

LEGITIMIDADE DE HÍBRIDOS INTRAVARIETAIS DE COQUEIRO
ANÃO VIA DNA FINGERPRINT

ALINNE OLIVEIRA NUNES AZEVEDO

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO – UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
MARÇO – 2015

LEGITIMIDADE DE HÍBRIDOS INTRAVARIETAIS DE COQUEIRO
ANÃO VIA DNA FINGERPRINT

ALINNE OLIVEIRA NUNES 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
MARÇO – 2015

LEGITIMIDADE DE HÍBRIDOS INTRAVARIETAIS DE COQUEIRO
ANÃO VIA DNA FINGERPRINT

ALINNE OLIVEIRA NUNES 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”

Aprovada em 30 de março de 2015

Comissão Examinadora:

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

Prof^a. Helaine Christine Cancela Ramos (D.Sc. Genética e Melhoramento de Plantas) – UENF

Prof. Gonçalo Apolinário de Souza Filho (D.Sc. Biociências e Biotecnologia)
UENF

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

A Deus; ao meu esposo, Carlos Diego; e a minha família por acreditar em mim e me apoiar para que tudo acontecesse.

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus, primeiramente, pois sem Ele nada teria sido possível. Foi Ele quem me deu força, iluminou meus caminhos me ajudando a prosseguir mesmo quando tudo parecia impossível.

À Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro e ao Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, pela formação acadêmica que, me fará ultrapassar inúmeras fronteiras no campo profissional.

A Capes e a FAPERJ pelo financiamento do projeto de pesquisa que resultou neste trabalho.

Aos meus pais, por todo amor, carinho, dedicação, paciência e por me ensinarem todos os princípios e valores da vida. Obrigada também por toda compreensão nos momentos em que estive ausente sempre me dando força para que eu não desistisse dos meus sonhos.

Aos meus irmãos Arthur, Alex e Alessandra e a toda a minha família paterna e materna por acreditarem em mim e me proporcionarem sempre os melhores momentos quando estamos juntos. A torcida de vocês foi fundamental.

Ao meu esposo Carlos Diego, que foi enviado por Deus para chegar à minha vida no momento certo. Agradeço pela paciência, companheirismo, compreensão, pelos conselhos, pelos ensinamentos, e pela parceria fora e dentro do mundo acadêmico. Obrigada por sempre me ajudar com todo seu amor,

carinho e dedicação, sempre dando o seu melhor. Sem você, tudo seria muito mais difícil.

Ao meu orientador, Messias Gonzaga Pereira, muito obrigada por ter acreditado em mim, por estar sempre disponível, pela troca de experiência e aprendizado.

Às minhas conselheiras Prof^a Telma Nair Santana Pereira e Prof^a Helaine Christine Cancela Ramos e aos demais professores do programa por toda atenção, disponibilidade e pelos conhecimentos transmitidos.

Às técnicas Marcela Boechat e Vitória pelos conhecimentos teóricos e práticos transmitidos, e por todo suporte na execução dos meus experimentos. Vocês foram dois anjos na minha vida. À Marcela Boechat e à Pós-doutoranda Fernanda Santana em especial, por sempre estarem disponíveis para me aconselhar mesmo quando os assuntos não eram acadêmicos. Além de ajudadoras, grandes amigas que jamais esquecerei.

Aos meus amigos do LMGV, muito obrigada por todo apoio, pela ajuda, pelos ensinamentos e pelos ótimos momentos que passei ao lado de vocês mesmo apesar de tanto trabalho ou da correria da vida acadêmica. Optei por não citar nomes para não esquecer ninguém, mas todos sempre ficarão guardados com muito carinho no meu coração.

SUMÁRIO

RESUMO _____	vii
ABSTRACT _____	ix
1. INTRODUÇÃO _____	1
2. OBJETIVOS _____	4
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA _____	5
3.1. Importância Socioeconômica da cultura do coco _____	5
3.2. Origem e Distribuição do Coqueiro _____	7
3.3. Aspectos Botânicos e Fisiológicos do Coqueiro _____	8
3.4. Coqueiro Anão _____	9
3.4.1. Anão Verde do Brasil _____	10
3.4.2. Anão Amarelo da Malásia e de Gramame _____	11
3.4.3. Anão Vermelho Malásia e de Gramame _____	11
3.4.4. Anão Vermelho de Camarões _____	12
3.4.5. Herança da cor do fruto em coqueiro anão _____	12
3.5. Recursos Genéticos e Bancos de Germoplasma _____	14
3.6. Variabilidade Genética _____	15
3.7. Melhoramento Genético do Coqueiro _____	16
3.7.1. Métodos de Melhoramento _____	17
3.7.2. Estratégias de Melhoramento _____	17

3.8. Importância do DNA Fingerprint no melhoramento do coqueiro	18
4. MATERIAIS E MÉTODOS	21
4.1. Material Genético	21
4.2. Identificação dos marcadores para avaliar a pureza genética de sementes híbridas	23
4.3. Extração de DNA	24
4.4. Reações de amplificação de DNA	24
4.5. Eletroforese	26
4.6. Análise dos Dados	27
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
5.1. Triagem em Bulks	28
5.2. Validação planta a planta	36
6. CONCLUSÃO	39
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40

RESUMO

AZEVEDO, Alinne Oliveira Nunes; M.Sc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; Março de 2015; LEGITIMIDADE DE HÍBRIDOS INTRAVARIETAIS DE COQUEIRO ANÃO VIA DNA FINGERPRINT; Orientador: Prof. Messias Gonzaga Pereira; Conselheiros: Prof^a. Telma Nair Santana Pereira e Prof^a. Helaine Christine Cancela Ramos.

Diante da vasta importância econômica do coqueiro anão para o Brasil e do desenvolvimento de um programa de melhoramento do coqueiro que visa à produção de híbridos intravarietais de coqueiro anão. Este trabalho tem por objetivos principais: viabilizar a produção de híbridos de mesma herança morfológica; identificar marcadores SSR que permitam o reconhecimento de híbridos intravarietais de coqueiro anão puros para fins experimentais e comerciais; obter *DNA Fingerpringing* via marcadores SSR das populações de coqueiro anão estudadas e verificar a legitimidade de sementes híbridos de coqueiro anão a partir das marcas identificadas. Para tanto foram coletadas aproximadamente 20 amostras de folhas de 13 populações de coqueiro anão para extração de DNA e reações de amplificação utilizando 57 pares de *primers* microssatélites previamente selecionados. A identificação dos marcadores foi dividida em duas etapas: triagem em bulk e validação planta a planta nos genitores. A primeira etapa consistiu na utilização dos 57 *primers* selecionados e um bulk de cada população parental contendo amostras foliares dos 20 genótipos de cada uma delas. Foram identificados 27 *primers* que apresentaram polimorfismo entre as populações, dentre eles: 7 locos SSR com alelos

específicos para a variedade amarela, 9 locos SSR com alelos específicos para a variedade vermelha e 3 locos SSR com alelos específicos para a variedade verde. Esta informação é respaldada pelo dendrograma que resultou na diferenciação de quatro grupos distintos, de acordo com as cores características das variedades. Também foi possível eleger 10 pares de *primers* potenciais para identificar os híbridos Anão Verde x Anão Amarelo e 13 pares de *primers* potenciais para identificar os híbridos Anão Vermelho x Anão Amarelo já que estes não são passíveis de serem identificados morfológicamente quando o Anão Amarelo não é o genitor feminino. A segunda etapa consistiu em verificar se as marcas identificadas na etapa anterior estavam fixadas nos 20 genótipos de cada população. Para a combinação Anão Verde x Anão Amarelo, somente um *primer* apresentou marcas fixadas nas populações. Portanto, presume-se que por meio da técnica de *DNA Fingerprint* e das marcas detectadas será possível identificar sementes puras advindas de híbridos intravarietais (verde x amarelo e verde x vermelho) de forma precisa e segura, visto que para alguns cruzamentos a metodologia de identificação conforme a coloração da planta jovem não é uma alternativa viável. Especificamente no caso do cruzamento entre o Anão Verde *versus* Amarelo, utilizando o Verde como genitor feminino, a genotipagem molecular é a única alternativa viável. Por outro lado, até o momento marcas específicas para diferenciar cruzamentos intravarietais como verde x verde ainda não foram identificadas.

ABSTRACT

AZEVEDO, Alinne Oliveira Nunes; M.Sc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; Março de 2015; LEGITIMIDADE DE HÍBRIDOS INTRAVARIETAIS DE COQUEIRO ANÃO VIA DNA FINGERPRINT; Advisor: Prof. Messias Gonzaga Pereira; Conselheiros: Prof^a. Telma Nair Santana Pereira and Prof^a. Helaine Christine Cancela Ramos.

In face of the great economic importance of dwarf coconut for Brazil and the development of a breeding program of coconut that aims the production of intravarietal hybrids of dwarf coconut, the present work presents as main objectives: to permit the production of hybrids with the same morphological heritage; to identify SSR markers that permit to recognize pure intravarietal hybrids of dwarf coconut for experimental e commercial purposes; to obtain DNA fingerprinting via SSR markers of the dwarf coconut populations under study; and to verify the legitimacy of hybrid seeds of dwarf coconut from the identified markers. Thus, 20 leaf samples of 13 dwarf coconut populations were collected in order to extract DNA and amplification reactions using 57 microsatellite primer pairs that were previously selected. The identification of markers was divided in two steps: screening in Bulk and plant to plant validation of genitors. The first step consisted of using the 57 selected primers and a Bulk of each parental population which contained leaf samples from all 20 genotypes of each population. 27 primers were detected because they presented polymorphisms between populations, 7 out of the 27 loci presented specific alleles for the yellow dwarf variety, 9 out of the 27 loci presented specific alleles for the red dwarf variety and

3 out of the 27 loci presented specific alleles for the green dwarf variety. Such data corroborates the dendrogram which presented differentiation of four distinct groups regarding the characteristic color of the varieties. It was also possible to elect 10 primer pairs with potential to identify hybrids Green Dwarf x Yellow Dwarf and 13 primer pairs with potential to identify hybrids Red Dwarf x Yellow Dwarf, considering that those hybrids cannot be morphologically identified when the Yellow Dwarf is not the female genitor. The second step consisted of verifying if the identified markers during the last step were fixed in all 20 genotypes of each population. For the combination Green Dwarf x Yellow Dwarf, only one primer presented fixed markers in the populations. Therefore, It can be concluded that due to DNA Fingerprint and selected markers it will be possible to identify pure seeds from intravarietal hybrids (Green x Yellow and Green x Red) in a precise and safe form, because for some crosses the methodology of identification according to seedling color is not a viable alternative. Specifically, regarding the crossing between Green Dwarf x Yellow Dwarf, using green dwarf as female genitor, the molecular genotyping is the only viable alternative. In the other hand, nowadays, there are no specific markers that are able to differentiate intravarietal crossings as green x green.

1. INTRODUÇÃO

O coqueiro (*Cocos nucifera* L.) é uma planta que pertence à classe Monocotyledoneae, e a família Arecaceae (Palmae). É a única espécie do gênero *Cocos* e possui duas variedades: o coqueiro gigante (Typica) e o coqueiro anão (Nana). Este último possui ainda três subvariedades: o anão verde, o vermelho e o amarelo, sendo que o anão vermelho ainda apresenta dois tipos fenotipicamente diferentes: o da Malásia e o de Camarões (Ribeiro, 2002).

A variedade anã é a mais utilizada em programas de melhoramento do coqueiro e na produção de híbridos por apresentar maior precocidade, maior produtividade em termos de número de frutos por planta por ano e menor porte em relação às demais variedades (Nuce De Lamothe e Rognon, 1977).

Apesar de controvérsias, o centro de origem do coqueiro é considerado o Sudeste Asiático, sendo que seu cultivo também está distribuído pela América Latina, Caribe e África Tropical em cerca de 200 países. Porém em apenas 90 deles predomina sua exploração comercial (Martins e Jesus Junior, 2011). A produção mundial de coco se concentra principalmente na Ásia, em países como as Filipinas, Índia e Indonésia, os três maiores produtores do mundo.

Esse continente também apresenta o maior percentual do cultivo e comércio do coco, embora o cultivo seja espalhado por toda zona intertropical (FAOSTAT, 2011). No Brasil, a cultura do coqueiro está estabelecida, preponderantemente, ao longo do litoral, desde o estado do Pará até o estado do Rio de Janeiro. Especificamente na região Sudeste, o Estado do Rio de Janeiro

apresenta-se como o segundo maior produtor com uma produção de 70.010 toneladas, sendo o maior produtor da região o Espírito Santo com uma produção de 173.716t (IBGE, 2012).

A maior parte da produção de coco no país é destinada ao consumo *in natura* aplicada à alimentação humana e à fabricação de produtos industrializados. Com isso, as pesquisas de melhoramento genético do coqueiro visam aumentar a quantidade de albúmen, número de frutos por planta, características sensoriais e organolépticas, resistência a pragas, doenças e secas. Entretanto, possui algumas limitações devido ao longo ciclo da cultura, pequeno número de sementes produzidas e impossibilidade de propagação vegetativa devido à natureza da cultura (Liyanage, 1967).

Uma das estratégias dos melhoristas nesse âmbito tem sido a avaliação de híbridos intervarietais (Anão x Gigante), visto que, em relatos da literatura observa-se que a manifestação da heterose em coqueiro ocorre para a produção de frutos, precocidade, resistência a pragas e doenças, número de folhas e circunferência do coleto (Santos *et al*, 1982). Como no Brasil, o grande interesse do coqueiro é para produção de água para consumo *in natura* ou industrial, a variedade anã verde é a mais apropriada.

Atualmente, a Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro em parceria com outras empresas, iniciou um trabalho vislumbrando a possibilidade de obter combinações híbridas envolvendo ecótipos específicos de anão, identificando híbridos que sejam mais produtivos, com foco no volume e qualidade da água e maior tolerância às enfermidades.

Contudo, ainda não existe um método confiável para a confirmação da identidade de cultivares de coqueiro e legitimidade de híbridos da espécie. Isso acarreta sérios problemas no cultivo de coco e produção de sementes, como a identificação dos cultivares ou dos híbridos, que só pode ser constatada nas fases mais tardias do crescimento com base em características reprodutivas, devido ao longo período juvenil e sua natureza perene (Perera, 2010).

A identificação equivocada de mudas não legítimas como legítimas causa uma série de problemas de ordem econômica, visto que uma plantação de coqueiro demanda uma grande área, haverá uma produção não satisfatória e toda mão de obra empregada será inútil.

Como os marcadores de DNA são simples, rápidos, menos ambientalmente condicionados, e alguns deles são experimentalmente bem reprodutíveis, eles têm sido amplamente aplicados na identificação, registro de planta ou variedade, e no controle da pureza de sementes híbridas, proporcionando autenticidade com alta precisão, alta confiabilidade e a depender do marcador, baixo custo (Zhao *et al*, 2000; Liang, *et al* 2001). Com auxílio dos marcadores é possível obter *DNA Fingerprints*, ou seja, descrever o padrão molecular de um genótipo.

O uso do *DNA Fingerprint* para o melhoramento do coqueiro permite a identificação de cultivares e verificação da legitimidade de sementes híbridas. Este estudo objetivou obter o *DNA Fingerprint* de 13 populações de coqueiro anão por meio de marcadores microssatélites visando melhorar a autenticação de sementes híbridas de coqueiro oriundas de cruzamentos intravarietais.

2. OBJETIVOS

- a) Obter *DNA Fingerprint* via marcadores SSR das 13 populações de coqueiro anão previamente selecionadas; e que estão sendo utilizadas paralelamente no programa de melhoramento do coqueiro da UENF;
- b) Identificar marcadores SSR que permitam o reconhecimento de híbridos intravarietais de coqueiro anão entre as populações avaliadas para fins experimentais e comerciais;
- c) Verificar a legitimidade de sementes híbridas de coqueiro anão, a partir das marcas identificadas;
- d) Viabilizar a produção de híbridos de mesma herança morfológica relacionada à cor.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Importância Socioeconômica da cultura do coco

A cultura do coqueiro é considerada a mais importante das culturas perenes. Todas as partes do coqueiro apresentam um percentual de aproveitamento, desde a raiz até os frutos, gerando produtos utilizados na alimentação, na indústria e outros de menor importância (Ferreira *et al*, 1998).

Em termos econômicos e sociais a cocoicultura tem uma vasta importância por gerar empregos e renda durante todo o ano, visto que, além de ser uma cultura perene, pode ser consorciada com outras culturas e até mesmo com a criação de animais o que contribui para fixação do homem no campo (Fontenele, 2005).

A produção mundial de copra (albúmen desidratado a 6%) se concentra principalmente na Ásia, nos países das Filipinas, Índia e Indonésia. Esse continente também apresenta o maior percentual do cultivo e comércio do coco, apesar de que o cultivo é espalhado por toda zona intertropical (Ferreira *et al*, 1998). Na última década o cultivo mundial de coco registrou um acréscimo em área de plantio e colheita.

Em 2001, a produção mundial foi de 51,9 milhões de toneladas, numa área colhida de 11,1 milhões de hectares, enquanto que no ano de 2010, a produção foi de 62,4 milhões de toneladas em uma área colhida de 11,7 milhões de hectares, representando um incremento de 20,2% na produção e de apenas 5,4

% na área colhida. O rendimento médio mundial na produção de frutos variou de 4,68 t/ha no ano de 2001 para 5,33 t/ha no ano de 2010 (FAOSTAT, 2012).

Dentre os principais países produtores de coco e suas respectivas áreas colhidas, nos anos de 2001, 2005 e 2010, a Indonésia destaca-se como o maior produtor mundial, seguido por Filipinas, Índia, Brasil e Sri Lanka que somaram juntos 52,0 milhões de toneladas, representando 83,2% da produção mundial.

O Brasil encontra-se como quarto maior produtor de coco mundialmente. A maior parte da sua produção é destinada ao consumo *in natura* aplicada à alimentação humana e à fabricação de produtos industrializados como: coco ralado, leite de coco, flocos, creme, onde somente o refugo é processado na indústria, visando a produção de copra para obtenção de óleo (Ribeiro, 2002).

Diante disso, as pesquisas de melhoramento genético do coqueiro visam aumentar a quantidade de albúmen, número de frutos por planta, características sensoriais e organolépticas, resistência a pragas, doenças e secas. (Liyanage, 1967).

Considerando-se a última década, a produção e a área colhida com coco no Brasil, apresentaram crescimento, passando de 1,4 bilhões de frutos em 2001 para 1,8 bilhões de frutos em 2010. A área colhida no mesmo período variou de 273,3 mil hectares para 264,3 mil hectares, representando um acréscimo de 28,6% na produção e uma redução de 3,3% na área colhida (Agrianual, 2012).

O Sudeste alcançou a segunda posição com 14,6% da produção de coco no Brasil. Comparando-se os anos de 2001 e 2010, a produção brasileira de frutos de coco apresentou crescimento na maioria dos estados. Constatou-se também, um aumento na área colhida nos estados do Ceará, Pará, Paraíba, Pernambuco e Rio de Janeiro (Agrianual, 2012).

Os Estados do Rio de Janeiro e Espírito Santo apresentaram os maiores valores para a média anual de rendimento, sendo de 16.737 e 14.917 frutos por hectare; respectivamente. Esses resultados obtidos são bem superiores aos verificados nos demais Estados produtores e também em relação à média nacional. As elevadas produtividades médias obtidas nos estados do Espírito Santo e Rio de Janeiro são justificadas pela ampliação das áreas cultivadas, principalmente, a partir da década de 90, utilizando-se mudas de coqueiro anão verde proveniente de material genético de melhor qualidade e melhor nível

tecnológico de manejo, sobretudo irrigação, adubação e controle fitossanitário (Benassi, 2012).

De maneira geral, a cultura do coqueiro tem avançado mostrando respostas positivas, acerca da produtividade; e deixando cada vez mais evidente sua importância socioeconômica para o país. Entretanto ainda existem algumas limitações, não só de caráter tecnológico, mas também de apoio governamental que vise ampliar a competitividade dos pequenos produtores (Martins e Jesus Junior, 2011).

3.2. Origem e Distribuição do Coqueiro

O coqueiro é uma palmeira tropical com notável importância sócio-econômica e que se encontra amplamente distribuída por todo mundo (Siqueira *et al*, 2002). Muito tem se discutido sobre o centro de origem do coqueiro, que é considerado ainda, pela maioria dos autores como sendo o Sudeste Asiático. Porém, em trabalhos mais recentes, Harries e Clement (2013) apresentaram uma nova hipótese a respeito da origem e dispersão do coqueiro.

Através de uma longa revisão bibliográfica a respeito da dispersão do coqueiro pelo mundo, Harries e Clement (2013), perceberam que o coqueiro não tinha sua origem restrita a um país ou região, mas sim, a um ecossistema: atóis de corais. Esta hipótese defende a ideia de que o coqueiro originou-se, evoluiu e se dispersou naturalmente por flutuação de seus frutos pelas correntes marítimas que “unem” todo o ecossistema de corais.

Como esse ecossistema está presente em toda faixa tropical do mundo e está sujeito a constantes mudanças geográficas de suas fronteiras, não foi possível para Harries e Clement (2013) determinarem um local de origem exato. Assim, com base nesta hipótese, o coqueiro não pode ter sua origem restrita a uma única região no planeta.

A disseminação do coqueiro por meio de dispersão natural levou cerca de 80 milhões de anos. Durante esse período, o coqueiro desenvolveu mecanismos que o permitiu ser disperso através dos 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 através do oceano para novas regiões (Batugal e Jayashree, 2005).

Entretanto, apesar de o fruto do coqueiro apresentar uma adaptação natural para a dispersão por correntes marítimas, a sua dispersão ocorreu também através do homem. Essa interação notável culminou na distribuição geográfica da espécie *Cocos nucifera* e, conseqüentemente, na sua diversidade fenotípica. É provável que durante o período pré-colombiano, navegadores das Filipinas tenham disseminado o coco 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 remetem a uma influência promovida pelas expansões dos navegantes rumo ao oeste em direção a Madagascar. Em seguida, o coco foi introduzido pelos europeus a partir da Índia para a Costa Atlântica da África, América do Sul e Caribe (Gunn *et al*, 2011).

No Brasil, a variedade gigante foi introduzida em 1553, proveniente da Ilha de Cabo Verde e; a introdução da variedade anã ocorreu da seguinte forma: o anão-verde, em 1924, de Java, o anão-amarelo, em 1938, e o anão-vermelho, em 1939, ambos provenientes do Norte da Malásia. Já o anão vermelho-de-camarões foi introduzido em 1978, proveniente da Costa do Marfim (Fontes e Ferreira, 2006).

3.3. Aspectos Botânicos e Fisiológicos do Coqueiro

Segundo Chan e Elevitch (2006), o coqueiro é uma planta que pertence a Classe Monocotyledoneae e a Família Arecaceae (Palmae). É a única espécie do gênero *Cocos* e possui duas variedades: o coqueiro-gigante (*Typica*) e o coqueiro-anão (*Nana*). Este último possui ainda três subvariedades: o anão verde, o vermelho e o amarelo, sendo que, o anão vermelho ainda apresenta dois tipos fenotipicamente diferentes, o da Malásia e o de Camarões (Siqueira *et al*, 2002).

O coqueiro apresenta um sistema radicular fasciculado, seu caule é do tipo estipe que pode atingir em média 18 metros, com uma porção terminal tenra e comestível conhecida como palmito. As folhas são do tipo penada, composta de pecíolo, ráquis e folíolos. O coqueiro emite cerca de 12 a 18 folhas ao ano, a

dependem da variedade. As inflorescências são paniculadas, axilares e protegidas por brácteas. São compostas por pedúnculo, espigas e flores masculinas e femininas. O fruto é uma drupa de epicarpo liso, mesocarpo espesso e fibroso, e endocarpo onde se encontra a semente protegida pelos albúmens líquido e sólido (Passos, 1998).

Segundo Nuce De Lamothe e Rognon, (1977), o coqueiro é uma planta monóica, que apresenta os órgãos sexuais em flores distintas, porém na mesma inflorescência. Na variedade gigante a fase feminina se inicia após a fase masculina, ou seja, as flores masculinas liberam pólen cerca de 15 dias após a abertura da espata. Já as flores femininas só tornam-se receptivas após findar o ciclo masculino, impossibilitando a autofecundação. É por isso, que nessa variedade o tipo de fecundação é predominantemente polinização cruzada (Nuce De Lamothe e Rognon, 1977).

O coqueiro é uma planta de clima tropical, com condições favoráveis entre 20°N e 20°S de latitude. A disponibilidade de água exerce alta influência sobre seus processos fisiológicos, existindo assim condições de temperatura e umidade que são determinantes para o seu cultivo (Ferreira *et al*, 1998). Requer clima quente, pois baixas temperaturas acarretam mudanças em sua morfologia e em seus mecanismos fisiológicos. O clima deve ser úmido, ressaltando situações de extremos que são prejudiciais para a planta. O regime pluvial ideal é caracterizado por precipitação anual de 1500mm e mensal de 130mm. O coqueiro é altamente exigente em luz, necessitando de ventos fracos e moderados para auxiliar nos processos de absorção e transpiração (Ferreira *et al*, 1998; Fontes e Ferreira, 2006).

3.4. Coqueiro Anão

O coqueiro anão é uma variedade predominantemente autógama e mais sensível a estresses bióticos e abióticos. Apresenta desenvolvimento vegetativo precoce e pode atingir de 10 a 12m de altura. A sua produção inicia entre 2 a 3 anos após o plantio e tem vida útil entre 30 e 40 anos. Em acréscimo, produz cerca de 150 a 200 frutos/planta/ano e, estes frutos destinam-se ao consumo *in natura* e ao uso agroindustrial (Fontes *et al*, 2002; Batugal e Jayashree, 2005).

Produtividades bem mais elevadas, cerca de 400 frutos por ano, têm sido relatadas por produtores em regiões do semiárido brasileiro.

A variedade anã possui ainda três subvariedades caracterizadas pela cor do fruto, pecíolo, inflorescência, que são o anão verde, o vermelho e o amarelo como já citado, sendo que o anão vermelho ainda apresenta dois tipos fenotipicamente diferentes, o da Malásia e o de Camarões (Ribeiro, 2002). A cultivar verde é mais resistente às condições adversas do ambiente e a amarela, mais suscetível.

Segundo Bourdeix et al (2005) existem doze variedades de coqueiro anão catalogadas em todo o mundo, a saber: Anão Amarelo da Malásia (MYD), Anão Vermelho da Malásia (MRD), Anão Verde do Brasil (BGD), Anão Vermelho de Camarões (CRD), Anão Verde de Pilipog (PILD), Anão de Niu Leka (NLAD), Anão Verde do Sri Lanka (PGD), Anão Vermelho Tahitiano (TRD), Anão Verde Catigan (CATD), Anão Marrom de Madang (MBD), Anão Verde da Tailândia (THD) e Anão Verde de Tacunan (TACD). Entretanto, dentre estas variedades apenas as variedades Anão Amarelo da Malásia (MYD), Anão Vermelho da Malásia (MRD), Anão Verde do Brasil (BGD) e Anão Vermelho de Camarões (CRD) existem no Brasil, além do Anão Amarelo de Gramame e Anão Vermelho de Gramame.

O Anão Verde do Brasil, por sua vez, está distribuído pelo litoral brasileiro em diversas regiões produtoras recebendo assim, a designação dos locais onde foram prospectados e coletados, como, por exemplo, o Anão Verde do Brasil de Jiqui e Anão Verde do Brasil de Souza.

3.4.1. Anão Verde do Brasil

No Brasil, o coqueiro anão verde é o mais cultivado dentre as outras subvariedades, principalmente pela maior aceitação desses frutos entre os consumidores. Segundo Bourdeix (1988), apresenta a menor taxa de autofecundação que é 94,3%, assumindo assim, o maior percentual de alogamia (5,7%) entre as subvariedades, o que ocasiona maior variabilidade desse material.

A cultivar anã verde possui taxa de germinação intermediária em relação às outras cultivares, apresentando percentuais entre 21,33% no primeiro mês e

57,48% no segundo mês (Rabelo *et al*, 2006). Sob determinadas condições é a cultivar que proporciona o florescimento mais precoce com 2,5 anos de idade (Aragão *et al*, 2002) e apresenta fase feminina curta e com uma certa simultaneidade com a fase masculina da mesma inflorescência e da inflorescência seguinte (Ribeiro *et al*, 1999). Segundo Castro (2007) a fase feminina do coqueiro anão verde assemelha-se a fase feminina do coqueiro gigante.

Os frutos de 7 e 12 meses apresentam os maiores valores de peso de fruto e fibra, respectivamente, e aos 6 meses oferecem os maiores valores de albúmen líquido, quando comparado as demais cultivares (Aragão *et al*, 2001).

3.4.2. Anão Amarelo da Malásia e de Gramame

Segundo Siqueira *et al* (1998) e Ribeiro *et al* (1999), o anão amarelo possui dois tipos que não se distinguem em características morfo-agronômicas, o Anão Amarelo de Gramame e o Anão Amarelo da Malásia. O anão amarelo possui uma taxa intermediária de autofecundação de 94,9% quando comparado com as outras subvariedades (Bourdeix, 1988). Tem crescimento vegetativo mais rápido que o verde e o vermelho de camarões, apresentando similaridade com os outros anões vermelhos (Ribeiro *et al*, 1999).

Essa cultivar floresce entre 2,5 e 2,7 anos de idade, segundo dados coletados por Aragão *et al* (2003), e possui simultaneidade completa das fases masculina e feminina na mesma inflorescência (Ribeiro *et al*, 1999). Os frutos com 7 e 12 meses possuem peso intermediário, e os valores referentes ao albúmen sólido e ao albúmen líquido são os menores entre as cultivares (Aragão *et al*, 2001).

3.4.3. Anão Vermelho Malásia e de Gramame

Semelhantemente ao anão amarelo, o anão vermelho também possui dois tipos que não se distinguem em características morfo-agronômicas, o Anão Vermelho de Gramame e o Anão Vermelho da Malásia, que para alguns autores também são considerados dois tipos geneticamente diferentes.

O anão vermelho apresenta a maior taxa de autofecundação de 99,5% quando comparado com as outras cultivares (Bourdeix, 1988). Sua taxa de germinação é menor em relação às cultivares verde e amarela, porém tem crescimento vegetativo mais rápido que o verde e o vermelho de camarões (Ribeiro et al, 1999).

Tem seu florescimento entre 2,7 e 2,9 anos de idade, segundo dados coletados por Aragão et al (2003) e possui simultaneidade completa das fases masculina e feminina na mesma inflorescência (Ribeiro *et al*, 1999). Os frutos com 7 e 12 meses têm peso maior que os frutos de outras cultivares, e os valores referentes ao albúmem sólido e ao albúmen líquido são os intermediários entre elas (Aragão *et al*, 2001).

3.4.4. Anão Vermelho de Camarões

O Anão vermelho de Camarões possui uma coloração mais fraca do que os outros anões vermelhos, o que facilita sua distinção entre eles. Entretanto, cor diferenciada não é o único aspecto no qual esse tipo de anão vermelho se distingue dos demais. Além disso, ele apresenta uma taxa de germinação mais lenta e uniforme, crescimento vegetativo mais lento, tem menor porte e não exhibe dilatação na base do estipe, e o ângulo de inserção das folhas é bem menor que os outros anões vermelhos (Loiola, 2005).

Segundo Cambui (2007), esse tipo é o mais distante geneticamente entre as outras cultivares de coqueiro anão. Os frutos com 7 e 12 meses possuem os maiores valores referentes ao albúmem sólido e ao albúmen líquido do que os frutos de outras subvariedades (Aragão *et al*, 2001).

3.4.5. Herança da cor do fruto em coqueiro anão

A coloração, característica de partes da planta do coqueiro (exemplo: fruto, inflorescência, coleto) tem grande importância, não só na identificação de cultivares, como também para identificação de híbridos legítimos na fase de germinação atuando como marcador morfológico e acelerando a seleção de plantas legítimas (Aragão *et al*, 1999)

Segundo Bourdeix (1988) a cor do coqueiro é devida a expressão de 2 genes independentes, simbolizados por “R, r, G, g” onde, os seguintes genótipos produzem os devidos fenótipos de acordo com o Quadro 1.

Quadro 1 – Representação genotípica e fenotípica do coqueiro anão

Genótipo	Fenótipo
rrgg	Amarelo
RRgg, Rrgg	Vermelho
rrGG, rrGg	Verde
RRGG, RRGg, RrGG, RrGg	Marrom

Aragão *et al* (1999) testaram todas as combinações possíveis entre todos os genótipos e fenótipos gerados pelos 2 genes que controlam a herança da cor, inclusive cruzamentos recíprocos. Com isso, eles concluíram que a depender da situação, as cores verde e marrom também funcionaram como marcadores na identificação de híbridos.

De 72 combinações realizadas, 50% ocorreram na situação de marcadores parciais, 26,4% na situação de não marcadores e 23,6% atuaram como verdadeiros marcadores, distinguindo confiavelmente as sementes híbridas. Isso ocorre porque essas situações dependem tanto da combinação entre os parentais (normal ou recíproca) quanto do estado de homozigose ou heterozigose dos locos. A situação de marcador parcial é quando devido às condições de heterozigosidade dos locos de um ou de ambos parentais, existindo a possibilidade de se obter no mínimo dois genótipos e dois ou mais fenótipos podendo ser igual à cor do parental feminino, igual à cor do parental masculino e diferente dos parentais.

No entanto, se a cultivar verde for utilizada sempre como genitor feminino a maioria das combinações tornam-se inviáveis quanto à aplicação dos marcadores morfológicos na identificação nas sementes híbridas devido à presença de alelos dominantes em seu genótipo. O problema é o mesmo, se os híbridos forem provenientes de cruzamentos entre genitores de mesma herança morfológica.

Então a seleção de mudas confiando apenas sobre os parâmetros morfológicos, como cor do pecíolo e vigor de crescimento, muitas vezes resulta

em seleção indesejável de mudas de polinização cruzada e também de rejeição de possíveis bons híbridos. O problema é dobrado se a seleção é para o plantio de sementes comerciais, onde o estabelecimento de tipos impuros pode resultar em desperdício de tempo, recursos e perda de desejável pureza genética (Rajesh *et al*, 2013).

Aragão *et al* (1999) propuseram que seria ideal antes de qualquer cruzamento, determinar a situação dos loci dos parentais quanto a homozigose e heterozigose, principalmente, através de marcadores moleculares tornando o processo de hibridação mais seguro.

3.5. Recursos Genéticos e Bancos de Germoplasma

A Rede Internacional de Recursos Genéticos de Coco (COGENT) tem como uma das metas do programa, estabelecer e manter uma base de dados internacional onde pudessem ser cadastrados todos os acessos conservados nos Bancos de Germoplasma de Coco do Mundo (Batugal, 2006).

A base de dados criada pelo COGENT, Coconut Genetic Resources Database (CGRD) dispõe, atualmente de 1680 acessos cadastrados distribuídos em 24 Bancos de Germoplasma. A região que apresenta maior número de acessos cadastrados é o Sudeste Asiático, destacando-se a Índia, as Filipinas e a Indonésia. O COGENT possui 5 sub-redes, com o objetivo de conservar, avaliar e disponibilizar os 200 mais importantes acessos de cada Região. Cada sub-rede coordenada por um país da região, e são elas: Sudeste e Leste Asiático, Sul da Ásia, Sul do Pacífico, África e Oceano Índico e América Latina e Caribe (Batugal, 2006). A sub-rede da América Latina é formada pelos Bancos de Germoplasma do Brasil, da Jamaica e do México.

No Brasil, os trabalhos com recursos genéticos de coco iniciaram na Embrapa Tabuleiros Costeiros (CPATC) com a formação do Banco Ativo de Germoplasma de Coco em 1982, localizado no Campo Experimental do Betume, no município de Neópolis-SE, constituindo um programa de ações específicas na área de melhoramento e recursos genéticos (Aragão, 1999). A conservação de germoplasma de coco no BAG é feita através de coleções *in vivo* e *ex situ*, com diferentes quantidades de indivíduos por acessos, em função da disponibilidade dos materiais introduzidos (Ribeiro, 2002).

Para constituir o BAG, em 1982, a Embrapa viabilizou a introdução dos acessos: Anão Amarelo da Malásia (AAM) e Anão Vermelho da Malásia (AVM) e Anão Vermelho de Camarões (AVC), procedentes da Costa do Marfim. Em 1983, ocorreu nova introdução de acessos oriundo da Costa do Marfim: Gigante-do-Oeste-Africano (GOA), Gigante-de-Rennell (GRL), Gigante-da-Polinésia (GPY), Gigante-de-Rotuma (GRT), Gigante-de-Tonga (GTG), Gigante-de-Vanuatu (GVT). Gigante-da-Malásia (GML), além de reintroduzidos os Anões Amarelo (AAM) e Vermelho da Malásia (AVM) e Anão Vermelho de Camarões (AVC), e, em 1984, foram introduzidos os seguintes: Gigante-do-Oeste-Africano (GOA), Gigante-da-Polinésia (GPY), Gigante-de-Rennell (GRL), Gigante-de-Tonga (GTG), Gigante-de-Vanuatu (GVT) e Gigante-da-Malásia (GML) e em 1986, outra reintrodução com Gigante-de-Rennell (GRL), Gigante-da-Polinésia (GPY) e Gigante-de-Vanuatu (GVT) (Ribeiro e Siqueira,1995).

Os trabalhos de prospecção e coleta de germoplasma no Brasil foram iniciados também em 1982, tendo sido prospectadas e introduzidas as seguintes populações de coqueiro gigante: Praia do Forte, BA, Pacatuba, SE, Merepe e Santa Rita, PE, São José do Mipibu e Baía Formosa, RN; e as populações de coqueiro-anão: amarelo e vermelho-de-gramame (PB); e verde-de-ijiqui, RN (Ribeiro e Siqueira,1995).

A caracterização e avaliação desses acessos foram iniciadas em 1983, baseadas em aspectos morfológicos e moleculares. Essa última, por meio de uma parceria entre, a Embrapa Tabuleiros Costeiros e a Universidade Estadual do Norte Fluminense, em 1996 (Ribeiro, 2002). Alguns trabalhos realizados dentro dessa parceria foram Wadt (1999), Nunes (2013), Loiola (2014) e Azevedo (2014).

3.6. Variabilidade Genética

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).

Já foram realizados diversos estudos de diversidade genética com coqueiro utilizando características morfoagronômicas, tais como: Harries (1978), o qual melhorou o método de análise de componentes de frutos desenvolvida por Whitehead (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, os marcadores moleculares vêm apresentando expressiva aplicação em estudos de diversidade genética do 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.

3.7. Melhoramento Genético do Coqueiro

O coqueiro (*Cocos nucifera* L.) é uma espécie diploide, única representante do gênero *Cocos* e, apresenta 32 cromossomos dispostos em 16 pares, ou seja, $2n=2x=32$ (Uhl e Dransfield, 1987). 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 o coqueiro Gigante apresenta protandria (amadurecimento do androceu anteriormente ao gineceu), enquanto o coqueiro anão apresenta amadurecimento simultâneo do androceu e gineceu, resultando em favorecimento da autofecundação.

3.7.1. Métodos de Melhoramento

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).

3.7.2. Estratégias de Melhoramento

A investigação da variabilidade genética entre populações de coco é fundamental para o desenvolvimento de novas cultivares adaptadas a diferentes condições ambientais, bem como para a seleção de parentais divergentes para potencializar a heterose em hibridações futuras.

Uma das estratégias que vem sendo aplicada pelos melhoristas a fim de aumentar a produtividade de coco e resolver outros problemas da cultura, envolve a produção e avaliação de híbridos intervarietais, entre as variedades Anão x Gigante, visto que para esse caso existem relatos da literatura sobre a manifestação da heterose em coqueiro para a produção de frutos, precocidade, resistência a pragas e doenças, número de folhas, circunferência do coletor (Santos *et al*, 1982), porcentagem de germinação (Farias *et al*, 2002).

No Brasil, os híbridos intervarietais possuem potencial para a produção de 120 a 160 frutos/planta/ano e pode ser utilizado tanto na forma *in natura* como na agroindústria (Aragão *et al.*, 1997). Além dessas vantagens, os híbridos são mais variáveis por serem formados pela constituição genética de dois ou mais parentais, e conseqüentemente, podem apresentar maior estabilidade de produção e de outras características, quando submetidos a diferentes ambientes ecológicos em relação a seus parentais (Aragão *et al.*, 1997).

O programa de melhoramento de coco da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) em parceria com outras empresas vem desenvolvendo ações no tocante a produção de híbridos intravarietais de coqueiro anão. O programa visa principalmente hibridações entre cultivares de anão verde com expectativa de que esses alcancem maior heterose que os híbridos intervarietais no tocante a produção de frutos e qualidade de água de coco, visto que esse é a principal utilidade do fruto do coqueiro para o comércio brasileiro.

Algumas ações já foram realizadas como um estudo prévio da diversidade genética entre populações de coqueiro anão de regiões produtoras que resultou no trabalho de Azevedo (2014), bem como o desenvolvimento de um experimento onde algumas dessas populações estão sendo utilizadas em um delineamento em Top Cross, cujo testador comum foi o BJD-Jiqui.

3.8. Importância do DNA Fingerprint no melhoramento do coqueiro

DNA Fingerprints têm sido utilizados para descrever o padrão molecular de um genótipo e podem ser obtidos a partir de vários tipos de marcadores moleculares. Os marcadores de DNA permitem obter um padrão de polimorfismo único na comparação de diferentes genótipos, em outras palavras, permitem obter o perfil genético ou *DNA Fingerprint* de determinados genótipos.

Através do perfil genético dos genótipos é possível realizar trabalhos de caracterização de variedades e cultivares; realizar controle de pureza de sementes; verificar a taxa de fecundação cruzada existente; detectar variação somaclonal em cultura de tecidos; constatar a obtenção de híbridos somáticos e reduzir o número de gerações de retrocruzamento necessárias para a recuperação do progenitor recorrente (Hoffmann e Barroso, 2006).

Vários tipos de marcadores moleculares têm sido utilizados em estudos de *DNA Fingerprint*, tanto marcadores dominantes como codominantes. Porém os mais indicados, principalmente com a finalidade de proteção das cultivares são os marcadores codominantes como microsatélites (SSR), SNP, CAPS e SCAR.

Os marcadores microsatélites (SSR) são caracterizados como pequenas frequências de 1 a 4 nucleotídeos em tandem distribuídos ao acaso no genoma. A técnica baseia-se na amplificação das sequências repetidas, utilizando *primers*

complementares às regiões conservadas que flanqueiam o microssatélite. Esses tipos de marcadores possuem elevado conteúdo de informação genética por loco, são tecnicamente simples e de baixo custo quando comparado a outras técnicas moleculares (Guimarães e Moreira, 2005).

Os polimorfismos de único nucleotídeo (SNPs) são marcadores codominantes caracterizados pela substituição de um nucleotídeo. Além disso, os SNPs são frequentes e podem ser distribuídos por todo o genoma. A fim de desenvolver estes marcadores, é necessário um grande número de atividades anteriores de sequenciamento, contudo, a sua aplicação é tão simples como outras técnicas baseadas em PCR (Lebrun, 2005). Nos últimos anos, os marcadores SNPs têm sido muito úteis no melhoramento de plantas em estudos de diversidade genética, mapas de ligação e mapas baseados em clonagem, estrutura populacional, estudos de associação, melhoramento de plantas assistido por marcadores e genômica funcional (Kumar et al., 2012).

Os marcadores SCAR são amplificados utilizando-se *primers* específicos, desenvolvidos com base em sequências mapeadas ou caracterizadas. Estes marcadores também pertencem à classe dos marcadores codominantes. Muitos dos *primers* SCAR são resultantes da conversão de *primers* RAPD, RFLP e ISSR. Possuem a vantagem de serem mais consistentes, porém com um custo mais elevado (Millach, 1998).

Os marcadores CAPS, também conhecidos como PCR-RFLP, são fragmentos de DNA amplificados via PCR, utilizando-se *primers* específicos, seguidos por digestão com enzimas de restrição. A principal vantagem desse marcador é a co-dominância e a alta reprodutibilidade dessa técnica embora haja necessidade de conhecimento prévio da sequência de DNA para a construção dos *primers* (Faleiro, 2007).

A grande variabilidade genética do coqueiro disponível entre populações de coqueiro gigante e anão pode ser explorada por melhoristas em diversos programas de melhoramento, permitindo assim, o desenvolvimento de novas cultivares e possibilitando a produção de híbridos portadores de características de interesse (Batugal e Jayashree, 2005).

Diante disso, a seleção de mudas híbridas precisa ser realizada com maior rigor na verificação da pureza genética. Como os parâmetros morfológicos, como cor do pecíolo e vigor de crescimento, podem sofrer variação ambiental, e

muitas vezes resultam em seleção indesejável de mudas de polinização cruzada e também de rejeição de possíveis bons híbridos. O problema é dobrado se a seleção é para o plantio de sementes comerciais, onde o estabelecimento de tipos impuros pode resultar em desperdício de tempo, recursos e perda de desejável pureza genética (Rajesh *et al*, 2013).

Além disso, com a proposta de se desenvolver cultivares híbridas de coqueiro anão de cores diferentes e de mesma cor, surge a necessidade de se criar uma estratégia que auxilie os melhoristas a identificar sementes puras com maior confiabilidade. Avaliação e manutenção da pureza genética das linhagens parentais e híbridos é crucial para o sucesso na adoção de híbridos e os marcadores moleculares, por sua vez, tem potencial para atingir esse objetivo.

Já existem alguns trabalhos realizados com coqueiro no tocante ao estudo de *DNA Fingerprint*. Rajesh *et al* (2013) identificaram um marcador relacionado a altura da planta característica utilizando marcadores RAPD. Foram desenhados *primers* SCAR a partir da sequência RAPD encontrada para ser mais específico na diferenciação entre anões e gigantes e tornar a técnica mais rigorosa e específica quando comparados com o marcador RAPD. O marcador SCAR desenvolvido pode ser utilizado para distinguir progênes autopolinizadas em cruzamentos Anões x Gigantes.

Perera (2010) identificou dois pares de *primers* microssatélites, por sua vez mais específicos que os *primers* SCAR do trabalho citado anteriormente, que podem ser utilizados com sucesso para distinguir unicamente o Coqueiro Gigante do Sri Lanka (SLT) do Anão Verde do Sri Lanka (SLGD) e do Anão Amarelo do Sri Lanka (SLYD). Com isso, os *primers* identificados permitem também verificar a pureza genética de sementes advindas dos híbridos SLGD x SLT e SLYD x SLT.

Os *primers* foram testados em amostras de DNA provenientes de mudas em viveiro e os resultados foram satisfatórios quanto à identificação dos híbridos. Por fim, Perera (2010) concluiu que os marcadores de DNA desenvolvidos neste estudo, foram capazes de recuperar cerca de 11 % das mudas de coqueiros híbridos que seriam descartadas como contaminante, confirmando assim, a utilização destes *primers* com a finalidade de testar a pureza das mudas em viveiro.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Material Genético

Foram utilizados no presente programa de pesquisa, 13 populações de coqueiro anão provenientes de diferentes regiões produtoras do Brasil e que são potenciais genitores para a produção de híbridos nessas regiões. A escolha das populações foi orientada pelos resultados de Azevedo (2014), o qual desencadeou a implementação de um experimento de campo com híbridos de coqueiro anão em parceria com as empresas: COMERCIAL REGON, COHIBRA e EMBRAPA. As coletas das amostras foliares foram realizadas nos estados do Pará, Ceará, Sergipe, Paraíba e Bahia. Cada população foi representada por aproximadamente 20 genótipos, totalizando 220 genótipos (Tabela 1).

As populações foram escolhidas com base na representatividade das mesmas, em termos de utilização para produção de sementes, idade (áreas mais antigas), isolamento e pureza genética. As mesmas foram descritas por Azevedo (2014) conforme resumo a seguir:

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

- Anão-verde-do-Brasil-de Paraipaba (BGD-Paraipaba) – Esta população foi estabelecida no perímetro irrigado de Paraipaba, Ceará - Brasil, a partir de sementes procedentes da EMPARN. O BGD de Paraipaba é usado pela COHIBRA (Empresa privada, produtora de sementes comerciais de coqueiro) como genitor feminino de híbridos.

- Anão-Verde-do-Brasil-de-Figueiredo-Souza (BGD- Souza-FS) – O Anão Verde do Brasil de Figueiredo Souza constituiu a primeira área de cultivo de coqueiro do perímetro irrigado de Souza, Paraíba – Brasil. Semelhante ao BGD de Jiqui, o BGD de Figueiredo Souza produziu sementes de coqueiro Anão Verde para outras áreas produtoras do Brasil.

- Anão-Verde-do-Brasil-de-Souza (BGD-Souza-SD) – O Anão Verde do Brasil de Souza constituiu 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, desde a década de 1960.

- Anão-Verde-do-Brasil-da-Bahia (BGD-Bahia) – Esta população foi estabelecida na década de 1990, em uma propriedade particular em Ribeira do Pombal, Bahia – Brasil, a partir de sementes cedidas pela EMBRAPA Tabuleiros Costeiros em Aracaju, Sergipe – Brasil.

- Anão-Verde-do-Brasil-do-Pará-1 (BGD-PARÁ-1) – Esta população foi estabelecida na década de 1940, em uma propriedade particular no Pará, Brasil, a partir de sementes procedentes de Abaetuba, uma região produtora de coqueiro 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-2 (BGD-PARÁ-2) – Esta população foi estabelecida na década de 1990, em uma propriedade particular no Pará - Brasil a partir de sementes procedentes de palmeiras da população BGD-PARÁ-1.

- Anão-Vermelho-de-Gramame (GRD) e Anão-Amarelo-de-Gramame (GYD) – Populações provenientes de Gramame, localidade próxima a João Pessoa – PB. Todavia, as amostras usadas no presente trabalho foram obtidas do campo de produção da COHIBRA em Amontada-CE, Brasil.

- Anão-Amarelo-da-Malásia (MYD) e Anão-Vermelho-da-Malásia (MRD) – Estas populações foram estabelecidas no Banco Internacional de Coco para América Latina e Caribe, em Itaporanga (Sergipe - Brasil), 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-de-Camarões (CRD) - O Anão Vermelho de Camarões (CRD) foi introduzido na COHIBRA por Dr. Wilson Menezes Aragão em 2000, sendo as sementes provenientes da Embrapa.

Tabela 1 Descrição das populações de coqueiro estudadas.

Sigla	População	Local de Coleta	Nº de indivíduos
BGD-Jiqui	Anão-verde-do-Brasil-de-Jiqui	COHIBRA - PE	20
BGD-Paraipaba	Anão-verde-do-Brasil-de-Paraipaba	COHIBRA - CE	20
BGD-Souza-FS	Anão-verde-do-Brasil-de-Souza (Figueiredo Souza)	Figueiredo Souza-Paraíba	10
BGD-Souza-SD	Anão-verde-do-Brasil-de-Souza (Souza Dantas)	Souza Dantas-Paraíba	10
BGD-Bahia	Anão-verde-do-Brasil-da-Bahia	Pombal – BA	20
BGD-PARÁ-1	Anão-verde-do-Brasil-do-Pará-1	Pará (Área Nova)	10
BGD-PARÁ-2	Anão-verde-do-Brasil-do-Pará-2	Pará (Área Velha)	10
BGD-Trairi	Anão-Verde-do-Brasil-do-Trairi	COHIBRA-CE	20
MRD	Anão-Vermelho-da-Malásia	EMBRAPA -SE	20
GRD	Anão-Vermelho-de-Gramame	COHIBRA - CE	20
CRD	Anão-Vermelho-de-Camarões	COHIBRA - CE	20
MYD	Anão-Amarelo-da-Malásia	EMBRAPA -SE	20
GYD	Anão-Amarelo-de-Gramame	COHIBRA - CE	20

4.2. Identificação dos marcadores para avaliar a pureza genética de sementes híbridas

A identificação dos marcadores foi realizada em duas etapas: Triagem em Bulks e Validação planta a planta.

a) Triagem em bulks

Esta etapa consistiu na utilização dos 57 *primers* selecionados (tabela 6) dos quais 35 deles foram desenvolvidos pelo pesquisador Lalith Perera do CRISL, sendo 10 deles não publicados, e as sequências foram adquiridas em sua parceria. Cada uma das 13 populações deu origem a um bulk composto por um conjunto de amostras foliares das diferentes plantas que representavam a população e todos os *primers* foram testados com cada um dos bulks. Foram identificados os *primers* que apresentaram polimorfismo entre as populações capazes de distingui-las.

b) *Avaliação planta a planta dos genitores*

Esta etapa consistiu na utilização dos *primers* selecionados na etapa anterior e os 20 genótipos de cada população a fim de confirmar se os alelos identificados nesses *primers* estão fixados nas respectivas populações.

4.3. Extração de DNA

As amostras foram coletadas e armazenadas na geladeira a temperatura de aproximadamente (0°C a 7°C). A partir das amostras coletadas, procedeu-se a extração de DNA utilizando o kit *DNeasy Plant Mini Kit* da QIAGEN. As concentrações de DNA nas amostras foram estimadas por meio de equipamento de espectrofotometria (*NanoDrop 2000C – ThermoScientific*) e, posteriormente padronizadas na concentração de 5ng.µl⁻¹. Para a triagem foi feita a extração dos bulks de amostras foliares como descrito anteriormente. Para a avaliação planta a planta foram extraídas amostras de DNA de cada indivíduo.

4.4. Reações de amplificação de DNA

As reações de amplificação de DNA foram realizadas conforme as concentrações finais propostas por Baudouin (2009), num volume final de 20 µl. Foi utilizado um termociclador GeneAmp – PCR System 9700 (*PE AppliedBiosystems*) com o seguinte programa: Um ciclo de desnaturação inicial a

94°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos de amplificação de 94°C por 30 segundos (desnaturação), 51 °C por 1 minuto (anelamento), 72 °C por 1 minuto (extensão), e uma extensão final a 72 °C por 30 minutos (Baudouin, 2009). Foi adotada a temperatura de anelamento de 51°C para todos os *primers*, visto que todos funcionaram nesta temperatura após alguns testes iniciais.

As reações de amplificação foram realizadas envolvendo 57 *primers* SSR distintos. A Tabela 2 apresenta a sequência dos *primers* que foram utilizados nas supracitadas reações de amplificação.

Tabela 2. Sequências dos *Primers* SSR para Coco.

Nome Primers	Forward primer	Reverse primer
CnCir A3 ¹	AATCTAAATCTACGAAAGCA	AATAATGTGAAAAGCAAAG
CnCir A9 ¹	AATGTTTGTGTCTTTGTGCGTGTGT	TCCTTATTTTTCTTCCCCTTCCTCA
CnCir B12 ¹	GCTCTTCAGTCTTTCTCAA	CTGTATGCCAATTTTTCTA
CnCir E10 ¹	TGGGTTCCATTCTTCTCTCATC	GCTCTTTAGGGTTCGCTTTCTTAG
CnCir E12 ¹	TCACGCAAAAGATAAAACC	ATGGAGATGGAAAGAAAGG
CnCir F2 ¹	GGTCTCCTCTCCCTCCTTATCTA	CGACGACCCAAAACCTGAACAC
CnCir G11 ¹	AATATCTCCAAAATCATCGAAAG	TCATCCCACACCCTCCTCT
CnCir H4 ¹	TTAGATCTCCTCCCAAAG	ATCGAAAGAACAGTCACG
CnCir H7 ¹	GAGATGGCATAACACCTA	TGCTGAAGCAAAAAGAGTA
CnCir H11 ¹	TCATTCAGAGGACAAAAGTT	TAAAAATTCATAAAGGTAAAA
CnCir C5 ¹	ACCAACAAAGCCAGAGC	GCAGCCACTACCTAAAAAG
CNZ40 ²	CTTGATTGCATTCTCAAATGG	CTGAGACCAAATACCATGTGT
CAC2 ³	AGCTTTTTTCATTGCTGGAAT	CCCCTCCAATACATTTTTTCC
CAC3 ³	GGCTCTCCAGCAGAGGCTTAC	GGGACACCAGAAAAAGCC
CAC4 ³	CCCCTATGCATCAAAACAAG	CTCAGTGTCCGTCTTTGTCC
CAC6 ³	TGTACATGTTTTTTGCCAA	CGATGTAGCTACCTTCCCC
CAC8 ³	ATCACCCCAATACAAGGACA	AATTCTATGGTCCACCACACA
CAC10 ³	GGAACCTCTTTTGGGTCATT	GATGGAAGGTGGTAATGCTG
CAC11 ³	GATCTTCGGCGTTCCTCA	TCTCCTCAACAATCTGAAGC
CAC13 ³	GGGTTTTTTAGATCTTCGGC	CTCAACAATCTGAAGCATCG
CAC 20 ³	CTCATGAACCAAACGTTAGA	CATCATATACATACATGCAACA
CAC21 ⁵	AATTGTGTGACACCTAGCC	GCATAACTCTTTCATAAGGA
CAC23 ⁵	TGAAAACAAAAGATAGATGTCA	GAAGATGATTTGATATGGAAC
CAC38 ³	ACCCTACTTCTAACTGTTCACTC	CAGCTTGATAAATATCATCCAT
CAC 39 ³	AATTGAGATAAGCAGATCAGTG	GTCGGTCTTTATTCAGAAGG
CAC50 ³	CTTACTCACCCATAACAAAG	TTGTAGTTGCCCATATCTCTT
CAC65 ⁴	GAAAAGGATGTAATAAGCTGG	TTTGTCCCCAAATATAGGTAG
CAC68 ³	AATTATTTTCTTGTTACATGCATC	AACAGCCTCTAGCAATCATAG
CAC71 ³	ATAGCTCAAGTTGTTGCTAGG	ATATTGTCATGATTGAGCCTC
CAC 72 ³	TCACATTATCAAATAAGTCTCACA	GCTCTCTTTCTCATGCACA

Cont. Tabela 2

Nome Primers	Forward primer	Reverse primer
CAC77 ⁵	CAGAGGTCACAACCATATTG	CTTTAGCTATTTGTTCCAAGG
CAC84 ³	TTGGTTTTTGTATGGA ACTCT	AACCAAATGCTAACATCTCA
CAC25	CATGCTTCCTCTAGTTTAATCA	AACAAATGAAAACCTTGATTCC
CAC27 ⁵	TCCAAGTCCTTGGTTAGC	AAAAACACAACCCACCTAAG
CAC37	CAAGACAAATCAGTTTCAAGTC	CTTTATTCCCTTGTCACTGG
CAC43	TGCATGTTTCAGTACTTATTTTG	AAAAAGCCAGCACTACTCC
CAC46 ³	GATGGTTGGATATCATTCTTG	TTGACCTATCAAATGTGCC
CAC55	CTATGCATCAAACAAGGAG	CAAATCTAGGTAGCTTGAGGT
CAC60	AATCGCAGTCTAAGAAGGTG	GAAAAGGTCACCAATATGAAG
CAC67 ⁵	GGAGAAACGGTATACCAGAG	CCTCATTTAGATGCCCTATC
CAC69 ⁵	TATAAATGGGTAGCCCTGAG	TGAATAGGTTGGTGAATGTG
CAC70 ⁵	AACAAATGAAAACCTTGATTCC	AACTTGCCATGTTTTACTTGT
CAC75	GTTTCACCTTGTACTCTGTCC	GAGAAATGGAAAACCTTTTGTG
CAC82	GATCCCCTTTTTACACTATTTG	GATTAGGGTTAAGGTGAAC
CAC83	AATTGAAACCAACCCAACAA	TTGCCATGTTTTACTTGTAGC
CAC85	AATATCATCCATTTTATGACCA	GAATGATGGTTCTGCCTATT
CAC86	GGTTGGCAAAGAATAAGAAG	GTTCCAGATAGAAGGATCATG
CnCir B3 ¹	CATCTTGCTTTTACCATCC	AATACTGTGCGGTTTTGCTT
CNZ01 ¹	ATGATGATCTCTGGTTAGGCT	AAATGAGGGTTTGAAGGATT
CNZ04 ²	TATATGGGATGCTTTAGTGGA	CAAATCGACAGACATCCTAAA
CNZ06 ²	ATACTCATCATCATAACGACGC	CTCCCACAAAATCATGTTATT
CNZ10 ²	CCTATTGCACCTAAGCAATTA	AATGATTTTCGAAGAGAGGTC
CNZ12 ²	TAGCTTCCTGAGATAAGATGC	GATCATGGAACGAAAACATTA
CNZ29 ²	TAAATGGGTAAGTGTGTTGTGC	CTGTCCTATTTCCCTTTTCATT
CNZ43 ²	TCTTCATTTGATGAGAATGCT	ACCGTATTCACCATTCTAACA
CNZ44 ²	CATCAGTTCCACTCTCATTTTC	CAACAAAAGACATAGGTGGTC
CNZ46 ²	TTGGTTAGTATAGCCATGCAT	AACCATTTGTAGTATACCCCC

¹BAUDOUIN, 2009; ²RIVERA, 1999; ³PERERA *et al*, 1999; ⁴PERERA *et al*, 2000 ⁵MAURO-HERRERA *et al*, 2010.

4.5. Eletroforese

Os produtos da PCR foram diluídos numa relação de 4 µl de amostra para 20 µl de Buffer E do kit DNF 900 e dis e submetidos a um sistema de eletroforese capilar (Fragment Analyzer - AATI), no qual fragmentos amplificados de 35 a 500pb são separados com uma resolução de aproximadamente 2bp. Cada corrida teve duração de 2h e 20min sob uma voltagem de 8 kw.

4.6. Análise dos Dados

Para análise dos bulks foi realizada no programa GenAIEx (Peakall e Smouse, 2012), a análise da distância genética entre 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 formatada para servir de dados de entrada para os programas que promovem as análises de agrupamento (Peakall e Smouse, 2012).

Para a análise de agrupamento feitas por meio das matrizes de distância genética, obtidas do programa GenAIEx (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).

A análise descritiva foi realizada nos programas Genalex (Peakall e Smouse, 2012), PowerMarker (Liu e Muse, 2005), e PopGene (Yeh et al, 1997). A análise promovida por tais programas proporcionou a estimação de índices de diversidade como PIC, Probabilidade de Identidade (I) e Probabilidade de Exclusão (Q), e caracterização dos alelos como tamanho, variação, alelos específicos, possibilitando a realização de inferências mais acuradas sobre as populações avaliadas e sobre os *primers* utilizados.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Triagem em Bulks

Dos 57 *primers* utilizados no trabalho, 27 deles foram polimórficos (Tabela 3). Os *primers* polimórficos geraram um total de 63 alelos, dos quais 48 alelos são efetivos e uma média de 2 alelos por *locus* (Tabela 3). Alguns dos *primers* utilizados foram classificados como altamente polimórficos em trabalhos de diversidade genética (Perera *et al*, 2000, 2003, 2008; Meerow *et al*, 2003; Konan *et al*, 2007; Rajesh *et al*, 2008; Dasanayaka *et al*, 2009; Perera, 2010; Kumar *et al*, 2011;).

Os valores de PIC variaram de 0,132 a 0,618 com uma média de 0,340. O maior valor foi obtido pelo *primer* CnCirE10 e os menores pelos *primers* CnCir E12, CAC 67 e CAC 82 (Tabela 4). Os loci CnCir E12, CAC 67 e CAC 82 apresentaram a maior probabilidade de identidade ($I=0,746$), o que é justificável pelo seu baixo polimorfismo. De maneira complementar, a probabilidade combinada de exclusão apresentou valores baixos, sendo o *primer* CnCirE10 como mais viável na distinguibilidade entre as populações.

Tabela 3. *Locus*, variação dos amplicons (pb), maior frequência alélica, número de alelos e número de alelos efetivos por *locus*.

Locus	Variação dos amplicons (pb)	Maior Frequência alélica	Nº Alelos	Alelos efetivos
CnCir A3	223-233	0,615	3,000	2,195
CnCir A9	254-259	0,500	2,000	2,000
CnCir E10	226-237	0,385	4,000	3,101
CnCir E12	142-151	0,923	2,000	1,166
CnCir G11	176-182	0,615	2,000	1,899
CnCir H11	177-244	0,700	4,000	1,641
CAC3	135-194	0,500	2,000	2,000
CAC4	183-213	0,846	2,000	1,352
CAC13	148-162	0,500	2,000	2,000
CAC21	148-157	0,500	2,000	2,000
CAC23	116-163	0,500	2,000	2,000
CAC65	143-165	0,846	2,000	1,352
CAC77	137-149	0,500	2,000	2,000
CAC27	117-123	0,500	2,000	2,000
CAC60	143-153	0,500	2,000	2,000
CAC67	163-172	0,923	2,000	1,166
CAC69	163-172	0,846	2,000	1,352
CAC70	152-162	0,500	2,000	2,000
CAC75	172-197	0,808	3,000	1,489
CAC82	211-219	0,923	2,000	1,166
CAC83	161-166	0,769	3,000	1,610
CNZ01	114-116	0,615	2,000	1,899
CNZ04	150-166	0,500	2,000	2,000
CNZ06	84-97	0,500	2,000	2,000
CNZ10	109-141	0,769	3,000	1,610
CNZ29	122-143	0,769	3,000	1,610
CNZ46	96-104	0,500	2,000	2,000
Total	-	17,354	63,000	48,604
Média	-	0,615	2,000	2,000

Tabela 4. Locus, Conteúdo de Informação Polimórfica (PIC), Probabilidade de Identidade (I) e Probabilidade de Exclusão (Q).

Locus	PIC	I	Q
CnCir A3	0,484	0,268	0,290
CnCir A9	0,375	0,375	0,188
CnCir E10	0,618	0,164	0,415
CnCir E12	0,132	0,746	0,066
CnCir G11	0,361	0,389	0,181
CnCir H11	0,450	0,393	0,222
CAC4	0,226	0,581	0,113
CAC13	0,375	0,375	0,188
CAC21	0,375	0,375	0,188
CAC23	0,375	0,375	0,188
CAC65	0,226	0,581	0,113
CAC77	0,375	0,375	0,188
CAC27	0,375	0,375	0,188
CAC60	0,375	0,375	0,188
CAC67	0,132	0,746	0,066
CAC69	0,226	0,581	0,113
CAC70	0,375	0,375	0,188
CAC75	0,303	0,476	0,170
CAC82	0,132	0,746	0,066
CAC83	0,343	0,421	0,194
CNZ01	0,361	0,389	0,181
CNZ04	0,375	0,375	0,188
CNZ06	0,375	0,375	0,188
CNZ10	0,343	0,421	0,194
CNZ29	0,343	0,421	0,194
CNZ46	0,375	0,375	0,188

Dentre os 27 *primers* polimórficos analisados, 7 locos apresentaram alelos específicos para a subvariedade amarela, 9 locos com alelos específicos para a subvariedade vermelha e 3 locos com alelos específicos para a

subvariedade verde (Tabela 5). Essas marcas permitiram a separação das 3 subvariedades de coqueiro anão.

Tabela 5 – *Primers* que apresentaram alelos específicos para tipo de cultivar de coqueiro Anão do Brasil.

Cultivar	Locus com alelos privados
Anão Verde	CnCir A3, CnCir G11, CNZ01
Anão Vermelho	CnCir A3, CnCir E10, CnCir H11, CAC67, CAC75, CAC82, CAC83, CNZ10, CNZ29
Anão Amarelo	CnCir E12, CnCir H11, CAC4, CAC65, CAC69, CAC83, CNZ10

Alguns estudos têm sido realizados para identificação de marcas específicas que diferenciem principalmente as variedades anãs e gigantes, a fim de aplicá-las na verificação da autenticidade de híbridos intervarietais (Perera, 2010; Rajesh *et al*, 2012, 2013). Entretanto, é de vasta importância identificar marcas específicas para as diferentes subvariedades de coqueiro anão quando se trabalha com híbridos intravarietais, já que nem sempre o marcador morfológico funciona com uma confiabilidade de 100%.

A coloração da planta é um exemplo de marcador morfológico que pode auxiliar na identificação de híbridos. Com base nisso, (Aragão *et al*, 1999) testaram todas as combinações possíveis entre todos os genótipos e fenótipos gerados pelos 2 genes que controlam a herança da cor, inclusive recíprocos. Com isso, eles concluíram que a depender da situação a identificação do híbrido através de um marcador morfológico não se torna viável. Isso se deve principalmente devido ao nível de heterozigose dos locos, e quando a progênie segrega fica mais difícil identificar com confiabilidade as sementes puras advindas de tal cruzamento.

A tabela 6 mostra que para os cruzamentos entre Anão Verde x Anão Vermelho e seu recíproco a identificação por meio de marcador morfológico (cor do coleto após germinação) é efetiva.

Tabela 6 – Marcadores morfológicos e Moleculares na identificação de combinações híbridas intravarietais

Genitor Feminino	Genitor Masculino		Identificação
Anão Verde	Anão Vermelho	Fenotípica	Marrom
Anão Vermelho	Anão Verde	Fenotípica	Marrom
Anão Verde	Anão Amarelo	Molecular	CnCir A3, CnCir E12, CnCir G11, CnCir H11, CAC4, CAC65, CAC69, CAC83, CNZ01, CNZ10
Anão Amarelo	Anão Verde	Fenotípica	Verde
Anão Vermelho	Anão Amarelo	Molecular	CnCir A3, CnCir E10, CnCir E12, CnCir H11, CAC4, CAC65, CAC67, CAC69, CAC75, CAC82, CAC83, CNZ10, CNZ29
Anão Amarelo	Anão Vermelho	Fenotípica	Vermelho

Para os cruzamentos entre Anão Verde x Anão Amarelo e Anão Vermelho x Anão Amarelo, o marcador morfológico só é efetivo quando o Anão Amarelo é utilizado como genitor feminino. Isso acontece porque quando o genitor feminino não é o Anão Amarelo, as sementes advindas de autofecundação apresentarão o mesmo padrão morfológico das sementes híbridas, visto que o fenótipo amarelo apresenta genes recessivos, o que dificulta a identificação via esse tipo de marcador. Portanto, os marcadores selecionados no presente estudo, podem ser aplicados como uma excelente ferramenta para aferir a legitimidade dessas combinações híbridas, sobretudo àquelas que nem mesmo os marcadores morfológicos são capazes de detectar.

Para se obter 100% de legitimidade das sementes híbridas é importante conhecer os marcadores que distinguem os possíveis parentais. A tabela 7 mostra quais *primers* microssatélites apresentaram marcas específicas para cada população. Vale ressaltar que tais populações estão sendo utilizadas no programa de Melhoramento de Coco da UENF em um delineamento em TopCross, cujo testador comum foi o BJD-Jiqui.

A tabela 7 mostra detalhadamente os alelos identificados para cada população e também cada par de *primer* que pode ser utilizado para identificar os cruzamentos obtidos no TopCross. Partindo do fato de que todas as populações foram cruzadas com o BGD-Jiqui, basta uma população apresentar um alelo diferente do alelo apresentado pelo testador, para que esse *primer* seja satisfatório para a verificação das sementes advindas de tal cruzamento.

Dessa forma, o conhecimento desses alelos permitirá que a verificação da pureza genética das sementes seja feita com maior confiabilidade, evitando maiores problemas como: desperdício de tempo, de recursos e perda de desejável pureza genética no experimento.

Tabela 7 – Primers que apresentaram alelos específicos para cada população de coqueiro Anão.

PRIMERS	BGD- JIQUI	BGD- PARAIPABA	GRD	BGD- TRAIRI	CRD	GYD	BGD- BAHIA	MRD	MYD	BGD- SOUZA- FS	BGD- SOUZA- SD	BGD- PARA- 01	BGD- PARA- 02
CnCir A3	226	226	223	226	233	233	226	223	233	226	226	226	226
CnCir E10	232/237	232/237	226/232	232/237	226/232	232/237	232/237	226/232	232/237	232/237	232/237	232/237	232/237
CnCir E12	150	150	150	150	150	150	150	150	142	150	150	150	150
CnCir G11	176	176	182	176	182	182	176	182	182	176	176	176	176
CnCir H11	176	176	176	176	244	216	176	176	158	176	176	176	176
CAC 4	183	183	183	183	183	207	183	183	207	183	183	183	183
CAC 65	143	143	143	143	143	165	143	143	165	143	143	143	143
CAC 67	172	172	172	172	163	173	173	173	173	173	173	173	173
CAC 69	173	173	173	173	173	163	173	173	163	173	173	173	173
CAC 75	172	172	173/196	172	183	172	172	196	172	172	172	172	172
CAC 82	218	218	218	218	211	218	218	218	218	218	218	218	218
CAC 83	165	165	165	165	163	161	165	165	161	165	165	165	165
CNZ 01	116	116	114	116	114	114	116	114	114	116	116	116	116
CNZ10	141	141	141	141	109	139	141	141	139	141	141	141	141
CNZ 29	122	122	143	122	131	122	122	143	143	122	122	122	122

A análise de agrupamento resultou no dendrograma. Foi possível verificar a formação de quatro grupos de acordo em concordância com as cores características das variedades e obedecendo ao nível de relacionamento genético entre os genótipos. O primeiro grupo foi formado por todas as populações de Anão Verde. O segundo grupo foi formado pelas populações Anão Vermelho da Malásia e Anão Vermelho de Gramame. O terceiro grupo pelo Anão Amarelo da Malásia e Anão Amarelo de Gramame. Já o quarto e último grupo foram constituídos apenas pelo Anão Vermelho de Camarões, mostrando-se diferente dos demais (Figura 1).

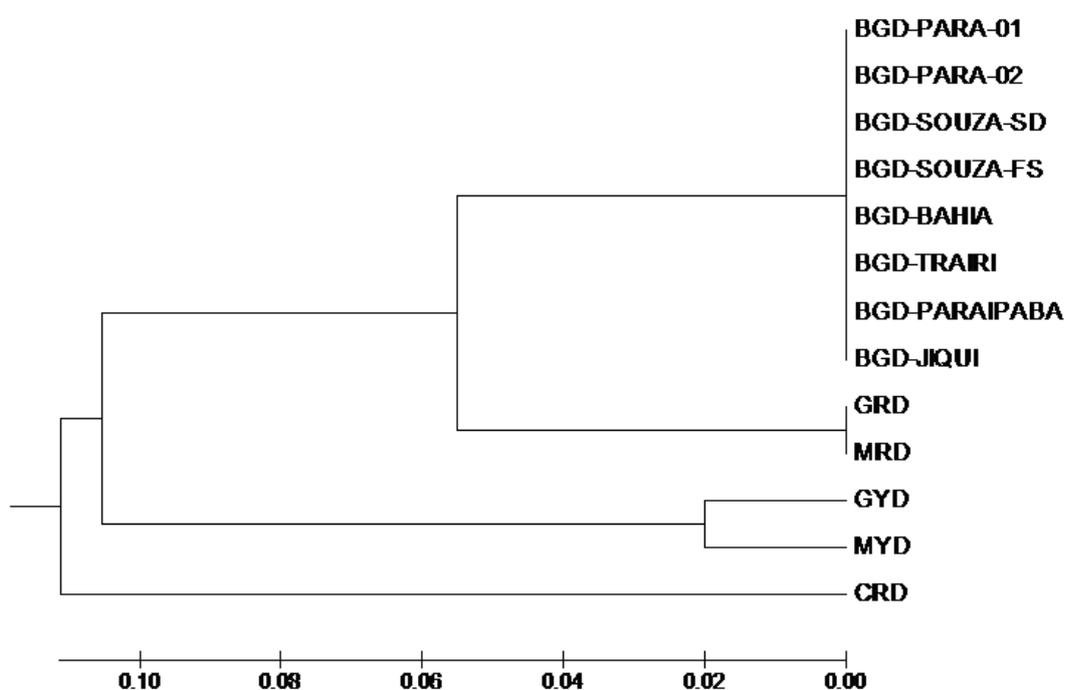


Figura 1 - Dendrograma apresentando o agrupamento das Populações de Coqueiro estudadas pelo método UPGMA.

Estudos anteriores, os quais também avaliaram genótipos de coqueiro anão através de dados morfológicos reportaram esta mesma tendência de agrupamento (Cambui *et al*, 2007; Sobral *et al*, 2012).

Sobral (2010) trabalhando com caracterização morfo-agronômica das populações de coqueiro Anão vermelho da Malásia (MRD), Anão vermelho de Gramame (GRD), Anão amarelo de Gramame (GYD), Anão amarelo da Malásia (MYD), Anão verde de Jiqui (BGDJ) e Anão Vermelho de Camarões (CRD), aponta que a análise de agrupamento pelo método UPGMA permitiu a formação

de três grupos principais. O primeiro grupo foi formado pelos acessos MRD, GRD, GYD, MYD. O segundo, pelo acesso BGDJ e o terceiro pelo acesso CRD.

Cambui *et al* (2007), apresentaram um agrupamento distinto também baseado em dados morfo-agronômico. O método proposto por Tocher aplicado à matriz de distâncias Euclidianas possibilitou a divisão das seis cultivares em três grupos de similaridade. O grupo I envolveu as cultivares GRD, MYG e GYD. O grupo II, constituído pelas cultivares MRD e BDGJ e o grupo III, a cultivar CRD.

Os trabalhos citados obtiveram resultados semelhantes, porém não com o mesmo poder discriminatório das populações em estudo. No entanto, em ambos os trabalhos, assim como na figura 1, o CRD se mostra geneticamente distinto de todas as outras populações. Devido a essa tendência, Cambui (2007) já aponta esse acesso em seu estudo como um potencial genitor para hibridação intravarietal com os demais anões.

No entanto, a ausência de variabilidade encontrada entre as populações de Anão Verde pode ser justificada pelo seu estreito relacionamento genético já ressaltado por alguns autores 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, o que indica que este evento pode ser a razão para os baixos níveis de diversidade genética em anões. Isto implica uma menor distância genética entre os acessos de coqueiro anão do Brasil e, conseqüentemente, um maior nível de relacionamento genético.

5.2. Validação planta a planta

Para a etapa de validação das amostras foram considerados somente os *primers* polimórficos entre a população BGD-Jiqui e as populações de coqueiro anão amarelo, tendo em vista o topcross em andamento desenvolvido pelo Programa de Melhoramento Genético da UENF. Como não foram encontrados *primers* capazes de diferenciar cruzamentos Anão Verde x Anão Verde e considerando que para os cruzamentos Anão Verde x Anão Vermelho o marcador morfológico é efetivo, a genotipagem planta a planta das populações de Anão Verde e Anão Vermelho não foram realizadas.

Nessa etapa foram genotipadas as 60 amostras, sendo 20 do BGD-Jiqui, 20 do MYD e 20 do GYD utilizando os 10 *primers* apontados na tabela 5.

De acordo com o perfil eletroforético dos bulks, os *primers* citados anteriormente na tabela 6 seriam confiáveis para a identificação dos híbridos. Entretanto, na genotipagem das amostras individuais somente o *primer* CnCir A3 dentre os 10 *primers* tinha seus alelos fixados nas populações a fim de promover uma confiabilidade maior na identificação das sementes híbridas (Figuras 2 e 3).

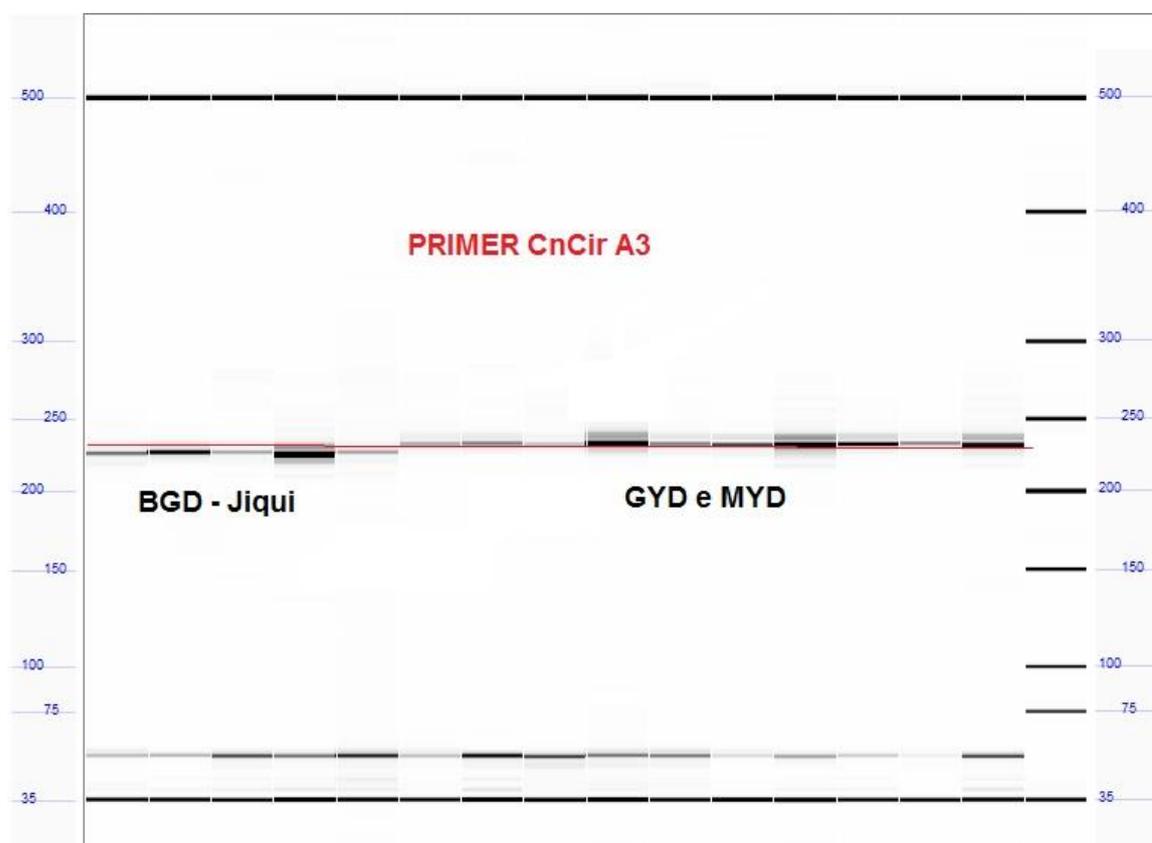


Figura 2 – Gel virtual da eletroforese capilar gerado pelo software ProSize 2.0 amostrando 5 indivíduos das populações BGD-Jiqui, GYD e MYD.

A baixa fixação dos alelos em cada loco pode ser uma consequência da metodologia de confecção dos bulks. Como os bulks foram compostos por amostras foliares que foram maceradas juntas, isso pode ter ocasionado na baixa representatividade de alguns indivíduos mascarando a análise feita na etapa da triagem.

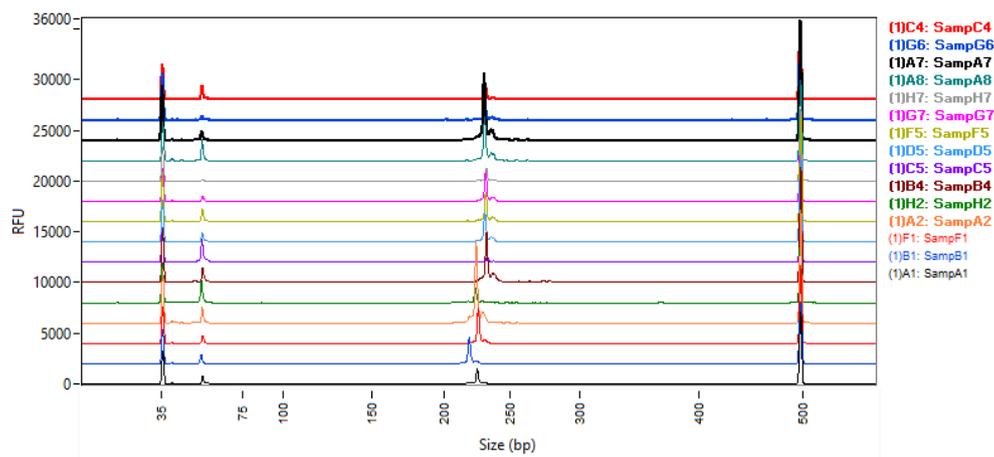


Figura 3 – Eletroferograma gerado pelo software ProSize 2.0 amostrando 5 indivíduos das populações BGD-Jiqui, GYD e MYD.

Por outro lado, esse problema pode ser solucionado quando os genótipos dos parentais são conhecidos antes da hibridação. Fazendo-se uma análise genética preliminar dos parentais é possível selecionar somente aqueles que apresentam o alelo de interesse para participar dos cruzamentos. Dessa forma todos os *primers* identificados na etapa de triagem poderão ser utilizados com sucesso na identificação das sementes híbridas.

6. CONCLUSÃO

A partir da identificação de 27 *primers* polimórficos, foi obtido o DNA Fingerprint de 13 populações de coqueiro anão. O conhecimento dessas marcas sugere que, 10 pares de *primers* aplicáveis na identificação de híbridos entre Anão Verde x Anão Amarelo e 12 pares de *primers* aplicáveis na identificação de híbridos entre Anão Verde x Anão Vermelho. Também foi possível identificar marcas capazes de distinguir os cruzamentos entre Anão Verde x Anão Amarelo e Anão Vermelho x Anão Amarelo, já que o marcador morfológico só é efetivo quando o Anão Amarelo é utilizado como genitor feminino.

No entanto, na avaliação das amostras individuais somente o *primer* CnCir A3 tinha seus alelos fixados nas populações a fim de promover uma confiabilidade maior na identificação das sementes híbridas dos cruzamentos de Anão-verde-do-Brasil-de-Jiqui e Anão-Amarelo-da-Malásia e Anão-verde-do-Brasil-de-Jiqui e Anão-Amarelo-de-Gramame.

Portanto, presume-se que através da técnica de *DNA Fingerprint* a partir dos *primers* microssatélites utilizados, será possível identificar sementes puras advindas de híbridos intravarietais, principalmente híbridos resultantes dos cruzamentos entre Anão Verde x Anão Amarelo de forma precisa e segura, visto que para esses cruzamentos, sendo o Anão Verde genitor feminino (caso do presente estudo), a metodologia de identificação conforme a coloração da planta jovem não é uma alternativa 100% viável. Por outro lado, até o momento, marcadores específicos para diferenciar cruzamentos intravarietais como: Anão Verde x Anão Verde ainda não foram identificadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agriannual (2012) Anuário da Agricultura Brasileira: Coco-da-baía. São Paulo: FNP, Consultoria e Agroinformativos,. p. 285-291.
- Aragão, W. M.; Tupinambá, E.A.; Ângelo, P.C. da S.; Ribeiro, F.E. (1997) Seleção de cultivares de coqueiro para diferentes ecossistemas do Brasil. *In*: Queiroz, M. A.; Goedert, C. O.; Ramos, S. R. R. Recursos genéticos e melhoramento de plantas para o Nordeste brasileiro. Petrolina: Embrapa Semi-Árido.
- Aragão, W.M.; Câmara, T. M.; Ribeiro, F. E. (1999) Marcadores Morfológicos em Coqueiros (*Cocos nucifera* L .). **Documentos**, v. 7, p. 22.
- Aragão, W.M., Boaventura, R.F., Aragão, R.R.B., Barros, K.B.R. (2001) Variabilidade e correlações entre caracteres morfológicos reprodutivos em cultivares de coqueiro-anão (*Cocos nucifera* L., var. nana). *Agrotrópica* 13: 27-32.
- Aragão, W.M., Ribeiro, F.E., Tupinambá, E.A., Siqueira, E.R. de (2002) Variedades e híbridos de coqueiro. *In*: Aragão, W.M. (Org.). Coco: pós-colheita. 29ed. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros.

- Aragão, W.M., Ribeiro, F.E., Tupinambá, E.A., Siqueira, E.R. de (2003) Variedades e híbridos. *In*: Fontes, H.R., Ribeiro, F.E., Ferreira, J.M. (Org.) *Coco: produção, aspectos técnicos*. Aracaju; Brasília: Embrapa Tabuleiros Costeiros; Embrapa Informação Tecnologia.
- 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.
- Azevedo, C. D. O. (2014) *Diversidade genética de populações de coqueiro (Cocos nucifera L.) via marcadores SSR*. Tese (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Campos dos Goytacazes - RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 58p.
- Baudouin, L. (2009) Consolidate microsatellite data on coconut diversity: Appendices. Montpellier: CIRAD.
- Batugal, P., Jayashree, K. (2005) COGENT's multi-site International Coconut Genebank. *In*: Batugal, P., Ramanatha, R., Oliver, J. (Org.) *Coconut Genetic Resources*. 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.
- BATUGAL, P. (2006) The International Coconut Genetic Resources Network (COGENT): its history, achievements and future plans. *In*: ADKINS, S.W.; FOALE, M.; SAMOSIR, Y.M.S. *Coconut revival: new possibilities for the 'tree of life'*. 125 ed. Canberra: Australian Centre For International Agricultural Research, 10-14p.

- Benassi, A.C. (2012) Informes sobre a produção de coco: <http://www.todafruta.com.br/porta/ICNoticiaAberta.asp?idNoticia=26219> em novembro de 2013.
- Bourdeix, R. (1988) Genetic determinism in dwarf coconut germ colour. *Oleagineux* 43:371–374.
- Bourdeix, R., Konan, J.L. and N'Cho, Y.P. (2005) Coconut: A guide to traditional and improved varieties. Editions diversiflora. Montpellier, France. 104p.
- Cambui, É.V.F. (2007) *DIVERSIDADE GENÉTICA ENTRE CULTIVARES DE COQUEIRO ANÃO (Cocos nucifera L., VAR. NANA)*. Tese (Mestrado em Agroecossistemas) - Aracaju - SE, UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE, 67p.
- Cambui, É.V.F., Aragão, W. M., Lea, M. DE L. DA S. (2007) Variabilidade Genética entre Cultivares de Coqueiro Anão (*Cocos nucifera* L. - Var. Nana). *Revista Brasileira de Biociências*, 5: 165–167.
- Castro, C.P. (2007) *COMPORTAMENTO DE CULTIVARES DE COQUEIRO ANÃO (Cocos nucifera L.) NOS TABULEIROS COSTEIROS*. Tese (Mestrado em Agroecossistemas) - Aracaju - SE, UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE, 87p.
- Chan, E., Elevitch, C.R. (2006) *Cocos nucifera* (coconut). *Species Profiles For Pacific Island Agroforestry*, Holualoa, 27 p.
- Cruz, C.D. (2008) Programa GENES: Diversidade genética. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.
- 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. *Journal of Natural Science Foundation Sri Lanka*, 37(2): 99–109.

- Doyle, J.J., Doyle, J.L., Hortorium, L.H.B. (1987) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12 (1): 13-15.
- Faleiro, F.G. (2007) Marcadores Genético-moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos. Embrapa Cerrados, Planaltina-DF, 102p.
- FAOSTAT - Culturas ano 2012: www.faostat.org em 14/05/2012 página mantida pela FAO.
- FAOSTAT - Culturas ano 2011: <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx> em 11/2013 página mantida pela FAO.
- Farias, W.S., Gaíva, H.N., Pereira, W.E. (2002) Comportamento de cinco genótipos de coqueiro (*Cocos nucifera* L.) na fase de germinação e de crescimento de mudas, sob diferentes sistemas de produção. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 24(2): 458-462.
- Ferreira, J.M.S., Warwick, D.R.N., Siqueira, L.A. (Ed.). A cultura do coqueiro no Brasil. 2. ed. Brasília, DF: SPI, 292 p.
- Fontenele, R.E.S. (2005) CULTURA DO COCO NO BRASIL: CARACTERIZAÇÃO DO MERCADO ATUAL E PERSPECTIVAS FUTURAS CULTURA DO COCO NO BRASIL. *Anais do XII Congresso da SOBER*, p. 1–20.
- Fontes, H.R., Ferreira, J.M.S., Siqueira, L.A. (2002) Sistema de produção para a cultura do coqueiro. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros. 63p. (Embrapa Tabuleiros Costeiros. Sistemas de Produção, 01). Disponível em <http://www.cpatc.embrapa.br>
- Fontes, H.R., Ribeiro, F.E., Fernandes, M.F. (eds) (2003) Coco Produção - aspectos técnicos. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 106p. (Frutas do Brasil).

- Fontes, H.R.; Ferreira, J.M.S. A cultura do coco. Embrapa Informação Tecnológica. Brasília, DF: 108p (Coleção Plantar).
- 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).
- Guimarães, C.T., Moreira, M.A. (2005) Genética Molecular aplicada ao melhoramento de plantas. *In*: BORÉM, A. (Ed.). Melhoramento de espécies cultivadas. (2ª ed.). Viçosa, MG: UFV, 969 p.
- Harries, H.C. (1978) The evolution, dissemination and classification of *Cocos nucifera* L. *Bot Rev* 44: 265–319.
- Harries, H.C., Clement, C.R. (2013) Long-distance dispersal of the coconut palm by migration within the coral atoll ecosystem. ***Annals of botany***, 6p.
- Hoffmann, L.V.; Barroso, P.A.V. (2006) Marcadores Moleculares como Ferramentas para Estudos de Genética de Plantas. Campina Grande, 35p. (Embrapa Algodão. **Documentos**, 147)
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - *Levantamento Sistemático da Produção Agrícola*. Rio de Janeiro, v.25, n.12, 2012, p.1-84: ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola em 14 de fevereiro de 2013 página mantida pelo IBGE.
- JUCÁ, M.P., GAÍVA, H.N., PEREIRA, W.E., MILESKI, A. (2002) Comportamento vegetativo de seis cultivares de coqueiro-anão (*Cocos nucifera* L.). *Revista Brasileira de Fruticultura*, 24: 463 - 467.
- Konan, K.J.N., Konan, K.J.L. Edmond, K. K., Lebrun, P., Abdourahamane, S. (2007) Coconut Microsatellite Diversity Analysis Technology Transfer to Côte D'ivoire. *Biotechnology*, 6: 383–388.

- Kumar, S.P., Manimekalai, R., Ranjitha, K.B.D. (2011) Microsatellite Marker Characterization of South Pacific Coconut (*Cocos nucifera* L.) Accessions. *International Journal of Plant Breeding and Genetics*, 5: 34–43.
- Kumar, S., Banks, T.W., Cloutier, S. (2012) SNP Discovery through Next-Generation Sequencing and Its Applications. *Journal of Plant Genomics*, 2012: 15 p. Article ID 831460.
- 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.
- Liang, M.S., Zeng, Y., Zhou, X., Hou, L.J.; Li, X. (2001) Genetic markers and their applications in identifying crop cultivars. *Chinese Bull Bot.*, 18: 257–265.
- Liu, K, Muse, S.P. (2005) PowerMarker: an integrated analysis environment for genetic marker analysis. *Bioinformatics Applications Note*, 21(9): 2128–2129.
- Liyanaige, D.V. (1967) Identification of genotypes of coconut palms suitable for breeding. *Experimental Agriculture*, 3(3): 205-210.
- Loiola, C.M. (2005) Seleção de cultivares de coqueiro com menor porte. Monografia. (Bacharelado em Agronomia) - São Cristóvão - SE, Universidade Federal de Sergipe, 22p.
- Martins, C.R., Jesus Junior, L. A. DE. (2011) Comércio internacional - Panorama 2010. *Documentos*, 164: 32p.
- Mauro-Herrera M, Meerow A W. Perera L, Russell J and Schnell R J (2010) Ambiguous genetic relationships among coconut (*Cocos nucifera* L.) cultivars: the effects of out-crossing, sample source and size, and method of analysis. *Genetic Resources and Crop Evolution* 57 (2): 203-217

- Meerow, A. W. , Wisser, R.J., Brown, J. S., Kuhn, D.N., Schnell, R. J., 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. *Theoretical and applied genetics*, 106 (4):715–726.
- Nuce De Lamothe, M., Rognon, F. (1977) Les cocotiers nains à Port – Bouët Nain Jaune Ghana, Nain Rouge Malais, Nain vert Guiné Equatoriale, Nain Rouge Cameroun. *Oléagineux*, 32(8-9): 367-373.
- Nunes, A.O. Caracterização Morfológica, Agronômica e Molecular de Acessos de Coqueiro-gigante do Banco Ativo de Germoplasma de Coco da Embrapa Tabuleiros Costeiros. Monografia. (Bacharelado em Biologia) - São Cristóvão - SE, Universidade Federal de Sergipe, 37p.
- Passos, E.E.M. (1998) Morfologia do Coqueiro. *In*: Ferreira, J.M.S., Warwick, D.R.N., Siqueira, L.A. *A cultura do coqueiro no Brasil*. 2º ed. Brasília: Spi, p. 57-64.
- Peakall, R., Smouse, P.E. (2012) GenAlEx 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., Powell, W. (1999) Identification and characterisation of microsatellites in coconut (*Cocos nucifera* L.) and analysis of coconut population in Sri Lanka. *Molecular Ecology*, 8: 344-346
- Perera, L., Russell, J.R., Provan, J., 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., Russell, J.R., Provan, J., Powell, W. (2003) Studying genetic relationships among coconut varieties / populations using microsatellite markers. *Euphytica*, 132: 121–128.

- Perera, P.I.P., Perera, L., Hoher, V., Verdeil, J.L., Yakandawala, D.M.D., Weerakoon, L.K. (2008) Use of SSR markers to determine the anther-derived homozygous lines in coconut. *Plant cell reports*, 27(11): 1697–1703.
- Perera, L. Hybrid Testing and Variety Identification of Coconut (*Cocos nucifer a L.*) in Sri Lanka Using Microsatellite Markers (2010). *Cord*, 26(1): 39–43.
- Powell, W., Machray, G.C., Provan, J. (1996) Polymorphism revealed by Simple Sequence Repeats. *Trends In Plant Science*, 1: 215-222.
- Rabelo, T.K., Melo, M.F.V., Loiola, C.M., Aragão, W.M. (2006) Germinação de sementes de cultivares de coqueiro. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, Comunicado Técnico, 57.
- Rajesh, M. K., Arunachalam, V., Nagarajan, P., Lebrun, P., Samsudeen, K., Thamban, C. (2008) Genetic survey of 10 Indian coconut landraces by simple sequence repeats (SSRs). *Scientia Horticulturae*, 118 (4): 282–287.
- Rajesh, M. K., Thomas, R.J., Rijith, J., Shareefa, M., Jacob, P.M. (2012) Genetic purity assessment of D x T hybrids in coconut with SSR markers. *Indian Jornal Genetic*, 72: 472–474.
- Rajesh, M.K., Jerard, B.A., Preethi, P., Thomas, R.J., Fayas, T.P. (2013). Development of a RAPD-derived SCAR marker associated with tall-type palm trait in coconut. *Scientia Horticulturae*, 150: 312–316.
- Ribeiro, F.E.; Siqueira, E.R. de. (1995) Introdução, coleta e conservação de germoplasma de coqueiro no Brasil. Aracaju: Embrapa CPATC, 15p. (Documentos, 3).
- Ribeiro, F.E., Siqueira. E.R. de, Aragao. W.M. de, Tupinamba. E.A. (1999) O coqueiro-anão no Brasil. Aracaju: Embrapa-CPATC. (Documentos, 81).

- Ribeiro, F.E., Soares, A.R., Ramalho, M.A.P. (1999) Divergência genética entre populações de coqueiro-gigante-do-brasil. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 34: 1615–1622.
- Ribeiro, F.E. (2002) Coqueiro. *In*: Bruckner, C.H. (Ed.). Melhoramento de fruteiras tropicais. Viçosa, MG: UFV, 444 p.
- Rivera, R. et al. Isolation and characterization of polymorphic microsatellites in *Cocos nucifera* L. *Genome*, 42(4), p. 668-675, 1999.
- Santos, G.A., Carpio, C.B., Ilagan, M.C., Cano, S.B., Delacruz, B.V. (1982) Flowering and early performance of four IRHO coconuts hybrids in the Philippines. *Oléagineux*, 37(12):571-580.
- Siqueira, E.R., Ribeiro, F.E., Aragão, W.M., Tupinambá, E.A. (1998) Melhoramento Genético do coqueiro. *In*: Ferreira, J.M.S., Warwick, D.R.N., Siqueira, L.A. *A cultura do coqueiro no Brasil*. 2ªed. Brasília: Spi, p. 57-64.
- Siqueira, L.A., Aragão, W.M., Tupinambá, E.A. (2002) A introdução do coqueiro no Brasil: Importância agrônômica e histórica. Aracaju-SE: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 24 p. (Documentos).
- Sobral, K.M.B. (2010) *Divergência genética entre acessos de coqueiro anão para caracteres morfológicos e agrônômicos na baixada litorânea de sergipe*. Tese (Mestrado em Agroecossistemas) – São Cristóvão – SE, Universidade Federal de Sergipe, 98p.
- 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.
- Uhl NW, Dransfield J (1987) *Genera Palmarum: a classification of palms based on the work of Herald E. Lawrence*: Moore Jr. Allen Press, 1987. 610p.

- Yeh F C, Yang R C, Boyle T B, Ye ZH, Mao JX (1997) POPGENE: The user-friendly shareware for population genetic analysis. Molecular biology and biotechnology centre, Canada, 10..
- ZHAO Z.Q.; Zheng, H.L.; Zhang, C.G. (2000) Development of molecular markers and their application in botany research. *Fujian Sci&Technol Trop Crops.*, 25: 13–16.
- 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.
- Wadt, L.H.O.; Sakiyama N.; Pereira, M.G.; Tupinambá, E.A.; Ribeiro, F.E.; Aragão, W.M. (1999) RAPD markers in the genetic diversity study of coconut. In: *International Symposium on Coconut Biotechnology*. 1999, Merida México. *Current Plant Science and Biotechnology in Agricultura*, v.35, p.89-98.
- Whitehead, R.A. (1965) Flowering in *Cocos nucifera* L. In: *Jamaica. Tropical Agriculture* .Trinidad 42: 19-29p.