

TAMANHO DO GENOMA E CARIOTIPAGEM CONVENCIONAL E
DIFERENCIAL EM COQUEIRO (*Cocos nucifera* L.)

MONIQUE FREITAS NETO

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO – UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
JANEIRO - 2014

TAMANHO DO GENOMA E CARIOTIPAGEM CONVENCIONAL E
DIFERENCIAL EM COQUEIRO (*Cocos nucifera* L.)

MONIQUE FREITAS NETO

Tese 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 Doutor em Genética e Melhoramento
de Plantas.

Orientadora: Prof^a. Telma Nair Santana Pereira

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
JANEIRO – 2014

TAMANHO DO GENOMA E CARIOTIPAGEM CONVENCIONAL E DIFERENCIAL EM COQUEIRO (*Cocos nucifera* L.)

MONIQUE FREITAS NETO

“Tese 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 Doutora em Genética e Melhoramento de Plantas”.

Aprovada em 22 de janeiro de 2014.

Comissão Examinadora:

Dr^a. Semíramis Rabelo Ramalho Ramos (D. Sc. Produção Vegetal/Melhoramento de Plantas) – EMBRAPA/CPATC

Prof. Messias Gonzaga Pereira (Ph.D. Melhoramento de Plantas) – UENF

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

Prof^a. Telma Nair Santana Pereira (Ph. D. Melhoramento de Plantas) – UENF
(Orientadora)

DEDICATÓRIA

A Deus, pela dádiva da vida.

À minha família, pelo amor incondicional, pelos esforços em prol da minha educação, e por estar comigo nos momentos mais importantes da minha vida.

“...todas as coisas concorrem para o bem daqueles que amam a Deus”.

(Romanos, 8:28)

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre guiar meus caminhos e orientar as minhas escolhas.

À Universidade Estadual do Norte Fluminense, que foi minha segunda casa durante esses quase 10 anos e, em especial, ao Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento de Plantas pela oportunidade de qualificação.

À CAPES, pelo suporte financeiro durante o doutorado.

À Professora Dra. Telma Pereira, pela orientação, pelos ensinamentos, pelos conselhos, pelos “puxões de orelha”, pela amizade, pela torcida, pela paciência e pela confiança a mim dispensados desde o projeto Jovens Talentos (FAPERJ).

Aos Professores do Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, pelos conselhos e pelos ensinamentos, em especial aos Professores Dr. Messias Pereira, Dr. Alexandre Pio Viana e Dra Helaine Christine Ramos.

À Universidade Estadual de Santa Cruz, em especial à Professora Dra. Margarete Magalhães de Souza e aos doutorandos Cláudio e Gonçalo, pela parceria e ensinamentos durante os dias na Bahia.

À Embrapa Tabuleiros Costeiros, em especial à Dr^a Semíramis Rabelo Ramalho Ramos e à mestranda Aline Nunes, pela contribuição, pelo esclarecimento de dúvidas, pela gentileza e pelo fornecimento de amostras dos genótipos de coqueiro- gigante e anão.

Ao secretário da Pós-graduação Daniel, pelo esclarecimento de dúvidas, pela torcida, pela paciência e pela amizade.

À minha família, meus pais Luiz Carlos e Maria da Penha, meus irmãos Marcelo, Marcos e Michelle, meus sobrinhos Pâmella, Arthur, Anne e o pequeno Marcelinho e minhas cunhadas Maria Elisa e Jaqueline, por todo carinho, amor, esforço, educação e torcida incondicional.

À minha tribo querida, Sarinha, Fábio, Marcela, Jonn, Thiago, Lug e Renatinha, amigos que sempre estiveram ao meu lado e acompanharam cada etapa da minha vida acadêmica.

Às minhas irmãs conquistadas durante a graduação e a pós-graduação, Késsia, Mari, Thaís, Monique, Priscila, Hérika, Fefa e Lyzia.

Aos amigos da citogenética, os antigos e os novos, pelo convívio, pelos ensinamentos e pela amizade.

Às amigas construídas durante os anos na pós-graduação, em especial às amigas, Mariana, Fernanda, Juliana, Tatiana, Keila, Eilleen, Érica, Geovana, Paty, Suzy e Marcela.

Aos colegas do LMGV.

A todos que fizeram e fazem a diferença na minha vida.

SUMÁRIO

RESUMO	VII
ABSTRACT	X
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	4
3. CAPÍTULOS.....	5
3.1. CARIOTIPAGEM CONVENCIONAL E DIFERENCIAL VIA BANDEAMENTO CMA/DAPI E HIBRIDIZAÇÃO FLUORESCENTE <i>IN SITU</i> TELOMÉRICA (FISH) EM COQUEIRO- ANÃO (<i>COCOS NUCIFERA</i> L.)	5
3.1.1. INTRODUÇÃO	5
3.1.2. REVISÃO	7
3.1.2.1. Família Arecaceae	7
3.1.2.2. O Coqueiro	8
3.1.2.3. O coqueiro-anão-verde.....	10
3.1.2.4. Determinação do Cariótipo.....	11
3.1.3. MATERIAL E MÉTODOS.....	17
3.1.3.1. Material vegetal	17
3.1.3.2. Definição do protocolo para a observação das placas metafásicas	17
3.1.3.3. Obtenção das placas metafásicas.....	17
3.1.3.4. Cariotipagem convencional	18

3.1.3.5. Bandeamento CMA/DAPI.....	19
3.1.3.6. FISH telomérica.....	19
3.1.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
3.1.5. CONCLUSÕES	26
3.2. TAMANHO DO GENOMA DE COQUEIRO (<i>Cocos NUCIFERA</i> L.) GIGANTE E ANÃO	27
3.2.1. INTRODUÇÃO	27
3.2.2. REVISÃO	28
3.2.2.1. Família Arecaceae	28
3.2.2.2. O Coqueiro	30
3.2.2.3. Importância social e econômica do coco	31
3.2.2.4. Variedades de coco	33
3.2.2.5. Melhoramento genético e recursos genéticos do coqueiro	35
3.2.2.6. Tamanho do genoma	37
3.2.3. MATERIAL E MÉTODOS	41
3.2.3.1. Definição de protocolo	41
3.2.3.2. Determinação do conteúdo de DNA do coqueiro	42
3.2.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
3.2.4.1. Definição de protocolo para a cultura	44
3.2.4.2. Determinação do conteúdo de DNA	47
3.2.5. CONCLUSÕES	53
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54

RESUMO

FREITAS NETO, Monique; D.Sc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; Janeiro de 2014; TAMANHO DO GENOMA E CARIOTIPAGEM CONVENCIONAL E DIFERENCIAL EM COQUEIRO (*Cocos nucifera* L.) Orientadora: Prof^a. Telma Nair Santana Pereira; Conselheiros: Prof. Messias Gonzaga Pereira e Prof^a. Helaine Cristina Cancela Ramos.

O objetivo do presente trabalho foi caracterizar o genoma do coqueiro, acessos do grupo anão e gigante, por meio da cariotipagem convencional, diferencial CMA/DAPI, hibridização fluorescente *in situ* (FISH) telomérica, e determinação do conteúdo de DNA via citometria de fluxo. Para a cariotipagem, foram utilizadas pontas de raízes de plantas de coqueiro anão-verde-do-Brasil, submetidas ao pré-tratamento com paradiclorobenzeno durante 10h a 4°C. Em seguida, o material foi fixado, submetido à digestão enzimática (pectinase 20% e celulase 2%), centrifugado e, posteriormente, as lâminas foram preparadas. Para a coloração convencional, foi utilizado Giemsa 5%. Na coloração diferencial, foram realizados o bandeamento CMA/DAPI e a FISH. A primeira técnica utiliza cromomicina A₃ (CMA), que reconhece sítios ricos em GC, e o 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), que reconhece sítios ricos em AT, já a FISH identifica, nos cromossomos, a posição de sequências de DNA, utilizando sondas teloméricas. Para a montagem do cariótipo, foram mensurados o comprimento absoluto cromossômico, o

comprimento dos braços curtos e longos e foram estimadas a razão entre os braços e o índice centromérico. Na determinação do conteúdo de DNA, primeiramente, foi determinado o melhor protocolo, tendo sido testados o tipo de folha (jovem ou adulta -14^a. folha), o tamanho do tecido foliar (0,5cm², 1cm², 1,5cm²), o tempo de maceração do material na presença de solução tampão de extração (Partec) (60s, 90s e 120s), o tempo de coloração com iodeto de propídeo (30min, 40min e 60min) e o melhor padrão interno (*Zea mays* - conteúdo 2C = 5,43pg ou *Pisum sativum* - 2C=9,07 pg.). Posteriormente, após a definição do protocolo, o mesmo foi utilizado para a determinação do conteúdo de DNA de 14 acessos, sendo seis do grupo anão e oito do grupo gigante. Os resultados da cariotipagem convencional permitiram observar 2n=32 cromossomos, sendo que o comprimento dos cromossomos variou de 5,57µm a 2,13µm. O cariótipo é assimétrico, com 11 pares de cromossomos do tipo metacêntrico e 5 pares do tipo submetacêntricos. O bandeamento CMA/DAPI revelou blocos terminais presentes em 2 pares cromossômicos (1 metacêntrico e 1 submetacêntrico) coincidentes com a região organizadora de nucléolo (RON). O bandeamento permitiu a caracterização dos satélites, que mediram 1.36 µm (cromossomo 4) e 0.85 µm (cromossomo 7). A FISH telomérica revelou marcações exclusivamente na região terminal em todos os cromossomos, o que sugere que a espécie não sofreu nem inversão e nem translocação durante a sua evolução e que os telômeros dos cromossomos do coqueiro são do tipo *Arabidopsis* (TTTAGGG). Quanto à determinação do conteúdo de DNA, os melhores resultados foram obtidos com o material foliar que media 0,5cm², macerado na presença de solução tampão por 90 segundos à temperatura ambiente e corados com iodeto de propídeo durante 30 minutos, sob refrigeração. A espécie *Pisum sativum* (2C DNA=9,07pg) foi definida como o melhor padrão interno para a espécie. Os histogramas do conteúdo de DNA obtidos com amostras foliares jovens e adultas foram similares, o que facilitará trabalhos futuros. Foram obtidos histogramas com boa resolução e com coeficientes de variação de 2,5% a 3,2% o que indica boa qualidade da metodologia empregada. Houve diferença significativa a 5% de probabilidade entre os genótipos de acordo com o teste Scott e Knott, sendo que o genótipo Gigante de Rennel se distinguiu dos demais com a média mais alta de conteúdo de DNA (5,72pg) e o Gigante do

Oeste Africano foi o que teve a menor media de conteúdo de DNA (5,48pg). Pode-se, também, inferir que o tamanho do genoma dos genótipos do grupo Gigante é de 5,59pg e do grupo Anão é de 5,55pg, na média. O tamanho do genoma da espécie foi de 5,57pg, o que, em termos de pares de base, corresponde a 5.347 Mpb (Mega pares de bases), considerado um genoma de tamanho médio.

ABSTRACT

FREITAS NETO, Monique; D.Sc.; State University of North Fluminense Darcy Ribeiro; 2014 January; GENOMIC SIZE AND CONVENCIONAL AND DIFFERENCIAL KARYOTYPE OF COCONUT (*Cocos nucifera* L.). Adviser: Telma Nair Santana Pereira; Committee Members: Messias Gonzaga Pereira and Helaine Cristina Cancela Ramos.

The objective of this study was to characterize the genome of coconut genotypes, Dwarf and Tall genotypes, by conventional karyotyping, differential CMA / DAPI , fluorescence in situ hybridization (FISH) using telomere probes, and by determination of the DNA content via flow cytometry. The conventional karyotype root tips of plants from green dwarf coconut were pretreated with paradichlorobenzene during 10h at 4 ° C. After, the root tips were fixed, digested by enzymes (20% pectinase and cellulase 2%), centrifuged and subsequently slides stained with Giemsa at 5%. The differential staining banding CMA / DAPI uses chromomycin A3 (CMA) that recognizes GC- rich sites , and 4 ' ,6 - diamidino - 2 - phenylindole (DAPI), which recognizes AT- rich sites on chromosomes. The FISH technique identifies the position of DNA sequences on chromosomes by using telomeric probes. For the chromosome karyotype, it was measured the absolute chromosome length, the length of the short and long arms, and after that it was estimated the ratio between the arms and the centromeric index. For the determination of 2C DNA content, first, it was determined the best protocol to be used to determine the DNA content. To select the best protocol it was tested the

the type of leaf (young or 14th leaf), the size of leaf sample (0.5 cm², 1cm², 1.5cm²), the exposure time to the chopping buffer solution (60s, 90s, and 120s), the exposure time to the propidium iodide staining (30min, 40min, e 60min), and the internal standard (*Zea mays*, 2C=5.34pg or *Pisum sativum*, 2C=9,07). It was used 14 coconut genotypes, six from dwarf group and eight from tall group. By the conventional karyotype, the coconut has $2n = 32$ chromosomes and the chromosome length ranged from 5.57 μm to 2.13 μm . The karyotype is asymmetric, with 11 pairs of metacentric chromosomes and 5 pairs of submetacentric chromosomes. The banding CMA / DAPI revealed terminal blocks present in two chromosome pairs (1 metacentric and submetacentric 1) coinciding with the nucleolus organizer regions (RON). The banding allowed the characterization of two satellites, one measured 1,36 μm (chromosome 4) and the other 0.85 μm (chromosome 7). FISH revealed bands exclusively terminals in the telomeric region of all chromosomes, suggesting that this species has not undergone translocation or inversion during its evolution and that the coconut telomeres are of *Arabidopsis*-type (TTTAGGG). The protocol for the determination of the 2C DNA content gave histograms with good resolution and with coefficients of variation of 2.5 % to 3.2% which indicates good quality of the methodology used. The best protocol was the one which used leaf samples of 0.5 cm², chopped in buffer solution for 90s at room temperature, stained with propidium iodide for 30 min under cool temperature, and the best internal standard was *P. sativum* (2C DNA=9.07pg). There was no difference between young or old leaf; so, the 14th leaf can be used and this will help future works. There was significant difference, at the 5 % probability, among genotypes according to Scott and Knott test. The Rennel genotype distinguished from others with highest average of 2C DNA content (5.72 pg) and the West African Tall genotype had the lowest average of 2C DNA content (5.48 pg). It can be also inferred that the average of 2C DNA content of Tall group is 5.59 pg and the Dwarf group is 5.55 pg. The size of the genome of the species is 5.57 pg which in terms of base pairs correspond to 5.347 Mpb, considered a genome of medium size.

1. INTRODUÇÃO

O coqueiro (*Cocos nucifera* L.) é uma palmeira de clima tropical encontrada em diversas regiões do mundo. A espécie pertence à classe *Monocotyledoneae*, ordem *Palmales*, família *Areaceae*, subfamília *Cocoideae* e gênero *Cocos*. Esse gênero é monoespecífico, e a espécie é diplóide com $2n = 2x = 32$ cromossomos (Sisunandar *et al.*, 2010).

Areaceae é a família das palmeiras e possui cerca de 3.500 espécies (Uhl e Dransfield, 1987). As palmeiras possuem uma expressiva importância devido à diversidade de produtos que delas podem ser obtidos, principalmente os relacionados aos frutos e sementes. Essa família inclui representantes dióicos e monóicos, de morfologia bastante diversificada (Fontes e Ferreira, 2006; Aragão *et al.*, 2010; Fontes e Wanderley, 2010).

O centro de origem da espécie é o Sudeste Asiático; no entanto, estudos baseados em análises moleculares e morfométricas revelam que as populações de coqueiro cultivadas nas Américas, especificamente no Panamá, são muito similares às populações das Filipinas; portanto, a dispersão dos coqueiros das Américas iniciou-se na Costa Ocidental do Pacífico, provável centro de origem dos coqueiros das Américas (Foale e Harries, 2009; Clement *et al.*, 2013).

O coqueiro é dividido em dois grupos: o Nana (coqueiro-anão) e o Typica (coqueiro-gigante). Do cruzamento desses dois tipos, obtém-se o híbrido intervarietal, de ampla utilidade comercial, tanto *in natura* quanto agroindustrial (Aragão *et al.*, 2010). O coqueiro-gigante é predominantemente alógamo e, geralmente, os frutos são utilizados na indústria de alimentos, na produção de

coco ralado ou seus derivados, ou mesmo consumido *in natura* (Konan *et al.*, 2008). O coqueiro-anão é preferencialmente autógamo e, no Brasil, a sua produção se destina ao consumo *in natura* e agroindustrial da água de coco (Fontes e Wanderley, 2010).

Tradicionalmente, o coqueiro é cultivado na região Nordeste, sendo considerada uma das culturas de maior importância socioeconômica para as regiões litorâneas, devido à sua fácil adaptação a essas condições ambientais e por produzir continuamente, gerando emprego e renda durante todo o ano (Fontes e Wanderley, 2010). O maior produtor de coco do mundo é a Indonésia, estando o Brasil na quarta posição, sendo os maiores produtores os estados da Bahia, Ceará e Sergipe (AGRIANUAL, 2012).

No entanto, apesar da importância da espécie, a pesquisa, ainda, é incipiente, sendo necessário gerar informações básicas, como a análise cromossômica, que determina o número e tipos de cromossomos, tamanho do genoma, comportamento meiótico, viabilidade polínica, dentre outros. Esses estudos geram conhecimentos que podem auxiliar o melhoramento genético da cultura, que, também, ainda, é considerado incipiente (Loiola, 2009).

A análise cromossômica sempre foi um dos campos estimulantes da citologia e da genética, tendo relação com estudos taxonômicos e evolutivos, bem como no melhoramento genético e na caracterização de germoplasma (Brammer *et al.*, 2007). Os cromossomos podem ser visualizados via microscopia, já que, durante a divisão celular, mais precisamente na metáfase mitótica, a dimensão e a localização das constrições primária (centrômero) e secundária (região organizadora nucleolar e satélite) podem ser observadas (Sybenga, 1992). A forma mais comum de caracterizá-los é através da cariotipagem, que pode ser convencional (que envolve o uso de corantes que reagem com todo o material genético) ou diferencial (onde são utilizados corantes específicos para determinadas regiões do DNA) (Guerra, 1986; Guerra e Souza, 2002).

A coloração convencional cora o cromossomo inteiro, não permitindo identificar sequências específicas, porém, nos últimos anos, as técnicas de bandeamento cromossômico e a hibridização fluorescente *in situ* (FISH) têm permitido a visualização de blocos ou bandas de coloração diferenciada. Essas técnicas permitem uma melhor caracterização cromossômica e uma interação

entre o conhecimento da biologia celular, da citogenética clássica e genética molecular.

Uma outra informação importante na caracterização genômica é a determinação do tamanho do genoma da espécie (conteúdo de DNA), sendo que essa informação pode ser utilizada não só no melhoramento genético, como também em estudos evolutivos, de biologia celular, sistemática e taxonomia (Loureiro, 2007). O tamanho do genoma em plantas pode ser estimado por alguns métodos, sendo a citometria de fluxo um dos mais utilizados. Nessa técnica, o tamanho do genoma é inferido com base no conteúdo de DNA de células que estão na interfase (Dolezel e Bartos, 2005).

Na citometria, o conteúdo de DNA é estimado a partir da análise dos núcleos dos tecidos vegetais, extraídos, principalmente, das folhas, os quais são corados com fluorocromos específicos e emitem fluorescência que é captada pelo aparelho (citômetro de fluxo), produzindo um histograma com um pico dominante que corresponde aos núcleos na fase G1 do ciclo celular, e um pico menor, correspondendo aos núcleos em G2. Para a determinação do conteúdo de DNA, o pico G1 da planta investigada é comparado com a posição do pico de uma planta referência (padrão) onde o conteúdo de DNA é previamente conhecido (Dolezel, 1991; Loureiro, 2007). Entretanto, é necessário definir o melhor protocolo, já que as espécies respondem diferentemente.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral:

Caracterizar o genoma do coqueiro-gigante e anão, visando gerar informações básicas sobre a cultura via metodologias citogenéticas.

2.2. Objetivos Específicos:

- a) Determinar o cariótipo de coqueiro anão-verde-do-Brasil (AVBr) via coloração convencional;
- b) Identificar bandas CMA/DAPI em cromossomos do coqueiro anão-verde-do-Brasil (AVeBr), via coloração diferencial;
- c) Identificar, em cromossomos do coqueiro-anão-do-Brasil (AVBr), sequências teloméricas via Hibridização Fluorescente *in situ* (FISH);
- d) Determinar o conteúdo de DNA 2C de genótipos de coqueiro-gigante e anão.

3. CAPÍTULOS

3.1. CARIOTIPAGEM CONVENCIONAL E DIFERENCIAL VIA BANDEAMENTO CMA/DAPI E HIBRIDIZAÇÃO FLUORESCENTE *IN SITU* TELOMÉRICA (FISH) EM COQUEIRO-ANÃO (*Cocos nucifera* L.)

3.1.1. INTRODUÇÃO

O coqueiro (*Cocos nucifera* L.) é uma palmeira de clima tropical com grande importância econômica, sendo cultivada em diversos países. Vários produtos podem ser obtidos de diferentes partes da planta, entretanto os principais são provenientes dos frutos como a copra, o óleo, a água de coco, o leite de coco, a fibra, a ração animal, dentre outros (Harries, 1978).

O coqueiro pertence à classe *Monocotyledoneae*, ordem *Palmales*, família *Arecaceae*, subfamília *Coccoideae* e gênero *Cocos*. Este gênero é monoespecífico, apresentando, apenas, a espécie *Cocos nucifera* L., constituído por dois grupos principais, o grupo Anão e o grupo Gigante (Purseglove, 1975). O coqueiro gigante caracteriza-se por apresentar porte elevado, podendo atingir até 30 m de altura. É uma variedade predominantemente alógama, de crescimento rápido e fase vegetativa longa. Seus frutos são considerados de tamanho médio a grande

(Aragão *et al.*,2010). Já o coqueiro-anão caracteriza-se por ser uma variedade precoce, que pode atingir até 12m de altura, apresenta uma fase vegetativa mais curta e frutos menores. Essa variedade é autógama e pode ser dividida em três grupos: anão verde, anão amarelo e anão vermelho (Bourdeix, 1988, Aragão *et al.*,2010;).

Além disso, híbridos podem ser obtidos a partir do cruzamento de variedades desses dois grupos, com características intermediárias, o que é de interesse para programas de melhoramento genético da cultura.

O melhoramento genético do coqueiro tem como principal objetivo selecionar variedades altamente produtivas, que sejam localmente adaptadas e tolerantes à seca e às doenças e pragas, refletindo, diretamente, no aumento da produtividade, da estabilidade de produção e da sustentabilidade do agroecossistema do coqueiro (Loiola,2009).

A literatura reporta que a espécie é diplóide com $2n=2x=32$ cromossomos (Uhl e Dransfield, 1987), entretanto, apesar da importância da espécie, a pesquisa, ainda, é incipiente, ou seja, são poucos os relatos sobre a morfologia, tamanho, simetria do cariótipo, presença de constrições secundárias, dentre outros. Essas informações básicas são importantes para a cultura, considerando-se o desenvolvimento de um programa de melhoramento genético.

Uma forma de se conhecer, morfológicamente, cada cromossomo que compõe uma espécie é por meio da determinação do cariótipo. Segundo Hartl e Jones (1998), o cariótipo de um indivíduo ou de um organismo pode ser caracterizado pelo seu conjunto cromossômico metafásico, sendo organizado de acordo com o comprimento dos cromossomos e a posição dos centrômeros. O cariótipo é representado pelo cariógrama e pelo ideograma, onde são definidos o número e os tipos de cromossomos que compõem o genoma daquela espécie. A construção do cariótipo envolve técnicas de coloração convencional, como também coloração diferencial ou bandeamento, que permitem a detecção de regiões específicas de DNA ao longo dos cromossomos (Guerra, 2000).

Dentre as palmeiras (*Arecaceae*), informações cariológicas foram realizadas na década de 60 por Read, onde o número cromossômico de muitas espécies ficou determinado. No entanto, o trabalho que mais se destacou, no âmbito da citogenética da família, foi realizado por Roser (1994), que descreveu

cariologicamente e caracterizou regiões específicas de DNA de várias espécies da família *Arecaceae* por meio de bandeamentos (RON, CMA, DAPI).

Em coqueiro, a caracterização cromossômica, ainda, é incipiente, fazendo-se necessário gerar conhecimentos que possam auxiliar o melhoramento da cultura. Diante disso, este trabalho teve por objetivo determinar o cariótipo do coqueiro através da coloração convencional e diferencial via bandeamento de regiões cromossômicas específicas por meio de DAPI/CMA e da hibridização fluorescente *in situ*, utilizando-se sondas teloméricas.

3.1.2. REVISÃO

3.1.2.1. Família *Arecaceae*

A família *Arecaceae*, anteriormente denominada *Palmae*, é constituída por espécies conhecidas como palmeiras. As palmeiras são plantas terrestres ancestrais, com fósseis de, aproximadamente, 85 milhões de anos (Rodrigues, 2004) e possuem cerca de 2500 a 3500 espécies, distribuídas em 210 a 236 gêneros (Uhl e Dransfield, 1987). As palmeiras possuem uma expressiva importância econômica devido à diversidade de produtos que delas podem ser obtidos, principalmente os relacionados aos frutos e sementes, os quais servem como fonte de alimentos, medicamentos caseiros e, também, podem ser utilizados na confecção de utensílios e adornos domésticos e, ainda, como matéria-prima para indústrias.

Essa família inclui representantes dióicos e monóicos, de morfologia bastante diversificada. As raízes podem ser subterrâneas ou aéreas. As folhas, tanto curtas quanto longas, apresentam-se de forma palmada, pinadas e inteiras com bainhas abertas ou fechadas e pecíolos curtos ou longos. A inflorescência interfoliares ou infrafoliares na antese apresenta-se em forma de espiga. As flores são, geralmente, trímeras. Os frutos podem ser tanto pequenos como muito grandes com o pericarpo liso ou com presença de espinhos. O tegumento da semente é duro e contém, no seu interior, uma ou mais sementes. As plântulas

possuem folhas inteiras, bífidas e pinadas (Fontes e Ferreira, 2006).

Quanto ao habitat, as palmeiras se desenvolvem melhor nos trópicos e estão amplamente distribuídas por todo o mundo, principalmente em regiões onde o índice pluviométrico é alto (Zofemler, 1994).

O Brasil conta com cerca de 500 espécies nativas de palmeiras; dentre essas, destacam-se as espécies do gênero *Trithrinax*, as quais são endêmicas, *Syagrus* e *Butia*, que têm ampla distribuição pelo território nacional e as espécies de *Attalea*, *Allagoptera* e *Acrocomia*, que são comuns na região central do Brasil.

Do ponto de vista cariológico, estudos realizados com palmeiras se restringiram, apenas, ao número cromossômico. Porém, Roser (1994) descreveu, cariológicamente, 56 taxas, sendo que dessas, 11 gêneros e 17 espécies tiveram seu número cromossômico descrito pela primeira vez. Nesse mesmo trabalho, foram caracterizadas regiões específicas de DNA através de bandeamento C e RON (Região Organizadora de Nucléolos). O autor observou que o número de cromossomos das palmeiras estudadas variou de $2n=36$ a $2n=26$, sendo todas consideradas diplóides.

Conforme Dransfield (1990), gerar conhecimentos sobre a palinologia, anatomia e relações cromossômicas certamente contribuirá para uma compreensão mais refinada da inter- relação entre as palmeiras.

3.1.2.2. O Coqueiro

O coqueiro (*Cocos nucifera* L.) é uma espécie diplóide com $2n=32$ cromossomos, que pertence à família *Arecaceae* e ao gênero *Cocos*. Essa espécie é composta por alguns grupos, entre as quais as mais importantes são as *typica* (gigante) e *nana* (anã). Os híbridos de coqueiro mais empregados, atualmente, são resultantes dos cruzamentos entre essas duas variedades (Aragão *et al*, 2010).

O coqueiro-gigante, também conhecido como coco comum, foi introduzido, no Brasil, por volta de 1553, e, apesar de ser monoico, é predominantemente alógamo, já que não há sincronismo na maturação dos órgãos femininos e masculinos. Esse grupo caracteriza-se por apresentar porte alto, podendo atingir até 30m de altura. Os frutos obtidos dessas palmeiras apresentam tamanho que varia de médio a grande. . A colheita ocorre de 11 a 12 meses após a floração, e

a variedade pode produzir de 60 a 80 frutos/planta/ano. Esses frutos são utilizados como matéria-prima para a indústria de alimentos, na produção de coco ralado ou seus derivados, ou mesmo consumido *in natura* (Aragão et al, 2010).

O coqueiro-anão caracteriza-se por ser um grupo autógamo, dividido em três grupos, distinguidos pela cor do pecíolo, pela ráquis da folha e pela cor do epicarpo do fruto. Tais grupos são denominados coqueiro-anão-verde, anão-amarelo e anão-vermelho (Harries, 1978). Esse grupo, considerado precoce, inicia seu florescimento, em média, com três anos de idade. Apresenta uma produtividade, em média, de 150 a 200 frutos/planta/ano, tendo vida útil em torno de 30 a 40 anos. Seu porte é reduzido, podendo atingir de 10 a 12 m de altura. Os frutos desse grupo são menores. É uma variedade útil principalmente para água de coco, podendo armazenar, em média, 300 mL de água (Aragão *et al.*,2010)

Em relação aos aspectos botânicos, o coqueiro apresenta sistema radicular fasciculado, característico das monocotiledôneas; o caule é do tipo estipe, bastante desenvolvido e resistente; as folhas são do tipo penada, constituídas por folíolos. O coqueiro possui inflorescências paniculadas, axilares, protegidas por brácteas grandes, denominadas espatas. Ao completar seu desenvolvimento, a espata se abre e liberta a inflorescência, que é formada pelo pedúnculo, espigas e flores. Cada espiga apresenta, em sua base, algumas flores femininas e numerosas flores masculinas nos dois terços terminais (Passos, 2006).

O fruto do coqueiro é uma drupa. É formado por uma epiderme lisa ou epicarpo, que envolve o mesocarpo espesso e fibroso, e uma camada muito dura, o endocarpo, que fica mais para o interior do fruto. A semente, envolvida pelo endocarpo, é constituída por uma camada fina de cor marrom – o tegumento – que fica entre o endocarpo e o albúmen sólido. O albumém é uma camada carnosa, branca e muito oleosa, que forma uma grande cavidade, onde se encontra o albúmen líquido. Próximo a um dos orifícios do endocarpo e envolvido pelo albúmen sólido, localiza-se o embrião (EMBRAPA,2006).

O coqueiro é uma das fruteiras mais difundidas no mundo. Devido à sua dispersão e adaptabilidade, ocorre em praticamente todos os continentes e dele podem ser extraídos diversos produtos, sendo utilizados de forma tanto *in natura* quanto industrializada (EMBRAPA, 2011).

O centro de origem do coqueiro, ainda, é um tema de discussão entre os pesquisadores; no entanto, a hipótese mais aceita é que essa palmeira teve

origem no Sudeste Asiático, principalmente nas ilhas entre os oceanos Índico e Pacífico. Dessa região, foi levado para a Índia e, em seguida, para o Leste Africano. Após o descobrimento do Cabo da Boa Esperança, foi introduzido no Oeste Africano e daí para as Américas e toda a região tropical do globo. Atualmente, o coqueiro encontra-se em mais de 200 países (Foale e Harries, 2009).

Grande parte da produção de coco localiza-se nos países asiáticos, sendo a Indonésia o país que mais produz coco no mundo, seguido pelas Filipinas e Índia (FAO, 2012). Até 1990, o Brasil ocupava a 10ª posição no *ranking* mundial e, atualmente, ocupa a quarta posição, refletindo o avanço da cultura no país (EMBRAPA, 2010). Apesar desse avanço envolver, praticamente, todas as regiões do país, as maiores plantações e produções se concentram na faixa litorânea do Nordeste e em parte da região Norte. Devido às condições climáticas favoráveis, ambas as regiões são responsáveis por 70% da produção do coco brasileiro. O estado que mais produz coco, no país, é a Bahia, seguido por Ceará e Sergipe, que, juntos, respondem por mais de 50% da produção nacional de coco (AGRIANUAL, 2012).

3.1.2.3. O coqueiro-anão-verde

A cor verde é determinada pelos genótipos “rrGG” ou “rrGg” (Bourdeix, 1988). Devido a essa cor, os frutos são mais aceitos para o consumo de água. A literatura reporta que alguns consumidores, principalmente das regiões Sul e Sudeste do Brasil, acreditam que os frutos dos anões amarelo e vermelho são frutos do anão verde maduro, portanto sua qualidade pode estar afetada, sendo o estágio de maturação confundido com a cor do fruto (Castro, 2007).

O coqueiro anão verde apresenta uma alta taxa de fecundação em torno de 95% (Bourdeix,1988). Dependendo das condições ambientais, é uma das cultivares que apresentam florescimento mais precoce, com 2,5 anos de idade (Aragão *et al.*, 2002). Sua fase feminina apresenta simultaneidade com a fase masculina da mesma inflorescência e com a fase masculina da inflorescência seguinte (Konan *et al.*,2008). O anão verde é o mais tolerante às condições desfavoráveis e é o menos homogêneo, assemelhando-se ao coqueiro-gigante. Apresenta folhas de tamanho menor, mas o número de folíolos nas folhas é

semelhante ao de outros cultivares. Nas idades de dez a doze anos, os frutos apresentam os maiores pesos do fruto e fibra. O volume do albúmem líquido dessa cultivar é maior que as demais cultivares nos frutos com seis meses (Aragão *et al.*, 2001; Passos e Passos, 2003).

3.1.2.4. Determinação do Cariótipo

A técnica foi desenvolvida no século passado e seu crescente progresso acompanhou o aprimoramento de técnicas e equipamentos de microscopia. O primeiro trabalho com citogenética foi realizado em milho, em 1929 por Mc Clintock (Gill *et al.*, 1997).

A citogenética é considerada como o estudo da genética por meio da citologia. Ela envolve qualquer estudo relacionado com cromossomo, isolado ou em conjunto, condensado ou distendido, tanto no que diz respeito à sua morfologia, organização, função e replicação, quanto à sua variação e evolução (Sacchet, 1999).

A análise cromossômica sempre foi um dos campos estimulantes da citologia e da genética, tendo relação entre estudos taxonômicos e evolutivos, bem como no melhoramento genético e na caracterização de germoplasma. Apesar da revolução provocada pela Genética Molecular, a análise cromossômica continua sendo a única maneira de se observar o genoma de um eucarioto na forma de blocos individualizados de material genético, fáceis de serem mensurados, manipulados de diferentes formas (Brammer *et al.*, 2007).

Apesar dos grandes avanços dos últimos anos nas pesquisas em biologia molecular, a citogenética, ainda, é considerada como uma área de pesquisa relevante, pois dá suporte às novas tecnologias, seja nas técnicas de engenharia genética ou nas pesquisas de sequenciamento genômico.

Nos últimos anos, avanços consideráveis foram observados na citogenética molecular. A implantação de técnicas de bandeamento cromossômico e a hibridização fluorescente *in situ* (FISH) permitem a visualização de blocos ou bandas de coloração diferenciada, o que contribui com uma melhor caracterização cromossômica e permite interação entre o conhecimento da biologia celular, da citogenética clássica e da genética molecular.

Os cromossomos podem ser visualizados via microscopia, já que, durante a divisão celular, mais precisamente na metáfase mitótica, a dimensão e a localização das constrições primária (centrômero) e secundária (região organizadora nucleolar e satélite) podem ser observadas (Sybenga, 1992).

O cariótipo pode ser representado pelo cariograma e pelo ideograma. O cariograma corresponde a medidas físicas dos cromossomos obtidas a partir de fotomicrografia. No cariograma, os cromossomos são reunidos em pares e organizados de forma decrescente ou crescente, já o ideograma é o desenho esquemático do cariograma (Guerra e Souza, 2002). Para montagem do cariograma, os cromossomos são classificados de acordo com a posição do centrômero, comprimento total dos cromossomos e razão entre os braços curtos e longos (Levan *et al.*, 1964; Guerra, 1986). Além dessas, outras características também são utilizadas como o tamanho do genoma, características dos telômeros, tamanho e posição dos Knobs heterocromáticos, e as constrições secundárias (RONs) (Singh, 1993).

O cariótipo pode ser simétrico ou assimétrico, sendo que, no cariótipo simétrico, os cromossomos apresentam tamanhos semelhantes e os centrômeros são medianos ou submedianos, enquanto que cariótipos assimétricos são aqueles que apresentam cromossomos de tamanho mais heterogêneo e os centrômeros terminais ou subterminais. Conforme Paszko (2006), o aumento da assimetria pode ocorrer devido à mudança da posição centromérica de mediana/submediana para terminal/subterminal ou devido ao acúmulo de diferenças no tamanho relativo entre os cromossomos que formam o complemento. Para avaliar a assimetria cariotípica, existem alguns métodos, como, por exemplo, o índice TF (Total Form) estabelecido por Huziwara (1962), que corresponde à razão entre o somatório dos braços curtos e o comprimento do lote haplóide, podendo variar de 0 a 50%, sendo este último valor característico de cariótipos simétricos. Além desse, ainda pode ser utilizado o índice de assimetria AI proposto por Paszko (2006), que se baseia no coeficiente de variação do índice centromérico e do comprimento total dos cromossomos.

A cariotipagem pode ser caracterizada de duas formas: por coloração convencional, onde é utilizado um corante (Giemsa, Carmim acético, Orceína acética e Reativo de Schiff) que reage com todo o DNA fazendo com que esse fique completamente destacado, ou seja, não há formação de bandas. Por outro

lado, na coloração diferencial, são utilizados corantes específicos para certas regiões cromossômicas, gerando bandas. O bandeamento foi, primeiramente, difundido para cromossomos humanos e, posteriormente, para cromossomos de animais e vegetais. As bandas são visíveis como regiões de alta e baixa intensidade sob microscópio de fluorescência ou como áreas diferenciadas (Sharma e Sharma, 1994).

Tanto na coloração convencional quanto na diferencial, é necessário obter células mitóticas ou meióticas que apresentem cromossomos bem espalhados e condensados de forma a permitir a distinção dos cromossomos e realização das mensurações. Dessa forma, o material vegetal deve ser preparado de maneira a preservar as condições dos cromossomos, permitindo uma boa visualização dos mesmos. De maneira geral, utiliza-se um antimitótico, seguido de fixação do material para posterior coloração.

Dentre os antimitóticos utilizados no pré-tratamento, destaca-se o paradiclorobenzeno (PDB). O PDB é o mais útil do grupo dos benzenos nas pesquisas cromossômicas. Ele causa inibição do fuso, como também torna as constricções cromossômicas mais visíveis. O PDB apresenta uma ampla utilização, podendo ser utilizado tanto para espécies com cromossomos longos quanto para aquelas com cromossomos pequenos, o que varia é o tempo de tratamento estabelecido de forma diferenciada para cada espécie. Segundo Sharma e Sharma (1994), a temperatura requerida deve estar entre 10 a 16°C para obter resultados satisfatórios.

Na coloração convencional, utilizam-se corantes que reagem com todo o material genético, fazendo com que os cromossomos fiquem uniformemente corados. Dentre os corantes mais utilizados, destacam-se a fucsina, que pode ser ácida ou básica, a qual é bastante utilizada em estudos cromossômicos, o reagente Feulgen, que apresenta alta especificidade ao DNA e é muito utilizado em cariótipos (Guerra, 1986), e o Giemsa, que é uma mistura de vários corantes do grupo azul de metileno e seus produtos de oxidação. O corante Giemsa é um corante que marca os cromossomos uniformemente. Essas técnicas consideradas convencionais são limitantes qualitativamente e, muitas vezes, não proporcionam uma diferenciação longitudinal dos cromossomos. Contudo, com o emprego dessas técnicas, é possível determinar: o número cromossômico das espécies, as medidas dos cromossomos, o comprimento total da cromatina, o índice de

assimetria, a visualização da região centromérica, da constrição secundária e do segmento satélite a ela associada, quando presente, e, geralmente, a classificação dos cromossomos.

Muitas vezes, os padrões cromossômicos, revelados convencionalmente, são insuficientes para uma análise detalhada do cariótipo, principalmente quando os cromossomos são semelhantes. Contudo, técnicas de coloração diferencial têm contribuído para um estudo mais refinado dos cariótipos (Gill et al., 1991; Sumner 2003).

Dentre as técnicas de coloração diferencial, destacam-se os bandeamentos que identificam a distribuição e a quantidade de heterocromatina (C, G, N), diferenciação de tipos de heterocromatina (AT e CG), usando fluorocromos (DAPI e CMA₃), localização de regiões organizadoras de nucléolo, mediante impregnação pela prata (Ag-NOR). Esses são importantes para a identificação de cromossomos homólogos e homeólogos e para a caracterização de polimorfismos ou de relações de parentesco entre espécies próximas, distinguindo possíveis rearranjos cromossômicos (Guerra e Souza, 2002).

A técnica de coloração com fluorocromo CMA/DAPI é bastante informativa, pois não altera a morfologia dos cromossomos e permite uma análise mais detalhada do cariótipo. Essa técnica é um procedimento de coloração com os fluorocromos cromomicina A₃ (CMA), que reconhece sítios ricos em GC, e o 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), que reconhece sítios ricos em AT. O fato de se detectar a ocorrência e a posição física de diferentes famílias de DNA altamente repetido (heterocromatina) implica maior compreensão de como os genomas estão organizados e as relações entre espécies, gêneros e famílias, bem como os mecanismos de ajustes que ocorrem nos cariótipos de diferentes organismos durante o processo evolutivo (Guerra e Souza, 2002). Vários pesquisadores têm utilizado essa técnica em diferentes famílias botânicas, como, por exemplo, *Rutaceae*, *Cyperaceae*, *Orchidaceae*, entre outras (Guerra, 2000).

A caracterização citogenética da heterocromatina realizada a partir de colorações, empregando-se fluorocromos, pode auxiliar na caracterização de espécies e variedades. Analisando-se seis espécies de *Citrus* através do emprego dos fluorocromos DAPI e CMA, Guerra (2000) verificou divergências quantitativas e heteromorfismo no padrão de bandas das espécies. Divergências nos padrões de banda DAPI também foram observadas em espécies da família *Papilionoidae*

(Souza e Benko –Iseppon, 2004). O uso da cromomicina A₃ também pode ser empregado na detecção de regiões organizadoras de nucléolo (RONs), visto que essas regiões são, normalmente, flanqueadas por regiões de heterocromatina constitutiva ricas em pares de bases CG. Em *Allium communtatum* (*Aliaceae*), a aplicação das técnicas CMA/DAPI e coloração com nitrato de prata revelaram que as marcações com CMA₃ encontravam-se adjacentes às RONs (Besendorfer et al., 2002).

As RONs são segmentos específicos dos cromossomos que contêm cópias em *tandem* dos genes 5S, 18S, 26S do DNAr, que codificam RNA ribossômico. Essas regiões são, normalmente, localizadas como constrições secundárias dos cromossomos profásicos a metafásicos, sendo responsáveis pela formação dos nucléolos, estruturas presentes nas células eucariotas responsáveis pela biogênese dos ribossomos (Sumner, 2003).

A localização das RONs pode ser utilizada na diferenciação intra e interespecífica, além de servirem como padrões para auxiliar questões de posicionamento taxionômico de uma espécie em termos de evolução do cariótipo (KlinKhardt, 1998).

A técnica de hibridização *in situ* é ideal para localizar sequências de ácidos nucléicos (DNA ou RNA) dentro da célula, em organelas, cromossomos ou no núcleo celular. Com a FISH, é possível: a) Construir mapas físicos em cromossomos; b) analisar estruturas e aberrações cromossômicas; c) investigar a fusão, evolução cromossômica e de genomas; d) realizar a determinação da expressão gênica; e) realizar a determinação sexual. Várias questões podem ser investigadas com essa técnica, sendo muito utilizada na citogenética médica, em programas de melhoramento animal e vegetal, bem como no estudo filogenético e evolutivo (Leitch *et al.*, 1994).

A hibridização fluorescente *in situ* (FISH) consiste na hibridização de uma sequência de DNA ou RNA com uma sequência de nucleotídeos complementar situada no material genético em estudo. Essa técnica é comumente utilizada para verificar se o DNA alvo possui essa sequência e qual é a sua exata localização. Para visualizar a hibridização, é necessário marcar a sequência que irá parear com alguma molécula de fácil visualização, funcionando como uma sonda (Guerra, 2004). Essa técnica tem gerado avanços importantes na citogenética de plantas, destacando-se a construção de mapas físicos, a investigação detalhada

da estrutura cromossômica, o acompanhamento da quantidade de cromatina introduzida em cruzamentos interespecíficos e a análise de pareamentos intergenômicos em plantas híbridas (Scott *et al.*, 2004).

As sondas são sequências de DNA isoladas que se encontram representadas no cromossomo uma única vez ou que apresentam milhares de cópias nos cromossomos. Os primeiros trabalhos com FISH utilizaram, como sondas, sequências de DNA que se encontravam repetidas em *tandem*. Entre essas, as mais comuns são os DNAs satélites, o gene que codifica o RNA ribossomal 5S e a sequência que codifica o precursor 45S dos RNAs ribossomais 28S, 18S, geralmente referidos como DNAr 5S e 45S, respectivamente (Guerra, 2004).

Além dessas, também se destacam as sequências teloméricas. Essas sequências são normalmente curtas, altamente repetidas em *tandem* e se encontram nas regiões terminais dos cromossomos, formando os telômeros (Sykorova *et al.*, 2003). Os telômeros são as estruturas de proteção e essenciais para a estrutura e funcionalidade dos cromossomos, e, em plantas, eles, normalmente, são sequências conservadas compostas pela sequência (TTTAGGG)_n detectadas em plantas modelo usadas, comumente, na genética molecular (*Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana tabacum*, *Oryza sativa* e *Zea mays*), com exceção dos telômeros do tomateiro e das *Liliaceae* (Richards e Ausubel, 1988; Sykorova *et al.*, 2003).

Sykorova *et al.* (2003) relatam que, em monocotiledôneas, algumas espécies não apresentam o tipo telomérico comum em plantas. Os autores observaram que, em 16 espécies de 12 famílias, a sequência telomérica é similar aos telômeros observados nos cromossomos humanos (TTAGGG).

Geralmente, as sondas teloméricas hibridizam com as regiões terminais dos cromossomos, no entanto, de acordo com Kolchinsky e Gresshoff (1994), essas sondas podem hibridizar com outras regiões dos braços cromossômicos, o que indica que o material em estudo sofreu translocações ou inversões: tais informações são úteis para comparar genomas.

3.1.3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1.3.1. Material vegetal

Para este estudo, foram utilizadas pontas de raízes, obtidas de dez plantas (mudas) do grupo de coqueiro Anão-Verde, mantidas em casa de vegetação da Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado do Rio de Janeiro (PESAGRO), localizada em Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro. As pesquisas foram realizadas no laboratório de melhoramento genético vegetal (LMGV), no setor de citogenética da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), Campos dos Goytacazes, RJ e no laboratório de melhoramento de plantas (LAMEP) da Universidade Estadual de Santa Cruz, localizada em Ilhéus, BA.

3.1.3.2. Definição do protocolo para a observação das placas metafásicas

Pontas de raízes, medindo, aproximadamente, 2 cm de comprimento, foram coletadas e submetidas ao pré-tratamento com diferentes soluções antimitóticas para melhor visualização dos cromossomos. Os antimitóticos testados foram a 8 hidroxiquinoleína, o paradiclorobenzeno, a colchicina, nos tempos de 4h, 6h, 8h e 10h, nas temperaturas 4°C, 12°C e ambiente. Após a definição do melhor antimitótico para a espécie, as pontas foram lavadas em água destilada e fixadas em solução Carnoy (3 álcool etílico: 1 ácido acético), durante 24h, e mantidas no *freezer*, até o momento do preparo das lâminas.

3.1.3.3. Obtenção das placas metafásicas

As placas metafásicas foram obtidas a partir do protocolo de suspensão dos núcleos celulares (Damasceno Junior *et al.*, 2009). Para tal, as pontas foram separadas por espessura e transferidas para tubos *ependorf* de 1ml e submetidas à digestão enzimática (pectinase 20% e celulase 2%) à temperatura de 37°C, durante 6h, em banho-maria. Ao final da digestão, foram realizadas 3 centrifugações durante 10 min a 5000 rpm, na presença de água destilada para a

suspensão dos núcleos. Em seguida, os núcleos foram ressuspensos em solução de 2:1 (metanol:ácido acético) e conservados em *freezer* até a montagem das lâminas. Cerca de 50 lâminas foram preparadas em câmara úmida, sendo utilizado 1ml do material preparado e deixadas para secar à temperatura ambiente. Após a secagem, foram aplicadas diferentes técnicas de coloração.

3.1.3.4. Cariotipagem convencional

Para a cariotipagem convencional, as lâminas foram coloridas com solução de Giemsa 2%, durante 15 min, à temperatura de 37°C. Posteriormente, as lâminas foram cobertas com lamínulas e observadas em microscópio ótico Olympus BX 60, sob campo claro nas objetivas de imersão de 60 e 100X de aumento.

Dentre as centenas de células analisadas, cinco metáfases, contendo cromossomos com boa condensação e bom espalhamento, foram capturadas utilizando-se o *software* de captura Image-Pro Plus versão 5.1 (Media Cybernetics,2004). Foram mensurados o comprimento absoluto dos cromossomos e o comprimento dos braços longo e curto com auxílio do programa Micro Measure versão 3.3 (Reeves e Tear, 2000).

Com base nos dados, foi estimada a razão entre braços (r =braço longo/braço curto), o comprimento do lote haploide (CLH= soma do comprimento absoluto dos cromossomos metafásicos) e o índice centromérico (IC=[comprimento do braço curto/comprimento total] X 100). Esses dados foram utilizados para a construção do cariograma e do ideograma.

Para avaliação da assimetria cariotípica, foi utilizado o índice *Total Form* (TF) (Huziwara, 1962):

$$TF = \frac{(\sum \text{comprimento dos braços curtos})}{CLH} \times 100$$

E, também, o índice de assimetria (AI) proposto por Paszko (2006):

$$AI = \frac{CVc \times CVic}{100}$$

Os cromossomos foram classificados conforme Guerra (1986), o qual propôs quatro tipos cromossômicos: metacêntricos (M, $r=1,00$ a $1,49$; $ic=40,1$ a $50,0$), submetacêntricos (SM, $r=1,50$ a $2,99$, $ic=25,1$ a $40,0$), acrocêntricos (A, $r=3,00$ a 7 , $ic=0,01$ a $25,0$) e telocêntricos (T, $r=$, $ic=0$). Os cromossomos homólogos foram agrupados de acordo com o tamanho absoluto dos cromossomos, a posição do centrômero e a relação entre os braços cromossômicos.

3.1.3.5. Bandeamento CMA/DAPI

Para o bandeamento CMA/DAPI, foi utilizado o protocolo proposto por Guerra (2002). Lâminas foram coloridas com uma gota de CMA cobertas com lamínulas e mantidas em câmara úmida, durante 1h, no escuro. Posteriormente, foram retirados a lamínula e o excesso de corante com um jato de água, e as lâminas foram secas. Em seguida, foi adicionada uma gota de DAPI às lâminas e foram mantidas durante 30 min, em câmara úmida, no escuro. As lâminas foram montadas com o meio glicerol/McIlvaine. Tanto as lâminas da FISH quanto as coloridas com CMA/DAPI foram observadas em microscópio ótico de fluorescência Olympus BX 60 nas objetivas de imersão de 60X e 100X de aumento nos filtros de 460nm e 570nm.

3.1.3.6. FISH telomérica

O protocolo para hibridização *in situ* fluorescente foi proposto por Souza *et al.* (2010) com modificações. Lâminas foram submetidas ao tratamento com 100 μ g/mL RNase em tampão 2XSSC e incubadas em câmara úmida por 1 h a 37°C, seguido de lavagem em 2XSSC em RT e imersas em 4% paraformaldeído em RT por 10 min. Outra lavagem em 2XSSC foi realizada, com posterior desidratação em série alcoólica 70% e 96%. Após a secagem das lâminas ao ar, foi adicionada a mistura de hibridização com o volume final de 50% formamida, 10% dextran sulfato, 2XSSC, 0.13% SDS (Sodium dodecyl sulfato), mais 66 ng de sonda genômica obtida por PCR:

(5'-AAATCCCAAATCCCAAATCCCAAATCCCAAATCCCAAATCCC-3' e 5'-TTTAGGGTTTAGGGTTTAGGGTTTAGGGTTTAGCGTTTAGG-3')

e marcada por Nicktranslation, seguindo o protocolo do fabricante. A mistura de hibridização foi aquecida a 75 °C por 10 min. As preparações citológicas, contendo a mistura de hibridização, foram desnaturadas a 75 °C por 10 min e incubadas *overnight* a 37 °C. Os banhos pós-hibridação foram realizados a 42 C em 2xSSC, 0,1XSSC e, novamente, em 2XSSC. As sondas teloméricas foram detectadas com Digoxigenin-labeled em meio BSA 5%. O excesso de anticorpo foi eliminado com lavagens em 4XSSC/0.2% Tween 20. As lâminas foram montadas e contracoradas com meio DAPI/Vectashield® (H-1200) e estocadas a 6 - 8 °C até análise.

3.1.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Constatou-se que o protocolo mais adequado para a espécie foi o que utilizou o paradiclorobenzeno como solução antimitótica durante 10h, a 4°C. Metáfases mitóticas com boa condensação e separação dos cromossomos foram observadas conforme a figura 1. Em todas as metáfases analisadas, contaram-se 32 cromossomos (Figura 1 e 2), o que está em concordância com os resultados de Sisunandar *et al.* (2010), o que, em sendo uma espécie diploide, indica $x=n=16$ pares, o que foi confirmado pelo cariógrama (Figura 1A). Na família *Arecaceae*, aparentemente, o número cromossômico básico observado é de $x = 18$ (Moore,1973). Contudo, outros dados foram encontrados, como $x = 17$, de ampla ocorrência, sendo $x = 16$, 14 e 13, também, representativos (Raven, 1975). De acordo com Roser (1994), na família *Arecaceae*, o número de cromossomos pode variar de $2n= 26$ cromossomos a $2n= 36$ cromossomos.

O comprimento dos cromossomos do coqueiro-anão variou de 5,57µm a 2,13µm (Tabela 1). Roser (1994) observou que, em muitas espécies de palmeiras, o comprimento cromossômico variou de 6 µm a 1,5 µm, Sisunandar *et al.* (2010), trabalhando com embriões zigóticos criopreservados de coqueiro-anão-amarelo, realizaram uma análise cariológica de tal material e observaram 16

pares cromossômicos, com o comprimento variando de 5,47 μm a 2,03 μm . Esses valores, encontrados por outros autores, são próximos aos encontrados neste trabalho, e as diferenças de resultados podem ser devidas ao grau de condensação dos cromossomos provocados pelo agente antimitótico. Os cromossomos de coqueiro podem ser considerados de tamanho médio, pois Fukui (1996) considera cromossomos metafásicos pequenos aqueles que apresentam um comprimento inferior a 3 μm , médios variam de 3 a 8 μm e grandes aqueles cujo comprimento é superior a 8 μm .

Dos dezesseis pares de cromossomos observados neste trabalho, 5 pares foram classificados como submetacêntricos e 11 pares metacêntricos, resultados similares aos obtidos por Sisunandar *et al.*, (2010), porém os 5 pares submetacêntricos observados neste trabalho foram o 1, 2, 3, 4 e o 16, diferente do observado pelos autores supracitados que observaram como sendo submetacêntricos os pares 3, 4, 5, 7 e 9. A diferença quanto à classificação do tipo cromossômico pode ser atribuída ao tipo de antimitótico utilizado, ao método de classificação, ou a inversões e translocações que podem ocorrer durante a evolução da espécie.

Na família *Arecaceae*, o tipo cromossômico metacêntrico e o submetacêntrico são os mais comuns (Roser, 1994), no entanto outros tipos já foram observados. Abreu *et al.* (2011), ao caracterizar, cariologicamente, a macaúba (*Acrocomia aculeata* – *Arecaceae*), observaram 15 pares cromossômicos, sendo dois do tipo acrocêntrico.

O comprimento do lote haplóide (CLH) foi de 58,36 μm . O CLH permite inferir o tamanho aproximado do genoma da espécie. Na família *Arecaceae*, são poucos os trabalhos que caracterizam esse índice, contudo Corrêa *et al.* (2009) realizaram uma análise cariológica em 5 palmeiras do gênero *Butia* e observaram que o CLH variou de 32,21 μm a 37,83 μm . Já Oliveira (2011), trabalhando com 3 espécies do gênero *Euterpe* (*Arecaceae*), observou valores do CLH próximos aos obtidos no presente estudo. Na espécie *Euterpe edulis*, o CLH foi 49,50 μm ; em *Euterpe oleraceae*, foi 51,30 μm e, em *Euterpe precatória*, foi 59,39 μm . Esses dados permitem concluir que a espécie *C. nucifera*, em relação ao comprimento do lote haplóide, é mais semelhante às espécies do gênero *Euterpe* que às do gênero *Butia*.

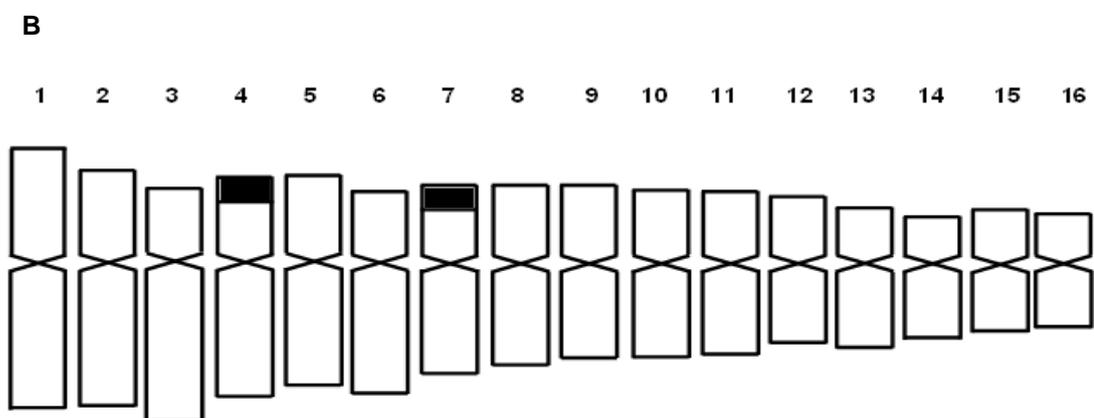
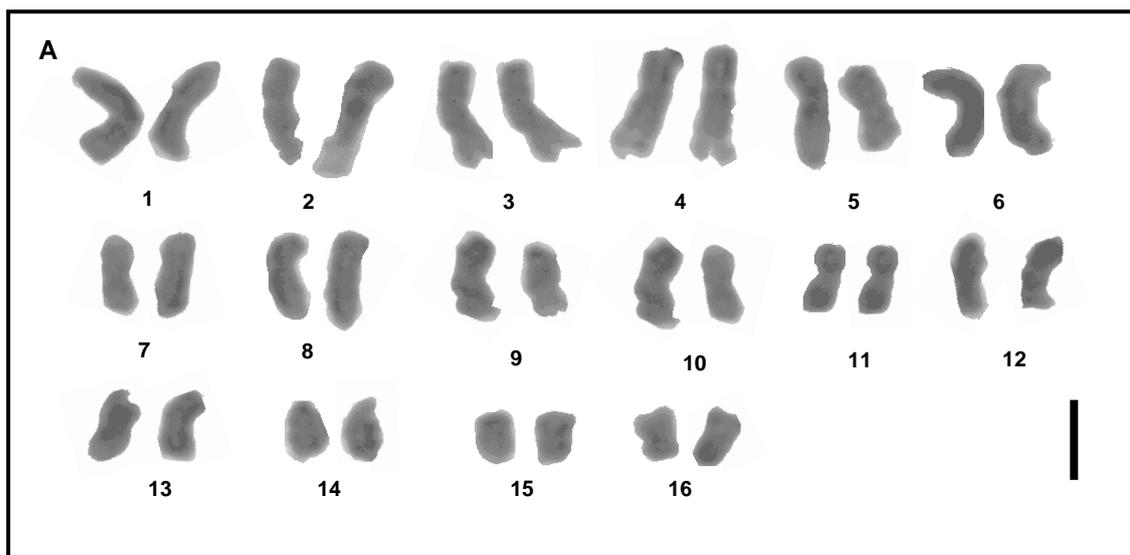


Figura 1- A) Cariograma, evidenciando os 16 pares cromossômicos; B) Ideograma, ressaltando os pares 4 e 7, que apresentam os blocos heterocromáticos ricos em CG detectados pelo bandejamento DAPI/CMA.

Tabela1- Comprimento médio dos braços longos (BL), dos braços curtos (BC) e dos cromossomos (C), razão entre os braços longo/curto (r), índice centromérico (IC), e tipo cromossômico (TC) identificados em genótipos de coqueiro anão-verde.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	CLH
BL	3,52±0,03	3,23±0,15	3,09±0,10	2,76±0,02	2,59±0,03	2,41±0,12	2,27±0,12	2,15±0,11	2,04±0,10	1,97±0,01	1,81±0,03	1,73±0,09	1,60±0,04	1,49±0,05	1,31±0,10	1,31±0,03	
BC	2,05±0,04	1,68±0,04	1,44±0,03	1,65±0,02	1,62±0,04	1,56±0,02	1,51±0,03	1,50±0,09	1,53±0,02	1,42±0,04	1,46±0,05	1,34±0,03	1,33±0,04	1,13±0,04	1,04±0,11	0,82±0,03	
C	5,57±0,04	4,91±0,03	4,53±0,07	4,41±0,05	4,21±0,05	3,97±0,02	3,78±0,09	3,65±0,04	3,57±0,07	3,39±0,07	3,27±0,03	3,07±0,04	2,93±0,05	2,62±0,04	2,35±0,10	2,13±0,09	58,36
r	1.71	1.92	2.14	1.67	1.49	1.44	1.49	1.43	1.33	1.38	1.23	1.29	1.20	1.31	1.25	1.59	
IC	0,36	0,34	0,31	0,37	0,4	0,4	0,4	0,41	0,42	0,41	0,44	0,43	0,45	0,43	0,44	0,38	
TC	SM	SM	SM	SM	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	SM	

M= cromossomo metacêntrico

SM= cromossomo submetacêntrico

CLH= comprimento do lote haplóide

O índice *Total Form* (TF) estimado para a espécie foi de 39,5%. De acordo com Huziwara (1962), esse índice pode variar de 0 a 50%, sendo que índices maiores que 45% são característicos de cariótipos extremamente simétricos. O índice de assimetria AI calculado conforme Paszko (2006) foi de 24,5.

A assimetria cariotípica é determinada pela variação do comprimento cromossômico e da posição do centrômero. Conforme os resultados, ambas estimativas de simetria de cariótipo indicam que o cariótipo do coqueiro pode ser considerado assimétrico. Acredita-se que espécies que apresentam cariótipo assimétrico sejam evolutivamente avançadas (Coelho e Battistin, 1996), ou seja, ao longo da evolução, as espécies sofreram mutações artificiais ou naturais (Maffei *et al.*, 1996).

Após a dupla coloração com os fluorocromos CMA e DAPI, foram observados blocos heterocromáticos ricos em citosina e guanina (CMA), terminais visíveis em 2 pares cromossômicos (Figura 2D e 2E). Esses blocos foram localizados nos braços curtos dos pares cromossômicos 4 (cromossomos submetacêntricos) e 7 (cromossomos metacêntricos). Esses blocos se situam, exatamente, na região organizadora de nucléolo (RON). A RON é um segmento cromossômico que apresenta cópias múltiplas (de 500 a 1000 cópias) dos dois maiores segmentos 18S e 28S de rRNA (Sybenga, 1992; Caixeiro, 1999). Durante a fase de contração mitótica dos cromossomos, a RON ativa na interfase se torna visível como uma constrição, denominada de constrição secundária, que pode se situar na região terminal ou intersticial do cromossomo e, quando localizada nesta última posição, dá origem ao satélite (Schubert, 2007). O comprimento dos satélites observados foi de 1.36 μm (cromossomo 4) e 0.85 μm (cromossomo 7).

Roser (1994), também, analisou o padrão de bandas CMA/DAPI em várias espécies de *Arecaceae*. O autor ressaltou que, na maioria das espécies estudadas, foram encontrados sinais de CMA em, apenas, 1 par cromossômico, e esses sinais estavam localizados na região subterminal onde, conforme observado nesse estudo, encontrava-se a região organizadora de nucléolo. No gênero *Butia*, os cariótipos das espécies estudadas exibiram dois pares cromossômicos satelitados, sendo um par submetacêntrico e um par metacêntrico (Corrêa *et al.*, 2009).

Oliveira (2011), também, observou 2 pares de cromossomos satelitados nas três espécies do gênero *Euterpe* (*Arecaceae*); em todas, os satélites foram

identificados na região subterminal dos braços longos dos cromossomos. De acordo com Roser (1999), em palmeiras, podem ser observados satélites nos braços longos, entretanto é mais comum encontrar satélites nos braços curtos cromossômicos.

Gaiero *et al.* (2012), ao utilizarem bandeamento CMA/DAPI para caracterizar palmeiras da espécie *Trithrinax campestris*, observaram sinais de CMA em quatro pares cromossômicos, e, ao contrário do observado em muitas espécies de *Arecaceae*, esses sinais localizaram-se em regiões próximas ao centrômero, ou seja, regiões não coincidentes com as RONS.

A hibridização fluorescente *in situ* (FISH) com a sonda telomérica revelou marcações, exclusivamente, nos terminais de todos os cromossomos, embora, em alguns cromossomos, a marcação tenha sido mais discreta (Figura 2E). Esses resultados permitem inferir que o coqueiro não sofreu translocações e inversões, já que não foram encontrados sinais teloméricos nas regiões intersticiais dos cromossomos.

Os sinais discretos observados em alguns cromossomos podem ter ocorrido devido à redução dos telômeros durante a fase de desenvolvimento da planta. Segundo Cowell *et al.* (2002), essa redução é comum e varia durante o desenvolvimento, sendo recuperada na passagem de uma geração somática para outra, atravessando um período de meiose e desenvolvimento embrionário. Durante esse período, sabe-se que as células sofrem mudanças bruscas dos seus padrões de metilação de DNA e modificações de histonas em relação às células somáticas (Cowell *et al.*, 2002). É possível que, nesse momento, a célula faça, também, um reajuste dos seus telômeros. Sabe-se que, em plantas, ocorrem formas alternativas de manutenção dos telômeros, por meio de recombinação e conversão gênica, reportadas em *Arabidopsis* (Riha *et al.*, 2001).

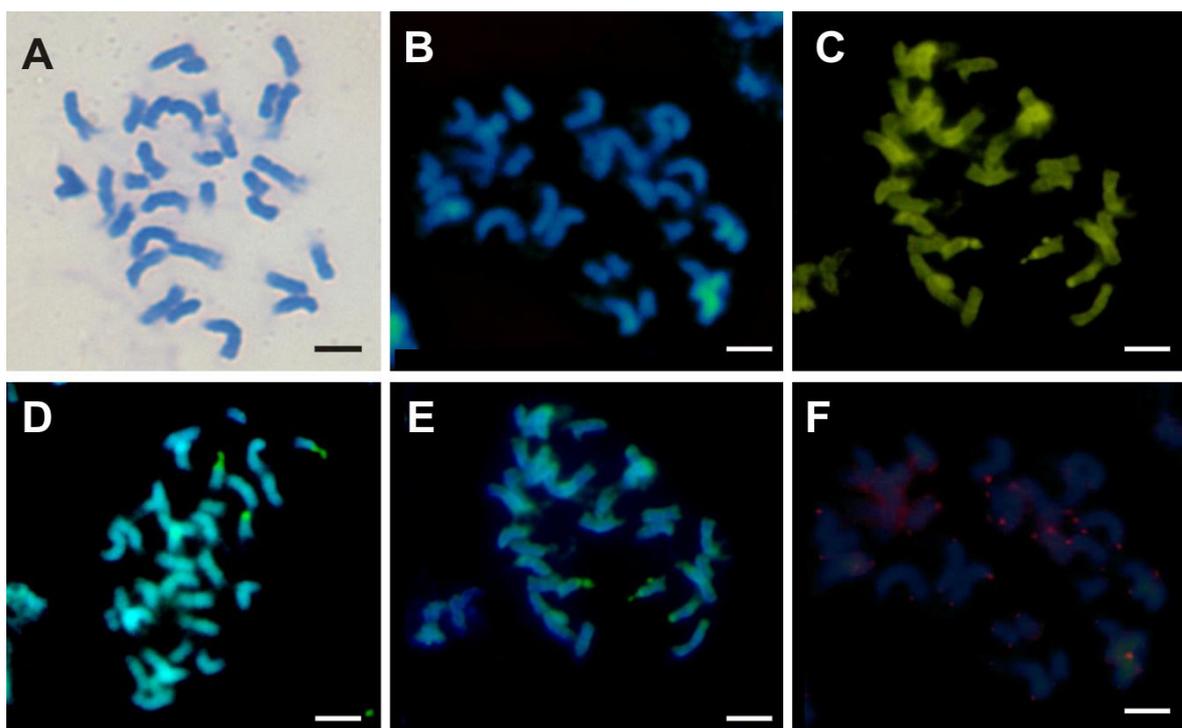


Figura 2- Metáfases mitóticas de coqueiro (A a F). A) Coloração convencional com Giemsa 5%; B) Coloração com DAPI; C) Coloração com Cromomicina (CMA); D e E) Bandeamento CMA/DAPI; F) Hibridização fluorescente *in situ* (FISH), utilizando-se sonda telomérica.

3.1.5. CONCLUSÕES

Com base nos resultados, conclui-se que:

1. O coqueiro-anão apresenta um cariótipo assimétrico com 5 pares de cromossomos submetacêntricos e 11 de cromossomos metacêntricos;
2. A espécie apresenta duas regiões organizadoras de nucléolo, uma no par 4 e outra no par 7;
3. As marcações teloméricas foram identificadas nas regiões terminais dos cromossomos, o que indica que, durante a evolução da espécie, não houve eventos de translocações ou inversões;
4. A espécie apresenta a sequência telomérica (TTTAGGG)_n conforme observado na maioria dos vegetais.

3.2. TAMANHO DO GENOMA DE COQUEIRO (*Cocos nucifera* L. - *Arecaceae*)- GIGANTE E ANÃO

3.2.1. INTRODUÇÃO

O coqueiro pertence à classe *Monocotyledoneae*, ordem *Palmales*, família *Arecaceae*, subfamília *Cocoideae* e gênero *Cocos*. Esse gênero apresenta, apenas, a espécie *Cocos nucifera* L., diplóide ($2n=2x=32$ cromossomos), sendo constituída por dois grupos principais: o Nana (coqueiro anão) e o Typica (coqueiro gigante) (Purseglove, 1975). Do cruzamento dessas duas variedades, obtém-se o híbrido intervarietal, de ampla utilidade comercial, tanto *in natura* (uso culinário, água de coco, doces, bolos, etc.) quanto agroindustrial (água de coco, leite de coco, óleo entre outros) (Batugal *et al.*, 2009).

O coqueiro-gigante pode atingir até 30 m de altura, apresenta frutos de tamanho médio a grande, é uma variedade alógama, seus frutos são utilizados como matéria-prima para a indústria de alimentos, na produção de coco ralado ou seus derivados, ou mesmo consumido *in natura*; já o coqueiro-anão apresenta um porte menor, podendo atingir até 12 m de altura, os frutos são menores e é uma planta autógama. No Brasil, a sua produção se destina, principalmente, ao mercado de consumo de água de coco (Aragão *et al.*, 2010).

O melhoramento genético do coqueiro tem como principal objetivo selecionar variedades altamente produtivas, que sejam, localmente, adaptadas e tolerantes à seca e às doenças e pragas, refletindo, diretamente, no aumento da

produtividade, da estabilidade de produção e da sustentabilidade do agroecossistema do coqueiro (Loiola,2009). No entanto, apesar da importância da espécie, a pesquisa sobre a genética da espécie, ainda, é incipiente, sendo necessário gerar informações básicas, como número e tipos de cromossomos, tamanho do genoma, comportamento meiótico, viabilidade polínica, dentre outros, que possam auxiliar o melhoramento genético da cultura.

A determinação do tamanho do genoma tem um importante papel na caracterização genômica com aplicabilidade não apenas no melhoramento genético, como também em estudos evolutivos, de biologia celular, sistemática e taxonomia, além de fornecer relevantes informações para trabalhos que envolvam sequenciamento e marcadores moleculares (Dolezel, 1991; Loureiro,2007).

O tamanho do genoma em plantas pode ser estimado por alguns métodos, sendo a citometria de fluxo um dos mais utilizados. Nessa técnica, o tamanho do genoma é inferido com base no conteúdo de DNA, que é estimado a partir da intensidade da fluorescência emitida pelos núcleos em suspensão corados com fluorocromos específicos (Dolezel e Bartos, 2005). Do ponto de vista prático, a determinação da quantidade de DNA nuclear pode substituir a contagem de cromossomos, especialmente quando se trabalha com um número muito grande de indivíduos como, por exemplo, em bancos de germoplasma (Schifno-Wittmann, 2001).

Em coqueiro, não têm sido encontrados muitos relatos sobre o tamanho do genoma da espécie. Diante da relevância e importância de informações básicas para o melhoramento da cultura, o objetivo do presente trabalho foi determinar o tamanho do genoma do coqueiro-gigante e anão via citometria de fluxo, utilizando-se 14 diferentes genótipos, sendo oito do grupo Gigante e seis do grupo Anão.

3.2.2.REVISÃO

3.2.2.1. Família *Arecaceae*

A família *Arecaceae* (*Palmae*), constituída por um grupo de espécies conhecidas como palmeiras, pertence ao Reino *Plantae*, Divisão *Magnoliophyta*, Classe *Liliopsida*, Ordem *Arecales*. É uma família bastante representativa, formada por mais de 3.500 espécies distribuídas em 236 gêneros. As palmeiras destacam-se pelo porte e pela morfologia das suas folhas, que as distinguem, facilmente, de outras plantas. Essa família inclui representantes dióicos e monóicos (Uhl e Dransfield, 1987).

Em relação aos aspectos botânicos, as espécies podem apresentar raízes subterrâneas ou aéreas. Os estipes podem ser solitários ou cespitosos e raramente escandentes, aéreos ou subterrâneos. Quando aéreo, o estipe pode apresentar-se liso ou densamente coberto por espinhos. As folhas, tanto curtas como longas, apresentam-se de forma palmada, pinadas e inteiras com bainhas abertas ou fechadas e pecíolos curtos ou longos. As inflorescências interfoliaras ou infrafoliaras na antese apresentam-se em forma de espiga, com presença de poucas ou muitas ráquias. As flores são, geralmente, trímeras. Os frutos podem ser tanto pequenos como muito grandes com o pericarpo liso ou com presença de espinhos. O tegumento da semente é duro e contém, no seu interior, uma ou mais sementes. As plântulas possuem folhas inteiras, bífidas e pinadas (Dransfield & Uhl, 1987; Henderson et al., 1995).

As palmeiras se distribuem em grande região do globo terrestre; no entanto, os limites extremos de distribuição são 44° N (Europa) com ocorrência de *Chamaerops humilis* L., e 44° S (Nova Zelândia) com ocorrência de *Rhopalostylis sapida* H.A.Wendl. & Drude. A maior concentração de espécies está na região da linha do Equador (Batugal, 2009).

O Brasil conta com cerca de 500 espécies nativas de palmeiras. Dessas, na região do Brasil Central e áreas adjacentes, são encontrados cerca de 11 gêneros e 44 espécies, sendo que *Trithrinax* é endêmica, *Syagrus* e *Butia* têm ampla distribuição assim como as espécies de *Attalea*, *Allagoptera* e *Acrocomia*, que são comuns na região.

A Família *Arecaceae*, juntamente com *Poaceae* e *Leguminosae*, destaca-se em função de sua utilização passada e atual pela humanidade. Particularmente para a região tropical, a importância das palmeiras é ainda mais expressiva devido à grande diversidade de produtos que delas podem ser obtidos,

especialmente aqueles relacionados aos seus frutos e sementes (Batugal *et al.*,2009).

3.2.2.2. O Coqueiro

O coqueiro (*Cocos nucifera* L.) pertence à família *Arecaceae*, que inclui cerca de 3500 espécies, agrupadas em 236 gêneros, sendo *C.nucifera* a única representante do gênero *Cocos* (Batugal *et al.*, 2009). *C. nucifera* é dividida em dois grupos principais: coco gigante com um número diplóide de cromossomos ($2n=32$) (Purseglove, 1975; Benassi *et al.*,2007).

O coqueiro é uma monocotiledônea, portanto não apresenta raiz principal, mas um sistema radicular fasciculado. O caule é do tipo estipe bastante desenvolvido e resistente; em seu ápice, as folhas se prendem protegendo sua única gema terminal. A folha do coqueiro é do tipo penada, constituída pelo pecíolo, onde se prendem numerosos folíolos. Uma folha madura mede, aproximadamente, 6 m de comprimento com 200 a 300 folíolos. O número de folhas depende da variedade, sendo que o coqueiro-anão apresenta maior número de folhas. O coqueiro possui inflorescências, que são formadas pelo pedúnculo, espigas e flores. Cada espiga apresenta, em sua base, flores femininas e, na porção terminal, flores masculinas. O fruto é uma drupa, formado por uma epiderme lisa ou epicarpo, que envolve o mesocarpo espesso e fibroso, e uma camada muito dura, o endocarpo. A semente, envolvida pelo endocarpo, é constituída por uma camada fina de cor marrom (o tegumento). O tegumento é uma camada carnosa, branca e muito oleosa, que forma uma grande cavidade, onde se encontra o albúmen líquido. Próximo a um dos orifícios do endocarpo, e envolvido pelo albúmen sólido, está o embrião (Fontes e Ferreira, 2006).

O coqueiro é encontrado em toda região tropical, entre as latitudes 20°N e 20°S, é propagado por sementes e de crescimento lento (Batugal *et al.*, 2009). É uma palmeira distribuída naturalmente e é considerada a espécie tropical mais importante utilizada pelo homem (Persley, 1992). Suas condições ótimas de cultivo são clima quente e úmido, com média de temperatura anual em torno de 27°C (Passos, 1998).

A literatura reporta que o coqueiro é originário das ilhas de clima tropical e subtropical do Oceano Pacífico. Em relação ao centro de origem da espécie,

existem muitas controvérsias, entretanto o Sudeste Asiático é a principal referência de centro de origem e diversidade do coqueiro (Foale e Harries, 2009).

Clement *et al.*, (2013) relatam que, com base em análises moleculares e morfométricas, as populações de coqueiro modernos cultivadas nas Américas são muito similares às populações das Filipinas.

O coqueiro é uma das frutíferas mais difundidas pelo mundo, ocorrendo em, praticamente, todos os continentes. Em virtude dessa dispersão e adaptabilidade, seu cultivo e sua utilização se dão de forma expressiva em todo o mundo, com os mais variados produtos, tanto de forma *in natura* quanto industrializada (Martins e Jesus Junior, 2011). A literatura reporta que o coqueiro encontra-se em mais de 200 países diferentes (Foale e Harries, 2009); no entanto, a exploração comercial do coco se concentra, aproximadamente, em 90 países, devido às melhores condições de cultivo, como solos arenosos, intensa radiação solar, umidade e boa precipitação (Aragão *et al.*, 2010).

Acredita-se que a dispersão natural do coqueiro se deu via flutuação na água. O fruto pode flutuar durante dias na água do mar, sem danificar o embrião e sem afundar. Por esse motivo, a dispersão natural dos frutos, nas correntes marítimas, pode ter levado os cocos para praias distantes (Sauer 1997 citado por Schuiling e Harries 1994).

No Brasil, o coqueiro foi introduzido após o descobrimento, mais precisamente por volta de 1553, no estado da Bahia, procedente das Ilhas Cabo Verde (Fontes e Ferreira, 2006). Acredita-se que a origem desse material seria a Índia ou Sri Lanka, de onde cocos teriam sido introduzidos em Moçambique. Evidências históricas indicam que o coqueiro introduzido foi o gigante (Fontes e Ferreira, 2006). Essa hipótese se acha confirmada pela semelhança entre o coqueiro do Oeste da África e o coqueiro Gigante de Moçambique (Nucé de Lamothe, 1983, citado por Embrapa, 2002). A introdução dos coqueiros anões ocorreu séculos mais tarde: por volta de 1924, o anão verde proveniente de Java e do Norte da Malásia; em 1938, o anão amarelo e um ano depois o anão vermelho, ambos provenientes do Norte da Malásia (Fontes e Ferreira, 2006).

3.2.2.3. Importância social e econômica do coco

O coqueiro é a palmeira de maior importância socioeconômica das regiões tropicais, gerando empregos, divisas e renda para mais de 86 países. De acordo com a FAO (2012), na última década, o cultivo dessa palmeira tem aumentado, expressivamente, por todo o mundo, entretanto grande parte da produção está concentrada na Ásia, cerca de 80% da produção. A Indonésia é o maior produtor de coco, seguida por Filipinas e Índia. O Brasil, atualmente, ocupa a 4ª posição, sendo que a produção, no país, cresceu a partir de 1990, devido ao incremento tecnológico na adubação, sistemas intensivos de cultivo, variedades melhoradas, que refletem em alta produtividade, principalmente no cultivo do coco Anão e híbrido (Martins e Jesus Junior, 2010).

No Brasil, o coco foi introduzido, primeiramente, na Bahia, proveniente da Ilha Cabo Verde; por isso, passou a ser chamado de coco- da- Bahia. Da Bahia, o coco disseminou-se por todo litoral do Nordeste, onde as condições são mais favoráveis para o cultivo. Nos anos 90, os cultivos de coco anão se restringiam às regiões Norte e Nordeste, porém, atualmente, a cultura se encontra em quase todas as regiões do país (Martins e Jesus Junior, 2010). Ainda assim, as regiões Nordeste e Norte são as que concentram as maiores plantações e produções. A Bahia se destaca como maior produtor de coco, seguida por Sergipe e Ceará, esses três estados juntos correspondem a mais de 50% da produção nacional de coco (IBGE, 2013).

A cultura do coqueiro tem uma importância social muito grande pelos empregos que gera e, principalmente, porque é cultivada, na sua maioria, por pequenos produtores, em pequenas propriedades dotadas de solos arenosos com baixa fertilidade natural (Persley, 1992).

No Brasil, são milhares de pessoas que estão envolvidas, direta e indiretamente, com a cultura, a qual é perene, com vida útil econômica, variando de 30 a 80 anos de idade de acordo com a variedade cultivada e produção distribuída durante todo o ano. Além disso, favorece a consorciação com culturas anuais e perenes em todas as fases de seu cultivo e manejo com animais na fase adulta de exploração, barateando a sua implantação e representando mais uma fonte de renda para o produtor. Todas essas características tornam a cultura do coqueiro uma atividade que favorece a fixação do homem no campo (Loiola, 2009).

O Brasil é o único país do mundo no qual o coqueiro não é utilizado para a obtenção do óleo, apesar de existirem cultivares com altos teores na copra (albúmen sólido desidratado a 6% de umidade), podendo, inclusive, produzir em torno de 3.000 Kg de óleo/ha, e, portanto, ser utilizado, também, no programa biodiesel (Batugal *et al*, 2005). Aqui, essa espécie é explorada, basicamente, para uso do fruto verde (água de coco) e seco (uso culinário e agroindústria de alimentos). Nas agroindústrias, sua utilização ocorre na confecção de leite de coco, coco ralado, e na produção agroindustrial de água de coco, entre outros (Batugal *et al.*,2009).

Segundo Viglio (1997), grande parte da produção de coco destina-se às agroindústrias para atender à demanda de grandes empresas produtoras de chocolate, biscoitos, iogurtes, sorvetes, confeitarias e padarias. Os mercados Sudeste e Sul consomem quase 40%, atendendo às pequenas indústrias (docerias, sorveterias etc) e, aproximadamente, 30% ficam no mercado Nordeste para atender ao consumo *in natura*, tanto de coco seco, quanto de coco verde.

3.2.2.4. Variedades de coco

A espécie é composta por dois grupos heteróticos, a variedade *Typica* (gigante) e a variedade *Nana* (anã). Do cruzamento dessas duas variedades, obtêm-se híbridos que apresentam características importantes para a exploração do coqueiro no Brasil (Aragão *et al.*, 2010).

As variedades de coco são classificadas em quatro grupos de acordo com o modo de reprodução (Konan *et al.*, 2008):

- Tipo 1 (alogamia estrita): não há sincronismo no desenvolvimento das estruturas reprodutivas femininas com as estruturas masculinas na mesma inflorescência e nas inflorescências adjacentes. Exemplo: algumas populações do coqueiro Gigante do Oeste Africano (GOA);
- Tipo 2 (autogamia parcial): sincronia no desenvolvimento e maturação dos órgãos femininos e masculinos na mesma inflorescência, mas não nas adjacentes. Exemplos: cultivares dos genótipos Gigante de Rennel (GRh), Gigante da Malásia (GML) e Gigante de Vanuatu (GVT);

- Tipo 3 (autogamia direta) : sincronia no desenvolvimento e maturação dos órgãos femininos e masculinos da mesma inflorescência, e com ou sem sincronia com a inflorescência adjacente. Exemplos: cultivares de Anão-Amarelo-da-Malásia (AAM), Anão-Verde-de-Sri-Lanka (AV) e Anão-Vermelho-de Camarões(AVC);
- Tipo 4 (autogamia semi direta) : sincronia no desenvolvimento e maturação dos órgãos femininos e masculinos da mesma inflorescência e na inflorescência adjacente. Exemplos: Anão-Verde-do-Brasil (AVB) e muitos híbridos intervarietais (anão X gigante).

O coqueiro-gigante, também conhecido, tradicionalmente, como mestiço, crioulo, e/ou comum, caracteriza-se por apresentar porte elevado, podendo atingir até de 20 a 30m de altura. A produção tem início a partir dos cinco anos de idade e pode durar até os 80 anos. A colheita dos frutos maduros ocorre de 11 a 12 meses após a floração (Aragão *et al.*,2010) Essa variedade pode produzir de 60 a 80 frutos/planta/ano, com tamanho variando de médio a grande. É uma variedade rústica de crescimento rápido e fase vegetativa longa (Fontes e Ferreira, 2006).

No Brasil, os coqueiros da variedade gigante são cultivados sem emprego da irrigação, cuja área plantada se concentra na faixa litorânea do Nordeste, onde predominam solos de baixa fertilidade com capacidade de retenção de água reduzida. Esses frutos são utilizados, como matéria-prima para a indústria de alimentos, na produção de coco ralado ou seus derivados, ou mesmo consumido *in natura* (Fontes e Wanderley, 2010). A variedade gigante, ainda, é bastante explorada, no Brasil, principalmente por pequenos produtores (Aragão *et al.*, 2010).

O coqueiro-anão tem sido cultivado em diversas regiões do país, sendo considerado o grupo mais utilizado comercialmente no Brasil para a produção de água de coco. De acordo com Mercon e Pandalai (1958), acredita-se que essa variedade se originou de uma mutação do coqueiro gigante ou por meio do processo de autofecundação do gigante (Swaminathan e Nawbiar, 1961).

A variedade anã é dividida em três grupos, distinguidos pela cor do pecíolo, pela ráquis da folha e pela cor do epicarpo do fruto. Tais grupos são coqueiro anão-verde, anão-amarelo e anão-vermelho (Ribeiro, 1993).

Bourdeix (1988), estudando a herança da cor do fruto em diferentes genótipos de coqueiro anão, descreve que tal característica é governada por dois genes (R, r e G, g). O autor observou que a cor amarela é resultante do genótipo duplo recessivo (rrgg), a cor vermelha pela dominância do alelo R e a cor verde pela dominância do alelo G. As demais combinações gênicas resultam na coloração marrom dos frutos.

O coqueiro-anão caracteriza-se por ser uma variedade precoce que inicia seu florescimento, em média, com três anos de idade. Apresenta uma produtividade em média de 150 a 200 frutos/planta/ano, tendo vida útil em torno de 30 a 40 anos. Seu porte é reduzido, podendo atingir de 10 a 12 m de altura. Os frutos desse grupo são menores. É uma variedade útil para água de coco, podendo armazenar, em média, 300 mL de água (Aragão *et al*, 2010).

Os híbridos podem ser obtidos do cruzamento entre anão x anão, gigante x gigante, e anão x gigante, sendo que os mais empregados, no mundo, são os resultantes dos cruzamentos entre anão x gigante. Acredita-se que a demanda desses híbridos por diversas regiões do país está aumentando gradativamente, e que, no futuro, será a principal cultivar plantada (Aragão *et al.*, 2010; Fontes e Ferreira, 2006).

Os híbridos apresentam algumas vantagens em relação aos coqueiros gigantes e anões. Dentre as características em relação ao gigante, destacam-se a precocidade, porte, produção de frutos e de copra e tamanho dos frutos. Já em relação aos anões, os híbridos apresentam ampla utilização dos seus frutos, na agroindústria de alimentos, na culinária, bem como para a produção de água de coco. A produção média dos frutos dos híbridos é de 120 a 150/planta/ano, podendo atingir produções mais altas de acordo com a aplicação de tecnologias (Fontes e Ferreira, 2006). De acordo com Martins e Jesus Júnior (2010), os híbridos têm obtido bons como um grupo de dupla finalidade, devido ao seu potencial de utilização tanto de forma *in natura* como no processamento industrial. De acordo com a Tabela 1, é possível observar as principais diferenças entre as variedades de coco.

3.2.2.5. Melhoramento genético e recursos genéticos do coqueiro

O programa de melhoramento do coqueiro, no Brasil, iniciou-se na década de 40, em Sergipe, onde os principais objetivos eram a introdução de germoplasma, autofecundação do coqueiro gigante e o cruzamento intervarietal anão x gigante (Miranda Júnior, 1955 citado por Aragão *et al.*, 2010). A literatura reporta que, nas décadas de 60 e 70, foram realizados alguns trabalhos com variedades de coco anão e gigante com o objetivo de desenvolver híbridos, entretanto apenas a partir da década de 80 é que o melhoramento do coqueiro ganhou impulso e, anos mais tarde, por volta de 1982 a 1983, formou-se o Banco Ativo de Germoplasma de Coco (Aragão *et al.*, 2010).

Existem coleções de germoplasma de coqueiro em vários países, estando as principais distribuídas nas Filipinas, na Índia, na Indonésia, na Costa do Marfim e na Malásia. Existem, ainda, outras coleções com menor expressão em Papua, Nova Guiné, Moçambique, Jamaica e México (Nair *et al.* 1993).

No Brasil, os dados indicam a existência de três coleções de germoplasma de coco, localizados na Empresa Baiana de Desenvolvimento Agrícola (EDBA), na Empresa de Pesquisa Agropecuária do Rio Grande do Norte (EMPARN) e Embrapa Tabuleiros Costeiros (CPATC) que conservam *ex situ* e *in vivo* um total de 27 acessos (Ramos *et al.*, 2004).

O Centro de Pesquisa Agropecuária dos Tabuleiros Costeiros (CPATC), localizado em Aracajú-SE, dispõe de um Banco Ativo de Germoplasma de Coco (BAG – Coco), que iniciou ações a partir de 1982. O banco mantém acessos de coqueiro-anão e gigante: Gigante-Oeste-Africano (GOA), Gigante-da-Malásia (GML), Gigante-da-Polinésia (GPY), Gigante-de-Rennel (GRL), Gigante-de-Rotuma (GRT), Gigante-de-Tonga (GTG), Gigante-de-Vanuatu (GVT), Gigante-do-Brasil-de-Santa-Rita (GBrSR), Gigante-do-Brasil-Merepe (GBrME), Gigante-do-Brasil-de-São-José-Mipibu (GBrSM), Gigante-do-Brasil-da-Bahia-Formosa (GBrBF), Gigante-do-Brasil-Praia-do-Forte (GBrPF), Gigante-do-Brasil-Pacatuba (GBrPC), Gigante-do-Brasil-Olho-de-Cravo (GBrOC), Gigante-do-Brasil Barrerinhas (GBrBA), Gigante-do-Brasil-Luís-Correia (GBrLC), Gigante-do-Brasil-Senador-Georgino-Avelino (GBrSGA), Gigante-do-Brasil-Terra-do-Rei (GBrTR), Gigante-do-Brasil-Avenida (GBrAV), Anão-Verde-do-Brasil-de-Jiqui (AveBrJ), Anão-Vermelho-de-Camarões (AVC), Anão-Vermelho-da-Malásia (AVM), Anão-Vermelho-de-Gramame (AVG), Anão-Amarelo-de-Gramame (AAG) e Anão-

Amarelo-da-Malásia (AAM) e Anão-Verde-do-Brasil-de-Souza (AveBrS) (Siqueira *et al.*, 1995; Embrapa, 2009).

Um programa de conservação e uso de recursos genéticos tem como objetivo o enriquecimento e a conservação dos recursos genéticos exóticos e nativos que sejam de importância socioeconômica atual e/ou potencial para o país. Complementando este objetivo estão as metas para promover e aumentar, através de caracterização e avaliação, sua utilização em programas de melhoramento, para o desenvolvimento de uma agricultura sustentável.

A variabilidade genética do coqueiro disponível nas atuais coleções de germoplasma pode ser explorada por melhoristas em diversos programas de melhoramento, o que permite o desenvolvimento de novas cultivares. Segundo Batugal *et al.* (2005), a variabilidade genética disponível entre populações de coqueiro gigante e anão possibilita a produção de indivíduos recombinantes, prováveis portadores de características de interesse.

Daher *et al.* (2002) afirma que a investigação da variabilidade genética entre populações de coco é fundamental para a busca de fontes de variabilidade genética e, principalmente, para o desenvolvimento de cultivares superiores adaptadas a diferentes condições ambientais, bem como para a seleção de parentais divergentes para potencializar a heterose em hibridações futuras.

3.2.2.6. Tamanho do genoma

O conhecimento do tamanho do genoma é importante em muitas áreas de pesquisa, e uma das formas de ser determinado é através da determinação do conteúdo de DNA. O conteúdo de DNA pode ser determinado através de diferentes técnicas, sendo a citometria de fluxo uma das mais utilizadas. Essa técnica foi desenvolvida nos anos 50, quando era utilizada para análises de células sanguíneas. Anos mais tarde, a técnica generalizou-se a outras áreas de estudo como as células vegetais e microbianas (Loureiro, 2007). A citometria de fluxo vem se consolidando como metodologia para vários estudos de atividade celular, como, por exemplo, estudos sobre nível de ploidia, estimativa do tamanho do genoma de diferentes espécies, detecção de híbridos interespecíficos, detecção de plantas haploides, detecção de aneuploidias, entre outros (Machado Junior, 2006)

A técnica envolve a análise das propriedades ópticas (dispersão da luz e fluorescência) de partículas que fluem numa suspensão líquida. Para tal, os núcleos devem ser isolados e precisam reagir com diferentes fluorocromos para serem detectados pelo citômetro de fluxo. Essa técnica permite análises em alta velocidade, aleatoriamente numa população sem qualquer tipo de subjetividade (Dolezel, 1997a). O citômetro de fluxo envolve a análise das características físicas e químicas das células que são individualmente conduzidas em um canal de corrente fluida que, ao interceptarem o feixe de luz proveniente de um laser, ou de uma lâmpada, causam dispersão em várias direções e, dependendo das características das células, são captadas pelo sistema (Macey, 1994).

Uma vez que a citometria de fluxo analisa as partículas individualmente e a uma velocidade elevada, populações numerosas de células e organelas podem ser medidas num curto espaço de tempo, e subpopulações desses citomas podem ser facilmente detectadas (Dolezel, 1997b).

A determinação do conteúdo de DNA foi, primeiramente, estudada em 1973 (Heller 1973) e continua a ser a principal utilização da citometria de fluxo em plantas. Nas plantas, o conteúdo de DNA é estimado a partir do ciclo celular, que, de acordo com Howard e Pelc (1986), o tempo entre cada mitose é dividido em três fases: G1, S e G2. Durante o período de crescimento celular (G1), a célula apresenta um conteúdo 2C, onde C é uma constante e representa o conteúdo de um conjunto haplóide de cromossomos. Na fase S, ocorre a duplicação do genoma nuclear, onde o conteúdo passa de 2C para 4C, que é observado na fase G2.

O tamanho do genoma nuclear é estimado a partir da análise da intensidade de fluorescência relativa dos núcleos de tecidos de folhas jovens, que produz um histograma com um pico dominante, o qual corresponde aos núcleos na fase G1 do ciclo celular e um pico menor, correspondendo aos núcleos em G2. Para a determinação do conteúdo de DNA, o pico G1 da planta investigada é comparado com a posição do pico de uma planta referência (padrão), onde o conteúdo de DNA é previamente conhecido. No entanto, dependendo do aparelho, as leituras podem sofrer algumas variações que, geralmente, são expressas através do coeficiente de variação (CV%), que, em plantas, pode variar de 1% a 10%, sendo as amostras consideradas de alta qualidade aquelas que apresentam CVs entre 1 a 2% (Marie e Brown, 1983; Dolezel, 1991).

Em cada histograma, são observados, geralmente, dois picos, o primeiro representa os núcleos em G1 e o segundo os núcleos em G2. A estimativa do tamanho do genoma é dada em picogramas (pg) de DNA ou em milhões de pares de bases (Mpb), sendo que $1\text{pg}=0,960\text{Mpb}$ (Cros *et al.*, 1994 e Dolezel, 1997).

A análise por citometria de fluxo baseia-se na fluorescência emitida pelos núcleos corados com fluorocromos específicos; dentre esses, se destacam o iodeto de propídeo e o brometo de etídeo que se intercalam na dupla fita de DNA, o DAPI que se liga a regiões ricas em adenina e timina, e a mitramicina e a cromomicina A3 que, preferencialmente, ligam-se às regiões ricas em citosina e guanina. A seleção do fluorocromo apropriado dependerá do tipo de análise (Dolezel, 1991). O iodeto de propídeo tem se destacado nas análises de determinação do conteúdo de DNA, pois produz histogramas com Cvs inferiores aos demais (Price e Johnston 1996).

No entanto, antes da coloração, é necessário obter uma suspensão dos núcleos. Em plantas, geralmente, utiliza-se tecido foliar, que são cortadas na presença de uma solução tampão e, posteriormente, os núcleos são corados com fluorocromos específicos para aquele tipo de análise. A escolha do tampão para a extração dos núcleos é uma etapa fundamental para a citometria de fluxo, e sua função é inibir a atividade das nucleases e preservar a integridade dos núcleos. Os mais utilizados são cations Mg^{2+} , as poliaminas e o Triton X-100 (Galbraith *et al.* 1983; Dolezel *et al.* 1989).

Após a extração dos núcleos, os mesmos são filtrados em redes de nylon de $50\mu\text{m}$, para eliminar resíduos que possam atrapalhar a leitura do aparelho e, em seguida, são corados com fluorocromos.

A literatura reporta algumas metodologias para a citometria de fluxo como as desenvolvidas por Galbraith *et al.* (1983), de Laat *et al.* (1987), Otto (1990) e Price e Johnston (1996). Entretanto, o método mais clássico é o desenvolvido por Galbraith *et al.* (1983). Esse método é simples e apresenta bons resultados, no entanto, quando se deseja obter histogramas de alta resolução, são utilizados alguns procedimentos mais sofisticados de isolamento, que envolvem a fragmentação do tecido, filtragem, centrifugação e ressuspensão para extração do núcleo intacto (Otto, 1990).

As determinações do conteúdo de DNA necessitam da comparação do genoma da espécie em estudo com o genoma de um padrão de referência, que

pode ser externo ou interno. O padrão de referência externo é utilizado antes e depois de cada amostra, já o padrão interno é preparado junto à amostra e é menos vulnerável a erros. Em plantas, Dolezel *et al.* (1992) sugeriram alguns genomas de cultivares selecionados de *Raphanus sativus* (2C = 1,11 pg), *Lycopersicon esculentum* (2C = 1,96 pg), *Glycine max* (2C = 2,50 pg), *Zea mays* (2C = 5,72 pg), *Pisum sativum* (2C = 9,09 pg), *Vicia faba* (2C = 26,90 pg), *Secale cereale* (2C = 16,19 pg) e *Allium cepa* (2C = 34,89 pg) como padrões internos de referência. A seleção do padrão adequado é crucial para a correta estimativa do tamanho do genoma nuclear (Dolezel *et al.*,1992).

O conhecimento do tamanho do genoma pode ser utilizado em estudos sobre as relações filogenéticas, em análise e correlação do tamanho do genoma e características fisiológicas ou agrônômicas, para estimar o efeito de fatores ambientais no conteúdo de DNA, bem como fornecer informações para estudos de melhoramento, taxionomia, e evolução (de Laat *et al.*,1987; Dolezel, 1991; Loureiro,2007).

Nas palmeiras, têm sido encontrados alguns relatos sobre a determinação do conteúdo de DNA via citometria de fluxo. Bennett e Leitch (1997) listaram o conteúdo de DNA de 583 espécies de angiospermas. Dentre essas, os autores citam 86 espécies de palmeiras, todas diplóides com exceção de uma; nessa lista se observa que o conteúdo 2C de DNA, estimado através de microdensitometria de Feulgen, variou de 1,9 pg a 78,2pg, sendo que, para o coqueiro, o valor citado é de 7,1pg.

Srisawat *et al.* (2005) determinaram o tamanho do genoma de *Elaeis guineensis* (Arecaceae) Os autores testaram diferentes espécies como padrão interno (milho, soja e tomate) e observaram que o genoma haplóide (C) da respectiva espécie variou de 1,56 a 1,81pg o que pode ser justificado pelas diferenças na idade das folhas utilizadas no estudo. Os autores também definiram que a soja (*Glycine max*, 2c= 3,77 ± 0,09 pg) foi o melhor padrão externo para a espécie em estudo. Madon *et al.* (2008) e, analisando o conteúdo de DNA das espécies do gênero *Elaeis* e utilizando a soja como padrão interno, observaram que o conteúdo 2C das espécies variou de 3,64 a 4,10 pg.

Em coqueiro, são poucos os relatos na literatura sobre o tamanho do conteúdo de DNA. O trabalho mais recente sobre o assunto foi desenvolvido por

Sandoval *et al.* (2003), que, utilizando a cevada como padrão interno, analisaram plantas cultivadas *in vitro* e determinaram que o conteúdo 2C foi de 5,6pg.

3.2.3. MATERIAL E MÉTODOS

3.2.3.1. Definição de protocolo

A pesquisa foi realizada no Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal, no setor de Citogenética da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, localizada em Campos dos Goytacazes – Rio de Janeiro. Para a definição do protocolo para as análises em citometria de fluxo, foram utilizados folíolos jovens provenientes de mudas da variedade Anão-Verde-do-Brasil-de-Jiqui mantidas em casa de vegetação da Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado do Rio de Janeiro (PESAGRO), localizada em Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro e folhas (número 14) de plantas adultas das variedades Anão-Verde-do-Brasil-de-Jiqui e Gigante-do-Brasil-Praia-do-Forte. Essas amostras foram cedidas pelo Banco Ativo de Germoplasma de Coco, localizado na Embrapa Tabuleiros Costeiro, em Aracajú – Sergipe.

O protocolo desenvolvido nesse estudo foi baseado na metodologia proposta por Galbraith *et al.* (1983) e Otto (1990), com modificações. Para a realização das análises, inicialmente, o material ficou armazenado em câmara úmida, na geladeira, durante 24h, 48h e 72h à temperatura de 10°C. Para a suspensão dos núcleos, foram testados três tamanhos do material foliar a ser analisado por amostra: 0,5cm², 1cm², 1,5cm². Em seguida, o material foi macerado com auxílio de lâmina em placa de Petri na presença de 500 µl, de solução tampão de extração (Partec), durante 60, 90 e 120 segundos, à temperatura ambiente.

Posteriormente, as amostras foram filtradas, utilizando-se filtros de 50 µm (Partec), e foram adicionados, em cada amostra, 2 ml de solução de coloração (Partec), contendo iodeto de propídeo e Rnase, a 4°C por 30, 40 e 60 minutos. O mesmo procedimento foi realizado com folíolos de mudas de *Zea mays* (conteúdo 2C = 5.43pg) e *Pisum sativum* (2C=9,07 pg), que foram utilizadas como padrão interno (Dolezel *et. al*, 1992).

Todas as amostras foram analisadas no citômetro de fluxo Partec PA II, e, para cada amostra testada, foram feitas cinco repetições e foram contabilizados 10.000 núcleos em cada análise. Com base nos resultados, o protocolo que gerou os melhores histogramas e coeficientes de variação foi selecionado como o mais adequado para o coqueiro e utilização na etapa de determinação do conteúdo de DNA.

3.2.3.2. Determinação do conteúdo de DNA do coqueiro

Para a determinação do conteúdo de DNA da espécie, foram utilizadas amostras de folhas (número 14) de 14 acessos de coqueiro, sendo seis do tipo anão e oito do tipo gigante (Tabela 1), todas transferidas pelo Banco Ativo de Germoplasma de Coco da Embrapa Tabuleiros Costeiro, em Aracajú – Sergipe.

As análises foram realizadas no Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal, setor de Citogenética da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, localizada em Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro.

O protocolo utilizado foi definido a partir de testes, como relatado anteriormente. Amostras de folhas dos acessos de coqueiro, medindo, aproximadamente, 0.5cm^2 , foram maceradas (*chopped*) em placa de Petri, com o uso de uma lâmina, na presença de 500 μl de solução tampão de extração (Partec), por 90 segundos, à temperatura ambiente, para a suspensão dos núcleos.

As amostras foram filtradas, utilizando-se filtros de 50 μm (Partec) e submetidas a colorações. Foram adicionados 2 ml de solução de coloração (Partec), contendo iodeto de propídeo e Rnase em cada tubo, a 4°C, durante 30 minutos. O mesmo procedimento foi realizado com folíolos da espécie *Pisum sativum* (2C=9,07 pg), que foi utilizada como padrão interno (Dolezel *et. al*, 1992). Após alguns ajustes no aparelho, as amostras contendo os folíolos dos genótipos de coqueiro e do padrão interno foram preparadas em conjunto e analisadas em citômetro de fluxo Partec PA II. Para cada genótipo, foram feitas cinco repetições, e foram contabilizados 10.000 núcleos em cada análise. Os parâmetros, como ganho, velocidade de análise da amostra, foram definidos, anteriormente, no estabelecimento do protocolo para a espécie, e os histogramas, médias, áreas, e

coeficiente de variação foram analisados, utilizando-se *Flow Max software* (Partec).

Tabela 1- Genótipos, origem e ano de introdução dos acessos representantes do grupo gigante e do grupo anão.

Acesso	Codificação	Procedência
Gigante-da-Polinésia	GPY	Taiti
Gigante-da-Malásia	GML	Malásia
Gigante-de-Rennel	GRL	Salomão
Gigante-de-Rotuma	GRT	Fiji
Gigante-de-Tonga	GTG	Tonga
Gigante-de-Vanuatu	GVT	Vanuatu
Gigante-do-Brasil-Praia-do-Forte	GBrPF	Brasil
Gigante-do-Oeste-Africano	GOA	Costa do Marfim
Anão-Amarelo-de-Gramame	AAG	Brasil
Anão-Amarelo-da-Malásia	AAM	Malásia
Anão-Verde-do-Brasil-de-Jiqui	AVeBrJ	Brasil
Anão-Vermelho-de-Gramame	AVG	Brasil
Anão-Vermelho-da-Malásia	AVM	Malásia
Anão-Vermelho-de-Camarões	AVC	República Camarões

Fonte: Adaptado de Aragão *et al.* (2010)

O tamanho do genoma foi, então, calculado de acordo com a seguinte equação (Dolezel e Bartos, 2005):

$$= \frac{\text{Média do pico } G_0/G_1 \text{ da amostra} \times \text{conteúdo de DNA } 2C \text{ do padrão}}{\text{Média do pico } G_0/G_1 \text{ do padrão}}$$

Para o agrupamento das médias, foi utilizado o teste Scott e Knott à de 5% de probabilidade com o auxílio do programa estatístico Genes (Cruz, 2001).

3.2.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.2.4.1. Definição de protocolo para a espécie

Os melhores resultados foram obtidos, utilizando-se 0.5cm² de amostra foliar, 500 µl de solução tampão de extração (Partec) durante 90 segundos de maceração e a coloração com iodeto de propídeo a 4°C, por 30 minutos (Figura 1). O mesmo protocolo foi utilizado para a escolha do melhor padrão interno, e a ervilha (*Pisum sativum*, 2C=9,07 pg) apresentou os melhores resultados. Conforme a figura 2, é possível diferenciar o pico G₁ da espécie em estudo do pico G₂ do padrão.

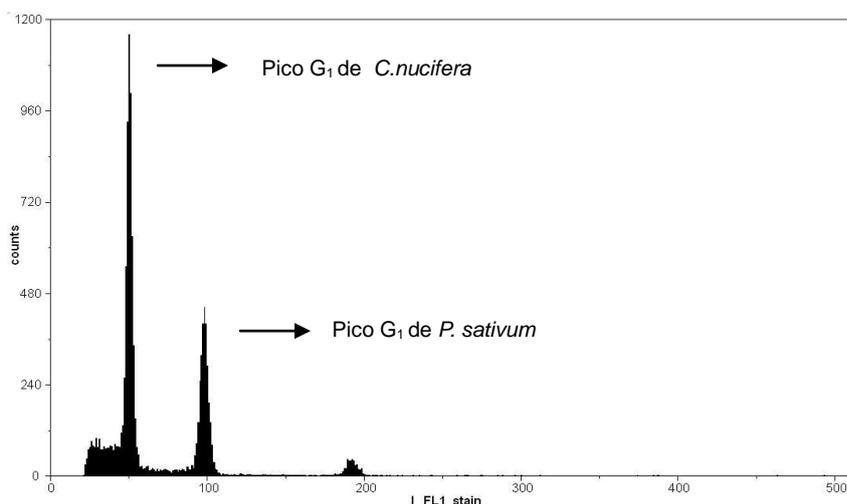


Figura 1- Histograma de citometria de fluxo para o coqueiro

Análises dos histogramas provenientes de tais resultados revelaram picos G₁ com boa resolução e coeficientes de variação (CV%) em torno de 2,5% para todos os três genótipos. De acordo com Marie e Brown (1993), o CV é um critério importante na validação da metodologia e definem valores entre 1 e 2 % para

análises de alta qualidade e 3 % como um valor de rotina. No entanto, a literatura reporta que CVs menores que 5% são considerados valores satisfatórios (Galbraith *et al.*,2002). Tais autores ainda reportam que, dependendo de algumas espécies, como as recalcitrantes, a exemplo do Coco, a obtenção desses valores recomendados é bastante complicada.

No presente estudo, não foram observadas diferenças ao utilizar folhas obtidas de mudas e folhas obtidas de plantas adultas já diferenciadas. Nos dois genótipos (AVeBrJ e GBrPF) analisados, o protocolo foi apropriado e permitiu a obtenção de histogramas de qualidade e com Cvs satisfatórios (Figura 2). De acordo com Fox e Galbraith (1990), a heterogeneidade da idade das folhas é considerada como um obstáculo para os estudos com citometria de fluxo e pode ser contornado otimizando cada passo do método para a extração dos núcleos.

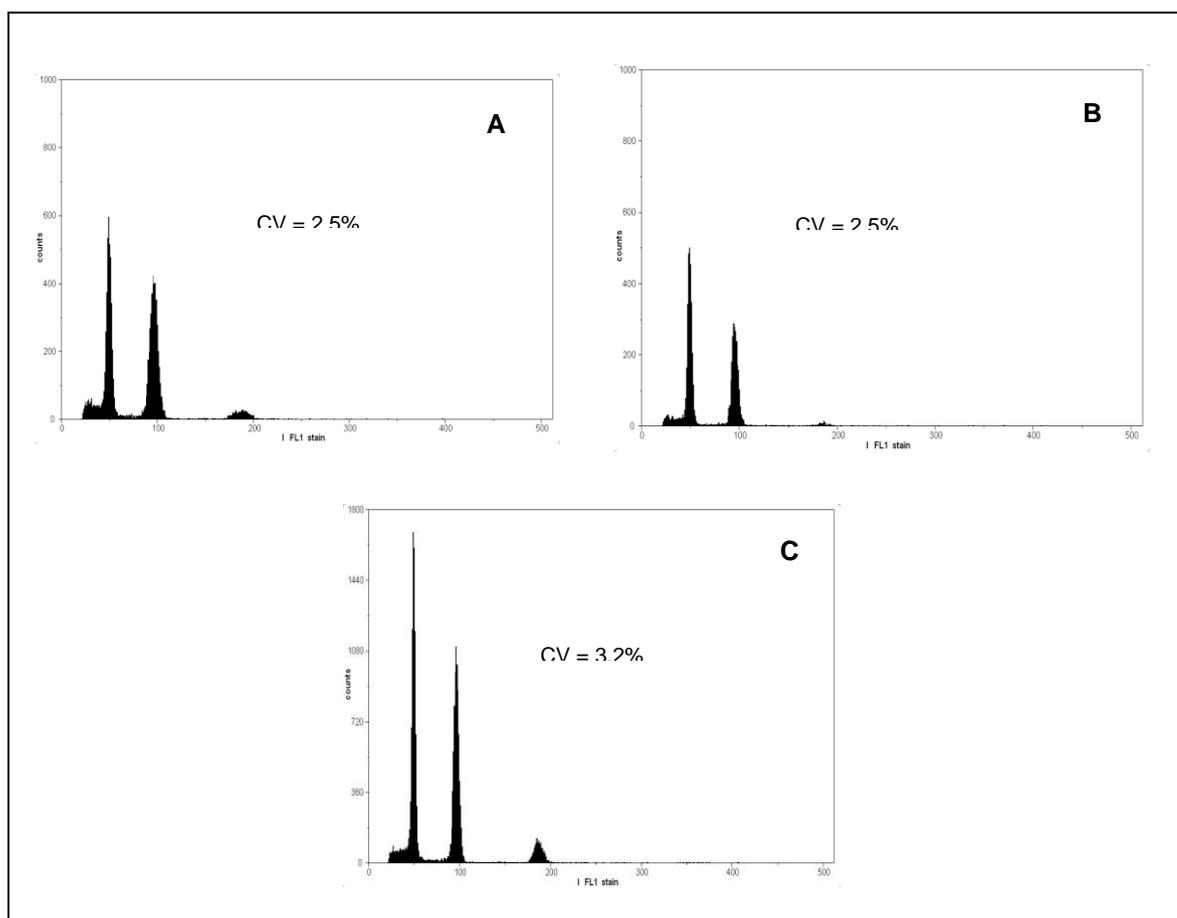


Figura 2 – Histogramas obtidos a partir da citometria de fluxo. A) AveBrJ (folíolos); B) AveBrJ (folha 14); C) GBrPF (folha 14).

Esse é o primeiro trabalho onde se utilizou folhas adultas para determinar o conteúdo de DNA de diferentes genótipos da espécie. Sandoval *et al.* (2003) utilizaram, apenas, folíolos de embriões cultivados *in vitro* de coqueiro, pois encontraram dificuldades quando analisaram folhas mais diferenciadas. Os resultados encontrados nesse estudo permitem que análises sejam feitas com plantas adultas, o que pode facilitar pesquisas que envolvam o uso de plantas adultas e onde há dificuldade de se obter plântulas, o que demanda maior tempo

No entanto, foi possível inferir que a qualidade dos histogramas decresceu à medida que as amostras ficavam mais tempo armazenadas na geladeira, (Tabela 3), ou seja, os melhores resultados foram obtidos das amostras que permaneceram 24h sob refrigeração. Teoricamente, qualquer tecido contendo núcleos intactos é apropriado para a medição do conteúdo de DNA nuclear (Greilhuber *et al.* 2007). No entanto, geralmente, recomenda-se o uso de folhas completamente expandidas e quase frescas; o tecido deve estar intacto, livre de doenças e parasitas (Dolezel e Bartos 2005).

Tabela 3- Coeficientes de variação (CV%) de três genótipos submetidos a diferentes tempos de armazenamento sob refrigeração em geladeira.

Genótipos	24h (CV%)	48h (CV%)	72h (CV%)
AVeBrJ *	2,5	3,0	6,7
AVeBrJ	2,5	3,0	6,9
GBrPF	3,0	4,0	7,2

*folhas obtidas de mudas

Em *Arecaceae*, são poucos os relatos sobre a determinação do conteúdo de DNA via citometria de fluxo, os existentes utilizam, geralmente, amostras cultivadas *in vitro*. Sandoval *et al.*(2003) utilizaram folhas imaturas de embriões zigóticos cultivados *in vitro* da variedade de coco Anão Amarelo da Malásia, para a determinação do conteúdo de DNA da espécie. Já Srisawat *et al.*(2005), ao determinar o conteúdo de DNA de dendê (*Elaeis guineensis*), também utilizaram folíolos provenientes de calos cultivados *in vitro*. Oliveira (2012) determinou o conteúdo de DNA de seis espécies do gênero *Oenocarpus* (*Arecaceae*), utilizando folhas jovens de material cultivado *in vitro*. Esses dados permitem inferir que a

determinação do conteúdo de DNA pode ser realizada tanto com folhas de plantas jovens quanto adultas sem afetar a qualidade das análises.

Em relação ao tamanho do material foliar, os resultados onde se utilizaram amostras de 1cm² e 1,5cm² apresentaram histogramas com alguns *debris*, o que comprometeu a qualidade da análise e refletiu em maiores CVs, em torno de 6%. Conforme Loureiro (2007), a quantidade de material vegetal necessária depende do tecido e deve ser determinada empiricamente. Tipicamente 20 a 100 mg de material foliar por amostra é suficiente para a maioria das espécies a fim de se obter uma taxa de fluxo de amostra de 50 a 100 partículas / s. Em muitos trabalhos de citometria de fluxo de plantas, utilizam-se, aproximadamente, 50 mg de material foliar para a obtenção de resultados satisfatórios (Loureiro 2007; Galbraith *et al.*, 1983; de Laat *et al.*, 1987). Na família *Arecaceae*, a literatura reporta que esse valor pode variar de 20mg a 80 mg (Sandoval *et al.*, 2003; Srisawat *et al.*, 2005, Oliveira, 2012); no presente trabalho, folíolos com 0.5cm² utilizado corresponde a 30mg, o que se aproxima do observado em outras espécies da família *Arecaceae*.

Para a suspensão dos núcleos, os tempos de 60 e 120 segundos não apresentaram resultados satisfatórios. Observou-se que, nas análises onde as amostras foram maceradas durante 60 segundos, a quantidade de núcleos suspensos e coloridos foi bastante inferior às demais, o que não permitiu a contagem de 10.000 núcleos em cada amostra, sendo necessário utilizar uma maior quantidade de tecido foliar. Esse tempo foi considerado insuficiente para liberação total dos núcleos. Já nas análises onde as amostras foram maceradas durante 120 segundos, foi possível observar histogramas com presença de *debris* próximo ao pico G1, o que, também, comprometeu a qualidade dos resultados.

Quanto ao tempo de coloração com iodeto de propídeo e Rnase (Partec), não foram observadas diferenças em relação à quantidade de núcleos coloridos e à qualidade da amostra, ou seja, nas análises onde foram testados os três tempos de coloração 30, 40 e 60 minutos, os resultados foram satisfatórios e similares.

3.2.4.2. Determinação do conteúdo de DNA

Os resultados obtidos com o protocolo desenvolvido para a espécie, neste estudo, foram satisfatórios para todos os 14 genótipos analisados.

Consequentemente, a metodologia gerou histogramas apresentando picos de núcleos G0/G1 com alta resolução tanto para os genótipos do grupo Anão, quanto para os do grupo Gigante (Figura 3 e 4).

Os histogramas gerados apresentaram-se com boa resolução e com pouco *debris* em todas as amostras o que refletiu, diretamente, nos coeficientes de variação (CVs) que variaram de 2.5% a 3.2%.

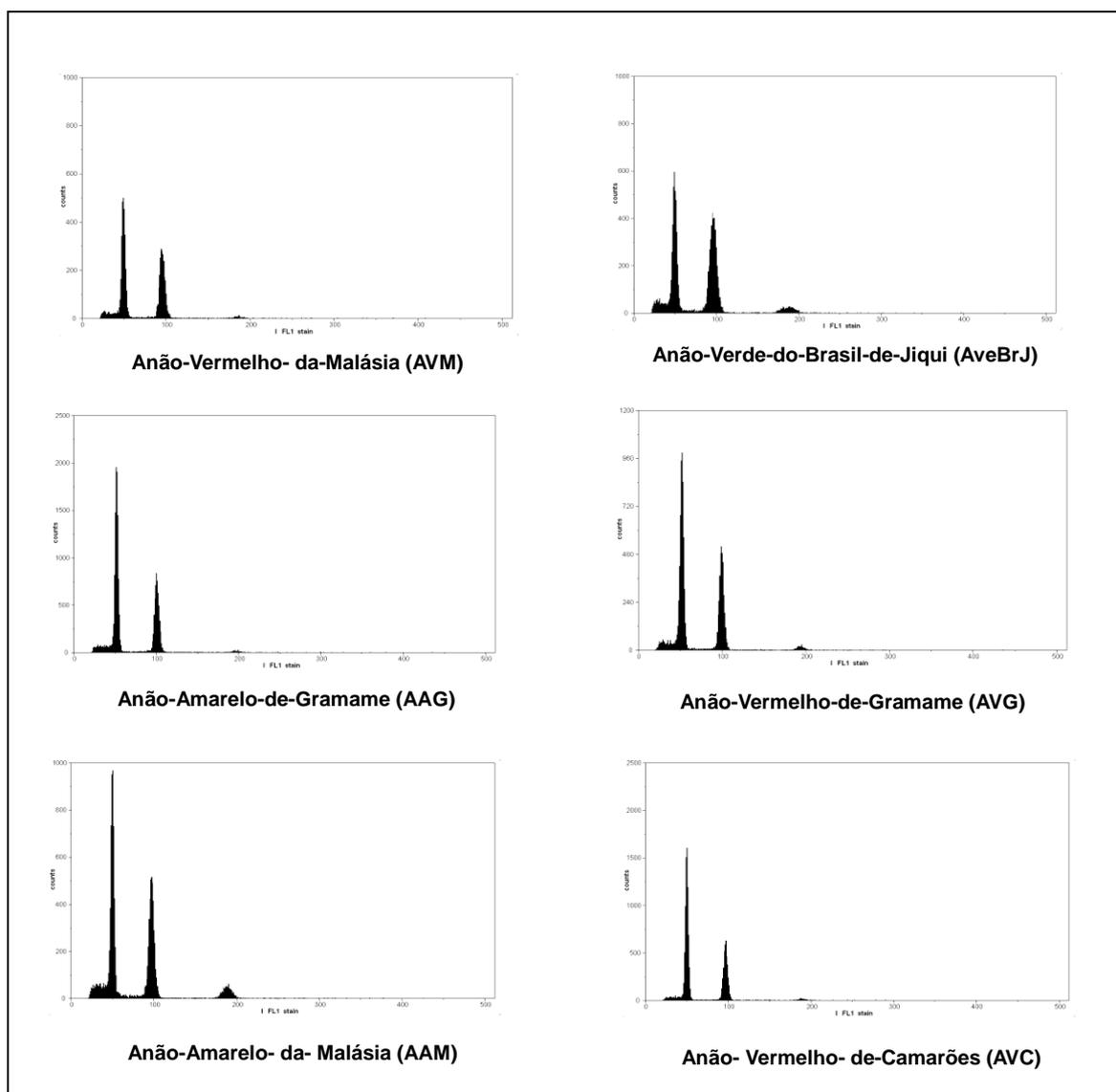


Figura 3 – Histogramas dos acessos de coqueiro do grupo Anão.

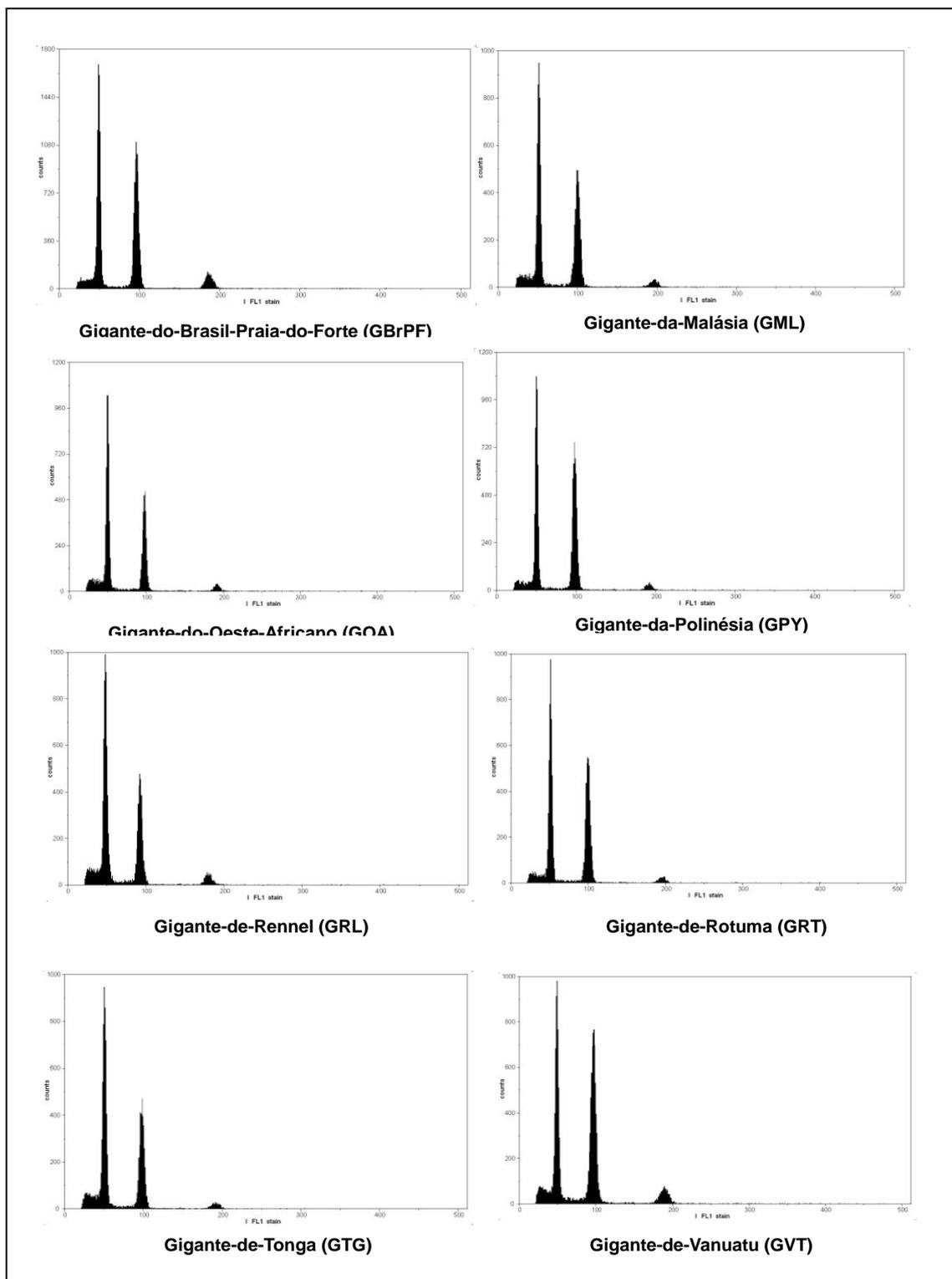


Figura 4 – Histogramas dos genótipos de coqueiro do grupo gigante.

A partir da análise dos histogramas, foi estimado o conteúdo 2C de DNA para todos os genótipos conforme a tabela 4.

Tabela 4 – Conteúdo de DNA (pg) de 14 genótipos de coqueiro pertencentes ao grupo Anão e ao grupo Gigante e Coeficientes de variação (CVs).

Acessos	Conteúdo de DNA (pg)	CV(%)
Gigante de Rennel	5.72 a	3.1
Gigante da Polinésia	5.68 b	2.8
Gigante de Rotuma	5.66 b	3.2
Gigante do Brasil Praia do Forte	5.60 c	3.2
Anão Vermelho de Gramame	5.58 c	2.7
Anão Amarelo de Gramame	5.56 c	2.8
Anão Amarelo da Malásia	5.56 c	2.5
Anão Vermelho da Malásia	5.56 c	2.8
Gigante de Vanuatu	5.54 c	2.7
Gigante de Tonga	5.54 c	3.0
Anão Vermelho de Camarões	5.54 c	3.0
Anão Verde do Brasil de Jiqui	5.52 d	2.5
Gigante da Malásia	5.50 d	2.9
Gigante do Oeste Africano	5.48 d	2.9

De acordo com a tabela 4, o conteúdo de DNA 2C dos 14 acessos variou de 5,48pg a 5,72pg; entretanto, os valores entre os genótipos foram bastante similares. Porém, o teste Scott e Knott utilizado para o agrupamento de médias revelou que há diferenças significativas entre o conteúdo de DNA dos 14 genótipos. O acesso Gigante-do-Oeste-Africano foi o que apresentou o menor conteúdo de DNA (5,48pg) e o Gigante-de-Rennel se destacou como o acesso de maior tamanho genômico (5,72pg). Dentro do grupo anão, o acesso que apresentou maior conteúdo de DNA foi o Anão-Vermelho-de-Gramame, e o Anão-Verde-do-Brasil-de-Jiqui foi o genótipo com menor conteúdo 2C (tabela 4). A média do conteúdo de DNA do grupo Gigante ficou em torno de 5,59 pg, do grupo Anão em torno de 5,55 pg e da espécie em torno de 5,57pg, o que, conforme Marie e Brown (1993), em pares de bases a espécie apresenta 5.347 Mpb.

Cambuí (2007), ao realizar estudos de divergência genética, observou que o anão verde é mais similar ao anão vermelho de Camarões e mais divergente do anão amarelo da Malásia. De acordo com a tabela 4, em relação ao conteúdo de DNA, essa similaridade, também, é observada, no entanto o agrupamento de médias mostra que o Anão-Verde-do-Brasil-de-Jiqui difere, estatisticamente, do Anão-Vermelho-de-Camarões. Já em relação aos anões amarelos, o Anão-Amarelo-da-Malásia não difere, estatisticamente, do Anão-Amarelo-de-Gramame, o que se assemelha ao encontrado por Siqueira *et al.*, (1998), que considera tais acessos como um tipo único.

Daher *et al.* (1998) consideram os anões vermelhos geneticamente distintos. A tabela 4 mostra que o anão vermelho de Gramame apresenta um conteúdo 2C superior ao anão vermelho da Malásia, entretanto essa diferença não é significativa.

Em coqueiro, análises como essas, ainda, são incipientes; Röser *et al.*, (1997) estimaram o conteúdo de DNA do coqueiro através de microdensitometria de Feulgen e obtiveram um valor 2C de 7,1 pg. Sandoval *et al.* (2003) avaliaram diferentes amostras de coco cultivados *in vitro* e observaram que o valor do conteúdo 2C, para a espécie, foi de 5,6pg, utilizando-se a cevada como padrão interno. Esse valor se aproxima do observado neste estudo, mesmo utilizando padrões internos diferentes. Isso fornece maior confiabilidade para estudos futuros, os quais necessitam saber o tamanho aproximado do genoma da espécie.

O valor encontrado neste estudo foi um pouco diferente dos registrados para outras espécies da família *Arecaceae* (Bharathan *et al.* 1994; Rival *et al.* 1997). A quantidade de DNA tem sido estudada em várias famílias de angiospermas, sendo que, na família *Arecaceae*, os primeiros estudos foram feitos com palmeiras em 1997, onde foram utilizadas 83 espécies pertencentes a 53 gêneros. Os autores observaram que o conteúdo 2C variou de 1.9pg observado em uma espécie diplóide (*Phytelephas aequariorialis* Spruce) a 78,2pg observado em uma espécie com alto nível de poliploidia (38X) (*Voanioala gerardii* J. Dransf.) (Roser *et al.*, 1997). No entanto, nesse estudo, os autores utilizaram outra metodologia, a microdensitometria de Feulgen. Trabalhos mais recentes em palmeiras, utilizando-se citometria de fluxo, reportam valores 2C de 17,5 pg para a *Trithrinax campestris*, considerado alto para as palmeiras (Gaiero *et al.*, 2012) e

valor 2C de 5,8 pg para a palmeira *Acrocomia aculeata*, valor este próximo do obtido neste estudo (Abreu et al., 2011).

Mandon *et al.*(2008) determinaram o conteúdo de DNA do gênero *Elaeis* que reúne importantes palmeiras da família *Arecaceae* e observaram que o conteúdo 2C, entre as espécies, variou de 3,64pg a 4,10pg. Nesse trabalho, foi utilizada como padrão externo a soja (*Glycine max*, 2C= 2.5pg). Já Oliveira (2011), trabalhando com três espécies do gênero *Euterpe* (*Arecaceae*), observou valores maiores que 8 pg, variando de 8,7pg a 9,41pg. O autor sugere que as diferenças na quantidade de DNA ocorrem devido a rearranjos estruturais cromossômicos, tais como deleções, duplicações, inversões e translocações. Em outro trabalho, Oliveira (2012), ao estimar o conteúdo de DNA de 5 espécies do gênero *Oenocarpus* (*Arecaceae*), observou valores que variaram de 6,46pg a 6,96pg.

3.2.5.CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste estudo permitem concluir que:

- O conteúdo de DNA pode ser realizado, utilizando-se folhas adultas já diferenciadas, o que facilitará futuros trabalhos com material adulto conservado em coleções *ex situ in vivo*, como é o caso do coqueiro;
- O conteúdo de DNA, dentro da espécie, foi variável, sendo o valor médio do conteúdo de DNA 2C do grupo Gigante de 5,59 pg, enquanto, no grupo Anão, o valor foi de 5,55pg;
- O conteúdo de DNA 2C da espécie foi de 5,57pg, considerado um tamanho de genoma pequeno dentro da família *Arecaceae*;
- Embora estatisticamente significativas, as diferenças de conteúdo de DNA foram pouco expressivas, sendo a diferença do maior para o menor de 4,2%. As diferenças existentes não promovem uma distinção entre os tipos gigante e anão, havendo maior variabilidade entre os acessos gigantes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abreu I S, Carvalho CR, Carvalho GMA, Motoike SY (2011) First karyotype, DNA C-value and AT/GC base composition of macaw palm (*Acrocomia aculeata*, Arecaceae) –a promising plant for biodiesel production. *Australian Journal of Botany* 59: 149-155.
- Aragão WM, Cruz EMO, Helvecio JS (2001) Caracterização morfológica do fruto e química da água de coco em cultivares de coqueiro anão. *Agrotópica*, Ilhéus 13(2):49-58p
- Aragão WM, ribeiro FE, Tupinambá EA, Siqueira ER (2002) Variedades e híbridos do coqueiro In: *Coco pós-colheita*. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica 26-34p.
- Aragão, W.M., Tupinamba, E.A., Angelo, P.C.S., Ribeiro, F.E. (2010) 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*. Brasília: Embrapa - SPI, p.1-24.
- Batugal PA, Bourdeix R, Baudouin L (2009) Coconut breeding. In: Mohan jain s., priyadarsham p.m. (eds) *Breeding plantation tree crops: tropical species*. Springer, New York, 327–375.

Batugal, P.; Rao, V.R.; Oliver, J., editors. (2005) Coconut Genetic Resources.

Bennet MD and Leitch IJ (1997) Nuclear DNA amounts in angiosperms: 583 new estimates. *Annals of Botany* 80: (2),169-196

Besendorfer V, Samardzija M, Zoldos V, Solic M, Paes D (2002) Chromosomal organization of ribosomal genes and NOR-associated heterochromatin and NOR activity in some populations of *Allium commutatum*. *Botanical Journal of the Linnean Society*. 139:99-108p.

Bourdeix, R. Efficacite de la selection massale sur les composantes du rendement chez le cocotier. *Oléagineux*, Paris, v.43, n.7, p. 283-295, 1988.

Brammer SP; Zanotto M; Caverzan A (2007) A citogenética vegetal: da era clássica à molecular. Passo Fundo. Embrapa Trigo, 2007. Disponível em: <http://www.cntp.embrapa.br>.

Caixeiro, APA (1999) Caracterização citogenética da heterocromatina constitutiva e sua implicação na evolução do cariótipo de espécies do gênero *Plebeia* (Hymenoptera: Apinae: Meliponini) Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) Viçosa MG, Universidade Federal de Viçosa-UFV, 68p.

Cambui EVF, Aragão WM and Leal MLS (2007) Variabilidade genética entre cultivares de coqueiro anão (*Cocos nucifera*, L.- Var. Nana). *Revista Brasileira de Biociências*, Porto Alegre, v.5, supl.1, p.165-167.

Castro CP (2007) Comportamento de cultivares de coqueiro anão (*Cocos nucifera* L.) nos tabuleiros costeiros do Norte de Sergipe (Dissertação Mestrado em agrossistemas) Universidade Federal de Sergipe 87p.

Clement C R, Villarreal DZ, Brown CZ, Ward GR, Pereira A A, Harries H C (2013) Coconuts in the Americas *Bot. Rev.* 79:342–370p.

- Clement CR; Zizumbo-Villarreal D; Brown CH; Ward RG; Alves-Pereira A; Harries HC. (2013). Coconuts in the Americas. *The Botanical Review* 79: 342-370.
- Coelho, LGM, Battistin, A. Estudo dos cariótipos em espécies de *Adesmia* DC. nativas no Rio Grande do Sul. In: 42 CONGRESSO NACIONAL DE GENÉTICA. Caxambu, *Revista Brasileira de Genética (supplement)* 19:3.
- Corrêa L.B., Barbieri L.R., Rossato M., Buttow M.V., Heiden G. (2009) Caracterização citológica de palmeiras do gênero *Butia* (Arecaceae). *Revista Brasileira de Fruticultura*, 31:1111-1116p.
- Costa LMC, Maia GAM, Costa J M C, Figueiredo RW, Sousa PHM (2005) Avaliação de água de coco obtida por diferentes métodos de conservação. *Ciênc. agrotec., Lavras* 29:6, 1239-1247p
- Cowell I. G., Aucott R., Mahadevaiah S. K., Burgoyne P. S., Huskisson N., Bongiorno S., Prantera G., Fanti L., Pimpinelli S., Wu R., Gilbert D. M., Shi W., Fundele R., Morrison H., Jeppesen P. and Singh P. B. 2002. Heterochromatin, HP1 and methylation at lysine 9 of histone H3 in animals. *Chromosoma*, 111: 22–36.
- Cruz CD (2006) Programa Genes versão Windows: aplicativo computacional em genética e estatística. Viçosa: Editora UFV.
- Daher, R. F.; Pereira, M. G.; Tupinambá, E. A.; Amaral Junior, A. T.; Aragão, W. M.; Rebeiro, F. E.; Oliveira, I. O.; Sakiyama, N. S. Assessment of coconut tree genetic divergence by compound sample RAPD marker analysis. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, v.2 n.3. p. 431-438. 2002 Brazilian Society of Plant Breeding.
- Damasceno Junior PC, Costa FR, Pereira TNS, Freitas Neto M, Pereira MG (2009) Karyotype determination in three Caricaceae species emphasizing the cultivated form (*Carica papaya* L). *Caryologia*, 62:10-15p.

- Dolezel J (1997) Application of flow cytometry for the study of plants genomes. Journal of Applied Genetics Olomouc, 38:3 285-302.
- Dolezel J and Bartos J (2005) Plant DNA Flow Cytometry and Estimation of Nuclear Genome Size. Annals of Botany 95: 99–110, 2005
- Doležel, J. (1991). Flow cytometric analysis of nuclear DNA content in higher plants. Phytochemical Analysis 2: 143-154.
- Doležel, J.; Lucretti, S. e Schubert, I. (1994). Plant chromosome analysis and sorting by flow cytometry. Critical Reviews in Plant Sciences 13 (3): 275-309.
- Doležel, J.; Sgorbati, S. e Lucretti, S. (1992). Comparison of three DNA fluorochromes for flow cytometric estimation of nuclear DNA content in plants. Physiologia Plantarum 85: 625-631.
- Dransfield J, Uhl NW (1987) Genera Palmarum: a classification of palms based on the work of Herald E. Lawrence: Moore Jr. Allen Press, 1987. 610p.
- Embrapa (2006) Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuárias. On line. Disponível em www.embrapa.br. Acessado em 24 de novembro de 2013.
- Embrapa (2010) Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuárias. On line. Disponível em www.embrapa.br. Acessado em 24 de novembro de 2013.
- Embrapa (2011) Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuárias. On line. Disponível em www.embrapa.br. Acessado em 24 de novembro de 2013.
- Embrapa (2013) – Agência Embrapa de Informação Tecnológica. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br>
- FAO 2011. World Production. Disponível em: <www.faostat.org.br>. Acesso em: 10 jan. 2011.

- Foale M, Harries H (2009) Farm and Forestry Production and Marketing Profile for Coconut (*Cocos nucifera*). In: Elevitch, C.R. (ed.). Specialty Crops for Pacific Island Agroforestry. Permanent Agriculture Resources (PAR), Holualoa, Hawai'i. <http://agroforestry.net/scps>
- Fontes H R e Ferreira MS (2006) A cultura do coqueiro. Embrapa Informação Tecnológica(Coleção Plantar, 48).
- Fontes H R, Ferreira JMS (2006). A cultura do coqueir : Embrapa Informação
- Fontes HR, Wanderley M (2010) Novos cenários para a cultura do coqueiro gigante no Brasil. Cinform. Aracaju ed 1400 9:8-14p
- Fox MH, Galbraith DW (1990) Application of flow cytometry and sorting to higher plant systems. In: Flow cytometry and sorting, 2ed, New York 663-650p.
- Fukui, K. 1996. Plant chromosomes at meiosis, p. 1–17. In: K. Fukui and S. Nakayama (eds.). Plant chromosomes: Laboratory methods. CRC Press, Boca Raton, Fla.
- Gaiero P , Mazzella C , Vaio M , Barros e Silva AE,, Santiñaque FF, López-Carro B , Folle GA , Guerra M (2010) An unusually high heterochromatin content and large genome size in the palm tree *Trithrinax campestris* (Arecaceae). Australian journal of Botany 60 (4): 378-382p.
- Galbraith DW, Lambart G, Macas J e Dolezel J (2002) Analysis of nuclear DNA content and ploidy in higher plants. Current Protocols in cytometric, Eds Robinson J,Azmi, A.e Tutois, S.John Wiley & Sons. Inc, New York.
- Galbraith, D. W.; Harkins, K. R.; Maddox, J. M.; Ayres, N. M.; Sharma, D. P. e Firoozabady, E. (1983). Rapid flow cytometric analysis of the cell-cycle in intact plant-tissues. Science 220 (4601): 1049-1051.

- Gill BS; Friebe B (1997) Plant cytogenetics at the dawn of the 21 st century. *Current Opinion in Plant Biology* 1:109-115p.
- Gill BS, Freire B, EWDO TR (1991) Standard karyotype and nomenclature system for description of chromosome bands and structural aberration in wheat. *Genome* 34: 830-839p.
- Guerra M. 2000c. Patterns of heterochromatin distribution in plant chromosomes. *Genetics and Molecular Biology* 23: 1029-1041.
- Guerra, M (1986) Reviewing the chromosome nomenclature of Levan et al. *Revista Brasileira de Genética*, 4:741-743.
- Guerra, M. (2004) FISH – Conceitos e aplicações na citogenética. Ed. Sociedade Brasileira de Genética. 176p
- Guerra, M; Souza, MJ (2002) Como observar cromossomos: um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana. Ribeirão Preto, SP: FUNPEC. 131p.
- Hartl,DL; Jones, EW (1998) *Genetics: Principles and analyses*. 4 edition., Jones and Bartlett Publishers, Sudbury, Massachusetts, 842p.
- Henderson, A.; Galeano, G.; Bernal, R. *Field guide to the palms of the Americas*. Princeton: Princeton University Press, 1995. 352p.
- Huziwara, y. Karyotype analysis in some genera of compositae. VIII. Further studies on the chromosome of Aster. *American Journal of Botany* 49:116-119p.
- IBGE (2012) Produção agrícola municipal: quantidade e valor da produção, área plantada e colhida. Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br>. Acesso em 4 de dezembro de 2012.

- KlinKardt MB (1998) Some aspects of karyoevolution in fishes. *Animal Research Development*. 47: 7-36p.
- Kolchinsky, A, Gresshoff, P M (1994) Dissecting molecular mechanisms of nodulation: taking a leaf from Arabidopsis. *Plant Mol. Biol.* 26:549-552p.
- Konan JL, Bourdeix R e George ML (2008) regeneration guidelines: coconut. *Crop specific regeneration guidelines*, Rome, Italy. 10p
- Leitch AR, Schwarzacher RT, Jackson D, Leitch IJ (1994) *In situ hybridization: a practical guide*. 1-3p.
- Loilola CM (2009) Comportamento de Cultivares de Coqueiro (*Cocos nucifera* L.) em diferentes condições agroecológicas dos tabuleiros costeiros do Nordeste Brasileiro Dissertação (Mestrado em Agroecossistemas, área de concentração Sustentabilidade em Agroecossistemas) Universidade Federal de Sergipe.
- Loureiro JCM (2007) Aplicação da citometria de fluxo ao estudo do genoma vegetal Tese Doutorado em Biologia Universidade de Aveiro 268p.
- Madon M, Phoon LQ, Clyde MM, Mohd Din A (2008) Application of flow cytometry for estimation of DNA nuclear content *Elais Journal of Oil Palm Research* 20: 447-452p.
- Maffei, EMD; Marin-Morales MA; Ruas, PM; Ruas CF (1996) Análise de assimetria cariotípica realizada em populações de *Mikania micrantha* HBK. (Asteraceae). *Brazilian Journal of Genetics (Supplement)* 19:131p.
- Marie D and Brown S (1993) A cytometric exercise in plant DNA histograms, with 2C values for 70 species. *Biology of the Cell* 78:41-51.

- Martins CR, Jesus Junior LAJ (2011) Evolução da produção de coco no Brasil e o comércio internacional : panorama 2010 / Embrapa Tabuleiros Costeiros - Aracaju,32p.
- Moore, H. E., 1973 a: Palms in the tropical forest ecosystems of Africa and South America. - In MEGGERS, B. J., AYENSU, E. S., DUCKWORTH, W. D., (Eds): Tropical forest ecosystems in Africa and South America: a comparative review, pp. 68-88. - Washington D.C.: Smithsonian Institution Press.
- Nair, M.K.; Nampoothiri, K.U.K.; Dhamadaan, S. Coconut breeding. Past achievements and future strategies. In: SILAS, E.G. Vellinakkara: Keraia Agricultural University, 1991. P. 17-25
- Oliveira L.C (2011) Palinologia, citogenética e conteúdo de DNA nuclear em espécies do gênero *Euterpe* (Dissertação de Mestrado apresentada a Universidade Federal de Lavras- Pós graduação em Genética e Melhoramento de Plantas) 92p.
- Otto FJ (1990) DAPI staining of fixed cells for high-resolution flow cytometry of nuclear DNA. In: Darzynkiewickz Z, Crissman HA, eds. Methods in cell biology, Vol. 33. San Diego: Academic Press,105–110p
- Passos CD, Passos EEM (2003) Aspectos morfológicos do caule e da folha do coqueiro anão (*Cocos nucifera* L.) Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros. (Embrapa Tabuleiros Costeiros comunicado técnico, 13).
- Passos EEM, Prado CHBA, LEAL MLS(1999) Condutância estomática, potencial hídrico foliar e emissão de folhas e inflorescências em três genótipos de coqueiro anão. *Agrotópica*, Ilhéus 11(3):147-152p.
- Passos, E E M (1998) Influência da maturação do fruto na germinação da semente de coco. Aracaju: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 3p. (Comunicado técnico, 27).

- Paszko, B (2006) A critical review and a new proposal of karyotype asymmetry indices. *Plant Systematics and Evolution* 258: 39-48p.
- Purseglove, JW (1975) *Tropical Crops- Monocotyledons Vol. 1 & 2*. Longman Ltd. London 607 p.
- Ramos, V.H.V (2004) Comportamento de cultivares de coqueiros anão e híbridos no Distrito federal. *Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal*, v. 26, n. 2, p. 363- 365p.
- Raven, P.H. *The Bases of Angiosperm Phylogeny: Cytology*. *Annals of the Missouri Botanical Garden, St. Louis*, 62:724-764p.
- Ribeiro, F E; Baudoin, L; Lebrun, P; Chaves, LJ; Brondani, C.; Zucchi, M; Vencovsky, R Population structures of brazilian tall coconut (*cocos nucifera* L.) By microsatellite markers. *Genetics and molecular biology*, 33, 4, 696-702p. 2010.
- Richards, EJ, Ausubel FM (1988) Isolation of a higher eukaryotic telomere from *Arabidopsis thaliana*. *Cell* **53**: 127–136.
- Riha, K., McKnight, T. D., Griffing, L. R. and Shippen, D. E. 2001. Living with genome instability: plant responses to telomere dysfunction. *Science*, 291: 1787-1800.
- Rival A, Beule T, Barre P, Hamon S, Duval Y, Noirot M (1997) Comparative flow cytometric estimation of nuclear DNA content in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq) tissue cultures and seed-derived plants *Plant Cell Reports* 16: 884–887p.
- Rodrigues VP (2004) Aspectos químicos e farmacológicos de uma palmeira brasileira. Dissertação de mestrado em ciências farmacêuticas apresentada a Universidade Federal do Rio de Janeiro 129p.

- Roser M (1994) Pathways of karyological differentiation in palms (Arecaceae). *Plant Systematics and Evolution*. 189: 83-122p.
- Roser M, Johson MAT, Hanson L (1997) Nuclear DNA amounts in Palms (Arecaceae) *Botanica Acta* 110:1 79-89p.
- Sacchet, AMOF (1999) Variabilidade genetic: ponto de partida para o melhoramento de plantas. In: Sacchet, AMOF (Org). *Genética para que te quero?* Porto Alegre: Ed UFRGS. 99-104p.
- Sandoval, A.; Hocher, V. E, Verdeil, J. L. (2003) Flow cytometric analysis of the cell cycle in different coconut palm (*Cocos nucifera* L.) tissues cultured in vitro. *Plant Cell Reports* 22 (1): 25-31p.
- Santos, GA, Batugal, PA; Otham A, Baudowin, L , Labouisse JP (1996) *Manual on standardized Research Techniques in coconut breeding*.IPGRI, 1996. 45p.
- Schifino-Wittmann MT (2001) Determinação da quantidade de DNA nuclear em plantas. *Ciência Rural* 31:5 897-902p.
- Schubert,I (2007) Chromosome evolution. *Current Opinion in Plant Biology* 10: 109-115p.
- Sharma AK; Sharma A (1994) *Chromosome Techniques – A Manual* Hardwood Academic Publishers. Switzerland. 368p.
- Singh, RJ (1993) *Plant cytogenetics*. United States: CRC: Press. Inc, 391p.
- Siqueira, LA, ARAGÃO, W.M., TUPINAMBÁ, E.A. (2002) A Introdução do coqueironeo Brasil, importância histórica e agrônômica, 24p, 2002. (EmbrapaTabuleiros Costeiros. Documentos, 47). Disponível em <http://www.cpatc.embrapa.br>

- Souza MGC, Benko-Iseppon AS (2004) Cytogenetics and band patterns on Caesalpinideae and Papilionidae native from Pará, Amazonas, Brasil. *Botanical Journal of the Linnean Society, Londres.* 144:1,181-191p.
- Souza, MM, Urdampilleta, JD, Forni-Martins, ER (2010) Improvements in cytological preparations for fluorescent in situ hybridization in *Passiflora*. *Genetics and Molecular Research* 9: 2148-2155p.
- Sisunandar RA, Turquay P, Samosir Y, Adkins SW (2010) Cryopreservation of coconut (*Cocos nucifera* L.) zygotic embryos does not induce morphological, cytological or molecular changes
- Srisawat T, Kanchanapoom K, Pattanapanyasat K, Srikul S, Chuthammathat W (2005) Flow cytometric analysis of oil palm: a preliminary analysis for cultivars and genomic DNA alteration *Songklanakarini J. Sci. Technol.* Vol. 27 (Suppl. 3), 645-652.
- Sumner AT (2003) *Chromosomes: Organization and Functions*. Blackwell Publishing Limited. 304p.
- Sybunga, J. (1992) Some sources of error in the determination of chromosome length. *Chromosoma*, 10:355-364p.
- Sýkorová E, Lim KY, Kunická Z, Chase MW, Bennett MD, Fajkus J, Leitch AR (2003) Telomere variability in the monocotyledonous plant order Asparagales *The Royal Society*.
- Zofemler WB 1994. *Guide to flowering plant families*. London: The University of North Carolina Press.