

## Transferibilidade de marcadores microssatélites de coco (*Cocos nucifera*) para butiá (*Butia odorata*)

Claudete Clarice Mistura<sup>1</sup>; Rosa Lía Barbieri<sup>2</sup>; Caroline Marques Castro<sup>2</sup>; Daniela Priori<sup>1</sup>; Juliana Castelo Branco Villela<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Federal de Pelotas. Campus Universitário Capão do Leão, s/n, CEP: 96160-000. Capão do Leão, RS. E-mail: c.mistura@uol.com.br; dani\_priori@yahoo.com.br

<sup>2</sup> Embrapa Clima Temperado. C.P. 403. BR 392, Km 78. CEP: 96001-970 - Pelotas, RS. E-mail: lia.barbieri@cpact.embrapa.br; caroline.castro@cpact.embrapa.br

<sup>3</sup>Bolsista Pós-doutorado CNPq. E-mail: jcbrancov@gmail.com

**Resumo:** Os frutos de palmeiras do gênero *Butia* são utilizados na alimentação e as folhas são usadas em artesanato. O objetivo deste trabalho foi avaliar a transposição de marcadores microssatélites desenvolvidos para o genoma de coco (*Cocos nucifera* L.) em butiá [*Butia odorata* (Barb. Rodr.) Noblick], para aplicação em estudos de caracterização molecular. Foram testados 50 pares de *primers* desenvolvidos para coco em 30 acessos de butiá coletados em três áreas distintas em uma população natural desta palmeira ocorrente no município de Tapes (RS). Dos 50 pares de *primers* avaliados, 28 amplificaram, sendo que oito deles apresentaram bandas inespecíficas e não foram considerados na análise estatística. A transferibilidade dos *primers* de coco testados em butiá foi de 40%. Os 20 pares de *primers* utilizados permitiram identificar 136 alelos, sendo o número médio de alelos por *locus* igual a sete. O número de alelos por *locus* variou entre cinco e nove. Os *loci* CNZ10 e CNZ43 apresentaram a maior diversidade alélica, com nove alelos, e os *loci* CNZ23, CNZ29 e CNZ46 evidenciaram a menor, com cinco. O conteúdo de informação polimórfica (PIC) variou de 0,97 a 0,98, com média de 0,975. A análise realizada com os 20 pares de *primers* de microssatélites indica que a diferença entre os indivíduos é muito maior dentro de cada área avaliada do que entre áreas distintas. Os marcadores microssatélites desenvolvidos para o genoma de coco podem ser utilizados com sucesso para análises genéticas em butiá.

Palavras chave: Arecaceae, recursos genéticos, SSR, variabilidade genética, *primers*

## Transferability of microsatellite markers developed developed for coconut (*Cocos nucifera*) to butiá (*Butia odorata*)

**Abstract:** The palm fruits of the genus *Butia* are used for food and its leaves are used in craftsmanship. The aim of this study was to evaluate the transferability of microsatellite markers developed for the genome of coconut (*Cocos nucifera* L.) to butiá [*Butia odorata* (Barb. Rodr.) Noblick], for application in molecular characterization. Fifty coconut primer pairs were tested on 30 accessions of butiá collected in three separate areas from a natural population occurring in Tapes (RS). Among the 50 pairs of primers evaluated, 28 amplified, and eight of them showed nonspecific bands and were not considered in the statistical analysis. The transferability of coconut primers tested on butiá was 40%. The 20 pairs of primers allowed the identification of 136 alleles, with an the average number of alleles per locus of seven. The number of alleles per locus varied from five to nine. The loci CNZ10 and CNZ43 had the highest allelic diversity, with nine alleles, and loci CNZ23, CNZ29 and CNZ46 showed the lowest diversity, with five alleles. The polymorphic information content (PIC) varied from 0.97 to 0.98, with an average of 0.975. The analysis performed with 20 microsatellite primer pairs shows that the difference between individuals is much higher inside each evaluated area than between different areas. The microsatellite markers developed for the coconut genome can be successfully used for genetic analysis in butiá.

Key words: Arecaceae, genetic resources, SSR, genetic variability, *primers*

## Introdução

*Butia odorata* (Barb. Rodr.) Noblick é uma das 266 espécies de palmeiras que ocorrem no Brasil (Leitman et al., 2010; Noblick, 2011). Seu fruto, conhecido como butiá, é apreciado para consumo in natura, sendo também utilizado no preparo de sucos, licores e geleias. Suas folhas são utilizadas no artesanato trançado e, no passado, foram usadas para estofaria (Lorenzi et al., 2010). Vastos butiazais desta espécie existiam no Bioma Pampa, estendendo-se desde o Rio Grande do Sul até o Uruguai. Porém, devido à ação antrópica, há poucos remanescentes (Rossato et al., 2007). Considerando o potencial de uso pouco explorado no Brasil, o butiá pode, a médio e longo prazo, se apresentar como alternativa para geração de renda, principalmente, em pequenas propriedades rurais.

Marcadores moleculares do tipo microssatélites (SSR - *Simple Sequence Repeats*) podem auxiliar na estimativa de parâmetros genéticos de populações, na compreensão de padrões de fluxo gênico e parentesco e em estudos de diversidade, gerando subsídios para a conservação de recursos genéticos. Estes marcadores podem ser desenvolvidos diretamente a partir de bibliotecas de DNA genômico ou de bibliotecas enriquecidas para microssatélites específicos. Também podem ser encontrados em bases de dados disponíveis *on line* ou, ainda, através de transferibilidade, considerando diferentes espécies (Kalia et al., 2011). Uma alternativa para viabilizar as análises de microssatélites em espécies para as quais ainda não existam *primers* específicos é a transposição de *primers* de espécies evolutivamente próximas. A transferibilidade dos marcadores SSR é maior entre espécies do mesmo gênero, ou de gêneros estreitamente relacionados, do que entre gêneros distante de uma mesma família (Mnejja et al., 2010).

Quando se iniciou o desenvolvimento deste trabalho, ainda não havia *primers* específicos para o gênero *Butia*. Porém, recentemente foi publicado um artigo apresentando marcadores de microssatélites desenvolvidos para *Butia eriospatha* (Mart. ex Drude) Becc. por um grupo de pesquisadores da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) e Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (APTA), onde os autores ressaltam a importância dos marcadores moleculares para o estudo da diversidade nas populações remanescentes (Nazareno et al., 2011). Mesmo assim, justifica-se a importância do presente trabalho, uma vez que quanto mais informações forem geradas sobre as

espécies ditas “órfãs” (com pouca ou nenhuma informação), como é o caso destas palmeiras, maior será o conhecimento e utilização destes recursos genéticos. Taxonomicamente, tanto o coco (*Cocos nucifera* L.) como o butiá fazem parte da mesma subfamília (Arecoideae), pertencem à mesma tribo (Cocoseae) e à mesma subtribo (Attaleinae). Baker et al. (2011) demonstraram que estas são espécies evolutivamente muito próximas. Assim, este trabalho teve como objetivo testar a transposição de marcadores microssatélites desenvolvidos para o genoma de coco em butiá (*Butia odorata*).

## Material e Métodos

Para o estudo de transferibilidade foram selecionados ao acaso 50 pares de *primers* de microssatélites (Tabela 1) desenvolvidos para *Cocos nucifera*, disponíveis na base de dados TropGENE Coconut Database (<http://tropgenedb.cirad.fr/en/coconut.html>). Os 50 pares de *primers* selecionados foram testados em amostras de 30 indivíduos adultos de *Butia odorata*, todos eles com mais de 150 anos de idade. Foram coletadas folhas de *B. odorata* em uma população natural existente existente na Fazenda São Miguel, localizada no município de Tapes (RS). Na Fazenda foram selecionadas três áreas distintas, sendo a primeira área (A1) distante cerca de 0,7 km da segunda (A2) e 2,55 km da terceira (A3); com 1,73 km entre A2 e A3. Foram selecionadas e coletadas aleatoriamente 10 plantas de cada uma das três áreas distintas (A1-1 a A1-10, A2-1 a A2-10 e A3-1 a A3-10) dentro da mesma população. As coordenadas geográficas específicas de cada área são: A1: Longitude 51°21'35,23" W e Latitude 30°31'22,34" S, A2: Longitude 51°21'47,61" W e Latitude 30°31'46,11" S e A3: Longitude 51°22'6,35" W e Latitude 30°32'43,79" S,

Como as plantas tinham estatura elevada (de 4 a 10 metros), a coleta foi realizada com auxílio de uma tesoura de poda acoplada a uma haste extensível. De cada indivíduo foi cortada a parte terminal de uma folha. Em laboratório, vários folíolos de cada planta foram cortados em porções de cerca de 3 cm, com auxílio de uma tesoura. A seguir, a amostra de cada indivíduo foi triturada em um moinho (moinho analítico de laboratório para trituração de amostras por impacto ou corte) com adição de nitrogênio líquido. Posteriormente, cada amostra foi colocada em tubos tipo Falcon (15 ml) e armazenada em ultra freezer (-80°C) até o momento da extração do DNA.

Tabela 1 - Sequências dos 50 pares de *primers* de microssatélites desenhados para *Cocos nucifera* e testados para a transferibilidade em *Butia odorata*. Pelotas, RS, 2012.

Nome	Forward	Reverse	pb	Ta
CnCir 171	ACGTACATTGGTATGAGGA	TGAAGAGAGAAGCAAACC	NP*	51
CnCir 194	TCGTTTCATCTCCATCTGT	CCAACCTCAAGGTGATCTCT	NP	51
CnCir 219	CCTTGTGCTAAGAGATTCA	AAGTTAGGGCATCCTTCT	NP	51
CnCir 238	AAATCCCAAACCTTCTTCTC	CGCTACGTTGGACATT	NP	51
CnCir H7	GAGATGGCATAACACCTA	TGCTGAAGCAAAGAGTA	NP	51
CnCir A3	TACGAAAGCAAGAAAACATA	AATAATGTGAAAAAGCAAAG	NP	51
CnCir E10	TTGGGTTCCATTTCTTCTCTCATC	GCTCTTTAGGGTTCGCTTTCTTAG	NP	51
CnCir S10	CAGAAACAGCCAATCAAGCAATA	ATCCATAATAGCCACTCAACAAAA	NP	51
CnCir G11	AATATCTCCAAAAATCATCGAAAG	TCATCCCACACCCTCCTCT	NP	51
CnCir F2	GGTCTCCTCTCCCTCCTTATCTA	CGACGACCCAAAACCTGAACAC	NP	51
CnCir E11	CAGAAACAGCCAATCAAGCAATA	ATCCATAATAGCCACTCAACAAAA	NP	51
CNZ01	ATGATGATCTCTGGTTAGGCT	AAATGAGGGTTTGGAAAGGATT	122	55
CNZ02	CTCTTCCCATCATATACCAGC	ACTGGGGGGATCTTATCTCTG	138	53
CNZ03	CATCTTTCATCATTTAGCTCT	AAACCAAAGCAAGGAGAAGT	91	51
CNZ04	TATATGGGATGCTTTAGTGGA	CAAATCGACAGACATCCTAAA	162	53
CNZ05	CTTATCCAAATCGTCACAGAG	AGGAGAAGCCAGGAAAGATT	163	53
CNZ06	ATACTCATCATCATACGACGC	CTCCACAAAATCATGTTATT	85	53
CNZ09	ATCTACCAGTGTGGTCCTCTC	ACCAGGAAAAAGAGCGGAGAA	137	53
CNZ10	CCTATTGCACCTAAGCAATTA	AATGATTTTCGAAGAGAGGTC	148	53
CNZ12	TAGCTTCCTGAGATAAGATGC	GATCATGGAACGAAAACATTA	214	53
CNZ13	TATGCTATTCACCTCATTTTTCG	ACTCTGTTTCACGATCAAAAA	138	50
CNZ16	TAAACTGAAAATAGCATGGGA	CTGACGGAATCTGTAAATTTG	186	55
CNZ17	ATGTAAGAAAAGTAGGGAGGC	CATAGGTTATCATGCAGAGCT	107	55
CNZ18	ATGGTTCAGCCCTTAATAAAC	GAACCTTTGAAGCTCCCATCAT	102	55
CNZ19	GAAGAAGGTGCTGGTTCTGTG	GGAGAAGAGAAGGAACAGAGA	181	55
CNZ20	GTGGGACACATTTATCATTTA	CAATTTTGTGCTGAAGAGGTAAA	94	55
CNZ21	ATGTTTTAGCTTCACCATGAA	TCAAGTTCAAGAAGACCTTTG	255	55
CNZ22	ACAAAGTCAAAGTTGATCAGC	ATTACACACACACACACACCA	240	55
CNZ23	ATCAAAACATGACACCGTAAC	CTGATAGATGACAAGGTGTGG	163	53
CNZ24	TCCTAAGCTCAATACTCACCA	CGCATTGATAAATACAAGCTT	257	53
CNZ26	CTAGGCTCCCATGTGTTTTT	CACTGCTGTTGTACACCTCCA	232	53
CNZ29	TAAATGGGTAAGTGTTTGTGC	CTGTCCTATTTCCCTTTTATT	135	51
CNZ31	GAAAGAATGTGGTGTGACAT	TAGTGCTAAGTCGATGGAAAT	189	51
CNZ32	TTGATCCCTAAGAGAAGGATC	GAAGAACACCAATGAGGTAAA	148	55
CNZ33	TTGCCCTATGACATTAAGA	GAGGTCAAAGTTATTTCCGAT	164	51
CNZ34	CATGTCGATTAATTATCCCAA	TGCAAATATGAATGCAAACAC	140	51
CNZ37	GTGGATAACTCATTTAGGTTG	TTCAAGAAGGTTCCGAAGGA	232	53
CNZ40	CTTGATTGCTATCTCAAATGG	CTGAGACCAAATACCATGTGT	151	53
CNZ42	TGATACTCCTCTGTGATGCTT	GTAGATTGTGGGAGAGGAATG	161	55
CNZ43	TCTTCATTTGATGAGAATGCT	ACCGTATTCACCATTCTAACA	197	51
CNZ44	CATCAGTTCCACTCTCATTTT	CAACAAAAGACATAGGTGGTC	165	53
CNZ46	TTGGTTAGTATAGCCATGCAT	AACCATTTGTAGTATACCCCC	116	51
CN11E6	TACTTAGGCAACGTTCCATTC	TAACCAGAAAAGCAAAAAGATT	NP	52
CN1C6	AGTATGTGAGTAGGATTATGG	TTCCCTGGACCCTTATCTCTT	NP	52
CN2A4	CAGGATGGTTCAAGCCCTTAA	GGTGGAAAGAGGGAGAGATTGA	88	52
CN2A5	AAGGTGAAATCTATGAACACA	GGCAGTAACACATTACACATG	NP	52
CN11E10	AGAGAGAGTAAATGGGTAAGT	CCCTTTTCAATTTTCTTATTC	137	52
CN11A10	GTTGGAGATTTAATTTTCTTG	CCCAATAATATTTTATAACAG	111	52
CN1G4	GTCGTCCTATACTCATCATCA	GATGCGTATGAGATGTGAGAG	NP	52
CN1H2	TTGATAGGAGAGCTTCATAAC	ATCTTCTTTAATGCTCGGAGT	NP	52

TropGENE *Coconut* Database, pb = pares de base, Ta = temperatura de anelamento, \*NP= não publicado

A extração do DNA foi realizada a partir das folhas das palmeiras marcadas nas três áreas de estudo, o protocolo de extração foi de acordo com o fabricante dos kits de extração de DNA utilizado (DNeasy Plant mini Kit Quiagen). Os testes de qualidade do DNA foram feitos em gel de agarose 1%, e a concentração foi verificada em fluorômetro. As reações de SSR-PCR seguiram o protocolo descrito por Teulat et al. (2000), com algumas modificações. A reação teve um volume final de 20 µl, composto por: 10,9 µl de H<sub>2</sub>O, 2,0 µl de 10x PCR Buffer, 1,0 µl de MgCl (50m M), 1,6 µl de dNTPs (12,5 mM), 1,3 µl de BSA (10mg µl), 1,0 µl de primer (*Forward e Reverse*) 10 µM, 0,2 µl de Taq DNA Polimerase (5u/µl) e 1,0 µl de DNA (5ng/µl). As amplificações foram realizadas em termociclador Applied Bio Systems Gene Amp PCR System 9700, programado para uma etapa inicial de desnaturação do DNA a 94°C por cinco minutos, seguido de 40 ciclos de 94°C por 15 segundos (desnaturação), 10 segundos a temperatura de anelamento (Ta), 72°C por 15 segundos e 72°C por cinco minutos, permanecendo a seguir a 4°C. As temperaturas de anelamento variaram de 55°C a 63°C, conforme a temperatura do primer utilizado (Tabela 2).

O produto da amplificação foi separado em gel de agarose a 2% e visualizado por meio de coloração com o corante Gel Red (*Biotium*). O marcador 1 Kb Plus DNA ladder (Invitrogen) foi utilizado como referência para estimar o tamanho dos fragmentos amplificados. Em seguida o gel foi visualizado e documentado em luz ultravioleta (UV), em fotodocumentador (Kodak Gel Logic 212 Imaging System, Molecular Imaging System Carestream Health, Inc., Rochester, NY, EUA). Os alelos amplificados foram identificados de acordo com o peso molecular das bandas geradas. Foi construída uma matriz multialélica para cada loco analisado, a partir da qual foi estimado: i) o conteúdo de informação de polimorfismo (PIC) de cada marcador foi estimado por meio da equação:  $PIC = 1 - \sum p_i^2$ , onde  $p_i$  é a frequência ao quadrado do alelo  $i$ ; ii) a distância genética entre os indivíduos foi estimada, utilizando o software NTSYS-PC, versão 2.1 (Rohlf, 2000), com base na distância de Rogers Modificado (Wright, 1978) conforme a equação:

$$DW = \frac{1}{\sqrt{2m}} \sqrt{\sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^m (p_{ij} - q_{ij})^2}$$

onde,  $p_{ij}$  e  $q_{ij}$  correspondem às frequências do alelo  $j$  no locus  $i$  nos dois genótipos em consideração,  $n_i$  é o número de alelos do locus  $i$ , e  $m$  se refere ao número de loci.

A partir da matriz original gerada com base na leitura dos géis de dados codominantes, foi estimada a distância euclidiana entre os indivíduos. Com base no quadrado da distância euclidiana foram calculadas as estimativas da variabilidade genética entre os indivíduos procedentes da mesma área, dentro de indivíduos e entre indivíduos procedentes de diferentes áreas, através da análise molecular da variância (AMOVA) utilizando o programa computacional Genes. O valor  $F_{st}$ , que representa a distância genética entre os indivíduos, foi utilizado para comparar a variação genética entre os indivíduos avaliados. Para testar a significância dos resultados da AMOVA foi utilizado o método não-paramétrico de permutações (Excoffier et al., 1992).

Com base na matriz de distância euclidiana foi construído um dendrograma, por meio do método de agrupamento da distância média UPGMA (*Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Average*). O ajuste entre a matriz de dissimilaridade e o dendrograma foi estimado pelo coeficiente de correlação cofenética ( $r$ ), conforme Sokal & Rohlf (1962), utilizando o programa computacional NTSYS-PC (Rohlf, 2000).

## Resultados e Discussão

Foi constatado que, dentre os 50 pares de primers testados e desenvolvidos para coco, 28 amplificaram para butiá. Porém, dentre os que amplificaram, oito resultaram em amplificações em múltiplas regiões do genoma e não foram considerados (Tabela 2). Com base nos resultados obtidos, pode-se inferir que a porcentagem de transferibilidade efetiva dos primers de coco para butiá foi de 40%. Este percentual de transferibilidade pode ser altamente variável dependendo das espécies em estudo. Ritschel et al. (2004), ao avaliarem 67 primers desenvolvidos para melão (*Cucumis melo* L.) e testados em melancia (*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. & Nakai), ambas espécies da família Cucurbitaceae, obtiveram 23% de transferibilidade. Em outro artigo de transferibilidade com marcadores microssatélites desenvolvidos para o arroz (*Oryza sativa* L. cv.

TNG67) e testados em 21 espécies de bambu, Chen et al. (2010) obtiveram 68,3% de transferibilidade. Mnejja et al. (2010) ao avaliar a transferibilidade de marcadores microssatélites de *Prunus* em outras espécies da família Rosaceae obtiveram 63,9% de transferibilidade. Nazareno et al. (2011), ao avaliarem 14 pares de *primers* desenvolvidos para *Butia eriospatha* e testados em *B. catarinensis*, obtiveram uma alta transferibilidade (86%). Este alto valor pode ser atribuído ao fato das espécies avaliadas pelos autores acima citados serem bastante próximas, uma vez que pertencem ao mesmo gênero. No presente estudo, pode-se observar que dos 20 *primers* utilizados, foi identificado um total de 136 alelos.

O número médio de alelos obtido por *locus* foi sete com amplitude variando entre cinco e nove. Os loci CNZ10 e CNZ43 apresentaram a maior diversidade alélica, com nove alelos. A menor diversidade alélica foi evidenciada para os loci CNZ23, CNZ29 e CNZ46, os quais apresentaram cinco alelos (Tabela 2). Quanto ao conteúdo de informação polimórfica (PIC), pode-

se observar que este variou de 0,97 a 0,98, sendo a média igual a 0,975 (Tabela 2). De acordo com Xie et al. (2010), o polimorfismo dos loci pode ser considerado alto (PIC > 0,5), médio (PIC entre 0,5 e 0,25) ou baixo (PIC < 0,25). Assim sendo, o valor do PIC obtido no presente trabalho, em todos os *loci*, pode ser considerado alto. Segundo Weir (1996), o conhecimento do conteúdo de informação do polimorfismo é importante, pois fornece uma estimativa do poder discriminatório de um *locus*. Valores menores de PIC, entre 0,60 a 0,86, foram encontrados em açazeiros (*Euterpe oleracea* Mart.), outra espécie de palmeira, por Oliveira et al. (2010).

Pela AMOVA, 8,99 % da variação total encontra-se entre as áreas amostradas, enquanto que a maior porção da variação, 91,00%, encontra-se entre os indivíduos dentro de cada área (Tabela 3).

Tabela 3 - Análise da variância molecular (AMOVA) gerada por dados de marcadores moleculares microssatélites em 30 indivíduos de *Butia odorata* coletados no município de Tapas, Pelotas, RS, 2012.

Fonte de Variação	GL <sup>1</sup>	SQ	VC	%VT
Entre áreas	2	5,13	0,12	8,99**
Dentro de áreas	27	34,87	1,29	91,00 <sup>ns</sup>
Total	29	40,00	1,41	100

<sup>1</sup> Graus de liberdade (GL), soma dos quadrados (SQ), componentes de variância (VC), percentagem da variação total (%VT), \*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade do erro.

Estes resultados estão de acordo com os encontrados por Büttow et al. (2010) que, em um estudo utilizando marcadores AFLP em butiá, obtiveram a maior parte da variação molecular (83,68) dentro das populações e a menor parte atribuída à diferença entre as populações (13,67%). Ainda de acordo com os mesmos autores, a maior variabilidade dentro das populações é comum em espécies que apresentam mecanismos eficientes de dispersão de pólen e sementes, como é o caso de *Butia odorata*. Outro fator a ser considerado é a distância entre as três áreas amostradas, o que favorece o fluxo gênico devido à proximidade entre as áreas avaliadas, de modo semelhante ao

que foi relatado por Boyle et al. (1990). Com base nos 20 *loci* SSR analisados foi possível discriminar 22 dos 30 genótipos avaliados (Figura 1). A distância genética entre os 30 indivíduos variou 0,11 a 0,33, com média geral de 0,22. Os indivíduos mais divergentes foram A1-8 e A3-8, enquanto os indivíduos A1-9, A2-4, A2-5 e A2-7 foram os mais similares, apresentando o mesmo perfil molecular para os 20 loci analisados, assim como A2-9 e A2-10 e A1-2 e A3-4 (Figura 1). Esses resultados corroboram com os resultados da AMOVA, uma vez que indivíduos de áreas distintas apresentaram 100% de similaridade.

O coeficiente de correlação cofenética obtido entre o dendrograma e a matriz de

distância genética foi igual a 0,78, índice considerado alto. Os vinte *loci* SSR transferidos de coco para 30 indivíduos adultos de *Butia* foram todos polimórficos. De acordo com Amorim et al. (2008), os marcadores SSR possibilitam classificar, de forma eficiente, os genótipos de acordo com sua origem, classificação e genealogia. O conhecimento do conteúdo de informação do polimorfismo é importante, pois fornece uma estimativa do poder discriminatório de um *locus*. Com relação a butiá, os resultados obtidos comprovam a eficácia da metodologia de

transferibilidade de locos SSR entre espécies evolutivamente próximas. Analisando os custos elevados e o tempo necessário para o desenvolvimento de marcadores SSR específicos para análise de microssatélites, os resultados obtidos permitem tornar mais eficiente o processo de caracterização molecular dos recursos genéticos dessa espécie, auxiliando na adoção de estratégias de conservação e melhoramento genético e manejo de populações naturais dessa palmeira no Sul do Brasil.

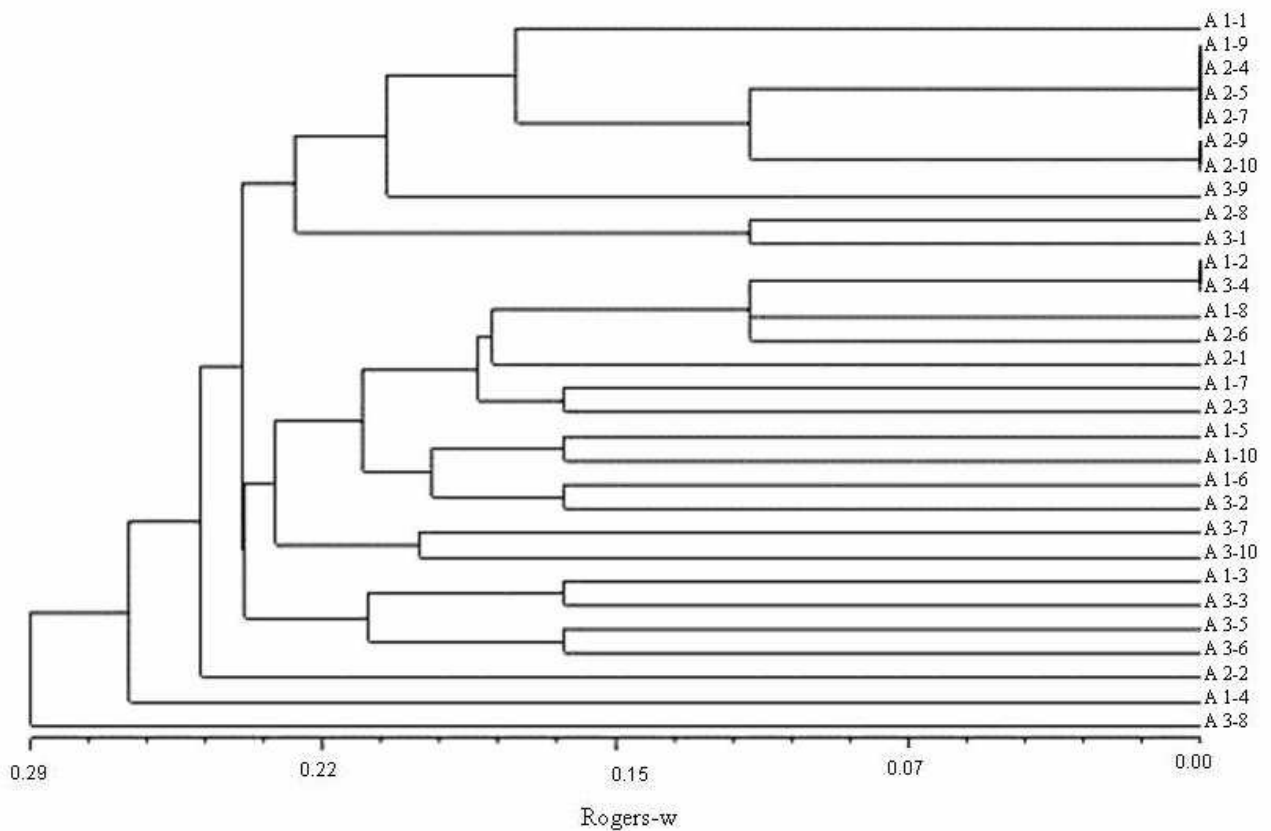


Figura 1 - Dendrograma resultante da análise de 30 indivíduos de *Butia odorata* obtido pelo método de agrupamento UPGMA, com base na matriz de distância genética obtida por meio da distância de Rogers modificada, utilizando 20 marcadores SSR. Coeficiente de correlação cofenética ( $r$ ) = 0,78. Pelotas, RS, 2012.

### **Conclusão**

A análise realizada com os 20 pares de *primers* de microssatélites indica que a diferença entre os indivíduos é muito maior dentro de cada área avaliada do que entre áreas distintas. Os marcadores microssatélites desenvolvidos para o genoma de coco podem ser utilizados com sucesso para análises genéticas em butiá.

### **Agradecimentos**

Agradecemos à CAPES, PROBIO II, FAPERGS e CNPq pela concessão de bolsas de estudo e financiamento ao projeto; e aos proprietários da Fazenda São Miguel, Tapes, RS, pela conservação da população natural de *Butia odorata* e parceria nas ações de pesquisa.

## Referências

- AMORIM, E. P.; REIS, R.V.; SEREJO, J. A. S.; AMORIM, V. B. O.; SILVA, S. O. Variabilidade genética estimada entre diplóides de banana por meio de marcadores microsatélites. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.43, n.8, p.1045-1052, 2008.
- BAKER, W. J.; NORUP, M.V.; CLARKSON, J. J.; COUVREUR, T. L. P.; DOWE, J.L.; LEWIS, C. E.; PINTAUD, J.C.; SAVOLAINEN, V.; WILMONT, T.; CHASE, M.W. Phylogenetic relationships among arecoid palms (Arecaceae: Arecoideae). **Annals of Botany**, Oxford, v.108, n.8. p.1417-1432, 2011.
- BOYLE, T.; LIENGSIRI, C.; PIEWLUANG, C. Genetic structure of black spruce on two contrasting sites. **Heredity**, Oxford, v.65, n. 3, p.393-399, 1990.
- BÜTTOW, M.V.; CASTRO, C.M.; SCHWARTZ, E.; TONIETTO, A.; BARBIERI, R.L. Caracterização molecular de populações de *Butia capitata* (Arecaceae) do sul do Brasil através de marcadores AFLP. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.32, n.1, p.230-239, 2010.
- CHEN, S.Y.; LIN, Y.Y.; LIN, C.W.; CHEN, W.Y.; YANG, C.H.; KU, H.M. Transferability of rice SSR markers to bamboo. **Euphytica**, Wageningen, v.175, p.23-33, 2010
- EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P. E.; QUATTRO, J. M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics**, Pittsburgh, v.131, n.2, p.479-491, 1992.
- KALIA, R.K., RAI, M.K., KALIA, S., SINGH, R., DHAWAN, A.K. Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants. **Euphytica**, Wageningen, v. 177, p. 309–334, 2011.
- LEITMAN, P., HENDERSON, A., NOBLICK, L. Arecaceae. In: **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2010. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB000053>>, Acesso em: 10 jun. 2012.
- LORENZI, H.; NOBLICK, L.R.; KAHN, F.; FERREIRA, E. **Flora brasileira – Arecaceae (palmeiras)**. Nova Odessa: Plantarum, 2010. 384 p.
- MNEJJA, M.; GARCIA-MAS, J.; AUDERGON J-M.; ARUS, P. *Prunus* microsatellite marker transferability across rosaceous crops. **Tree Genetics & Genomes**, v.6, n.5, p.689-700, 2010.
- NAZARENO, A.G.; ZUCCHI, M.I.; REIS, M.S. Microsatellite markers for *Butia eriospatha* (Arecaceae), a vulnerable palm species from the Atlantic Rainforest of Brasil. **American Journal of Botany**, Saint Louis, v.98, n.7, p.198-200, 2011.
- NOBLICK, L. R. Validation of the name *Butia odorata*. **Palms**, v. 55, n. 1, p. 48-49, 2011.
- OLIVEIRA, M.S.P.; SANTOS, J.B.; PERITO, E.A.; FERREIRA, D. R. Variabilidade genética entre acessos de açazeiro utilizando marcadores microsatélites. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.34, n.5, p.1253-1260, 2010.
- RITSCHER, P.S.; LINS, T.C.L. ; TRISTAN, R.L.; BUSO, G.S.C.; BUSO, J.A.; FERREIRA, M.E. Development of microsatellite markers from an enriched genomic library of genetic analysis of melon. **BMC Plant Biology**, London, v.4, n.9, p.1-14, 2004.
- ROSSATO, M.; BARBIERI, R. L.; SCHÄFER, A.; ZACARIA, J. Caracterização molecular de populações de palmeiras do gênero *Butia* do Rio Grande do Sul através de marcadores ISSR. **Magistra**, Cruz das Almas, v. 19, n. 4, p. 311-318, 2007.
- ROHLF, J. **NTSYS-pc**: numerical taxonomy and multivariate analysis system. Version 2.1. New York: Exeter, 2000. Software.
- SOKAL, R.R.; ROHLF, F.J.; The comparison of dendrograms by objective methods. **Taxon**, Utrecht, 11: 33-40, 1962.
- TEULAT, B.; ALDAM, C.; TREHIN, R.; LEBRUN, P.; BARKER, J.H.A.; ARNOLD, G.M.; KARP, A.; BAUDOUIN, L.; ROGNON, F. An analysis of genetic diversity in coconut (*Cocos nucifera*) populations from across the geographic range using sequence-tagged microsatellites (SSRs)



and AFLPs. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 100, n. 5, p. 764–771. 2000.

Trop GENE Coconut Data base. Disponível em: <  
<http://tropgenedb.cirad.fr/en/coconut.html> >  
Acesso em: 4 fev. 2010

XIE, W.G.; ZHANG, X.Q.; CAI, H.W.; LIU, W.; PENG, Y. Genetic diversity analysis and transferability of cereal EST-SSR markers to orchardgrass (*Dactylus glomerata* L.), **Biochemical Systematics and Ecology**, New York, v.38, p.740-749, 2010.

WRIGHT, S. **Evolution and genetics of populations** - variability within and among natural populations. Chicago: The University of Chicago Press, v.4, 1978.590p.

WEIR, B.S. **Genetic data analysis II** - Methods for discrete population genetic data. 2 ed. Sunderland: Sinauer Associates, 1996. 445p.

Recebido em: 09/08/2012  
Aceito em: 20/12/2012

Tabela 2 - Conteúdo de informação do polimorfismo (PIC) de vinte *loci* SSR com base na caracterização de 30 indivíduos de *Butia odorata* e o respectivo número de alelos identificados por *locus*, tamanho dos alelos identificados e amplitude das frequências alélicas. Pelotas (RS), 2012.

<i>Locus</i>	PIC	<i>Motif</i>	Nº de alelos	Alelo mais Frequente	Tamanhos alelos observados (pb)	Frequências alélicas	Ta (°C)
CNZ01	0,97	(CT) <sub>15</sub> (CA) <sub>9</sub>	8	122	85 - 136	0,005 - 0,110	54
CNZ04	0,98	(CT) <sub>29</sub> TT(CA) <sub>10</sub>	8	225	175 - 225	0,010 - 0,075	54
CNZ05	0,98	(CT) <sub>17</sub> (GT) <sub>7</sub>	8	210	170 - 230	0,0001 - 0,002	54
CNZ09	0,97	(CT) <sub>13</sub> (CA) <sub>6</sub> (CT) <sub>19</sub> (CA) <sub>8</sub>	6	122	80 - 126	0,0001 - 0,0081	54
CNZ10	0,98	(CT) <sub>18</sub> (GT) <sub>17</sub>	9	235	195 - 265	0,0001 - 0,0056	54
CNZ12	0,97	(CT) <sub>15</sub>	7	293	202 - 300	0,0001 - 0,01	53
CNZ16	0,98	(GTT) <sub>6</sub> (GCT) <sub>2</sub> (CTT) <sub>8</sub> TTTGTGC(GT) <sub>8</sub> CT(GT) <sub>7</sub> CT(GT) <sub>6</sub>	7	168	146 - 182	0,0001 - 0,012	55
CNZ17	0,97	(CA) <sub>12</sub> (GA) <sub>11</sub>	6	55	50 - 122	0,0001 - 0,012	55
CNZ23	0,98	(GA) <sub>18</sub>	5	164	130 - 164	0,0009 - 0,0049	53
CNZ29	0,97	(GT) <sub>22</sub> (GA) <sub>2</sub> CA(GA) <sub>1</sub>	5	120	115-147	0,004 - 0,012	55
CNZ42	0,98	(CT) <sub>16</sub>	6	169	145 - 182	0,001 - 0,0064	52
CNZ43	0,98	(GA) <sub>21</sub>	9	247	220 - 284	0,0001 - 0,0049	53
CNZ44	0,97	(GA) <sub>15</sub>	6	149	135 - 164	0,0001 - 0,01	54
CNZ46	0,96	(CT) <sub>24</sub>	5	95	90 - 115	0,0006 - 0,025	52
CN2A4	0,97	(CT)15TT(CT)3	7	170	140 - 200	0,0001 - 0,016	53
CnCir1 94	0,98	NP*	8	399	379 - 427	0,0004 - 0,0036	52
CnCir2 19	0,97	NP*	5	223	216 - 247	0,0004 - 0,0081	60
CnCirE 10	0,97	(CA)8(GA)11	6	235	198 - 240	0,0001 - 0,016	52
CnCirF 2	0,98	(TG) <sub>11</sub> (AG) <sub>12</sub>	7	220	178 - 234	0,0001 - 0,013	60
CnCir E11	0,98	NP*	8	218	202 - 260	0,0004 - 0,0064	60

PIC= conteúdo de informação do polimorfismo, pb = pares de base, Ta (°C) = temperatura de anelamento, \*NP= não publicado