifera* L.) in the Old World Tropics. **PLoS one**, v. 6, n. 6, p. e21143, 2011.

Kumar, S.; Nei, M.; Dudley, J.; Tamura, K. (2009) MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. **Brief Bioinform**, 9: 299-306.

Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from small number of individuals. **Genetics**, v.89, p. 583-590, 1978.

Noël, Konan K. Jean et al. Microsatellite gene diversity within Philippines dwarf coconut palm (*Cocos nucifera* L.) resources at Port-Bouët, Côte d'Ivoire. **Scientific Research and Essays**, v. 6, n. 28, p. 5986-5992, 2011.

Peakall, R. and Smouse P.E. (2012) GenA1Ex 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. **Bioinformatics** 28, 2537-2539.

Ribeiro, F.E.; Baudouin, L.; Lebrun, P.; Chaves, L.J.; Brondani, C.; Zucchi, M. E.; Vencovsky, R. (2010). Population structures of Brazilian tall coconut (*Cocos nucifera* L.) by microsatellite markers. **Genetics and Molecular Biology**, 33, 4, 696-702p. Sociedade Brasileira de Genética. Printed in Brazil.

Shuster, I. (2011). Marker-assisted selection for quantitative traits. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**. S1: 50 – 55p.