

## Tamanho do Genoma em Coqueiro (*Cocos nucifera* L.)<sup>1</sup> via Citometria de Fluxo<sup>1</sup>

Monique Freitas Neto<sup>1</sup>, Telma Nair Santana Pereira<sup>2</sup>, Ingrid Gaspar da Costa Gerônimo<sup>3</sup>, Alinne Oliveira Nunes<sup>2</sup>, Semíramis Rabelo Ramalho Ramos<sup>4</sup>, Messias Gonzaga Pereira<sup>3</sup>,

### Resumo

O objetivo do presente trabalho foi determinar o tamanho do genoma do coqueiro (*Cocos nucifera* L.) via determinação do conteúdo de DNA estimado via citometria de fluxo. Quatorze genótipos de coco, seis do tipo anão e oito do tipo gigante, foram utilizados nesse estudo. Para tal, amostras de folíolos medindo aproximadamente 0,5 cm<sup>2</sup>, por genótipo foram maceradas em solução tampão e filtradas para obtenção de uma suspensão dos núcleos. Posteriormente, os núcleos foram coloridos com iodeto de propídeo e em seguida foi adicionado RNase em cada amostra. Como padrão interno foi utilizado a cultivar CE-777 de milho (*Zea mays* L.). Após 30 minutos, as amostras foram analisadas em citômetro de fluxo (Partec PA II); para cada genótipo foi feita a leitura de cinco amostras. O conteúdo 2C de DNA de cada genótipo foi determinado, com médias variando de 2,74 pg a 2,86 pg, sendo a média geral 2,80 pg o que corresponde a 2.744 Mpb. O conteúdo de DNA do grupo Gigante foi o mais variável sendo o maior conteúdo estimado para o Gigante de Rennel, e o menor conteúdo para Gigante do Oeste Africano; o grupo Anão teve uma menor variação. A média do conteúdo 2C de DNA do grupo gigante foi de 2,80 pg e a do grupo Anão foi de 2,78pg. Os coeficientes de variação variaram de 2,5% a 3,1%, o que indica a precisão das medições. O teste Scott e Knott a 5% de probabilidade, agrupou os genótipos em 4 classes de acordo com as médias do conteúdo de DNA. Os resultados permitiram concluir que a espécie apresenta baixo conteúdo de DNA quando comparada com outros membros da família Arecaceae.

### Introdução

O coqueiro pertence à classe Monocotyledoneae, ordem Palmales, família Arecaceae, subfamília Coccoideae e gênero *Cocos*. Este 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). 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 etc) (Batugal *et al.*, 2009).

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 agro ecossistema do coqueiro (Loiola C.M.,2009). No entanto, apesar da importância da espécie a pesquisa ainda é incipiente sendo necessário gerar informações básicas, como número e tipos de cromossomos, conteúdo de DNA, comportamento meiótico, viabilidade polínica, dentre outros, que possam auxiliar o melhoramento genético da espécie.

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. O tamanho do genoma em plantas pode ser estimado por alguns métodos, um dos mais utilizados é a citometria de fluxo a qual o conteúdo de DNA 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).

1 Parte da tese de doutorado da primeira autora

2 Professores da UENF- LMGV/ Campos dos Goytacazes - RJ e-mail: [telmasp2012@gmail.com](mailto:telmasp2012@gmail.com)

4 Pesquisadora da Embrapa Tabuleiros Costeiros

3 Mestranda em Genética e Melhoramento de Plantas – UENF- LMGV/ Campos dos Goytacazes - RJ

Em coqueiro não tem sido encontrados 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, via conteúdo de DNA, dos diferentes genótipos de coqueiro utilizando a citometria de fluxo.

### Material e Métodos

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 determinação do conteúdo de DNA foram utilizadas amostras de folíolos de 14 genótipos de coqueiro, sendo 6 tipo anão e 8 tipo gigante. Esses genótipos estão conservados no banco ativo de germoplasma de coco da Embrapa Tabuleiros Costeiros em Aracajú – Sergipe.

Amostras de folíolos dos genótipos de coqueiro medindo aproximadamente 0.5cm<sup>2</sup> foram maceradas em placa de Petri em 500 µl de solução tampão de extração (Partec) durante 90 segundos a temperatura ambiente, para a suspensão dos núcleos. Em seguida, as amostras foram filtradas utilizando filtros de 50 µm (Partec). Na etapa de coloração dos núcleos foram adicionados 2 ml de solução de coloração (Partec) contendo iodeto de propídeo e RNase, a 4°C durante 30 minutos. A espécie *Zea mays* (conteúdo 2C = 5.43pg) foi utilizada como padrão interno (Dolezel *et. al.*, 1992). As amostras foram analisadas em citômetro de fluxo Partec PA II. Para cada genótipo foram feitas 5 repetições. Os parâmetros como ganho, velocidade de análise da amostra e padrão interno foram definidos anteriormente no estabelecimento do protocolo para a cultura e os histogramas, médias, áreas, e coeficiente de variação foram obtidos usando *Flow Max software* (Partec). 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 em nível de 5% de probabilidade com o auxílio do programa estatístico Genes (Cruz, 2001).

### Resultados e Discussão

Os resultados preliminares da citometria de fluxo revelaram picos  $G_1$  com boa resolução para todos os genótipos (Figura 1). Os núcleos suspensos geraram histogramas com coeficientes de variação (CVs) entre 2.5% a 3.2%. Segundo a literatura, CVs em plantas podem variar de 1% a 10% e que valores de 1% a 2% refletem análises de alta qualidade e que CV de 3% pode ser utilizado com valor de rotina (Marie & Brown, 1993; Galbraith *et al.* (2002).

A partir da análise dos histogramas foi estimado o conteúdo 2C de DNA para todos os genótipos conforme a tabela 1. O teste Scott e Knott utilizado na comparação das médias revelou que há diferenças significativas entre o conteúdo de DNA dos 14 genótipos, sendo que as médias variaram de 2.74 pg a 2.86 pg, com média geral de 2,80 pg. O genótipo Gigante do Oeste Africano foi o que apresentou o menor conteúdo de DNA e o Gigante de Rennel que se destacou como o genótipo de maior tamanho genômico. Dentro do grupo anão o genótipo que apresentou maior conteúdo de DNA foi o Anão Vermelho de Gramame e o Anão Verde de Jiqui foi o genótipo com menor conteúdo 2C (tabela 1). A média do conteúdo de DNA do grupo Gigante ficou em torno de 2,80 pg e do grupo Anão em torno de 2,78pg.

Conforme Bennet e Leitch (1997) nas angiospermas o valor C pode variar de 0,2 pg em *Arapdopsis thaliana* a 127.4pg em *Fritillaria assyriaca*.

A quantidade de DNA tem sido estudada em várias famílias de angiospermas sendo que na família Arecaceae os primeiros estudos foram feitos com palmeiras onde foram utilizadas 83 espécies, pertencentes a 53 gêneros. Os autores observaram que o conteúdo 2C variou entre 1.94pg e 27.81pg em diplóides, mostrando uma variação aproximada de 14,3 vezes no tamanho do genoma (Roser *et al* 1997).

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.

Tabela 1 – Conteúdo de DNA (pg) de 14 genótipos de coqueiro pertencentes ao grupo Anão e ao grupo Gigante e Coeficientes de variação (CVs).

Genótipos	Conteúdo de DNA (pg)	CV(%)
Gigante de Rennel	2.86 a	3.1
Gigante da Polinésia	2.84 b	2.8
Gigante de Rotuma	2.83 b	3.2
Gigante do Brasil Praia do Forte	2.80 c	3.2
Anão Vermelho de Gramame	2.79 c	2.7
Anão Amarelo de Gramame	2.78 c	2.8
Anão Amarelo da Malásia	2.78 c	2.5
Anão Vermelho da Malásia	2.78 c	2.8
Gigante de Vanuatu	2.77 c	2.7
Gigante de Tonga	2.77 c	3.0
Anão Vermelho de Camarões	2.77 c	3.0
Anão Verde de Jiqui	2.76 d	2.5
Gigante da Malásia	2.75 d	2.9
Gigante do Oeste Africano	2.74 d	2.9

Os resultados observados nesse trabalho permitem concluir que a espécie apresenta baixo conteúdo de DNA quando comparada com outros representantes da família Arecaceae, e que o conteúdo 2C não teve grande variação entre os genótipos do grupo anão e do grupo gigante.

### Agradecimentos

Os autores agradecem a Embrapa Tabuleiros Costeiros pelo envio das amostras foliares, a Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) pelo auxílio financeiro e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo de doutorado.

### Referências

- 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.
- Bennet MD and Leitch IJ (1997) Nuclear DNA amounts in angiosperms: 583 new estimates. **Annals of Botany** 80:2,169-196
- Cruz CD (2006) Programa Genes versão Windows: aplicativo computacional em genética e estatística. Viçosa: Editora UFV.
- Dolezel J and Bartos J (2005) Plant DNA Flow Cytometry and Estimation of Nuclear Genome Size. **Annals of Botany** 95: 99–110, 2005
- Dolezel J (1997) Application of flow cytometry for the study of plants genomes. **Journal of Applied Genetics** Olomouc, 38:3 285-302.
- 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.
- 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.
- 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.

Oliveira LC (2011) Palinologia, Citogenética conteúdo de DNA nuclear em espécies do gênero *Euterpe* Dissertação (**Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas**) Universidade Federal de Lavras .

Roser M, Johson MAT, Hanson L (1997) Nuclear DNA amounts in Palms (Arecaceae) **Botanica Acta** 110:1 79-89.

Schifino-Wittmann MT (2001) Determinação da quantidade de DNA nuclear em plantas. **Ciência Rural** 31:5 897-902.