

DIVERSIDADE GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE COQUEIRO
(*Cocos nucifera* L.) VIA MARCADORES SSR

CARLOS DIEGO DE OLIVEIRA AZEVEDO

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO – UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
JANEIRO - 2014

DIVERSIDADE GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE COQUEIRO
(*Cocos nucifera* L.) VIA MARCADORES SSR

CARLOS DIEGO DE OLIVEIRA AZEVEDO

“Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Genética e Melhoramento de Plantas.”

Orientador: Prof. Messias Gonzaga Pereira

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
JANEIRO – 2014

DIVERSIDADE GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE COQUEIRO
(*Cocos nucifera* L.) VIA MARCADORES SSR

CARLOS DIEGO DE OLIVEIRA AZEVEDO

“Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Genética e Melhoramento de Plantas.”

Aprovado em 22 de Janeiro de 2014

Comissão Examinadora:

Dr^a Semíramis Rabelo Ramalho Ramos (D.Sc. Melhoramento de Plantas) –
Embrapa Tabuleiros Costeiros

Prof. Silvaldo Felipe Silveira (D.Sc. Fitopatologia) – UENF

Prof. Gonçalo Apolinário de Sousa Filho (D.Sc. Biotecnologia e Biotecnologia) –
UENF

Prof. Messias Gonzaga Pereira (Ph.D. Plant Breeding) – UENF
(Orientador)

Aos meus pais, Carlos Magno de Souza Barros Azevedo e Dayse Lucid Ramos de Oliveira Azevedo, pelo inesgotável apoio e dedicação e pelo amor incondicional; a minha irmã, Nathália; e a minha esposa e colega de bancada, Alinne, dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus e a Nossa Senhora, por todas as graças alcançadas em minha vida, em especial, pelas graças que me conduziram ao bom êxito acadêmico e profissional;

À Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas da UENF, por todo o crescimento acadêmico e profissional conquistado;

Aos meus pais que sempre investiram na minha educação, torceram por mim e me incentivaram a buscar meus objetivos;

A minha irmã Nathália, pelo seu apoio;

A minha esposa Alinne, pelas trocas de informações durante o período em que estive escrevendo esta dissertação, por torcer e acreditar em mim nas épocas conturbadas do meu mestrado, épocas essas em que minha jornada tornou-se tripla e, sobretudo, por todo amor, carinho, atenção, paciência e companheirismo;

Aos meus avós, Luiz e Dilma, que sempre me incentivaram a progredir nos estudos e vibraram com cada conquista;

A minha madrinha, Fátima, pela torcida e incentivo constantes;

Ao meu orientador, Prof. Messias Gonzaga Pereira, por ter acreditado no meu potencial acadêmico e científico desde os tempos de aluno de iniciação científica, pela oportunidade de orientação ao longo do meu curso de mestrado e, pelos conhecimentos transmitidos;

Aos meus coorientadores, Telma Nair Santana Pereira e Alexandre Pio Viana, pelos conhecimentos transmitidos e por todo o suporte na execução dos meus experimentos. Em especial, à prof^a Telma, por acreditar em meu potencial e por dar-me conselhos que se mostraram cruciais para que eu pudesse vislumbrar novas conquistas;

À Empresa Comercial REGON, representada na pessoa do Luiz Mirisola, pelo apoio financeiro, logístico e profissional na coleta de amostras foliares;

À Embrapa Tabuleiros Costeiros, representada pela Dra. Semíramis, pelo suporte científico e fornecimento de amostras foliares;

Ao Dr. Wilson Aragão, pela indicação das populações de Coqueiro a serem amostradas;

À “mãe” de todos os alunos do LMGV, Vitória, bem como aos meus amigos do LMGV, Pedro, Lucas, Renato, Júlio, Marcela e Fernanda, pelos intercâmbios de experiências e conhecimentos, assim como por todo o apoio na condução do meu experimento;

A todos os professores, cuja participação ao longo do curso possibilitou o meu crescimento pessoal, acadêmico e profissional;

À FAPERJ, pelo custeio e financiamento do projeto de pesquisa que originou esta dissertação.

SUMÁRIO

Resumo.....	vi
Abstract.....	viii
1.INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	4
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	15
4.1. Material Genético.....	15
4.2. Extração de DNA.....	20
4.3. Análise Molecular via SSR (Sequências Simples Repetidas).....	21
4.3.1. Preparo das Reações de Polimerase em Cadeia (PCR).....	21
4.3.2. Eletroforese.....	22
4.4. Análise dos Dados.....	23
4.4.1. Distância Genética.....	23
4.4.2. Análise Molecular de Variância (AMOVA).....	23
4.4.3. Análise de Agrupamento.....	23
4.4.4. Análise de Coordenadas Principais (PCoA).....	24
4.4.5. Análise Descritiva.....	24
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25
5.1. Aplicação de microssatélites para análise molecular da diversidade genética de populações de coqueiro (Cocos nucifera L.) provenientes de diferentes regiões produtoras no Brasil.....	25

5.2. Aplicação de microssatélites para análise molecular da diversidade genética de populações de coqueiro Anão Verde do Brasil (<i>Cocos nucifera</i> L. var. Nana)	33
6. CONCLUSÃO	40
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	41

RESUMO

AZEVEDO, Carlos Diego de Oliveira; MSc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; Janeiro de 2014; “Diversidade genética de populações de coqueiro (*Cocos nucifera* L.) via marcadores SSR”; Orientador: Ph.D. Messias Gonzaga Pereira; Conselheiros: Ph.D. Telma Nair Santana Pereira e D.Sc. Alexandre Pio Viana.

O coqueiro (*Cocos nucifera* L.) é uma planta perene, tropical, originária do Sudeste Asiático e, cuja introdução no Brasil, ocorrida em meados do século XVI, é atribuída aos colonizadores portugueses. Além disso, trata-se de uma das principais espécies perenes de interesse econômico no mundo, dado o seu notável potencial de gerar emprego e renda. A aplicação de marcadores moleculares na etapa de seleção aumenta a eficiência na identificação de genótipos mais distantes geneticamente, potencializando o ganho genético quando em cruzamento. O presente estudo visa, por meio do uso de marcadores SSR (Sequências Simples Repetidas), avaliar a magnitude da variabilidade genética entre e dentro de populações de cocos-referência para produção de sementes em distintas regiões produtoras do Brasil, com o intuito de selecionar genótipos geneticamente divergentes a serem usados como parentais em futuros cruzamentos. Para tanto, foram utilizados 160 genótipos representando 16 populações pertinentes a diferentes variedades de coco (Anão Verde, Anão Vermelho, Anão Amarelo e Gigante), sendo cada uma proveniente de distintos estados brasileiros, com ênfase dada à do Anão Verde pela importância do mesmo no Brasil, e 10 genótipos oriundos do México. Anteriormente à análise

molecular, o DNA genômico foi extraído de acordo com o protocolo “mini-prep” de Doyle e Doyle com modificações. A análise molecular, via SSR, procedeu-se seguindo a metodologia sugerida por Baudouin (2009), com modificações. No total, foram conduzidas reações de amplificação usando 17 *primers* SSR. Porém, apenas os 15 *primers* eficazes foram usados nas análises posteriores. Os fragmentos de DNA amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose de alta resolução a 4%, sendo os produtos da PCRs corados como uma solução de Blue Juice + Gel Red. Após a determinação do *score* dos fragmentos amplificados, foi construída uma matriz com os dados do *score*, a qual foi utilizada na execução da análise dos dados, promovida pelo programa GenAlEx, e na geração do dendrograma, pelo programa MEGA 5. Os resultados deste trabalho foram divididos da seguinte forma: a) na primeira seção, são apresentados os resultados referentes a uma análise comparativa da diversidade genética entre distintas populações de coqueiro no Brasil, por meio de microssatélites, a qual envolveu diferentes populações de Gigante e Anão; b) na segunda seção, foi promovida uma análise molecular, por microssatélites, da diversidade genética de populações de coqueiro Anão Verde do Brasil, oriundas de várias regiões produtoras do país, constituindo o primeiro trabalho, usando microssatélites, que contemplou todas estas populações. Os valores de Heterozigosidade esperada (H_e), também conhecida por diversidade genética, foram baixos, indicando baixo índice de diversidade genética. Entretanto, as análises de estatística F, Fluxo Gênico, Coordenadas Principais e Agrupamento indicaram que há diversidade genética em nível moderado em todas as populações avaliadas. Portanto, este trabalho aponta que há diversidade genética nas diferentes populações de coqueiro avaliadas e destaca a diversidade genética detectada em populações de coqueiro Anão Verde do Brasil (AVB), sobretudo nas populações BGD-PA e BGD-PI, o que é uma informação muito importante para selecionar parentais e produzir futuros híbridos AVB X AVB com maior produtividade e qualidade de água.

Palavras-chave: Cocos nucifera L., SSR, Diversidade Genética, Híbridos Anão x Anão.

ABSTRACT

AZEVEDO, Carlos Diego de Oliveira; MSc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; January, 2014; “Genetic Diversity of Coconut Populations (*Cocos nucifera* L.) via SSR markers”; Advisor: Ph.D. Messias Gonzaga Pereira; Consultants: Ph.D. Telma Nair Santana Pereira and D.Sc. Alexandre Pio Viana.

Coconut (*Cocos nucifera* L.) is a tropical perennial palm tree, which is original from Southeast Asia and was introduced in Brazil in the middle of 16th century by Portuguese. In addition, it is one of the main perennial species of economic interest in the World due to its noteworthy potential to create jobs and income. The application of molecular markers during selection increases the efficiency in the identification of the most genetically distant genotypes, potentiating the genetic gain. The present study, via SSR markers (Simple Sequence Repeats), aims to evaluate the magnitude of genetic diversity among and within coconut populations, which are references for seed production in distinct growing regions in Brazil, in order to select genetically divergent genotypes to be used as parents for future crosses. Thus, a total of 160 genotypes were used to represent 16 populations of different coconut varieties (green dwarf, red dwarf, yellow dwarf and tall), each population from a distinct Brazilian State, emphasizing the Brazil Green Dwarf due to the relevance of such coconut populations in Brazil, and 10 genotypes from Mexico. Previously to the molecular analysis, genomic DNA was extracted, according to “mini-prep” protocol described by Doyle and Doyle. The molecular analysis via SSR was performed following Baudouin’s method with a few

modifications. Amplification reactions using a total of 17 SSR primers were done. Nevertheless, only the 15 efficient primers were used in the next analyses. The amplified DNA fragments were separated by electrophoresis on a high resolution agarose gel at 4%, the PCR products were stained by a solution of Blue Juice + Gel Red. After scoring the amplified fragments, a matrix of such data was built and used during the data analyses carried out by GenAlEx software and the dendrogram was created by MEGA 5 software. The results of this study were divided as follows: a) The first section has presented the results referring to the genetic diversity analysis of several Brazilian coconut populations, which involved different populations of tall and dwarf coconut; b) The second section, it was promoted a molecular analysis of the genetic diversity of Brazil Green Dwarf Coconut from several Brazilian growing regions via microsatellites. There was never before a study based on microsatellites that used all these BGD populations. The values of expected heterozygosity (H_e) also known as genetic diversity were low, indicating a low level of genetic diversity. Nevertheless, the analyses of F-statistics, Gene Flow (N_m), Principal Coordinates and Clustering, indicate that there is genetic diversity at moderate level within all evaluated populations. Therefore, this study points out that there is genetic diversity in each evaluated coconut populations and highlights the genetic diversity detected within the populations of Brazil Green Dwarf coconut (BGD), mainly the populations BGD-PA and BGD-PI, which is a really important information in order to select parents e produce future hybrids BGD X BGD with greater yield and water quality.

Keywords: *Cocos nucifera* L., SSR, Genetic Diversity, Dwarf x Dwarf Hybrids.

1. INTRODUÇÃO

O coqueiro (*Cocos nucifera* L.) é uma palmeira perene cujo centro de origem remonta ao Sudeste Asiático, visto que, nesta região, a espécie apresenta ampla diversidade morfológica, vários nomes locais e, ainda, nesta região, é encontrada a maioria dos insetos-praga relacionados à planta (Persley, 1992). A introdução do coqueiro na costa Atlântica da América ocorreu por navegadores mercantis em meados do século XVI (Purseglove, 1975).

Segundo Teulat et al. (2000), o gênero *Cocos* possui apenas uma espécie *Cocos nucifera* L., a qual, de acordo com Liyanage (1958), é dividida em três grupos de variedades: Gigante (var. *Typica*), Anão (var. *Nana*) e o intermediário (var. *Aurantiaca*). Além disso, a espécie é diploide e possui $2n=2x=32$ cromossomos (Nambiar e Swaminathan, 1960).

O coqueiro é considerado uma das espécies perenes de maior relevância do mundo, já que o seu cultivo detém a capacidade de gerar emprego e, conseqüentemente, renda em vários países, seja pelo consumo de seus frutos in natura ou pela industrialização do fruto, bem como, de outros órgãos desta planta, como raiz, estipe, inflorescência, folhas e palmito; originando mais de 100 produtos e subprodutos de significativo valor econômico. Além disso, o coqueiro é utilizado como planta paisagística, adornando espaços públicos e privados (Costa et al., 2005).

O IBPGR (1978) reportou as principais características morfológicas que permitem distinguir as variedades 'Anã' e gigante, posteriormente, estas

informações foram revisadas por Santos et al. (1995). Segundo Santos et al. (1995) no STANTECH (Manual de Técnicas de Pesquisa Padronizadas para o Melhoramento de Coqueiro), os coqueiros gigantes são alógamos e, conseqüentemente, heterozigotos; as palmeiras podem alcançar de 20 a 30m de altura; o florescimento inicia com cerca de 6 a 10 anos após o plantio; a fase produtiva estende-se por 60 a 70 anos. Em contrapartida, o coqueiro Anão é autógamo e, conseqüentemente, homozigoto; pode atingir de 15 a 18m de altura; o florescimento inicia com cerca de 3 anos após o plantio; e, permanece com produção economicamente viável por 30 a 40 anos.

Apesar dessas diferenças botânicas, segundo Liyanage (1950), as variedades podem ser cruzadas entre si, originando híbridos de características intermediárias, fato este muito interessante para programas de melhoramento.

A investigação da variabilidade genética entre populações de coco é fundamental para a busca de fontes de variabilidade genética para o desenvolvimento de cultivares superiores adaptadas a diferentes condições ambientais, mas, sobretudo, para a seleção de parentais divergentes a fim de potencializar a heterose em hibridações futuras.

Inicialmente, antes do desenvolvimento e aplicação dos marcadores moleculares, os estudos de diversidade genética em coqueiro, assim como em outras espécies, eram usados marcadores morfológicos. Santos et al. (1995) apresentam, em seu trabalho, uma lista de marcadores morfológicos que podem ser aplicados em estudos de diversidade genética em coqueiro.

Entretanto, desde o início dos anos 1980, grandes avanços aconteceram no que tange à aplicação de marcadores moleculares em plantas, sobretudo em estudos de diversidade genética, construção de mapas de ligação e seleção assistida.

Assim como as demais culturas perenes, a seleção de plantas de coqueiro, baseada apenas em fenótipo, torna o processo oneroso, sobretudo no que diz respeito ao tempo demandado para a realização dos trabalhos (Santos et al., 1995). Em contrapartida, os marcadores moleculares podem ser aplicados em qualquer estágio de desenvolvimento da planta e sofrem pouca influência do ambiente (Shuster, 2011).

Assim sendo, os marcadores moleculares têm sido muito requisitados, nos últimos anos, em inúmeros estudos de diversidade genética e seleção

assistida de muitas espécies, sobretudo espécies perenes como o coqueiro. De acordo com Shuster (2011), a eficiência do uso de marcadores moleculares independe do estágio de desenvolvimento em que a planta se encontra, além de serem pouco influenciados pelo ambiente.

Inúmeras técnicas de marcadores moleculares destacam-se na cultura do coqueiro, tais como, RFLP, RAPD, AFLP, ISTR, ISSR, SNP e SSR (Lebrun et al., 2005). Sendo esta última de grande importância em estudos de diversidade genética, porque, segundo Akkaya et al. (1992), SSR (Simple Sequence Repeats) é uma técnica baseada em PCR, cujos marcadores são codominantes e multialélicos, com alto conteúdo de informação e alto poder discriminante.

Em relação ao coqueiro, os marcadores microssatélites, assim como também são chamados os marcadores SSR, têm sido usados em estudos de estruturas de populações, bem como em estudos que visam à avaliação e caracterização de germoplasma de coqueiro (Perera et al., 1999).

Portanto, este trabalho pretende, por meio do uso de marcadores SSR, delinear um perfil da diversidade genética de genótipos de coqueiro oriundos de distintas regiões produtoras do Brasil e, num segundo momento, analisar isoladamente a diversidade das populações de coqueiro Anão Verde do Brasil (AVB ou BGD), com o intuito de permitir a seleção de parentais geneticamente divergentes e superiores a serem usados em futuros cruzamentos, sobretudo em hibridações de Anão Verde do Brasil (AVB X AVB).

2. OBJETIVOS

1. Promover um estudo comparativo da diversidade genética entre populações de coqueiro Gigante do Brasil, Anão Vermelho de Camarões, Anão Vermelho da Malásia, Anão Vermelho de Gramame, Anão Amarelo da Malásia, Anão Amarelo de Gramame, Anão Verde do Brasil, Anão Verde do México e Híbrido (Anão Verde de Jiqui x Anão Vermelho de Camarões);
2. Estudar a divergência genética entre e dentro de populações de coqueiro Anão Verde do Brasil de diferentes regiões de cultivo.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Histórico da Cultura do Coqueiro

O Sudeste Asiático é considerado o centro de origem do coqueiro (*Cocos nucifera* L.), visto que, nesta região, a espécie apresenta ampla diversidade morfológica e vários nomes locais, e, ainda onde é encontrada a maioria dos insetos-praga do coqueiro (Persley, 1992).

Evidências arqueológicas, tais como, fósseis datados do Paleoceno, apontam que plantas relacionadas ao coqueiro atual existiam desde aquela época na região do Oceano Índico e Pacífico (Tripathi et al., 1999). Em adição, textos de civilizações primitivas indicam que o coqueiro já existia há aproximadamente 3 mil anos (Menon et al., 1958; Fuller, 2007).

Ao longo da história, o coqueiro desempenhou um importante papel, contribuindo com o homem para o desenvolvimento da navegação, estabelecimento de rotas comerciais, bem como para a colonização de determinadas regiões no Pacífico e nos Velhos Trópicos (Harries, 1978). Apesar de o fruto do coqueiro apresentar uma adaptação natural para a dispersão por correntes marítimas, a sua dispersão no nível pantropical ocorreu por meio do homem (Harries, 1978; Harries et al., 2004).

No que diz respeito à dispersão natural do coqueiro, acredita-se que mediante o processo de seleção natural que levou cerca de 80 milhões de anos, o coqueiro desenvolveu mecanismos que lhe permitiram ser disperso pelos oceanos e se estabelecer em regiões costeiras, adaptando-se a tempestades de

vento e inundações periódicas, e resistindo sem o apoio ou presença de qualquer representante da fauna e flora e, por fim, novamente, dispersando seus frutos por meio do oceano para novas regiões (Harries, 1978; Foale, 2005).

Quanto à dispersão da espécie pelo homem, é provável que, durante o período pré-colombiano, navegadores austronésios oriundos das Filipinas tenham disseminado o coqueiro para o Leste da Polinésia e, posteriormente, o tenham introduzido na Costa Pacífica da América Latina. Enquanto que, na região do Oceano Índico, a estrutura das populações remete a uma influência promovida pelas expansões dos austronésios rumo ao oeste em direção a Madagascar. Posteriormente, o coqueiro foi introduzido pelos europeus a partir da Índia para a Costa Atlântica da África, América do Sul e Caribe (Harries, 1978; Gunn et al., 2011).

A supracitada introdução na Costa Atlântica da América do Sul foi realizada pelos europeus durante o período de extensiva navegação mercantil que ocorreu no Século XVI (Ribeiro et al., 2010).

Até a década de 1990, o cultivo do coqueiro estava restrito às regiões Norte e Nordeste do Brasil. Entretanto, atualmente, o cultivo é encontrado em quase todas as regiões do país (Martins, 2011).

Botânica

O coqueiro é uma planta perene pertencente ao gênero *Cocos*, o qual apresenta apenas a espécie *Cocos nucifera* L., o que denota a ausência de parentes botânicos nesta espécie. Ainda no que tange à taxonomia, o coqueiro pertence à Família Arecaceae, antiga Palmaceae, e à subfamília Coccoideae, a qual possui 27 gêneros e 600 espécies (Teulat et al., 2000).

No que diz respeito aos aspectos morfológicos e botânicos, o coqueiro apresenta caule do tipo estipe que atinge em média 18 m de altura; sistema radicular do tipo fasciculado, o qual pode atingir uma profundidade de 1,20 m, sendo que a região mais explorada pelo sistema radicular seja na faixa de 0,20 a 0,60 m; as folhas são compostas e do tipo penada, sendo as plantas capazes de emitir de 12 a 18 folhas por ano; as flores são individualmente masculinas e femininas, porém situam-se em uma mesma planta (monoícia) em inflorescências do tipo panículas, as quais são axilares e protegidas por brácteas do tipo espata (Passos, 1998; Holanda et al., 2007).

Segundo Gunn et al. (2011), devido a sua diversidade fenotípica, o coco pode ser classificado quanto à morfologia do fruto e quanto ao hábito de crescimento da planta.

Portanto, quanto à classificação morfológica dos frutos (categorização clássica), revelam-se dois grupos de variedades, a saber: 'niu kafa', o qual é caracterizado por frutos oblongos e/ou triangulares e com grande proporção de fibra na casca; e o 'niu vai', o qual apresenta frutos arredondados com cores brilhantes e uma grande quantidade de endosperma líquido. Em acréscimo, acredita-se que o grupo 'niu kafa' seja o mais ancestral e, dessa forma, remete a seleção natural por dispersão oceânica, enquanto o 'niu vai' sugere a seleção artificial promovida pelo homem (Harries, 1978; Gunn et al., 2011).

No que diz respeito ao hábito da planta, o coqueiro tem sido dividido em duas variedades, a citar: a variedade 'Anã' (Nana), a qual representa cerca de 5% do coco cultivado no mundo, e caracteriza-se por ser autógama, possuir crescimento lento do estipe, espaços curtos entre as cicatrizes foliares e, produzir frutos do tipo 'niu vai'; ainda, tal variedade pode ser subdividida em três subvariedades quanto à coloração dos frutos – Anão Verde, Amarelo e Vermelho; e a variedade 'Gigante' (Typica), a qual é caracterizada por ser alógama, devido à anterioridade da maturação das inflorescências masculinas frente às femininas, apresentando crescimento mais rápido que as variedades 'Anã' e espaços maiores entre as cicatrizes foliares; em adição, esta variedade é cultivada para a produção de copra para óleo e para a obtenção de fibra (Bourdeix et al., 2005; Gunn et al., 2011).

Segundo Bourdeix et al. (2005), existem ainda variedades com hábito intermediário e outros tipos de coqueiro, tais como, Anão 'niu leka' (Polinésia) e o Coqueiro Rei (King Coconut – *Cocos nucifera* var. *Aurantiaca*), endêmico do Sri Lanka.

Fitotecnia

De acordo com Fontes et al. (2002), o coqueiro é uma planta tropical e, portanto, requer: clima quente, com temperatura média de 27°C e não inferior a 15°C, quando ocorrem distúrbios fisiológicos que comprometem o crescimento e a floração; umidade relativa do ar superior a 60%, porém não muito elevada para não comprometer a fisiologia e/ou favorecer a proliferação de fungos; o regime

pluviométrico anual deve ser de 1500mm, com taxa mensal de 130mm; e, por fim, a média de insolação mensal exigida pela planta é de 120h.

Quanto ao solo, o coqueiro mais bem adaptado a solos leves e bem drenados e, portanto, é adaptado ao tipo de solo predominante nos tabuleiros costeiros – Neossolo Quartzarênico. Todavia, estes solos apresentam baixa capacidade de retenção de água, a qual é compensada pela associação quase frequente desses solos com lençóis freáticos pouco profundos, embora, em alguns casos, a irrigação se faça necessária. Além disso, estes solos são sabidamente pobres em nutrientes e matéria orgânica e, dessa forma, é necessária a suplementação nutricional da planta para garantir o crescimento vegetativo e produção (Fontes et al., 2002).

Atualmente no Brasil, são cultivados comercialmente o coqueiro Gigante, o coqueiro Anão e o híbrido, ocupando 70, 10 e 20% dos plantios comerciais no país, respectivamente (Fontes et al., 2002; Martins, 2011).

O coqueiro Gigante é rústico, crescimento rápido, atinge de 20 a 30m de altura, inicia o florescimento cerca de 10 anos após o plantio, produz até 80 frutos/planta/ano, sendo esses frutos de médio a grande e o tempo útil de exploração econômica da planta é de 60 a 70 anos. Os frutos são usados, no Brasil, desde a forma *in natura* até em agroindústria de alimentos (Fontes et al., 2002; Martins, 2011).

O Coqueiro Anão subdivide-se nas subvariedades Verde, amarela e vermelha, sendo o Anão Verde responsável pela maioria dos plantios comerciais de coqueiro Anão. Em linhas gerais, a variedade ‘Anã’ caracteriza-se por ser mais sensível a estresses bióticos e abióticos, apresentar desenvolvimento vegetativo precoce, atingir de 10 a 12m de altura, iniciar a produção entre 2 a 3 anos após o plantio e finalizar sua vida útil entre 30 e 40 anos. Em acréscimo, produz cerca de 150 a 200 frutos/planta/ano que se destinam ao consumo *in natura* e ao uso agroindustrial (Fontes et al., 2002).

O coqueiro híbrido intervarietal Anão x Gigante é explorado comercialmente para fins da produção de água de coco, fibras e, sobretudo, para a produção de polpa (albúmen sólido). As plantas são precoces como as da variedade ‘Anã’, atingem até 20m de altura e produzem de 130 a 150 frutos/planta/ano, sendo estes frutos de tamanho médio (Fontes et al., 2002; Martins, 2011).

De acordo com Holanda et al. (2008), os frutos do coqueiro são colhidos conforme a destinação a ser dada ao produto. Assim, coqueiros anões e híbridos, os quais se destinam à produção de água, têm seus frutos colhidos com aproximadamente 7 meses após a abertura da inflorescência, já que, nesta fase, a qualidade da água atingiu seu máximo. Em contrapartida, para a produção de coco seco, não importa a variedade, a colheita deve ser feita entre 11 e 12 meses após a abertura da inflorescência. Ainda é importante salientar que, neste momento, os frutos apresentam cor castanha com manchas verdes e pardas irregulares, portanto, bastante diferentes do coco verde.

Aspectos Sócio-econômicos

O coqueiro apresenta centenas de usos como fonte de alimento, bebida, fibras, materiais de construção, óleo (com aplicação farmacêutica e industrial) e carvão (Batugal et al., 2005; Holanda et al., 2008; Gunn et al., 2011).

A planta é considerada uma das espécies perenes de maior relevância do mundo, porque detém a capacidade de gerar emprego e, conseqüentemente, a renda em vários países, seja mediante o consumo de seus frutos *in natura* ou pela industrialização, bem como de outros órgãos desta planta (raiz, estipe, inflorescência, folhas e palmito), originando mais de 100 produtos e subprodutos de significativo valor econômico. Além disso, o coqueiro é utilizado como planta paisagística, adornando espaços públicos e privados (Costa et al., 2005).

Aproximadamente 92 países exploram comercialmente o coqueiro, isto porque, nesses países, são encontradas condições ideais para o cultivo, tais como, solos arenosos, alta umidade, boa precipitação e intensa radiação solar (Aragão et al., 2010; Martins, 2011).

Segundo Batugal et al. (2005), ainda assim, em um passado recente, apesar do grande potencial da cultura, mais de 90% dos produtores eram, na verdade, pequenos produtores que apresentavam um baixo nível de qualidade de vida.

Com o intuito de reverter este quadro, em 1991, o Grupo Consultor em Pesquisa Agrícola Internacional (CGIAR) incluiu o coqueiro no seu portfólio de pesquisas e, mais tarde, o Instituto Internacional de Recursos Genéticos Vegetais (IPGRI) organizou a Rede Internacional de Recursos Genéticos de Coco (COGENT), a qual visou e ainda visa, por meio do uso sustentável dos recursos

genéticos de coco disponíveis, promover a redução da pobreza e a melhoria da qualidade de vida nos países produtores (Batugal et al., 2005).

Atualmente, devido aos avanços tecnológicos e, conseqüentemente, das técnicas de manejo, a cultura vem sendo viabilizada até mesmo em regiões menos propícias e, sobretudo, tem permitido a inserção de pequenos produtores, ao redor do mundo, em melhores patamares em termos de qualidade de vida (Martins, 2011).

De acordo com os dados mais recentes apresentados pela FAO, o coqueiro ocupa no mundo uma área plantada em torno de 11,8 milhões de hectares, sendo que mais de 80% da produção significativa está compreendida em países do Leste e Sudeste Asiático. Em acréscimo, os dados apontam para um total da produção mundial de coco de aproximadamente 61,7 milhões de toneladas (UNCTAD, 2013).

A produção de coco no Brasil, em 2013, foi de 1.935.435,00 frutos, com destaque para a Região Nordeste, a maior produtora, com uma produção de 1.434.114 frutos (IBGE, 2013).

Genética e Melhoramento do Coqueiro

Quanto ao seu arcabouço genético, o coqueiro é uma espécie diploide, única representante do gênero *Cocos* (Teulat et al., 2000) e apresenta 32 cromossomos dispostos em 16 pares, ou seja, $2n=2x=32$ (Nambiar e Swaminathan, 1960). Portanto, de acordo com Batugal e Bourdeix (2005), atualmente, o melhoramento do coqueiro tem sido restrito ao nível intraespecífico.

O sistema de cruzamento entre as plantas de coqueiro depende da variedade. Ou seja, a variedade Gigante comporta-se como alógama, e a variedade 'Anã' como autógama (Batugal e Bourdeix, 2005). Isto ocorre porque a variedade Gigante apresenta protandria (amadurecimento do androceu anteriormente ao gineceu), enquanto a variedade 'Anã' exibe amadurecimento simultâneo do androceu e gineceu, resultando em favorecimento da autofecundação.

A bissexualidade inerente aos coqueiros gigantes e anões permite que a polinização seja manipulada com o intuito de assegurar o nível desejado de introgressão, usando gigantes, como fonte de genótipos heterozigotos, e anões,

como fonte de homozigotos, fato de importante contribuição para obtenção de progenitores visando às hibridações intervarietais (Batugal e Bourdeix, 2005).

Entretanto, também é possível a ocorrência de autofecundação em plantas de coqueiro Gigante, porque pode haver coincidência do amadurecimento de flores masculinas e femininas de inflorescências distintas, por sobreposição de uma inflorescência anterior com a próxima (Batugal e Bourdeix, 2005).

Ao longo da história do melhoramento da cultura, o coqueiro foi submetido aos seguintes métodos de melhoramento: seleção massal, a qual se mostrou desfavorável devido à depressão por endogamia exibida pelos coqueiros gigantes; seleção com teste de progênies; híbridos simples intra e intervarietais, envolvendo, no caso de híbridos intervarietais, cruzamentos recíprocos; híbridos complexos, tais como, híbridos duplos e híbridos triplos; e, por fim, mais recentemente, o desenvolvimento de variedades sintéticas, que envolvem o cruzamento entre linhas selecionadas com aferida capacidade combinatória (Batugal e Bourdeix, 2005).

Estudos de Diversidade Genética do coqueiro

Para o sucesso de programas de melhoramento, é imprescindível conhecer profundamente a constituição e a diversidade genética das espécies, bem como, do material genético submetido aos programas de melhoramento, de modo a conhecer não somente a variabilidade genética do material em estudo, como os efeitos da interação desta com o ambiente e, assim, viabilizar a obtenção de genótipos superiores (Milach, 1998).

A aplicação de descritores morfométricos é um dos métodos de estudar a diversidade genética em coqueiro. De acordo com Arunachalam e Rajesh (2008), diversos descritores morfológicos foram aplicados visando avaliar a diversidade genética do coqueiro. Uma lista de descritores morfológicos é disponibilizada por Santos et al. (1995) em STANTECH (Manual de Técnicas Padronizadas de Pesquisa para o melhoramento de coqueiro).

Conforme apresentado por Santos et al. (1995), o estudo da diversidade genética, por meio de dados morfométricos, é complexo, porque a maioria das características observadas é passível de influência ambiental.

Foram vários os estudos de diversidade genética que usaram características morfométricas, tais como: Harries (1978), o qual melhorou o

método de análise de componentes de frutos desenvolvida por Whitehead em 1965, a fim de estudar a diversidade genética do coqueiro no mundo; Ashburner et al. (1997) realizaram a análise de componentes de frutos usando 29 acessos de populações de coqueiro oriundas da Região do Pacífico Sul; Zizumbo-Villareal e Marín (2001) estudaram a diversidade genética de 18 populações de coqueiro do México, usando 19 características morfométricas e fisiológicas de folhas, além da plasticidade fenotípica; Zizumbo-Villareal et al. (2005) analisaram a diversidade genética de acessos de coqueiro do México em condições *in situ* e *ex situ*, usando 17 características morfométricas.

Em contrapartida, desde a década de 1980, os marcadores moleculares vêm apresentando expressiva aplicação em estudos de diversidade genética. Os marcadores moleculares são ferramentas eficientes em estudos de diversidade envolvendo espécies perenes como o coqueiro, visto que são passíveis de serem aplicados em qualquer estágio de desenvolvimento da planta e sofrem pouca influência do ambiente. Portanto, durante as últimas décadas, vários marcadores moleculares foram empregados para estudar a diversidade genética em coqueiro, por exemplo, RFLP, AFLP, RAPD, ISTR, ISSR, SSR e SNPs (Lebrun et al., 2005).

Dentre estes marcadores, destacam-se os marcadores microssatélites ou SSR, os quais, segundo Perera et al. (1999), têm sido usados em análises de estrutura de populações de coqueiro, bem como mostram-se adequados para avaliação e caracterização de germoplasma em coqueiro.

Aplicação de Microssatélites em estudos de Diversidade Genética em Coqueiro

Microssatélites ou Sequências Simples Repetidas (SSR) foram primeiramente aplicados em plantas, mais precisamente, em soja, por Akkaya et al. (1992). Conforme descrito por Akkaya et al. (1992), SSR é uma técnica baseada em PCR que apresenta marcadores codominantes e multialélicos com alto conteúdo informativo e alto poder de discriminação.

Perera et al. (1999) desenharam *primers* SSR polimórficos, para avaliar a diversidade genética do coqueiro, oriundos de diferentes regiões produtoras no mundo.

Perera et al. (2000) usaram oito pares de *primers* SSR além daqueles propostos em 1999, para analisar a diversidade genética em 130 acessos de

coqueiro, representando 75 genótipos de Gigante e 55 genótipos de Anão, pertencentes a 94 ecótipos de coqueiro distintos de diferentes regiões do mundo.

Perera et al. (2001) visaram estudar a diversidade genética entre e dentro de populações do coqueiro Gigante do Sri Lanka, usando oito *primers* SSR, selecionados dentre aqueles descritos por Perera et al. (1999).

Baudouin e Lebrun (2002) desenvolveram, no Centro Internacional de Pesquisa Agronômica para o Desenvolvimento (CIRAD), França, um kit composto por 14 pares de *primers* SSR, todos polimórficos e específicos para o coqueiro.

Perera et al. (2003) aplicaram 12 pares de *primers* SSR, dentre os quais, sete pertenciam à lista descrita por Perera et al. (1999), e outros cinco inéditos. Portanto, os 12 pares de *primers* SSR foram aplicados a 94 populações de coqueiro de diferentes partes do mundo visando investigar a diversidade genética e o relacionamento genético desses acessos. De acordo com Perera et al. (2003), este estudo permitiu maior conhecimento a cerca da diversidade do coqueiro em âmbito mundial.

Meerow et al. (2003) usaram 15 *primers* SSR, diferentes daqueles do kit do CIRAD, com o objetivo de investigar a diversidade genética de cultivares na coleção de germoplasma de coqueiro do Sul da Flórida, e distinguir genótipos legítimos do Anão de Fiji na Flórida.

Nöel et al. (2007) desenvolveram um sistema que permitiu uma melhor caracterização de acessos do Banco de genes de Coqueiro para África e Oceano Índico (ICG-AIO). Portanto, foi empregado o kit de *primers* SSR, desenvolvido por Baudouin e Lebrun (2002), para avaliar a 62 indivíduos de 11 acessos no Centro Nacional de Pesquisa Agronômica (CNRA) na Costa do Marfim.

Rajesh et al. (2008) utilizaram o kit de *primers* do CIRAD para estudar a diversidade genética de raças locais de coqueiro na Índia. Um alto nível de diversidade genética foi detectado, o que assegurou o quanto é importante a atuação dos produtores na conservação e uso do germoplasma.

Ribeiro et al. (2010) estudaram a diversidade genética entre e dentro de 10 populações de coqueiro Gigante do Brasil, usando 13 dos 14 *primers* SSR contidos no kit desenvolvido por Baudouin e Lebrun (2002). Ribeiro et al. concluíram que os *primers* SSR foram capazes de detectar alto nível de diversidade genética, fator importante para futuros trabalhos e programas de melhoramento.

Martinez et al. (2010) aplicaram 13 *primers* do kit do CIRAD, para avaliar a diversidade genética de acessos do Gigante da República Dominicana, Anão Amarelo da Malásia (MYD) e um híbrido do Gigante local x MYD. Em adição, o estudo visou detectar uma possível correlação da diversidade com resistência ao amarelecimento letal.

Gunn et al. (2011) empregaram 10 *primers* SSR do kit CIRAD (Baudouin e Lebrun, 2002), para investigar a diversidade genética de 1322 acessos de coqueiro de diferentes partes do mundo. Os acessos representaram tanto a diversidade geográfica quanto a fenotípica da espécie. Este estudo apontou duas origens geográficas do coqueiro: Sudeste Asiático e sul do subcontinente Indiano.

Yao et al. (2013) utilizaram 15 *primers* SSR, sintetizados pelo CIRAD, para avaliar a eficácia da polinização controlada praticada com três acessos de coqueiro gigantes presentes no Banco Internacional de genes de coqueiro da África e Oceano Índico (ICG-AIO). Com base na diversidade genética estimada pelos marcadores SSR, pode-se perceber que tais marcadores representam uma ferramenta importante, para aferir a eficácia da polinização controlada, como um método de regeneração do Banco (ICG-AIO).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Material Genético

Um total de 16 populações de coco (*Cocos nucifera* L.), provenientes de diferentes regiões produtoras do Brasil, incluindo os Estados do Pará, Ceará, Rio Grande do Norte, Sergipe, Piauí e Bahia, além de uma população oriunda do México. Cada população foi representada por dez genótipos, totalizando 170 genótipos que foram analisados molecularmente (Tabela 1).

A seguir são apresentadas algumas informações básicas sobre as populações em estudo:

- Anão Verde do Brasil de Jiqui (BGD-JIQUI-RN) – Esta população foi estabelecida às margens da Lagoa Jiqui em Parnamirim na Paraíba por um pesquisador do DENOCS (Departamento Nacional de Obras Contra a Seca) na década de 1960. O Anão Verde do Brasil de Jiqui é a principal fonte de sementes para as regiões produtoras de coqueiro Anão Verde do Brasil. Em acréscimo, é o genitor feminino de híbridos (Anão x Gigante) desenvolvidos no Brasil.

Tabela 1. Nomenclatura de trabalho, Sigla, Nome das Populações e Número de Indivíduos amostrados por População.

Nome da População	Nomenclatura de Trabalho	Procedência das amostras	Número de Indivíduos
Anão Verde do Brasil de Jiqui	BGD-JIQUI-RN	EMPARN -RN	10
Gigante do Brasil de Touros	Gigante-de-Touros	COHIBRA - CE	10
Anão Verde do Brasil de Figueiredo Souza	BGD-FS-PB	Propriedade Particular - Paraíba	10
Anão Verde do Brasil de Souza	BGD-SOUZA-PB	Propriedade Particular - Paraíba	10
Anão Verde do Brasil de Paraipaba	BGD-PA-CE	COHIBRA-CE	10
Anão Vermelho de Gramame	RD-GRAM-CE	COHIBRA-CE	10
Anão Amarelo de Gramame	YD-GRAM-CE	COHIBRA-CE	10
Híbrido	BGD X CRD – CE	COHIBRA-CE	10
Gigante do Brasil da Praia do Forte	TALL-PF-CE	COHIBRA-CE	10
Anão Vermelho de Camarões	CRD-CE	COHIBRA-CE	10
Anão Verde do Brasil de Picos	BGD-PI	Propriedade Particular -Piauí	10
Anão Verde do Brasil de Ribeira do Pombal	BGD-BA	Propriedade Particular - Bahia	10
Anão Amarelo da Malásia	MYD-SE	EMBRAPA-SE	10
Anão Vermelho da Malásia	MRD-SE	EMBRAPA - SE	10
Anão Verde do México	MEXICAN	México	10
Anão Verde do Brasil do Pará	BGD-OLD-PA	Propriedade Particular - Pará	10
Anão Verde do Brasil do Pará	BGD-PA	Propriedade Particular - Pará	10
TOTAL			170

- Gigante do Brasil de Touros – (Gigante-de-Touros) – As amostras foram cedidas pela EMPARN (Empresa de Pesquisa Agropecuária do Rio Grande do Norte). Este material tem sido usado pela EMPARN como genitor masculino de hibridações com o Anão Verde do Brasil de Jiqui.
- Anão Verde do Brasil de Souza (BGD-FS-PB) – Esta população foi estabelecida na década de 1960 pelo DENOCS. O Anão Verde do Brasil de Souza foi a segunda área de cultivo do perímetro irrigado de Souza e

teve um papel importante para o estabelecimento de outras áreas produtoras de coqueiro em Souza, Paraíba – Brasil.

- Anão Verde do Brasil de Figueiredo Souza (BGD-FS-PB) – Esta população foi estabelecida usando sementes do DENOCS em 1956. O Anão Verde do Brasil de Figueiredo Souza foi a primeira área de cultivo de coqueiro do perímetro irrigado de Souza, Paraíba – Brasil. Assim como o BGD de Jiqui, BGD de Figueiredo Souza produziu sementes de coqueiro Anão Verde para outras áreas produtoras do Brasil.
- Anão Verde do Brasil de Paraipaba (BGD-PA-CE) – Esta população foi estabelecida no perímetro irrigado de Paraipaba (Ceará – Brasil), provavelmente, usando sementes procedentes do DENOCS. O BGD de Paraipaba é usado como genitor feminino do híbrido intervarietal da COHIBRA.
- Anão Vermelho de Gramame (RD-GRAM-CE) – Amostras foram obtidas do campo de produção da COHIBRA em Amontada-CE, Brasil. As sementes que originaram este plantio foram provenientes de Gramame, localidade próxima a João Pessoa - PB, sendo uma das populações mais antigas no Brasil. Esta população foi considerada distinta do Ecótipo Anão Vermelho da Malásia na tese de Wadt, 1997.
- Anão Amarelo de Gramame (YD-GRAM-CE)– Amostras foram obtidas do campo de produção da COHIBRA em Amontada-CE, Brasil. As sementes que originaram este plantio foram provenientes de Gramame, localidade próxima a João Pessoa - PB, sendo uma das populações mais antigas no Brasil. Esta população foi considerada distinta do Ecótipo Anão Amarelo da Malásia na tese de Wadt, 1997.
- Híbrido (BGD X CRD – CE) - Híbrido produzido pela empresa COHIBRA situada no Ceará, Brasil. Este híbrido envolve o Anão Verde do Brasil de Jiqui e o Anão Vermelho de Camarões. Trata-se do primeiro plantio de híbrido entre coqueiros anões no Brasil.

- O Gigante do Brasil da Praia do Forte (Tall-PF-CE) - Foi prospectada e coletada pela Embrapa em 1983, na Vila Praia do Forte (Bahia, Brasil). Esta população, atualmente é composta por 100 mil plantas de coqueiro e está localizada em uma faixa de 14 km ao longo da Costa Norte do Estado da Bahia, entre os rios Pojuca (121°35'30"S) e Imbassá (12°30'30"N), pertencente ao Município de Mata de São João, BA e distante 80 km de Salvador. Tal população é isolada de qualquer plantio comercial de coqueiro, principalmente de plantios com as cultivares de coqueiro Anão e do híbrido intervarietal Anão x Gigante. Em 1987, a Embrapa, representada por Edmar Ramos de Siqueira, indicou esta população para a COHIBRA. A COHIBRA coletou as sementes e as implantou em 10 ha na fazenda Santo Antônio, Município de Amontada, CE. Tal população é utilizada tanto para produção de frutos secos para uso *in natura* e agroindustrial, quanto para fornecimento de pólen empregado nos cruzamentos com as cultivares de coqueiro Anão, principalmente com o Anão Verde do Brasil de Jiqui (AVeBrJ).
- Anão Vermelho de Camarões (CRD – CE) - Amostras foram obtidas do campo de produção da COHIBRA em Amontada-CE, Brasil. O Anão Vermelho de Camarões (AVC) foi introduzido na COHIBRA por Dr. Wilson Menezes Aragão em torno do ano 2000, sendo as sementes procedentes da Embrapa. O pólen desse Anão foi usado em 2010 para produzir o híbrido simples AVeBrJ x AVC com os objetivos de produção e uso da água de coco e copra, além de reduzir o porte do coqueiro. A partir de 2014, a COHIBRA, provavelmente, vai iniciar a produção comercial de sementes do híbrido triplo (AVeBrJ x AVC) x GBrPF, atividade inédita no mundo.
- Anão Verde do Brasil de Picos (BGD-PI) – Esta população foi estabelecida na década de 1950, em uma propriedade particular em Picos, Piauí – Brasil. Não há registros quanto à procedência das sementes que originaram este plantio.

- Anão Verde do Brasil de Ribeira do Pombal (BGD-BA) – Esta população foi estabelecida na década de 1990, em uma propriedade particular em Ribeira do Pombal, Bahia – Brasil. As sementes que originaram este plantio são procedentes da EMBRAPA Tabuleiros Costeiros em Aracaju, Sergipe – Brasil.
- Anão Amarelo da Malásia (MYD-SE) – Esta população foi estabelecida no campo experimental de Itaporanga (Sergipe - Brasil), mais precisamente, no Banco Internacional de Coco para América Latina e Caribe, o qual está sobre a coordenação da EMBRAPA Tabuleiros Costeiros. As sementes que foram introduzidas no Banco são procedentes da estação experimental Marc Delore na Costa do Marfim.
- Anão Vermelho da Malásia (MRD-SE) - Esta população foi estabelecida no campo experimental de Itaporanga (Sergipe - Brasil), mais precisamente, no Banco Internacional de Coco para América Latina e Caribe, o qual está sobre a coordenação da EMBRAPA Tabuleiros Costeiros. As sementes que foram introduzidas no Banco são procedentes da estação experimental Marc Delore na Costa do Marfim.
- Anão Verde do México (Mexican) – As amostras foram cedidas pelo Dr. Oropeza na forma de DNA liofilizado. Estas amostras foram obtidas de variedades locais do México de coqueiro Anão Verde, cujas sementes são procedentes da Costa do Marfim.
- Anão Verde do Brasil do Pará (BGD-OLD-PA) – Esta população foi estabelecida na década de 1940 em uma propriedade particular no Pará, Brasil. As sementes usadas para constituir o plantio são procedentes de Abaetuba, uma região na qual o coqueiro é produzido desde a colonização do Brasil. Os frutos desta propriedade serviram de sementes para diversas áreas de cultivo de coqueiro Anão Verde no Pará.
- Anão Verde do Brasil do Pará (BGD-PA) – Esta população foi estabelecida na década de 1990 em uma propriedade particular no Pará, Brasil. As

sementes usadas para constituir o plantio são procedentes de palmeiras da população BGD-OLD-PA.

4.2. Extração do DNA

Aproximadamente 200 mg de tecido foliar foram macerados manualmente em cadinhos de porcelana e imersos em nitrogênio líquido; depois, foram transferidos para tubos de capacidade 1,5 ml (Eppendorf – safe-lock), os quais foram também submergidos em nitrogênio líquido. O procedimento de extração de DNA foi efetuado conforme o protocolo “mini-prep” de Doyle e Doyle (1990), contendo as alterações descritas a seguir.

Aos tubos contendo tecido vegetal macerado, foram adicionados 800µl do tampão de extração pré-aquecido contendo 1% CTAB (brometo de cetil-trimetilamônio), 1,4M de NaCl (fabricante: Sigma), 20mM de EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético), 100mM Tris-HCl (pH 8,0), 1% PVP (polivinilpirrolidona) e 0,1% de 2-mercaptoethanol, sendo que os tubos foram incubados a 65°C entre 30 e 40 minutos no aparelho de banho-maria B.4E da Temp-Therm e, posteriormente, agitados suavemente a cada 10 minutos.

A posteriori, os tubos foram centrifugados a 14000rpm por 5 minutos em uma centrífuga Eppendorf (centrifuge 5415D). O sobrenadante (600µl) foi transferido para novos tubos, quando foi adicionado igual volume de clorofórmio, álcool isoamílico (24:1) foi adicionado a cada tubo, sendo os tubos continuamente invertidos até que seu conteúdo se tornasse turbido.

Após a centrifugação por 5 minutos a 14000rpm, ao sobrenadante foi acrescido igual volume de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1). Depois de uma nova centrifugação, o sobrenadante foi transferido para novos tubos e, então se adicionou isopropanol gelado e, posteriormente, os tubos foram agitados com suaves inversões, sendo depois colocados no Biofreezer (Nuair: -85°C ultralow freezer) por cerca de 30 minutos.

Em sequência, foi realizada uma centrifugação a 14000rpm por 10 minutos, obtendo-se um pellet, que foi lavado duas vezes com 200µl de etanol 70%, e uma vez com 200µl de etanol 95%. Em seguida, este pellet contido no tubo foi seco com auxílio de uma placa aquecedora (Boekel 110002), por 15 a 20 minutos, para a evaporação do álcool utilizado na lavagem.

É importante ressaltar que há a possibilidade de que essa etapa de secagem seja feita à temperatura ambiente, o que demandaria mais tempo. Com o fim dessa etapa, o pellet foi ressuspenso em 200µl de solução Tris-EDTA (10mM tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8,0) e incubado com RNase (fabricante: Invitrogen) em uma concentração final de 40µg/ml a 37°C por 30 minutos, também no aparelho de banho-maria.

Depois disso, foram adicionados 20µl de NaCl 5M e 140µl de isopropanol gelado, cuja mistura foi incubada no Biofreezer por mais 30 minutos. Por fim, o conteúdo dos tubos foi centrifugado a 14000rpm por 10 minutos, sendo desidratado novamente como previamente descrito e, finalmente, o pellet foi ressuspenso em 200µl de água ultrapura.

As concentrações de DNA nas amostras foram estimadas por meio de equipamento de espectrofotometria (NanoDrop 2000C – Thermo Scientific) e, posteriormente, padronizadas na concentração de 5ng.µl⁻¹ mediante cálculos com base nas leituras feitas no supracitado equipamento.

4.3. Análise molecular via SSR (Sequências Simples Repetidas)

Os procedimentos estão descritos de acordo com a metodologia sugerida por Baudouin (2009) com algumas modificações.

4.3.1. Preparo da amostra para Reação da Polimerase em Cadeia (PCR)

As reações de amplificação de DNA foram realizadas conforme Baudouin (2009), num volume final de 20 µl contendo os reagentes nas seguintes concentrações: 2,50 µL de Tampão 10X (500 mM (NH₄)₂SO₄, 100mM Tris-HCl pH 8,4, 1% de Triton X-100), 1,6 µL de 25 mM MgCl₂, 2,0 µL de 0,2 mM dNTPs, 1,6 µL de 0,5 mM de *primer*, 0,20 U de Taq DNA polimerase Biotools e 2µL de DNA genômico, completando o volume final com água ultrapura (10,1µL).

As reações foram efetuadas no termociclador GeneAmp – PCR System 9700 (PE Applied Biosystems), com o seguinte programa: um ciclo de desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos de amplificação a 94°C por 30 segundos (desnaturação), 1 minuto (anelamento) a 51°C, 1 minuto (extensão) a 72°C e uma extensão final a 72°C por 30 minutos (Baudouin, 2009).

Ao todo, realizaram-se reações de amplificação envolvendo 17 *primers* SSR distintos, os quais foram extraídos de Baudouin (2009). A Tabela 2 apresenta a sequência dos *primers* a serem utilizados nas supracitadas reações de amplificação.

Tabela 2. Sequências e Temperatura de Anelamento de *Primers* SSR para Coco.

Nomenclatura Internacional	Sequências dos <i>Primers</i>
CinCirA3	F: AATCTAAATCTACGAAAGCA R: AATAATGTAAAAAGCAAAG
CinCirA9	F:AATGTTTGTGTCTTTGTGCGTGTGT R:TCCTTATTTTTCTTCCCCTTCCTCA
CinCirB6	F: GAGTGTGTGAGCCAGCAT R: ATGTTACAGTCCTTCCA
CinCirB12	F: GCTCTTCAGTCTTTCTCAA R: CTGTATGCCAATTTTTCTA
CinCirC3'	F: AGAAAGCTGAGAGGGAGATT R: GTGGGGCATGAAAAGTAAC
CinCirC7	F: ATAGCATATGGTTTTCT R: TGCTCCAGCGTTCATCTA
CinCirC12	F: ATACCACAGGCTAACAT R:AACCAGAGACATTTGAA
CinCirE2	F: TCGCTGATGAATGCTTGCT R: GGGGCTGAGGGATAAACC
CinCirE10	F: TTGGGTTCCATTTCTTCTCATC R: GCTCTTTAGGGTTCGCTTTCTTAG
CinCirE12	F: TCACGCAAAAAGATAAAAACC R: ATGGAGATGGAAAGAAAGG
CinCirF2	F: GGTCTCCTCTCCCTCCTTATCTA R: CGACGACCCAAAACCTGAACAC
CinCirG11	F: AATATCTCCAAAATCATCGAAAG R: TCATCCCACACCCTCCTCT
CinCirH4'	F: TTAGATCTCCTCCCAAAG R: ATCGAAAGAACAGTCACG
CinCirH7	F: GAGATGGCATAACACCTA R: TGCTGAAGCAAAAAGAGTA
CinCirH11	F: TCATTGAGAGGACAAAAGTT R: TAAAAATTCATAAAGGTAAAA
CinCirC5	F: ACCAACAAAAGCCAGAGC R: GCAGCCACTACCTAAAAAG
CNZ40	F: CTTGATTGCTATCTCAAATGG R: CTGAGACCAAATACCATGTGT

4.3.2. Eletroforese

Os fragmentos de DNA amplificados foram separados em gel de agarose de alta resolução concentrado a 4% por um sistema eletroforese horizontal. Os produtos da PCR, antes de serem submetidos à eletroforese, foram corados com uma solução de Blue Juice e Gel Red. Após esta etapa, foram geradas matrizes

de dados construídas mediante o *score* das bandas observadas nas imagens dos géis.

4.4. Análise dos dados

4.4.1. Distância Genética

Foi realizada, no programa GenAlEx (Peakall e Smouse, 2012), a análise da distância genética entre e dentro de populações utilizando a matriz de *score* de marcas. Esta análise gera uma matriz com valores de distância genética entre os genótipos, de acordo com a Distância genética de Nei, a qual foi transformada para servir de dados de entrada para os programas que promovem as análises de agrupamento, molecular de variância e de coordenadas principais (Peakall e Smouse, 2012).

4.4.2. Análise Molecular de Variância (AMOVA)

A AMOVA foi promovida pelo programa GenAlEx (Peakall e Smouse, 2012), utilizando, como dados de entrada, a planilha de dados do *score* das marcas observadas nas imagens de gel, geradas pelo sistema de eletroforese já mencionado. Como resultado desta análise, obtém-se uma estimativa da ocorrência de variância entre e dentro das populações em estudo, totalizando dois níveis hierárquicos (Kumar et al., 2009; Garayalde et al., 2011).

4.4.3. Análise de Agrupamento

Para as análises de agrupamento feitas por meio das matrizes de distância genética, obtidas do programa GenAlEx (Peakall e Smouse, 2012), foi utilizado o programa MEGA versão 5 (Tamura et al., 2011).

O agrupamento dos genótipos foi promovido pelo método de UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Means). Este método tem como objetivo reunir os genótipos analisados em grupos homogêneos, de tal forma que seja minimizada a variação dentro, e maximizada a variância entre os grupos. Essa análise facilita a avaliação da distância genética, principalmente quando o

número de indivíduos envolvidos no estudo é relativamente grande (Amaral Júnior et al., 2010).

4.4.4. Análise de Coordenadas Principais (PCoA)

Esta análise utiliza a matriz de distâncias genéticas para produzir um gráfico de coordenadas no qual os acessos ou populações estão representados por pontos no plano cartesiano (Gower, 1966). Assim como as análises de agrupamento, esta análise permite visualizar o nível de diversidade genética dos acessos avaliados.

4.4.5. Análise Descritiva

A análise pelo programa GenAlEx proporcionou a estimação de parâmetros, possibilitando a realização de inferências mais acuradas sobre a diversidade das populações avaliadas. São elas: número de alelos, número de alelos efetivos, Índice de Shannon, Homozigosidade observada e esperada, Heterozigosidade observada e esperada, Porcentagem de *loci* polimórficos dentro de populações, Índice de fixação e fluxo gênico (Peakall e Smouse, 2012).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Conforme será visto a seguir, os resultados deste trabalho foram subdivididos, a fim de permitir maior aprofundamento nas análises pretendidas para cada situação. Em um primeiro momento, será delineado um perfil da diversidade genética do coqueiro no Brasil e, portanto, serão representadas algumas das mais importantes populações de coqueiro do país. Em um segundo momento, o enfoque será dado às populações de coqueiro Anão Verde do Brasil (AVB), com o intuito de possibilitar a recomendação e a seleção de parentais promissores para futuras hibridações AVBXAVB, visando à maior produtividade e qualidade de água.

5.1. Aplicação de microssatélites para análise molecular da diversidade genética de populações de coqueiro (*Cocos nucifera* L.) provenientes de diferentes regiões produtoras no Brasil.

Um total de 15, dentre os 17 *primers* microssatélites testados, mostrou-se efetivo. Os *loci* efetivos foram CnCirA9, CnCirB6, CnCirB12, CnCirC3', CnCirC7, CnCirC12, CnCirE2, CnCirE10, CnCirE12, CnCirF2, CnCirG11, CnCirH4', CnCirH7, CnCirH11 e CnCirC5, os quais geraram 39 alelos, apresentando uma média de 2.60 alelos por *locus*. Dentre os *loci* analisados, dois foram monomórficos (CnCirE10 e CnCirH7), enquanto os 13 restantes mostraram-se

polimórficos. O número de alelos efetivos (N_e) variou de 0.941 (*locus* CnCirH7) a 1.713 (CnCirC12), apresentando uma média igual a 1.198 (Tabela 3).

No que diz respeito à Heterozigosidade esperada ou diversidade genética (H_e), o *locus* CnCirC12 apresentou o maior valor dentre os demais ($H_e = 0,412$), enquanto, os *loci* CnCirE10, CnCirF2 e CnCirH7 apresentaram o menor valor de H_e ($H_e = 0$). O valor médio de diversidade genética esperado que foi observado equivaleu a 0.125 (Tabela 3).

Tabela 3. *Locus*, tamanho do alelo, número de alelos (N_a), número de alelos efetivos por *locus* (N_e) e diversidade genética (H_e).

Locus	Tamanho do Alelo (bp)	N_a	N_e	H_e
CnCirA9	100-150	2	1.067	0.036
CnCirB6	175-225	3	1.228	0.191
CnCirB12	175-225	3	1.265	0.155
CnCirC3'	175-250	4	1.495	0.306
CnCirC7	200-225	2	1.329	0.170
CnCirC12	175-225	3	1.713	0.412
CnCirE2	125-175	3	1.372	0.221
CnCirE10	300	1	1.000	0.000
CnCirE12	190-210	3	1.149	0.089
CnCirF2	180-250	2	1.000	0.000
CnCirG11	200-250	2	1.084	0.051
CnCirH4'	250-300	3	1.144	0.079
CnCirH7	160	1	0.941	0.000
CnCirH11	170-300	4	1.070	0.116
CnCirC5	100-150	3	1.108	0.056
Total	-	39	-	-
Média	-	2.60	1.198	0.125

Em adição, a Heterozigosidade esperada ou diversidade genética (H_e), o Índice de Shannon (I) e a Porcentagem de *loci* polimórficos em populações (%P) foram estimados para todas as populações avaliadas (Tabela 4).

Tabela 4. Diversidade Genética (H_e), Índice de Shannon (I) e Porcentagem de *loci* polimórficos em populações (%P) de cada população de coqueiro avaliada.

Populações	H_e	I	%P
BGD-SOUZA-PB	0.061	0.087	13.33
BGD-FS-PB	0.097	0.136	20.00
BGD-PA-CE	0.124	0.196	26.67
RD-GRAM-CE	0.125	0.189	33.33
YD-GRAM-CE	0.104	0.164	33.33
BGDXCRD-CE	0.185	0.282	46.67
Tall-PF-CE	0.159	0.236	33.33
CRD-CE	0.108	0.157	26.67
BGD-PI	0.241	0.351	53.33
BGD-BA	0.052	0.082	20.00
MYD-SE	0.033	0.046	6.67
MRD-SE	0.128	0.180	26.67
Mexican	0.173	0.255	46.67
BGD-OLD-PA	0.096	0.156	40.00
BGD-PA	0.275	0.405	60.00
BGD-Jiqui-RN	0.074	0.108	20.00
Gigante-de-Touros	0.097	0.136	20.00
MÉDIA	0.125	0.186	30.98

A diversidade genética variou de 0.033 (MYD-SE) a 0.275 (BGD-PA) com uma média de 0.125, indicando uma baixa diversidade genética. O Índice de Shannon, que também é uma estimativa de diversidade, variou de 0.046 (MYD-SE) a 0.405 (BGD-PA), com uma média de 0.186, indicando baixa diversidade genética dos acessos. Por fim, em contraponto, a porcentagem de *loci* polimórficos em populações variou de 6.67% (MYD-SE) a 60.0% (BGD-PA), com uma média 30.98%, indicando que coexistem populações com baixo nível de diversidade e outras com nível moderado de diversidade.

O híbrido de Anão Verde do Brasil de Jiqui (AVeBrJ) x Anão Vermelho de Camarões (AVC) apresenta um nível de diversidade genética ($H_e = 0.185$) inferior ao observado para as populações de Anão Verde do Brasil do Pará (AVeBrPa) ($H_e = 0.275$) e Anão Verde do Brasil de Picos (AVeBrPi) ($H_e = 0.241$). Ao analisar os dados, apresentados na Tabela 4, quanto à Heterozigosidade esperada ou diversidade genética (H_e), para as populações Anão Verde do Brasil de Jiqui e Anão Vermelho de Camarões, bem como os valores do Índice de Shannon (I) e a Porcentagem de polimorfismo (%P), percebe-se que uma combinação híbrida

dessas populações não deve ser interessante por tender a expressar baixa heterose, pela baixa heterozigosidade dos pais. Portanto, com base nesta prerrogativa, é possível afirmar que outras combinações híbridas, tais como, AVeBrJ x AVeBrPa, AVeBrJ x AVeBrPi e AVeBrPa x AVeBrPi ou AVeBrPi x AVeBrPa, apresentem índices favoráveis para suscitar combinações híbridas de performance superior à da AVeBrJ x AVC.

Quanto aos genótipos procedentes do México, é possível destacar um nível médio de diversidade genética percebido tanto por meio dos valores médios do Índice de Shannon ($I = 0,255$) e Heterozigosidade esperada ($He = 0.173$) quanto mediante o valor médio da porcentagem de *loci* polimórficos em população ($\%P = 46,67$).

Em acréscimo, os resultados deste estudo em relação ao valor médio de diversidade genética do coqueiro Anão (0.128) corroboram as informações reportadas por estudos prévios que também usaram microssatélites, por exemplo, o valor médio de 0.348 observado por Perera et al. (2000), o valor médio de 0.374 encontrado por Perera et al. (2003), o valor médio de 0.222 descrito por Meerow et al. (2003), o valor médio 0.198 detectado por Noël et al. (2007), o valor médio de 0.04 apresentado por Rajesh et al. (2008), o valor médio de 0.21 reportado por Dasanayaka et al. (2009) e o valor médio de 0.218 notado por Noël et al. (2011).

O alvo principal deste estudo não era traçar um perfil da diversidade genética dos coqueiros gigantes do Brasil. Portanto, uma menor representatividade de acessos de coqueiro Gigante neste estudo implicou valores de He e I baixos e próximos aos valores observados nas demais populações avaliadas.

Todavia, o que se espera é que, com uma amostragem mais representativa, seja possível perceber maiores valores de He e I para as populações de coqueiro Gigante em detrimento dos valores mais baixos observados nas populações de coqueiro Anão. Esta tendência pode ser observada nos seguintes trabalhos que também usaram marcadores microssatélites: Perera et al., 1999, 2000; Rivera et al., 1999; Teulat et al., 2000; Meerow et al., 2003; e Perera et al., 2003.

O sistema de cruzamento de populações de coqueiro reforça as informações apresentadas acima. Coqueiros gigantes são predominantemente alógamos, enquanto anões são predominantemente autógamos (Liyanage, 1949).

A endogamia predominante apresentada pelos coqueiros anões (Harries, 1978) os conduziu a baixos níveis de heterozigosidade quando comparados aos das populações de Gigante. Conseqüentemente, baixa heterozigosidade é relacionada a baixo nível de diversidade genética.

Apesar da baixa diversidade genética apontada pelos índices de diversidade genética (H_e e I), outras análises, tais como, as análises de F-statistics, variância molecular (AMOVA), Agrupamento e Coordenadas Principais (PCoA), que indicam o oposto. Ou seja, estas análises indicam um nível considerável de diversidade genética nas populações de coqueiro avaliadas neste estudo. A seguir, serão apresentados e discutidos os resultados das análises supracitadas.

Quanto aos Índices pareados de diferença genética (F_{ST}), também chamados índices de fixação (Rajesh et al., 2008), de acordo com Noël et al. (2011), correspondem a uma estimativa de diferenciação entre e dentro de populações, e variaram de 0.378 a 1.0, com uma média de 0.685. Tais resultados refletem um nível moderado de diferenciação entre os acessos/populações (Tabela 5).

Conforme Hernan (2009), os valores de F_{ST} podem variar de 0 (não diferenciação) a 1 (completa diferenciação) entre um grupo específico e os subgrupos derivados dele. Noël et al. (2011) concluíram que, quando os valores de F_{ST} são maiores do que 0, é o suficiente para considerar os acessos como diferentes. Portanto, de acordo com o valor médio de F_{ST} de 0.42 reportado por Rajesh et al. (2008) e o valor médio de 0.463 obtido por Noël et al. (2011), os acessos avaliados, no presente estudo, podem ser considerados geneticamente diferentes de um nível elevado ($F_{ST} = 0.685$) e, conseqüentemente, tal informação aponta a ocorrência de ampla diversidade genética entre eles.

Em relação ao valor médio de fluxo gênico (N_m) apresentado pelo presente estudo (0.135), este é menor do que o valor médio encontrado por Rajesh et al. (2008) ($N_m = 0.37$). Assim, diferente das conclusões de Rajesh et al. (2008) acerca do valor de fluxo gênico e de sua ação colaborativa para a diferenciação gênica (F_{ST}), o valor médio apresentado aqui (0.135) não pode ser considerado significativo para promover a divergência das populações. Todavia, os valores médios de N_m apresentado pelos *loci* CnCirA9 e CnCirC12 (respectivamente, 0.328 e 0.411) indicam, assim como no estudo de Rajesh et al.

(2008), uma moderada contribuição do Fluxo Gênico para a diferenciação gênica e, conseqüentemente, para a diversidade genética dos acessos avaliados.

Tabela 5. F-statistics (Wright, 1951): F-statistics (Wright, 1951): coeficiente de endogamia ou índice de diferenciação entre indivíduos de uma população/subpopulação (F_{IS}), grau de diferenciação genética entre e dentro das populações e a diferenciação total (F_{IT}), grau de diferenciação total entre indivíduos ou subpopulações (F_{ST}) e Fluxo Gênico (N_m) para os 15 *loci* de microssatélites.

Locus	F_{IS}	F_{IT}	F_{ST}	Fluxo gênico (N_m)
CnCirA9	-0.823	-0.034	0.433	0.328
CnCirB6	0.935	0.978	0.666	0.125
CnCirB12	0.952	0.983	0.635	0.144
CnCirC3'	0.540	0.806	0.579	0.182
CnCirC7	1.000	1.000	0.527	0.224
CnCirC12	-0.928	-0.199	0.378	0.411
CnCirE2	0.688	0.862	0.558	0.198
CnCirE10	-	-	-	-
CnCirE12	-0.261	0.503	0.606	0.162
CnCirF2	-	1.000	1.000	-
CnCirG11	0.871	0.976	0.811	0.058
CnCirH4'	1.000	1.000	0.817	0.056
CnCirH7	-	1.000	1.000	-
CnCirH11	0.808	0.970	0.845	0.046
CnCirC5	0.186	0.786	0.738	0.089
Média	0.414	0.759	0.685	0.135

Além disso, a Análise de Variância Molecular (AMOVA) mostrou que a variação genética foi distribuída próximo da igualdade, apresentando 41% de variância entre as populações, e 59% de variância dentro de populações. Isto significa que há diversidade genética em nível significativo tanto dentro quanto entre as populações avaliadas. Esta tendência também foi descrita por Perera et al. (1998), Perera et al. (2001) e Noël et al. (2011), enquanto estudavam a diversidade genética de populações de coqueiro.

O dendrograma (Figura 1) apresenta cinco grupos, os quais foram formados obedecendo ao nível de relacionamento genético e de proximidade geográfica entre os acessos. Estudos anteriores reportaram esta mesma

tendência de agrupamento (Perera et al., 2003; Noël et al., 2007; Dasanayaka et al., 2009).

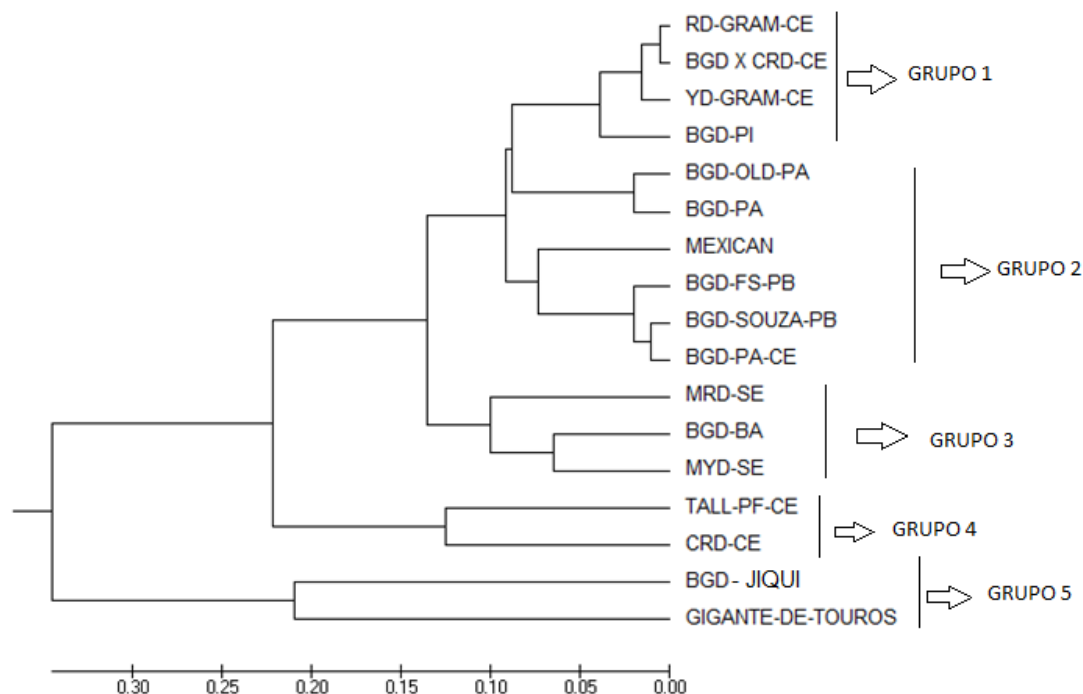


Fig.1 – Dendrograma apresentando o agrupamento das populações de coqueiro pelo método UPGMA.

Em relação às tendências ao agrupamento apresentadas acima, percebe-se que algumas populações de anões aparecem agrupadas com populações de Gigante, assim como anões, ainda que de frutos de cores distintas, apresentem-se agrupados. Uma justificativa para os comportamentos dos grupos apresentados no dendrograma deste estudo pode ser encontrada nos trabalhos de Perera et al. (2000) e Gunn et al. (2011).

Perera et al. (2000) afirmam que os coqueiros anões possivelmente evoluíram, durante um longo período de domesticação de uma pequena população de coqueiros gigantes, o que indica que este evento pode ser a razão não somente para os baixos níveis de diversidade genética em anões, bem como para o relacionamento genético entre acessos de origens e fenótipos distintos.

Gunn et al. (2011) afirmam que os coqueiros introduzidos na América Latina ao longo do tempo, em especial no Brasil, consistem de acessos do Grupo Indo-Atlântico, bem como acessos que sofreram alguma mistura gênica dos dois

grupos (Indo-Atlântico e Pacífico). Entretanto, considerando a diversidade genética dos acessos de coqueiro inicialmente introduzidos no Brasil, pode-se perceber que há uma tendência a menores níveis de diversidade genética do que em outras regiões a que são atribuídas o status de centros de origem do coqueiro, sobretudo, no Sudeste Asiático. Isto implica uma menor distância genética entre os acessos de coqueiro do Brasil e, conseqüentemente, um maior nível de relacionamento genético.

Portanto, a possível origem dos anões a partir de um pequeno grupo de gigantes, conforme apontado por Perera et al. (2000), juntamente com os resultados do trabalho de Gunn et al. (2011), tornam plausível o agrupamento de gigantes e anões, bem como o agrupamento de coqueiros com diferentes cores de frutos, principalmente em se tratando de germoplasma do coqueiro do Brasil.

A Análise de Coordenadas Principais corroboram os dados apresentados no dendrograma e exhibe graficamente as populações distribuídas, de acordo com o relacionamento genético e a proximidade geográfica (Figura 2). Meerow et al. (2003) e Dasanayaka et al. (2009) também reportaram resultados similares enquanto estudavam a diversidade genética de coqueiros usando microssatélites.

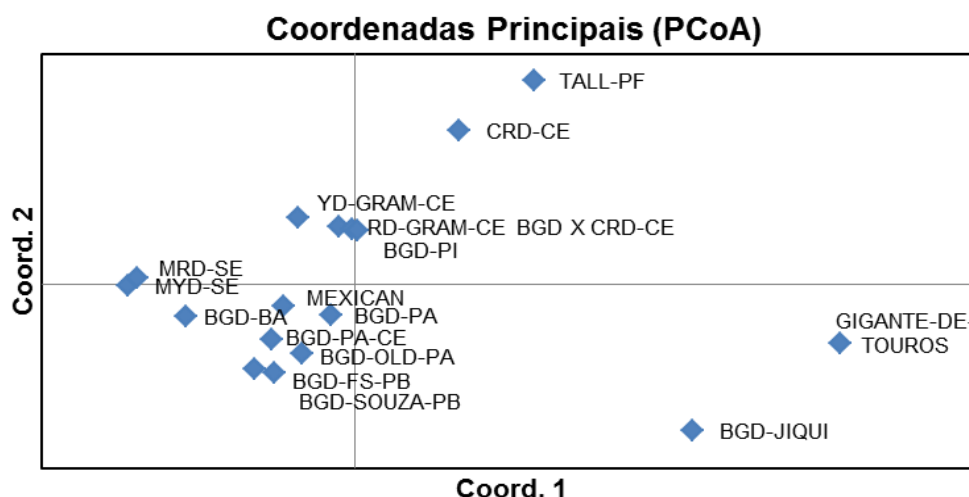


Fig. 2 – Gráfico Cartesiano resultante da Análise de Coordenadas Principais envolvendo todas as populações de coqueiro em estudo.

5.2. Aplicação de microssatélites para análise molecular da diversidade genética de populações de coqueiro Anão Verde do Brasil (*Cocos nucifera* L. var. *nana*).

Um total de 15, dentre os 17 *primers* microssatélites testados, mostrou-se efetivo. Os *loci* efetivos foram CnCirA9, CnCirB6, CnCirB12, CnCirC3', CnCirC7, CnCirC12, CnCirE2, CnCirE10, CnCirE12, CnCirF2, CnCirG11, CnCirH4', CnCirH7, CnCirH11 e CnCirC5, os quais foram responsáveis por gerar 34 alelos no total, apresentando uma média de 2.267 alelos por *locus*. Foram detectados três *loci* monomórficos, a saber: CnCirE10, CnCirH7 e CnCirC5. Em contrapartida, os *loci* detectados como os mais polimórficos foram: CnCirB12, CnCirC3', CnCirC12, CnCirE2, CnCirE12, CnCirH4', CnCirH11 (cada um com três alelos); e o *locus* menos polimórfico foi o CnCirF2, o qual apresentou dois alelos, sendo que um desses esteve presente em todas as populações, exceto na população BGD-Jiqui, que apresentou um alelo completamente distinto das demais populações. Em relação à diversidade genética (H_e), o *locus* que apresentou o maior valor foi CnCirC12 (média = 0.5); e o valor mais baixo foi exibido pelos *loci* CnCirE10, CnCirF2, CnCirH7 e CnCirC5 ($H_e = 0$). O número de alelos efetivos variou de 1.0 (CnCirE10, CnCirF2, CnCirH7 e CnCirC5) a 2.015 (CnCirC12), com um valor médio de 1.215 (Tabela 6).

Em acréscimo, a Heterozigosidade esperada ou diversidade genética (H_e), Índice de Shannon (I) e Porcentagem de *loci* polimórficos em população (%P) foram estimados para todas as populações avaliadas (Tabela 7).

A diversidade genética variou de 0.052 (BGD-BA) a 0.275 (BGD-PA) com uma média de 0.128, indicando uma baixa diversidade genética. O Índice de Shannon, o qual também é uma estimativa de diversidade, variou de 0.082 (BGD-BA) a 0.405 (BGD-PA) com uma média de 0.190, indicando baixa diversidade genética dos acessos. Por fim, em contraponto, a porcentagem de *loci* polimórficos em populações variou de 13.33 % (BGD-SOUZA-PB) a 60.0% (BGD-PA) com uma média de 31.67%, indicando que coexistem populações com baixo nível de diversidade e outras com nível moderado de diversidade.

Tabela 6. *Locus*, tamanho do alelo, número de alelos (Na), número de alelos efetivos por *locus* (Ne) e diversidade genética (He).

Locus	Tamanho do Alelo (pb)	Na	Ne	He
CnCirA9	100-150	2	1.017	0.015
CnCirB6	200-225	2	1.118	0.138
CnCirB12	175-225	3	1.277	0.171
CnCirC3'	175-225	3	1.261	0.224
CnCirC7	200-225	2	1.247	0.124
CnCirC12	175-225	3	2.015	0.500
CnCirE2	125-175	3	1.472	0.276
CnCirE10	300	1	1.000	0.000
CnCirE12	190-210	3	1.242	0.135
CnCirF2	180-250	2	1.000	0.000
CnCirG11	200-250	2	1.130	0.073
CnCirH4'	250-300	3	1.216	0.115
CnCirH7	160	1	1.000	0.000
CnCirH11	200-300	3	1.233	0.143
CnCirC5	150	1	1.000	0.000
Total	-	34	-	-
Média	-	2.267	1.215	0.128

Tabela 7. Diversidade Genética (He), Índice de Shannon (I) e Porcentagem de *loci* polimórficos em populações (%P) de cada população de coqueiro Anão Verde do Brasil (AVB ou BGD).

Acessos	He	I	%P
BGD-SOUZA-PB	0.061	0.087	13.33
BGD-FS-PB	0.097	0.136	20.00
BGD-PA-CE	0.124	0.196	26.67
BGD-PI	0.241	0.351	53.33
BGD-BA	0.052	0.082	20.00
BGD-OLD-PA	0.096	0.156	40.00
BGD-PA	0.275	0.405	60.00
BGD-Jiqui-RN	0.074	0.108	20.00
MÉDIA	0.128	0.190	31.67

Nos últimos anos, a aplicação de microssatélites, em estudos de diversidade genética, indicou baixos valores de Heterozigosidade esperada ou diversidade genética (He) para populações de coqueiro Anão em comparação

com populações de Gigante. Os resultados deste estudo, em relação ao valor médio de diversidade genética do coqueiro Anão (0.128), corroboram as informações reportadas por estudos prévios que também usaram microsatélites, a saber, o valor médio de 0.348 observado por Perera et al. (2000), o valor médio de 0.374 encontrado por Perera et al. (2003), o valor médio de 0.222 descrito por Meerow et al. (2003), o valor médio 0.198 detectado por Noël et al. (2007), o valor médio de 0.04 apresentado por Rajesh et al. (2008), o valor médio de 0.21 reportado por Dasanayaka et al. (2009) e o valor médio de 0.218 notado por Noël et al. (2011).

O sistema de cruzamento de populações de coqueiro Anão reforça as informações apresentadas acima. A endogamia predominante apresentada pelos coqueiros anões (Harries, 1978) os conduziu a baixos níveis de heterozigosidade quando comparados aos das populações de Gigante. Conseqüentemente, baixa heterozigosidade é relacionada a baixo nível de diversidade genética.

Apesar da baixa diversidade genética observada quanto aos valores de heterozigosidade esperada, os índices da estatística F, o fluxo gênico, a Análise de Coordenadas Principais (PCoA) e a Análise de agrupamento indicaram moderada diversidade genética entre os acessos.

Os índices pareados de diferença genética (F_{ST}), também chamados índices de fixação (Rajesh et al., 2008), de acordo com Noël et al. (2011), correspondem a uma estimativa de diferenciação entre e dentro de populações, e variaram de 0.055 a 1.0, com uma média de 0.522. Tais resultados refletem um nível moderado de diferenciação das populações (Tabela 8).

Conforme Hernan (2009), os valores de F_{ST} podem variar de 0 (não diferenciação) a 1 (completa diferenciação) entre um grupo específico e os subgrupos derivados dele. Noël et al. (2011) concluem que, quando os valores de F_{ST} são maiores do que 0, é o suficiente para considerar os acessos como diferentes. Portanto, de acordo com o valor médio de F_{ST} de 0.42, reportado por Rajesh et al. (2008), e o valor médio de 0.463, obtido por Noël et al. (2011), os acessos avaliados no presente estudo podem ser considerados geneticamente diferentes de um nível moderado a elevado e, conseqüentemente, tal informação destaca a ocorrência de diversidade genética entre eles.

Tabela 8. F-statistics (Wright, 1951): coeficiente de endogamia ou índice de diferenciação entre indivíduos de uma população/subpopulação (F_{IS}), grau de diferenciação genética entre e dentro das populações e a diferenciação total (F_{IT}), grau de diferenciação total entre indivíduos ou subpopulações (F_{ST}) e Fluxo Gênico (N_m) para os 15 *loci* de microssatélites.

Locus	F_{IS}	F_{IT}	F_{ST}	Fluxo gênico (N_m)
CnCirA9	-0.067	-0.008	0.055	4.286
CnCirB6	1.000	1.000	0.677	0.119
CnCirB12	1.000	1.000	0.199	1.007
CnCirC3'	0.604	0.876	0.688	0.113
CnCirC7	1.000	1.000	0.403	0.370
CnCirC12	-0.874	-0.586	0.154	1.377
CnCirE2	1.000	1.000	0.469	0.283
CnCirE10	-	-	-	-
CnCirE12	-0.655	-0.092	0.340	0.485
CnCirF2	-	1.000	1.000	0
CnCirG11	0.810	0.968	0.831	0.051
CnCirH4'	1.000	1.000	0.683	0.116
CnCirH7	-	-	-	-
CnCirH11	1.000	1.000	0.767	0.076
CnCirC5	-	-	-	-
Média	0.529	0.680	0.522	0.552

Em adição, o valor médio de fluxo gênico (N_m), apresentado pelo presente estudo (0.552), é maior do que o valor médio encontrado por Rajesh et al. (2008) ($N_m = 0.37$). Assim, diferentemente das conclusões de Rajesh et al. (2008) acerca do valor de fluxo gênico e sua ação colaborativa para a diferenciação gênica (F_{st}), o valor médio apresentado neste trabalho (0.552) pode ser considerado suficiente para significativa divergência das populações. Tal valor de fluxo gênico é plausível se considerarmos o fato de que os coqueiros anões são aptos a realizarem polinização cruzada (Whitehead, 1965).

Além disso, a Análise de Variância Molecular (AMOVA) mostrou que a variação genética foi distribuída próximo da igualdade, apresentando 38% de variância entre populações e 62% de variância dentro de populações. Este comportamento também foi apresentado por Perera et al. (1998), Perera et al. (2001) e Noël et al. (2011).

O dendrograma (Figura 3) apresenta quatro grupos, os quais foram formados obedecendo ao nível de relacionamento genético e de proximidade geográfica entre acessos. Estudos anteriores reportaram esta mesma tendência

de agrupamento. Em relação ao agrupamento quanto ao relacionamento genético entre os acessos, conforme apresentado anteriormente, Perera et al. (2000) afirmam que os coqueiros anões possivelmente evoluíram durante um longo período de domesticação de uma pequena população de coqueiros gigantes, e apontam que esta pode ser a razão dos baixos níveis de diversidade genética observados em anões e seu decorrente nível de relacionamento genético.

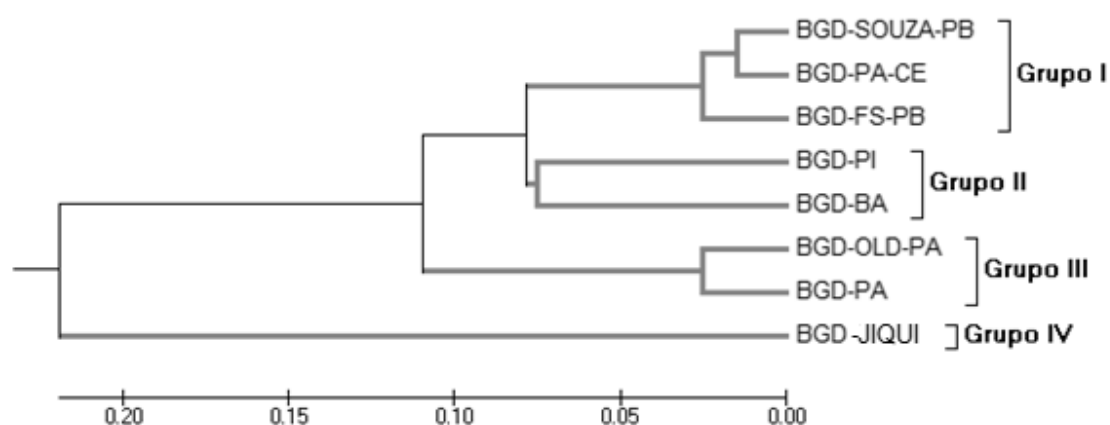


Fig.3 – Dendrograma apresentando o agrupamento das Populações de coqueiro Anão Verde do Brasil pelo método UPGMA.

Além disso, no que diz respeito à proximidade geográfica, o dendrograma exhibe as populações oriundas do extremo nordeste brasileiro (BGD-FS-PB, BGD-SOUZA-PB, BGD-PA-CE, BGD-PI e BGD-BA), agrupando-as, assim como as populações do norte do Brasil (BGD-OLD-PA and BGD-PA); por fim, a população BGD-JIQUI agrupou-se separadamente de todas as demais populações em estudo, isto porque esta população é tida como derivada do germoplasma de coqueiro Anão Verde originalmente introduzido no Brasil na década de 1920 (Ribeiro et al., 2010). Anteriormente, alguns estudos também reportaram a tendência de agrupamento de acessos de coqueiro Anão de acordo com a proximidade geográfica (Perera et al., 2003; Noël et al., 2007; Dasanayaka et al., 2009).

A Análise de Coordenadas Principais corroboram os dados apresentados no dendrograma, e exhibe graficamente as populações distribuídas de acordo com o relacionamento genético e à proximidade geográfica (Figura 4). Meerow et al.

(2003) e Dasanayaka et al. (2009) também reportaram resultados similares, enquanto estudavam a diversidade genética de coqueiros anões usando microssatélites.

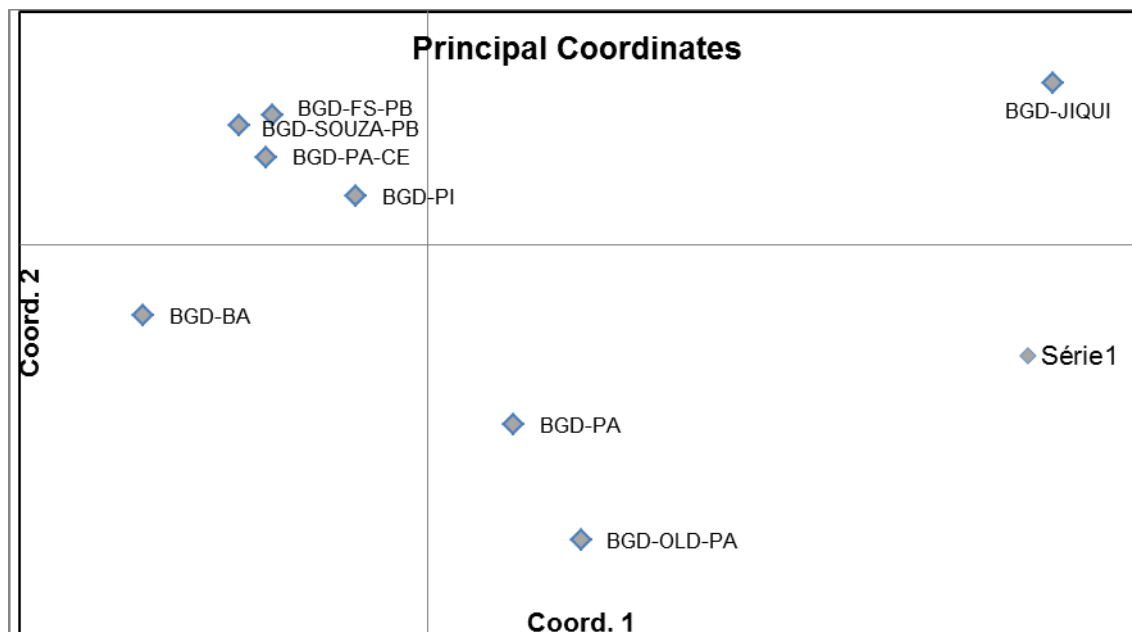


Fig. 4 - Gráfico Cartesiano resultante da Análise de Coordenadas Principais envolvendo todas as populações de coqueiro em estudo.

Portanto, é importante perceber que as Análises de Agrupamento e PCoA, bem como as Análises de Variância Molecular e F_{st} , indicam que há uma significativa diversidade genética entre e dentro das populações de Anão Verde do Brasil (AVB ou BGD).

Em adição, este trabalho permite indicar, com base nos valores apresentados pelos diferentes índices genéticos (H_e , I e $\%P$) e nas demais análises (F_{ST} , PCoA e Agrupamento), as seguintes populações como potenciais parentais para futuras hibridações: Anão Verde do Brasil do Pará e Anão Verde do Brasil de Picos. Ainda sugere que um híbrido, resultante do cruzamento entre indivíduos dessas duas populações, pode apresentar uma performance tão ou mais promissora do que em hibridações onde o AVeBrJ é usado como receptor de pólen.

Todavia, ressalta-se que estudos envolvendo a tomada de dados sobre caracteres agrônômicos destas populações devem ser conduzidos para que possa ser testado em que nível os dados moleculares de diversidade corroboram

os dados de campo, sobretudo, no que tange à produção e à qualidade dos frutos produzidos.

Somente, após esta análise comparada de dados será possível recomendar com precisão materiais genéticos para serem genitores em combinações híbridas Anão Verde x Anão.

6. CONCLUSÃO

Com este trabalho, foi possível delinear um perfil da diversidade genética de acessos de coqueiro pertencentes a distintas variedades e oriundos de diversas regiões produtoras do Brasil.

A maior porção da diversidade genética é encontrada dentro das populações *per se* e, principalmente, a maior parte da diversidade compreende as populações de coqueiro Anão Verde do Brasil (AVB ou a sigla internacional BGD), com destaque para as populações BGD-PA (Anão Verde do Brasil do Pará) e BGD-PI (Anão Verde do Brasil de Picos-PI).

Há anos tem sido discutido se existe diversidade genética entre e dentro de populações de coqueiro Anão Verde do Brasil (AVB). Como nunca antes, fez-se um levantamento da diversidade genética de tantas amostras de populações de AVB.

Previamente a este estudo, alguns dados não publicados indicavam que o AVB não possuía significativa diversidade genética, tanto devido ao seu comportamento reprodutivo quanto à origem deste germoplasma e à forma de sua introdução no Brasil. Entretanto, apesar de todas as expectativas, este estudo vem apresentar evidências de que existe diversidade genética em nível significativo, a ponto de possibilitar, em combinação com dados agrônômicos, a seleção de indivíduos ou populações a serem usados como parentais para o desenvolvimento de futuros híbridos AVBX AVB.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akkaya, M.S., Bhagwat, A.A., Cregan, P.B. (1992) Length polymorphisms of simple sequence repeat DNA in soybean. *Genetics* 132(4): 1131–1139.
- Amaral Júnior, A.T., Viana, A.P., Gonçalves, L.S.A., Barbosa, C.D. (2010). Procedimentos multivariados em recursos genéticos vegetais. *In: Pereira, T.N.S. (ed) Germoplasma: conservação, manejo e uso no melhoramento de plantas*. 1ª Edição. Viçosa, MG: Arka, 254p.
- Aragão, W.M., Ribeiro, M.F.V. (2009) Cultivares de coqueiro para a produção de coco seco: coqueiro Gigante vs híbridos. *In: Cintra, F.L.D., Fontes, H.R., Passos, E.E.M., Ferreira, J.M.S. (Ed.). Fundamentos tecnológicos para a revitalização das áreas cultivadas com coqueiro gigante no nordeste do Brasil*. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 37-60p.
- Arunachalam, V. and Rajesh, M.K. (2008) Breeding of coconut palm (*Cocos nucifera* L.). *CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources* 53: 1-12.
- Ashburner, G.R., Thompson, W.K., Halloran, G.M. and Foale, M.A. (1997) Fruit component analysis of south Pacific coconut palm populations. *Genetic Resources and Crop Evolution* 44: 327–335.
- 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.
- Batugal, P. e Bourdeix, R. (2005) Conventional Coconut Breeding. *In: Batugal, P., Rao, V.R., Oliver, J. (eds) Coconut Genetic Resources. International Plant Genetic Resources Institute – Regional Office for Asia, the Pacific and Oceania (IPGRI-APO)*. Serdang, Selangor DE, Malaysia, 1-10p.

- Baudouin, L. (2009). Consolidate microsatellite data on coconut diversity. CIRAD – Montpellier, França.
- Baudouin, L. and Lebrun, P. (2002) The development of a microsatellite kit and dedicated software for use with coconuts. *Biotrop. Bull.* 17: 16-20.
- Bourdeix, R., Konan, J.L., N'Cho, Y.P. (2005) Coconut – A guide to traditional and improved varieties. Editions Diversiflora.104p.
- Costa, R.S.C., Nascente, A.S., Ribeiro, G.D., Ferreira, M.G.R. (2005) Cultivo do Coqueiro em Rondônia. Ed. Téc. NASCENTE, A.S. EMBRAPA Rondônia. Versão Eletrônica: ISSN 1807-1805. Porto Velho, Rondônia.
- Dasanayaka, P.N., Everard, J.M.D.T., Karunanayaka, E.H., Nandadasa, H.G. (2009) Analysis of coconut (*Cocos nucifera* L.) diversity using microsatellite markers with emphasis on management and utilisation of genetic resources. *J. Natn. Sci. Foundation Sri Lanka* 37(2): 99-109.
- Doyle, J.J. e Doyle, J.L. (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13-15.
- Foale, M. (2005) An Introduction to coconut palm. *In: Batugal, P., Rao, V.R., Oliver, J. (eds) Coconut Genetic Resources. International Plant Genetic Resources Institute – Regional Office for Asia, the Pacific and Oceania (IPGRI-APO). Serdang, Selangor DE, Malaysia, 1-10 p.*
- Fontes, H.R., Ferreira, J.M.S., Siqueira, L.A. EDITORES (2002). Sistema de produção para a cultura do coqueiro. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros.: <http://www.cpatc.embrapa.br> em 09/2013 página mantida pela Embrapa Tabuleiros Costeiros.
- Fuller, D. (2007) Non-human genetics, agricultural origins and historical linguistics in South Asia. *In: Petraglia MD, Allchin B, eds. The evolution and history of human populations in South Asia. Dordrecht, The Netherlands: Springer. 393–443.*
- Garayalde, A.F., Poverene, M., Cantamutto, M., Carrera, A.D. (2011) Wild sunflower diversity in Argentina revealed by ISSR and SSR markers: an approach for conservation and breeding programmes. *Annals of Applied Biology* 318: 305–317.
- Gower, J.C. (1966) Some distance properties of latent root and vector methods used in multivariate analysis. *Biometrika* 53: 325-38.
- Gunn, B.F., Baudouin, L., Olsen, K.M. (2011). Independent Origins of Cultivated Coconut (*Cocos nucifera* L.) in The Old World Tropics. *PLoS ONE* 6(6): 1 - 8. doi:10.1371/journal.pone.0021143.
- Harries, H.C. (1978) The evolution, dissemination and classification of *Cocos nucifera*. L. *Bot Rev* 44: 265–319.

- Harries, H.C., Baudouin, L., Cardena, R. (2004) Floating, boating and introgression: Molecular techniques and ancestry of the coconut palm populations on Pacific islands. *Ethnobot Res and App* 2: 37–53.
- Hernan, L. (2009) Data analysis for molecular characterization of plant genetic resources. *Genet. Resour. Crop. Ev.* 56: 277-292.
- Holanda, J.S., Oliveira, M.T., Sobrinho, E.E., Dantas, T.B. (2007). *Tecnologias para produção intensiva de coco anão*. Natal: EMPARN, 2007. 40p.: (Boletim de Pesquisa, n. 34).
- Holanda, J.S., Alves, M.C.S., Chagas, M.C.M. (2008). *Cultivo do coqueiro no Rio Grande do Norte*. Natal, RN: EMPARN, 2008. 27p. – (sistemas de produção; 1).
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2013). *Levantamento Sistemático da Produção Agrícola*. Rio de Janeiro v.25, n.12, p. 1-84: ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola 11/2013 página mantida por IBGE.
- Kumar, M., Mishra, G.P., SINGH, R., Kumar, J., Naik, P.K., Singh, S.B. (2009) Correspondence of ISSR and RAPD markers for comparative analysis of genetic diversity among different apricot genotypes from cold arid deserts of trans-Himalayas. *Physiol. Mol. Biol. Plants* 15(3): 225 – 236.
- Lebrun, P., Berguer, A., Hodgkin, T., Baudouin, L. (2005) Biochemical and Molecular Methods for Characterizing Coconut Diversity. *In: Batugal, P., Rao, V.R., Oliver, J. (eds) Coconut Genetic Resources. International Plant Genetic Resources Institute – Regional Office for Asia, the Pacific and Oceania (IPGRI-APO)*. Serdang, Selangor DE, Malaysia, p. 225-247.
- Liyanage, D.V. (1949) Preliminary studies on the floral biology of the coconut palm. *Trop. Agric.* 105: 171-175.
- Liyanage, D.V. (1950) Sex life of the coconut palm. *Ceylon Coconut Quaterly*. 2: 33-3.
- Liyanage, D.V. (1958) Varieties and forms of the coconut palm grown in Ceylon. *Ceylon Coconut Quarterly* 9: 1–10.
- Martinez, R.T., Baudouin, L., Berger, A., Dolle, M. 2010. Characterization of the genetic diversity of the Tall coconut (*Cocos nucifera* L.) in the Dominican Republic using microsatellite (SSR) markers. *Tree Genetics & Genomes* 6: 73–81.
- Martins, C.R. *Evolução da produção de coco no Brasil e o comércio internacional: panorama 2010* / Carlos Roberto Martins, Luciano Alves de Jesus Júnior – Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2011. 28p. il.; color. (Documentos / Embrapa Tabuleiros Costeiros, ISSN 1517-1329; 164): http://www.cpatc.embrapa.br/publicacoes_2011/doc_164.pdf em 02/2013 página mantida pela EMBRAPA.

- Menon, K.P., Pandalai, K.M. (1958) The coconut palm, a monograph. Kerala, South India: Indian Central Coconut Committee. 384p.
- Meerow, A.W., Wisser, R.J., Brown, J.S., Kuhn, D.N., Schnell, R.J. and Broschat, T.K. (2003) Analysis of genetic diversity and population structure within Florida coconut (*Cocos nucifera* L.) germplasm using microsatellite DNA, with special emphasis on the Fiji Dwarf cultivar. *Theor. Appl. Genet.* 106: 715-726.
- Milach, S.C.K. (1998). Marcadores moleculares em plantas. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, RS: 17–28p.
- Nambiar, M.C., Swaminathan, M.S. (1960) Chromosome morphology, microsporogenesis and pollen fertility in some varieties of coconut. *Indian J Genet Plant Breed* 20: 200–211.
- Nöel, K.K.J., Louïs, K.K.J., Edmond, K.K., Lebrun, P. and Abdourahamane, S. (2007) Coconut microsatellite gene diversity analysis technology transfer to Côte D'Ivoire. *Biotechnology* 6(3): 383-388.
- Nöel, K.K.J., Edmond, K.K., Louïs, K.K.J. e Eugene, K.K. (2011) Microsatellite gene diversity within Philippines dwarf coconut palm (*Cocos nucifera* L.) resources at Port Bouët, Côte d'Ivoire. *Scientific Research and Essays* 6 (28): 5986-5992.
- Passos, E.E.M. Ecofisiologia do Coqueiro. *In: Ferreira, J. M. S.; Warwick, D. R. N.; Siqueira, L. A. A cultura do coqueiro no Brasil. 2º Edição. Brasília: Spi, 1998. 65-71p.*
- Peakall, R. e Smouse, P.E. (2012) GenAIEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research- an update. *Bioinformatics* 28: 2537-2539.
- Perera, L., Russell, J.R., Provan, J. and Powell, W. (1999) Identification and characterization of microsatellites in coconut (*Cocos nucifera* L.) and the analysis of coconut populations in Sri Lanka. *Mol Ecol* 8: 344–346.
- Perera, L., Russell, J.R., Provan, J. and Powell, W. (2000) Use of microsatellite DNA markers to investigate the level of genetic diversity and population genetic structure of coconut (*Cocos nucifera* L.). *Genome* 43:15-21.
- Perera, L., Russel, J.R., Provan, J. and Powell, W. (2001) Levels and distribution of genetic dversity of coconut (*Cocos nucifera* L., var. *Typica form typica*) from Srio Lanka assessed by microsatellite markers. *Euphytica*, 122: 381-389.
- Perera, L., Russell, J.R., Provan, J. and Powell, W. (2003) Studying genetic relationships among coconut varieties/populations using microsatellite markers. *Euphytica* 132: 121-128.
- Persley, G.J. (1992) Replanting the Tree of Life: Toward an International Agenda for Coconut Palm Research. CAB/ACIAR, Wallingford, 156p.

- Purseglove, J.W. (1975) Tropical crops monocotyledons. Longmans, London.
- Rajesh, M.K., Arunachalam, V., Nagarajan, P., Lebrun, P., Samsudeen, K. and Thamban, C. (2008) Genetic survey of 10 Indian coconut landraces by simple sequence repeats (SSRs). *Scientia Horticulturae* 118: 282-287.
- 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): 696-702.
- Rivera, R., Edwards, K.J., Barker, J.H.A., Arnold, G.M., Ayad, G., Hodgkin, T., Karp, A. (1999) Isolation and characterization of polymorphic microsatellites in *Cocos nucifera* L. *Genome* 42: 668-675.
- Santos, G.A., Batugal, P.A., Othman, A., Baudouin, L. and Labouisse, J.P. (eds) (1995) Manual on Standardized Research Techniques In Coconut Breeding. IPGRI – International Plant Genetic Resources Institute and COGENT – Coconut Genetic Resources Network. 105p.
- Shuster, I. (2011) Marker-assisted selection for quantitative traits. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*. S1: 50–55.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Masatoshi, N., Kumar, S. (2011) MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol. Biol. Evol.* 28(10): 2731–2739.
- Teulat, B., Aldam, C., Trehin, R., Lebrun, P., Barker, J.H.A., Arnold, G.M., Karp, A., Baudouin, L., Rognon, F. (2000) Analysis of genetic diversity in coconut (*Cocos nucifera* L.) populations from across the geographic range using sequence-tagged microsatellites (SSRs) And RFLPs. *Theoretical Applied Genetics* 100: 764-771.
- Tripathi, R.P., Mishra, S.N., Sharma, B.D. (1999) *Cocos nucifera*-like petrified fruit from the Tertiary of Amarkantak, M.P., India. *Paleobotanist* 48: 251–255.
- United Nations Conference on Trade and Development (UNCTAD), 2013.
- Yao, S.D.M., Konan, K.J.L., Pokou, N'Da D., Konan, K.J.N., Issali, A.E., Sie, R.S. and Zoro, B.I.A. (2013) Assessment of the genetic diversity conservation in three tall coconut (*Cocos nucifera* L.) accessions regenerated by controlled pollination, using microsatellite markers. *African Journal of Biotechnology* ,12(20), 2808-2815. DOI: 10.5897/AJB11.3608.
- Zizumbo-Villarreal, D. and Marín, P.C.G. (2001) Morpho-physiological variation and phenotypic plasticity in Mexican populations of coconut (*Cocos nucifera* L.). *Genetic Resources and Crop Evolution* 48: 547–554.
- Zizumbo-Villarreal, D., Fernández-Barrera, M., Torres-Hernández, N. and Marín, P.C.G. (2005) Morphological variation of fruit in Mexican populations of *Cocos*

nucifera L. (Arecaceae) under in situ and ex situ conditions. *Genetic Resources and Crop Evolution* 52: 421–434.

Wright, S. (1951) The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics* 15: 323-354.

Whitehead, R.A. (1965) Flowering in *Cocos nucifera* L. *In: Jamaica. Tropical Agriculture* .Trinidad 42: 19-29p.