

MELHORAMENTO GENÉTICO DO COQUEIRO (*Cocos
nucifera L.*): CAPACIDADE COMBINATÓRIA E DIVERSIDADE
GENÉTICA VIA RAD-SEQUENCING.

PEDRO HENRIQUE ARAÚJO DINIZ SANTOS

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO – UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
Março - 2016

MELHORAMENTO GENÉTICO DO COQUEIRO (*Cocos
nucifera* L.): CAPACIDADE COMBINATÓRIA E DIVERSIDADE
GENÉTICA VIA RAD-SEQUENCING.

PEDRO HENRIQUE ARAÚJO DINIZ SANTOS

“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.”

Orientador: Prof. Messias Gonzaga Pereira

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
Março – 2016

MELHORAMENTO GENÉTICO DO COQUEIRO (*COCOS
NUCIFERA L.*): CAPACIDADE COMBINATÓRIA E DIVERSIDADE
GENÉTICA VIA RAD-SEQUENCING.

PEDRO HENRIQUE ARAÚJO DINIZ SANTOS

“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.”

Aprovado em 14 de março de 2016

Comissão Examinadora:

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

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

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

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

À minha esposa Aline, meu filho Lucca, aos meus pais José Roberto Santos e Marli Alzira Diniz Santos, às minhas irmãs Carolina e Flaviana, enfim, à todos pelo incansável apoio e amor incondicional; dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por permitir que esse sonho se realizasse.

Aos meus familiares, em especial ao meu pai José Roberto e à minha mãe Marli, por sempre acreditarem no meu sucesso e torcerem por mim.

Às minhas irmãs Carolina e Flaviana, que mesmo a distância me incentivaram em cada decisão tomada em minha vida.

À minha esposa Aline por sempre me apoiar e pelo amor despendido em todos os momentos que passamos juntos.

Ao meu “pequeno GRANDE guerreiro” filho, por me mostrar o real sentido da minha existência.

À Faperj, pelo suporte financeiro e pela infraestrutura para a realização desse trabalho.

Ao meu orientador Messias Gonzaga Pereira, pelo exemplo de profissionalismo, pelos ensinamentos e apoio na condução deste trabalho e também pelos conselhos e companheirismo em momentos de dificuldades.

Aos professores dos LMGV, pelas valiosas contribuições.

Aos amigos do LMGV, pela agradável convivência durante o período do doutorado.

Às técnicas do laboratório, Vitória e Marcela, pelo auxílio nas tarefas de laboratório e pela tranquilidade e à Doutora Fernanda Santana pelo apoio prestado durante todo o processo laboratorial, ajuda de você foi essencial!!!

À Embrapa Tabuleiros Costeiros pelo apoio prestado na realização das tarefas de campo.

À Doutora Semíramis Rabelo Ramalho Ramos pelas valiosas contribuições ao longo do projeto e no fechamento do trabalho compondo a banca de defesa da tese

Aos Doutores Luiz Angelo Mirisola Filho e Wilson Menezes de Aragão, muito obrigado pela atenção e ensinamentos de prática de campo.

Ao funcionário da Secretaria de Pós-Graduação de Genética e Melhoramento de Plantas Daniel, pela amizade e pela prestatividade.

Ao meu grande amigo Paulinho pelos momentos de descontração e conselhos nos momentos em que precisei.

Aos amigos de Sete Lagoas Bezola, Ameba, Dezinho, Nicolau, Netinho, Webinho, e Zezinho, pelos bons momentos vividos e acima de tudo pela amizade verdadeira.

E a todos os que de certa forma contribuíram para que esse trabalho se realizasse com sucesso, o meu MUITO OBRIGADO!!!!!!

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	4
3. CAPÍTULOS.....	5
3.1 Estudo da variabilidade genética entre e dentro de populações de coco anão (<i>Cocos nucifera</i> L.) via RAD-Sequencing.	5
3.1.1 INTRODUÇÃO	5
3.1.2 REVISÃO	6
3.1.2.1 Origem e dispersão do coqueiro	7
3.1.2.2 Estratégias no melhoramento aplicado ao coqueiro	8
3.1.2.3 Aplicações de tecnologias de sequenciamento de nova geração à Genotipagem via Sequenciamento	9
3.1.2.4 Coqueiro anão.....	10
3.1.2.4.1 Anão Verde do Brasil	10
3.1.2.4.2 Anão Amarelo da Malásia e de Gramame	11
3.1.2.4.3 Anão Vermelho Malásia e de Gramame	11
3.1.2.4.4 Anão Vermelho de Camarões.....	12
3.1.2.5 Genotipagem via Sequenciamento (GBS) por Sequenciamento de DNA Associados a Sítios de Restrição (RAD-Sequencing).....	12
3.1.3 MATERIAL E MÉTODOS	14

3.1.3.1	Material vegetal.....	14
3.1.3.2	Extração de DNA	17
3.1.3.3	Teste com Enzimas de Restrição.....	17
3.1.3.4	Montagem das Bibliotecas RAD.....	20
3.1.3.5	Análises de Bioinformática	21
3.1.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	23
3.1.4.1	Teste com Enzimas de Restrição.....	23
3.1.4.2	Análise de Diversidade via RAD-Sequencing	27
3.1.5	CONCLUSÕES.....	36
3.2	Avaliação de Híbridos Inter e Intrasubvarietais de Coco Anão (<i>Cocos nucifera</i> L.) via Fenotipagem Digital	38
3.2.1	INTRODUÇÃO	38
3.2.2	REVISÃO	41
3.2.2.1	Origem e Botânica	41
3.2.2.2	Importância Econômica.....	41
3.2.2.3	Recursos Genéticos do Coco.....	42
3.2.2.4	Variabilidade Genética do Coqueiro.....	43
3.2.2.5	Delineamento Topcross para Estimar a Capacidade Combinatória.....	44
3.2.2.6	Fenotipagem Digital	45
3.2.3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	46
3.2.3.1	Material Genético	46
3.2.3.2	Obtenção dos Híbridos Topcrosses	47
3.2.3.3	Avaliação dos Híbridos Topcrosses	49
3.2.3.3.1	Características avaliadas.....	50
3.2.3.4	Análise e Processamento de Imagens Digitais	50
3.2.3.5	Validação das imagens digitais	51
3.2.3.6	Análises Estatísticas	52
3.2.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	54
3.2.4.1	Validação digital	54
3.2.4.2	Análise de Variância	56
3.2.5	CONCLUSÕES	63
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	64

RESUMO

SANTOS, Pedro Henrique Araújo Diniz, D.Sc., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Março de 2016. Melhoramento Genético do Coqueiro (*Cocos nucifera* L.): Capacidade combinatória e diversidade genética via Rad-Sequencing. Orientador: Messias Gonzaga Pereira. Coorientadora: Helaine Christine Cancela Ramos.

A UENF tem um programa de melhoramento genético aplicado ao coqueiro que propõe identificar e selecionar híbridos de coco anão que apresentem boa capacidade combinatória e com alto potencial para produção de água, bem como apurar a variabilidade genética entre acessos de coco anão através de tecnologias de Genotipagem via Sequenciamento, utilizando a técnica RAD-Sequencing (RAD-Seq). A enzima AseI apresentou o melhor padrão de digestão, com 6 e 7 milhões de fragmentos resultantes da digestão do DNA de um anão verde do Brasil do Pará (BGD-PARÁ) e um anão vermelho de Camarões (CRD). Esta enzima rendeu cerca de 50 % a mais de fragmentos quando comparado com as outras enzimas testadas (BglII e EcoRV). Foram encontrados em média 164.013 sítios variantes, sendo 27.873 polimórficos. O valor médio de alelos privados encontrados para cada população foi de 8.390, tendo variado de 2.773 para o anão verde de Jiqui (BGD-Jiqui) até 36.237 para o anão amarelo de Gramame (GYD). Foi verificado que as estimativas da média da homoziguidade observada para as populações amostradas foram de 0,9258 com os valores, variando de 0,9038 a 0,9434 para o anão verde da Bahia (BGD-Bahia) e MRD, respectivamente. Os dendrogramas com base nas populações e nos indivíduos

mostraram tendência de agrupamento, não pela sua localidade, mas pelos grupos subvarietais. Além disso, fica evidente o baixo polimorfismo entre as diferentes populações de anão verde do Brasil, inclusive, pouca variação intrapopulacional em que tais populações não se mostraram distintas, porém, tais populações podem ser usadas como genitoras para obtenção de híbridos intersubvarietais, uma vez que o uso de marcadores RAD-Seq aumentou o poder de detecção de variabilidade genética, se tornando uma ferramenta viável e promissora na identificação de indivíduos que possam aumentar o efeito da heterose em cruzamentos específicos. Foi conduzido um experimento para avaliar híbridos resultantes de cruzamentos entre indivíduos advindos de um delineamento topcross, utilizando processamento e análise de imagem digital, que se mostrou extremamente promissora na obtenção dos dados, tornando o processo mais eficiente e menos oneroso. Foi verificada manifestação da heterose ainda em fase juvenil, fato este evidenciado pelo ranqueamento dos híbridos, tendo sido observada superioridade na grande maioria dos híbridos em relação à testemunha BGD-Jiqui. A análise de variância indicou presença de variabilidade para a maioria das características avaliadas. Foi observada significância através do erro padrão estimado quando se considerou o tamanho da parcela contendo duas plantas para a maioria das características, porém, quando se variou o número de repetições, as significâncias se comportaram com maior flutuabilidade, com Altura de Planta, Comprimento de Folha e Diâmetro do Coleto apresentando significância a partir de 6, 9 e 8 repetições, respectivamente. Os resultados nos permitem indicar alguns cruzamentos direcionados baseados tanto na distância genética via marcadores moleculares quanto em relação ao efeito de dominância manifestado nos híbridos avaliados, como, por exemplo, MYD x CRD, BGD-PARÁ x anão verde de Souza Dantas (BGD-Dantas) e anão vermelho da Malásia (MRD) x anão amarelo de Gramame (GYD).

ABSTRACT

SANTOS, Pedro Henrique Araújo Diniz, D.Sc., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Março de 2016. Coconut breeding (*Cocos nucifera* L.): Combining ability and genetic diversity by Rad-Sequencing. Advisor: Messias Gonzaga Pereira. Co-advisor: Helaine Christine Cancela Ramos.

The UENF has a breeding program applied to the coconut tree which proposes to identify and select dwarf coconut hybrids that have good combining ability with high potential for water production, and to ascertain the genetic variability of dwarf coconut access through genotyping technologies via sequencing using the RAD-Sequencing technique (RAD-Seq). The AseI enzyme showed the best standard of digestion with 6 to 7 million resulting fragments of DNA digestion of a Pará Brazil green dwarf (BGD-PARA) and the Cameroon Red Dwarf (CRD), respectively. This enzyme yielded about 50% more fragments when compared with the other tested enzymes (BglII and EcoRV). They were found on average 164,013 sites variants, and from this amount, 27,873 were polymorphic. The average value of private alleles found in each population was 8,390, and ranged from 2,773 to Jiqui Brazilian green dwarf (BGD-Jiqui) to 36,237 for Gramame yellow dwarf (GYD). It was found that the average estimates of homozygosity observed for the sampled populations were 0.9258 with values ranging from 0.9038 to 0.9434 for Bahia green dwarf (BGD-Bahia) and MRD, respectively. The dendrograms based on populations and individuals showed a grouping of tendency, not by their location but by subvarietal groups. Furthermore, it is evident the low polymorphism among

different populations of Brazil green dwarf, even little intrapopulation variation where such populations were not distinct, however, they show that such populations can be used as parents for obtaining intersubvarietal hybrids since the use of RAD-Seq markers increased the genetic variability detection power, becoming a viable and promising tool for identifying individuals that may increase the effect of heterosis in specific combinations. An experiment to evaluate hybrids resulting from crosses between individuals arising from a topcross design using digital processing and image analysis was performed, which showed extremely promising in obtaining the data, making it more efficient and less costly process. A manifestation of heterosis still in juvenile phase was observed. Such fact was demonstrated by the ranking of hybrid, where there was a superiority of the vast majority of hybrids in relation to BGD-Jiqui check. Analysis of variance indicated the presence of variability for most features. Significance was observed by the estimated standard error when considering the plot size containing two plants for most traits, however, when it varied the number of replications, the significances behaved with greater instability, with Plant height, Leaf length and Stem Diameter presenting significance from 6, 9 and 8 replications, respectively. The results allow us to indicate some targeted combinations based both on genetic distance via molecular markers and the dominance effect manifested in the hybrids, such as MYD x CRD, BGD-PARÁ x Souza Dantas green dwarf (BGD-Dantas) Malaysia red dwarf and (MRD) x Gramame yellow dwarf (GYD).

1. INTRODUÇÃO

No Brasil, atividades ligadas ao agronegócio respondem por um em cada três reais gerados no país (MAPA, 2010). Some-se a este fato a capacidade de geração de empregos diretos e indiretos resultante das atividades agrícolas, bem como a renda gerada pelas atividades agrícolas, e tem-se a visão da importância deste setor para o desenvolvimento da economia em âmbito regional e nacional.

O melhoramento genético de plantas é um dos principais responsáveis por ganhos de produtividade agrícola e pela posição destacada da agricultura brasileira no cenário mundial. Estima-se que os incrementos de produção dos cultivos obtidos nas últimas décadas se devem 50% ao melhoramento genético e 50% se deva ao manejo (Paterniani *et al.*, 2003).

O coqueiro (*Cocos nucifera* L.) é uma palmeira perene cujo centro de origem remonta ao Sudeste Asiático, tendo sido introduzida no Brasil pelos colonizadores portugueses em meados do século XVI (Costa *et al.*, 2005). A planta é considerada uma das espécies perenes de maior relevância do mundo, pois detém a capacidade de gerar emprego e, conseqüentemente, renda em vários países, seja através do consumo de seus frutos in natura ou pela industrialização do fruto bem como de outros órgãos desta planta (raiz, estipe, inflorescência, folhas e palmito), originando mais de 100 produtos e subprodutos de significativo valor econômico (Costa *et al.*, 2005).

O aumento significativo da demanda de água de coco acarretou uma rápida expansão de coqueirais da variedade anã, que passaram a ocupar áreas

não tradicionais de cultivo desta planta. Este fato fica evidenciado quando se observa a região sudeste, principalmente os estados do Espírito Santo e Rio de Janeiro, que apresentam a vantagem de se localizar próximos ao mercado consumidor, aumentando a oferta do produto com preços mais reduzidos. No Rio de Janeiro, a área de plantio e a produção de frutos passaram de 603 ha e quatro milhões de frutos, respectivamente, em 1990, para 6 mil ha e mais de 25 milhões de frutos em 1999 (Rego Filho et al.,1999).

Embora seja uma cultura importante tanto para o estado do Rio de Janeiro quanto para o Brasil, muito pouco se fez no país em termos de melhoramento genético. Considerando a natureza da cultura, perene por excelência, há que se lançar mão de ferramentas moleculares para melhor direcionar os trabalhos de melhoramento e reduzir o tempo para lançamento de novas cultivares. Considerando ainda as peculiaridades da cultura com pouca informação disponível e carência de variedades, especialmente variedades adaptadas às diversas regiões do país, propõe-se, aqui, a aplicação de um conjunto de técnicas moleculares, como a genômica e a bioinformática, associadas aos procedimentos de melhoramento. Estas estratégias permitirão não somente a geração de novas cultivares em relativamente curto espaço de tempo, como também irão gerar um banco de dados moleculares que servirão de suporte para futuros trabalhos no Brasil e no mundo.

Com a evolução das tecnologias de sequenciamento, os custos vêm sendo gradativamente reduzidos e o acesso a essas tecnologias tem sido facilitado, o que, conseqüentemente, resulta no aumento da disponibilidade de sequências completas ou parciais dos genomas de diversas espécies, possibilitando o emprego de marcadores baseados em sequências em estudos genéticos, tais como os marcadores SNPs. Em decorrência desta realidade, os marcadores SNPs têm se tornado cada vez mais preferidos para estudos genômicos aplicados ao melhoramento de plantas, também denominado melhoramento molecular.

Com o advento de tecnologias de sequenciamento de larga escala, comumente chamado de tecnologia de sequenciamento “next-generation” (NGS), têm sido aumentadas a velocidade do sequenciamento e a descoberta de marcadores moleculares do tipo SNP. Entre as tecnologias disponíveis atualmente para a detecção de milhares de SNPs simultaneamente, está a

tecnologia RAD-sequencing (*Restriction site associated DNA*) (Rowe et al., 2011), que consiste no sequenciamento de sequências de DNA associadas a sítios de restrição e posterior alinhamento para identificação de variantes entre indivíduos. A rápida redução dos custos da tecnologia de sequenciamento de próxima geração (NGS) tornou possível a realização de genotipagem ampla através de marcadores RAD-sequencing, possibilitando seu emprego em estudos de populações por diversos laboratórios (Etter et al., 2011) e em diversas espécies vegetais.

2. OBJETIVO GERAL

- Estudar a variabilidade genética entre populações de coqueiro anão do Brasil; e
- Testar a capacidade combinatória de híbridos topcrosses em fase juvenil.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigação e descrição da variabilidade genética de populações de coco anão, utilizando genotipagem via sequenciamento.
- Conhecimento dos padrões genéticos que possam auxiliar no processo de melhoramento genético da cultura do coco.
- Conhecimento da diversidade genética disponível no Brasil em termos de coqueiro anão verde, amarelo e vermelho.
- Investigar a existência de variabilidade genética entre as diferentes populações pertencentes a subvariedades de anão verde do Brasil.
- Validar a metodologia de fenotipagem digital aplicada na cultura do coco.
- Identificar e selecionar acessos de coco que tenham capacidade específica de combinação através de um delineamento topcross.
- Determinar um número ótimo de repetições e plantas dentro de parcela na avaliação de ensaios, envolvendo acessos de coco anão.

3. CAPÍTULO

3.1 ESTUDO DA VARIABILIDADE GENÉTICA ENTRE E DENTRO DE POPULAÇÕES DE COCO ANÃO (*Cocos nucifera* L.) VIA RAD-SEQUENCING.

3.1.1 INTRODUÇÃO

O coqueiro (*Cocos nucifera* L.) é uma palmeira perene cujo centro de origem remonta ao Sudeste Asiático e foi introduzida no Brasil pelos colonizadores portugueses em meados do século XVI. A planta é considerada uma das espécies perenes de maior relevância do mundo, pois detém a capacidade de gerar emprego e, conseqüentemente, renda em vários países, seja através do seu consumo *in natura* ou pela industrialização dos frutos, bem como de outros órgãos da planta (raiz, inflorescência, estirpe, folhas e palmito), originando mais de 100 produtos e subprodutos de valor econômico significativo. Além disso, o coqueiro é considerado uma planta paisagística, adornando espaços públicos e privados (Costa et al., 2005).

De acordo com os dados da FAO, o coqueiro ocupa uma área de 11,8 milhões de hectares no mundo, estando mais de 80% de sua produção no Sudeste Asiático. Os dados apontam um total na produção mundial de coco de

aproximadamente 61,7 milhões de toneladas (UNCTAD, 2013). Ainda conforme os dados da FAO (2009), disponibilizados pelo UNCTAD (2013), o Brasil ocupa o 5º lugar no ranking mundial de produtores de coco, contribuindo com cerca aproximadamente dois milhões de toneladas em seus 284.058 hectares plantados. Especificamente na região Sudeste, o estado do Rio de Janeiro apresenta-se como o segundo maior produtor, com uma produção de 70.010 toneladas, sendo o maior produtor da região o Espírito Santo, com uma produção de 173.716 toneladas.

O melhoramento genético de plantas é um dos principais responsáveis por ganhos de produtividade agrícola e pela posição destacada da agricultura brasileira no cenário mundial. Estima-se que os incrementos de produção dos cultivos obtidos nas últimas décadas se devem 50% ao melhoramento genético e 50% se deva ao manejo (Paterniani et al., 2003).

Considerando ainda as peculiaridades da cultura com pouca informação disponível e carência de variedades, especialmente variedades adaptadas às diversas condições climáticas, propõe-se, aqui, a aplicação de um conjunto de técnicas moleculares, como a genômica e a bioinformática, associadas aos procedimentos de melhoramento. Estas estratégias permitirão não somente a geração de novas cultivares em relativamente curto espaço de tempo, como também irão gerar um banco de dados moleculares que servirão de suporte para futuros trabalhos no Brasil e no mundo.

Nesta perspectiva, este trabalho visa a investigar e descrever a variabilidade genética de populações de coco anão pelo uso de uma nova abordagem de Restriction-Associated DNA-Sequencing (RAD-seq), baseada no uso de enzimas de restrição. O conhecimento da dinâmica dos padrões genéticos pode ser o ponto de partida para desenvolver ferramentas que auxiliem no melhoramento, diminuindo o tempo e otimizando o processo de obtenção de novas cultivares.

3.1.2 REVISÃO

3.1.2.1 Origem e dispersão do coqueiro

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

Harries e Clement (2013) relataram através de pesquisa bibliográfica que a origem do coqueiro não tinha uma localização específica, mas, sim, um ecossistema de atóis de corais. Esta hipótese defende a ideia de que o coqueiro se originou, evoluiu e se dispersou naturalmente por flutuação de seus frutos pelas correntes marítimas que “unem” todo o ecossistema de corais. Ainda segundo os autores, este ecossistema está presente em toda a faixa tropical do mundo e desde o início da sua existência, está sujeito a constantes mudanças, tanto geograficamente quanto ao local exato de origem. Sendo assim, os autores concluíram que o coqueiro não tem um centro de origem específico no planeta.

Batugal e Jayashree (2005), em pesquisa, concluem que a dispersão natural do coqueiro data de cerca de 80 milhões de anos e que esta espécie desenvolveu mecanismos que permitiram atravessar oceanos e se estabelecer em regiões costeiras de todo o mundo, adaptando-se a diversas intempéries sem a ação de qualquer agente externo, dispersando seus frutos novamente para outras regiões do globo terrestre.

Em contrapartida, Gunn et al. (2011) descreveram que, apesar de o coqueiro ser adaptado para a dispersão via correntes marítimas, o homem também se fez presente, contribuindo para sua dispersão. Esta intervenção antrópica acabou culminando em um novo cenário de distribuição geográfica da espécie *Cocos nucifera*, ampliando a variabilidade genética ao longo do território global.

No Brasil, a variedade gigante foi introduzida em 1553, proveniente da Ilha de Cabo Verde, e a introdução da variedade anã ocorreu da seguinte forma: o anão-verde veio de Java em 1924; o anão-amarelo, em 1938, e o anão-vermelho, em 1939, ambos provenientes do Norte da Malásia. Já o anão

vermelho-de-camarões foi introduzido em 1978, proveniente da Costa do Marfim (Fontes e Ferreira, 2006).

3.1.2.2 Estratégias no melhoramento aplicado ao coqueiro

O coqueiro é uma espécie diploide e única representante do gênero *Cocos* (Teulat et al., 2000), apresenta 32 cromossomos dispostos em 16 pares, sendo $2n=2x=32$ (Nambiar e Swaminathan, 1960).

Batugal e Bourdeix (2005) consideram que, atualmente, os estudos aplicados ao coco ainda se encontram restritos ao nível intraespecífico, uma vez que o sistema de cruzamento entre plantas de coqueiro depende diretamente da variabilidade existente entre os indivíduos.

O histórico do melhoramento do coco nos mostra que esta espécie foi submetida a diversos métodos de melhoramento, como a seleção massal, que se mostrou desfavorável devido à depressão por endogamia exibida pelos coqueiros gigantes; seleção com teste de progênies; híbridos simples intra e intervarietais, envolvendo, no caso de híbridos intervarietais, cruzamentos recíprocos; híbridos complexos, tais como híbridos duplos e híbridos triplos; e, por fim, mais recentemente, o desenvolvimento de variedades sintéticas, que envolvem o cruzamento entre linhas selecionadas com aferida capacidade combinatória (Batugal e Bourdeix, 2005).

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

Algumas ações já foram empreendidas, entre elas, um estudo prévio da diversidade genética entre populações de coqueiro anão de regiões produtoras, utilizando marcadores microsatélites, que resultou no trabalho de Azevedo (2014), bem como o desenvolvimento de um experimento, em que algumas

dessas populações estão sendo utilizadas em um delineamento em Top Cross, cujo testador comum foi o BJD-Jiqui.

Em um estudo em que foi traçado como objetivo aferir a correlação entre a resistência ao amarelecimento letal e a diversidade genética, Martinez et al. (2010) aplicaram 13 primers do kit CIRAD em acessos do Gigante da República Dominicana, Anão Amarelo da Malásia (MYD) e um híbrido do Gigante local x MYD.

Em outro estudo, Gunn et al. (2011) utilizaram 1322 acessos de coco de diferentes localidades no mundo, utilizando 10 primers SSR do KIT CIRAD (Baudoin e Lebrun, 2002), tendo tais acessos apresentado resultados que comprovam a existência de variabilidade tanto geográfica quanto fenotípica. Ficou evidenciado que o coqueiro tem duas origens: o Sudeste Asiático e o sul do subcontinente Indiano.

3.1.2.3 Aplicações de tecnologias de sequenciamento de nova geração à Genotipagem via Sequenciamento

O desenvolvimento de marcas bem como seu registro nas populações têm sido considerados um processo de alto custo, com muitos passos laboratoriais intensivos e demorados. O surgimento de SNP *arrays* tem reduzido o tempo e os esforços gastos em suas descobertas, porém, o desenvolvimento de novas marcas ainda requer bastante investimento. Estes marcadores são específicos para as populações em que eles são desenvolvidos, e a tendência alélica resultante pode se tornar problemática em populações e espécies divergentes (Elshire et al., 2011).

Ainda segundo Elshire et al. (2011), para o desenvolvimento de novas marcas, fazem-se necessárias informações preliminares das sequências que flanqueiam um SNP de interesse, onde apenas poucos SNPs podem ser considerados adequados para o desenvolvimento do marcador devido a vários fatores, entre os quais, a proximidade regiões repetitivas. Em contrapartida, as melhorias nas metodologias nas técnicas laboratoriais e em softwares estão tornando a prática menos onerosa, fazendo que não somente alguns indivíduos sejam sequenciados, mas populações inteiras, acarretando a descoberta de centenas de milhares de marcas.

Tecnologias de sequenciamento de nova geração têm sido utilizadas em populações de várias espécies de plantas para analisar a correlação entre o valor fenotípico e as marcas obtidas através da genotipagem, além de mapear várias características de interesse agrônômico para cada ambiente específico (Yu et al., 2006; Gore et al., 2009).

3.1.2.4 Coqueiro anão

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

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

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

3.1.2.4.1 Anão Verde do Brasil

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

Sob determinadas condições, é a cultivar que tem florescimento mais precoce, aos 2,5 anos de idade (Aragão et al., 2002), e apresenta fase feminina curta e com certa simultaneidade com a fase masculina da mesma inflorescência e da inflorescência seguinte (Ribeiro et al., 1999). Segundo Castro (2007), a fase feminina do coqueiro anão verde se assemelha à fase feminina do coqueiro gigante.

3.1.2.4.2 Anão Amarelo da Malásia e de Gramame

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

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

3.1.2.4.3 Anão Vermelho da Malásia e de Gramame

O Anão Vermelho de Gramame e o Anão Vermelho da Malásia são considerados dois tipos geneticamente diferentes para alguns autores.

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

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

3.1.2.4.4 Anão Vermelho de Camarões

O Anão vermelho de Camarões tem coloração mais fraca que os outros anões vermelhos, o que facilita sua distinção entre eles. Entretanto, a cor diferenciada não é o único aspecto pelo qual esse tipo de anão vermelho se distingue dos demais. Além disso, ele apresenta uma taxa de germinação mais lenta e uniforme, crescimento vegetativo mais lento, tem menor porte e não exibe dilatação na base do estipe, e o ângulo de inserção das folhas é bem menor que os outros anões vermelhos (Loiola, 2005).

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

3.1.2.5 Genotipagem via Sequenciamento (GBS) por Sequenciamento de DNA Associados a Sítios de Restrição (RAD-Sequencing)

Após o advento do Next Generation Sequencing (NGS), foram desenvolvidas técnicas recentes de genotipagem pelo uso de polimorfismo advindo de único nucleotídeo (SNPs) em larga escala, que permitem analisar o genoma em sua forma resumida, diminuindo sua complexidade. Estas técnicas

são, em geral, denominadas *Genotyping by Sequencing* (GBS), estando incluídas entre elas a *Restriction-Site Associated DNA-Sequencing* (RAD-seq) (Davey et al., 2011).

As técnicas de RAD-seq são virtualmente aplicáveis em qualquer espécie sem necessidade de caracterização prévia dos SNPs, cujo quantitativo gerado depende da enzima escolhida para a clivagem e do tamanho e complexidade do genoma.

Baird et al. (2008) propuseram a primeira técnica que reduziu consideravelmente os custos para a genotipagem por RAD-seq. Os SNPs são identificados nas *Restriction-Site Associated DNA-tags* (RAD-tags) e podem gerar fragmentos suficientemente pequenos para serem sequenciados nas reads de NGS, tornando possível genotipar várias amostras em multiplex, quando associadas a um sistema de adaptadores com barcodes durante a construção das bibliotecas. No trabalho supracitado, restrições com as enzimas EcoR1 e SbfI totalizaram mais de 13.000 SNPs em duas espécies modelo de grupos filogenéticos, consideravelmente distantes.

A metodologia desenvolvida por Elshire et al. (2011) emprega a digestão do DNA com enzimas de restrição que o cliva em fragmentos cujos sítios de restrição são complementares às extremidades dos adaptadores dos sistemas de barcodes. São construídos dois grupos de adaptadores, um com os barcodes e sequências complementares aos forward primers de sequenciamento, que possibilitam sequenciar várias bibliotecas na mesma corrida, e outro com sequências complementares aos reverse primers de sequenciamento. A técnica de Elshire et al. (2011) diminuiu drasticamente o custo e o tempo de preparo por apresentar menor número de etapas durante a construção das bibliotecas e otimizar o uso dos primers e dos adaptadores.

A metodologia RAD Sequencing tem se mostrado muito eficiente na descoberta de milhares de polimorfismo de nucleotídeo único (SNPs). Ela foi inicialmente desenvolvida na Universidade de Oregon e, a priori, seu uso foi expandido para fins de estudos em plantas e animais (Rowe et al., 2011).

Ainda de acordo com Rowe et al. (2011), esta tecnologia pode ser utilizada em estudos envolvendo espécies com diversos fins, como mapeamento de ligação, montagem de genomas, identificação de QTLs e também estudos a nível populacional com o intuito de compreender suas organizações

interespecíficas, como identificação das estruturas populacionais, padrões de migração e especiação.

Para espécies com genomas grandes ou que não têm um genoma de referência, o uso de enzimas de corte raro (sítios de restrição com 6 pares de base) pode auxiliar na redução da complexidade genômica, acarretando melhor amostragem do genoma, reduzindo a quantidade de dados perdidos e, conseqüentemente, aumentando a cobertura do genoma alvo (Poland et al., 2012).

3.1.3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1.3.1 Material vegetal

Foram utilizadas 13 populações de coqueiro anão provenientes de diferentes regiões produtoras do Brasil e que são potenciais genitores para a produção de híbridos nessas regiões. A escolha das populações foi baseada nos resultados de Azevedo (2014), que culminaram na realização de um experimento de campo com híbridos de coqueiro anão em parceria com as empresas REGON[®], COHIBRA[®] e EMBRAPA. As coletas das amostras foliares foram feitas nos estados do Pará, Pernambuco, Ceará, Sergipe, Paraíba e Bahia. Cada população foi representada por três indivíduos, totalizando 39 genótipos (Tabela 1).

Tabela 1- Descrição das populações de coqueiro para estudo de variabilidade via sequenciamento.

Sigla	População	Local de Coleta	Nº de indivíduos
BGD-Jiqui	Anão-verde-do-Brasil-de-Jiqui	COHIBRA - PE	3
BGD-Paraipaba	Anão-verde-do-Brasil-de Paraipaba	COHIBRA - CE	3
BGD-Souza-SD	Anão-verde-do-Brasil-de-Souza (Souza Dantas)	Souza Dantas-Paraíba	3
BGD-Souza-FS	Anão-verde-do-Brasil-de-Souza (Figueiredo Souza)	Figueiredo Souza-Paraíba	3
BGD-Bahia	Anão-verde-do-Brasil-da-Bahia	Pombal – BA	3
BGD-PARÁ N	Anão-verde-do-Brasil-do-Pará	Pará (Área Nova)	3
BGD-PARÁ V	Anão-verde-do-Brasil-do-Pará	Pará (Área Velha)	3
BGD-Trairi	Anão-Verde-do-Brasil-do-Trairi	COHIBRA-CE	3
MRD	Anão-Vermelho-da-Malásia	EMBRAPA -SE	3
MYD	Anão-Amarelo-da-Malásia	EMBRAPA -SE	3
GRD	Anão-Vermelho-de-Gramame	COHIBRA - CE	3
CRD	Anão-Vermelho-de-Camarões	COHIBRA - CE	3
GYD	Anão-Amarelo-de-Gramame	COHIBRA - CE	3

As populações foram escolhidas para representá-las tanto no que diz respeito ao uso na produção de sementes quanto em relação à idade, isolamento e pureza genética. Portanto, segue a descrição das populações segundo trabalho conduzido por Azevedo (2014):

- ✓ Anão-verde-do-Brasil-de-Jiqui (BGD-Jiqui) – Esta população foi introduzida no Rio Grande do Norte por um pesquisador do Departamento Nacional de Obras Contra a Seca (DENOCS). Esta população é a principal produtora de sementes para as regiões produtoras de coqueiro Anão Verde do Brasil. Em adição, é utilizada como genitora feminina de híbridos (Anão x Gigante) desenvolvidos no Brasil.

- ✓ Anão-verde-do-Brasil-de-Paraipaba (BGD-Paraipaba) – Esta população foi estabelecida no perímetro irrigado de Paraipaba, Ceará - Brasil, de sementes procedentes da EMPARN. O BGD de Paraipaba é usado pela COHIBRA (Empresa privada, produtora de sementes comerciais de coqueiro) como genitor feminino de híbridos.
- ✓ Anão-Verde-do-Brasil-de-Figueiredo-Souza (BGD- Souza-FS) – O Anão Verde do Brasil de Figueiredo Souza constituiu a primeira área de cultivo de coqueiro do perímetro irrigado de Souza, Paraíba – Brasil. Sendo semelhante ao BGD de Jiqui, o BGD de Figueiredo Souza produziu sementes de coqueiro Anão Verde para outras áreas produtoras do Brasil.
- ✓ Anão-Verde-do-Brasil-de-Souza (BGD-Souza-SD) – O Anão Verde do Brasil de Souza constituiu a segunda área de cultivo do perímetro irrigado de Souza e teve um papel importante para o estabelecimento de outras áreas produtoras de coqueiro em Souza, Paraíba – Brasil, desde a década de 1960.
- ✓ Anão-Verde-do-Brasil-da-Bahia (BGD-Bahia) – Esta população foi estabelecida na década de 1990, em uma propriedade particular em Ribeira do Pombal, Bahia – Brasil, proveniente de sementes cedidas pela EMBRAPA Tabuleiros Costeiros em Aracaju, Sergipe – Brasil.
- ✓ Anão-Verde-do-Brasil-do-Pará-1 (BGD-PARÁ-1) – Esta população foi estabelecida na década de 1940, em uma propriedade particular no Pará, Brasil, de sementes procedentes de Abaetuba, uma região produtora de coqueiro desde a colonização do Brasil. Os frutos desta propriedade serviram de sementes para diversas áreas de cultivo de coqueiro Anão Verde no Pará.
- ✓ Anão-Verde-do-Brasil-do-Pará-2 (BGD-PARÁ-2) – Esta população foi estabelecida na década de 1990, em uma propriedade particular no Pará – Brasil, de sementes procedentes de palmeiras da população BGD-PARÁ-1.
- ✓ Anão-Verde-do-Trairí (BGD-TRAIRÍ) – População encontrada na região centro-norte do Ceará com bom potencial agrônomo. Foi coletada sob a

supervisão da COHIBRA[®], que tem interesse em utilizá-la como genitora para obtenção de híbridos.

- ✓ Anão-Vermelho-de-Gramame (GRD) e Anão-Amarelo-de-Gramame (GYD) – Populações provenientes de Gramame, localidade próxima a João Pessoa – PB. Todavia, as amostras usadas no presente trabalho foram obtidas do campo de produção da COHIBRA[®], em Amontada-CE, Brasil.
- ✓ Anão-Amarelo-da-Malásia (MYD) e Anão-Vermelho-da-Malásia (MRD) – Estas populações foram estabelecidas no Banco Internacional de Coco para América Latina e Caribe, em Itaporanga (Sergipe - Brasil), estando sob a coordenação da EMBRAPA Tabuleiros Costeiros. As sementes introduzidas no Banco são procedentes da estação experimental Marc Delore, Costa do Marfim.
- ✓ Anão-Vermelho-de-Camarões (CRD) - O Anão Vermelho de Camarões (CRD) foi introduzido na COHIBRA[®] pelo Dr. Wilson Menezes Aragão, em 2000, sendo as sementes provenientes da Embrapa.

3.1.3.2 Extração de DNA

As amostras foram coletadas e armazenadas na geladeira à temperatura de aproximadamente (0°C a 7°C) no primeiro semestre do ano de 2013. Das amostras coletadas, foi feita a extração de DNA, utilizando o kit *DNeasy Plant Mini Kit* da QIAGEN. As concentrações de DNA nas amostras foram estimadas por meio de equipamento de espectrofotometria (*NanoDrop 2000C* – *ThermoScientific*). Para a avaliação da planta, foram extraídas amostras de DNA de cada indivíduo.

3.1.3.3 Teste com Enzimas de Restrição

Foi conduzido um ensaio com três enzimas diferentes, utilizando sequenciamento combinado a sítios de restrição de enzimas (RAD-Sequencing) a

fim de se determinar qual enzima teria um padrão de digestão que atendesse a nossa necessidade, tanto em relação à porcentagem de fragmentos em um intervalo de 200 a 350 pares de base quanto em relação à uniformidade da digestão do genoma.

As enzimas AseI (AT/TAAT), da *New England Biolabs*®, BglIII (A/GATCT) da *Life Science*®, e EcoRV (GAT/ATC) da *New England Biolabs*®, consideradas de corte raro, compuseram o ensaio para avaliar qual delas teria um padrão de digestão que atendesse aos quesitos supracitados.

Foram escolhidos dois acessos (BGD-PARÁ e CRD) para montar o ensaio, uma vez que, em estudo conduzido por Azevedo (2015) com marcadores microssatélites, eles apresentaram maior divergência genética, o que aumenta a probabilidade de se encontrar polimorfismo entre eles.

As reações de digestão foram conduzidas de forma separada para cada enzima e para cada acesso, sendo padronizadas, utilizando 200 ng de DNA genômico em 20 µl de reação (Tabela 2).

Tabela 2 – Descrição das alíquotas utilizadas no teste com os acessos BGD-PARÁ e CRD para determinar a enzima a ser utilizada na montagem das bibliotecas das 39 amostras.

	EcoRV	BglIII	AseI
Enzima (µl)	0,3	0,6	0,5
Tampão (µl)	2	2	2
DNA (µl)	3,4	3,4	3,4
Água (µl)	14,3	14	14,1
Total (µl)	20	20	20

Foram utilizados os produtos das reações das três enzimas para verificar qual combinação seria mais eficiente de acordo com a porcentagem de fragmentos gerados na faixa de 500 pares de base, que corresponde à nossa faixa de interesse. Desta forma, foram conduzidos três ensaios diferentes, Tabela 3, contendo as devidas combinações de enzimas com um volume final de 10 µl para posterior análise no Bioanalyzer 2100 da *Agilent Technologies*®, utilizando o *DNA 12000 kit 5067-1508* para estimar a porcentagem de fragmentos gerados na área de interesse (200 a 400 pares de base).

Tabela 3 – Ensaios conduzidos com a finalidade de selecionar a enzima com melhor porcentagem de fragmentos, com intervalo de 200 a 400 pares de base.

	Identificação	Alíquotas das Combinações Enzimáticas		
Ensaio 1	CRD	Asel 3,3ul	BgIII 3,3ul	EcoRV 3,3ul
	BGD-PARÁ	Asel 3,3ul	BgIII 3,3ul	EcoRV 3,3ul
Ensaio 2	CRD	EcoRV 5ul	Asel 5ul	-
	BGD-PARÁ	EcoRV 5ul	Asel 5ul	-
Ensaio 3	CRD	Asel 5ul	BgIII 5ul	-
	BGD-PARÁ	Asel 5ul	BgIII 5ul	-

O DNA genômico resultante da digestão de cada enzima, devidamente padronizado na concentração de 100 ng/μl, foi utilizado para a montagem das bibliotecas *RAD-Tags*. Os fragmentos resultantes da digestão foram submetidos ao *TruSeq[®] DNA Sample Prepare Kit* da *Illumina[™]*, tendo as extremidades de cada fragmento sido previamente ligadas a adaptadores biotinados, Figura 1, sendo que, *a posteriori*, foram selecionados através de beads magnéticas para um tamanho de aproximadamente 500 pares de bases. Os adaptadores contêm sequências *Illumina[™]* de anelamento dos primers de sequenciamento. Junto aos adaptadores, foi ligado um barcode específico (dual index) para cada amostra com o intuito de identificar e sequenciar todas as amostras juntas em um único multiplex.

Uma vez o ensaio montado, os dados foram submetidos ao programa *Stacks* (Catchen et al., 2011) para alinhamento dos tags e identificação de polimorfismo entre BGD-PARÁ x CRD.

O sequenciamento das bibliotecas foi feito utilizando o *MiSeq[®] v2 Reagent Kit 500 Cycles PE* da *Illumina[™]*, utilizando paired-end 250 bp na forma de multiplex, utilizando a plataforma *MiSeq[™]*.

Após o sequenciamento das bibliotecas RAD, os dados foram submetidos ao software *Stacks*, tendo os arquivos fastq de cada amostra sido devidamente processados, submetidos ao trimming e identificada cada uma por seu barcode específico. Tal software tem a capacidade de processamento de RAD-tags gerado por múltiplas restrições enzimáticas simultâneas e utiliza o modelo estatístico de máxima verossimilhança para identificação dos SNPs e exclusão dos erros de sequenciamento.

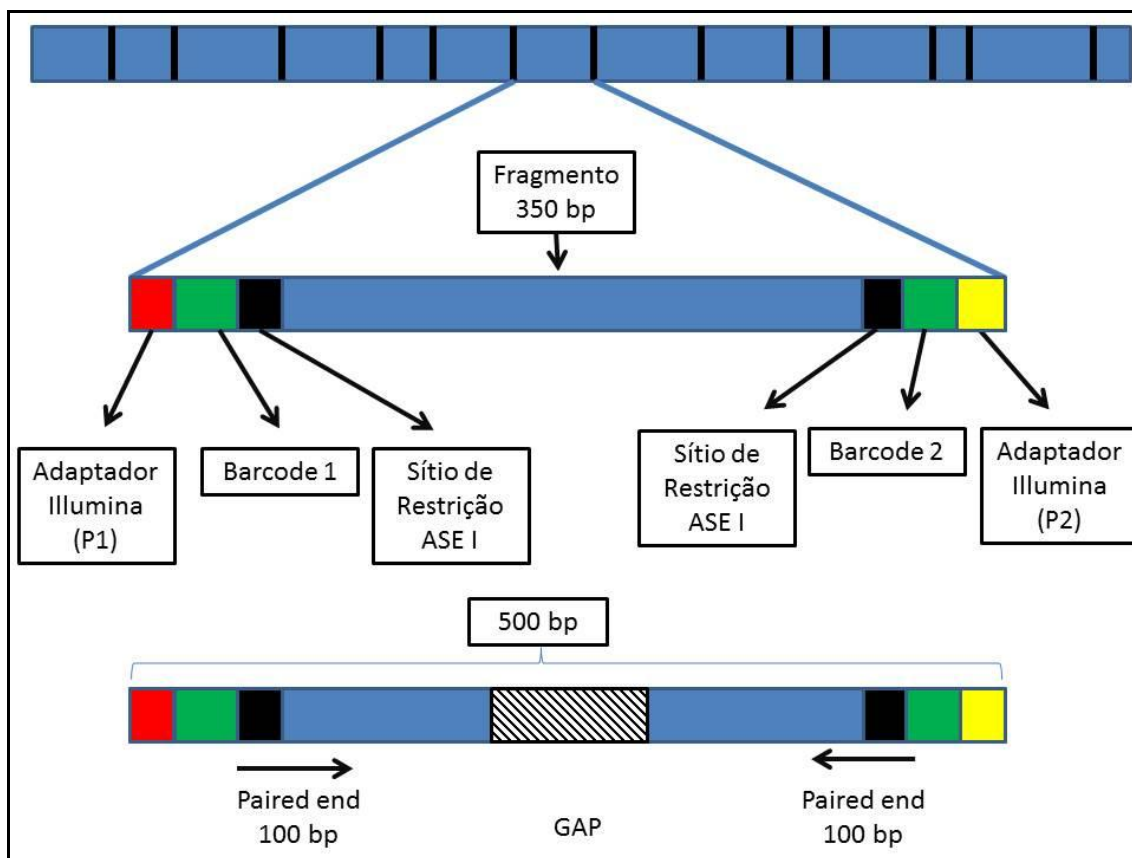


Figura 1 – Esquema de montagem das bibliotecas RAD utilizando o *TruSeq[®] DNA Sample Prepare Kit* da *Illumina[™]*

Sendo assim, foi feito o Demultiplexing de cada uma das enzimas/indivíduos e feita uma filtragem por qualidade e pela presença do sítio de corte da enzima.

Uma vez feita a contabilidade de fragmentos de cada enzima para os indivíduos, seguiu-se o estudo de diversidade de populações contendo um indivíduo em cada (BGD-Pará e CRD), utilizando o método *de novo* (sem o genoma de referência), gerando o número de sítios, número de sítios variantes, o número de sítios polimórficos e a porcentagem de sítios polimórficos para cada enzima utilizada. Também foi feita uma análise para averiguar o número de SNPs para cada tag.

3.1.3.4 Montagem das Bibliotecas RAD

Uma vez selecionada a enzima com o melhor padrão de digestão (AseI), ela foi utilizada para a montagem das bibliotecas RAD, seguindo a mesma metodologia nos testes preliminares para a escolha da enzima candidata.

Foram utilizadas as 13 populações, Tabela 1, contendo 3 indivíduos em cada, sendo cada indivíduo ligado a um barcode específico para identificação.

Após a montagem da biblioteca, também foi utilizado o Bioanalyzer 2100 da *Agilent Technologies*[®], utilizando o *DNA 12000 kit 5067-1508* para estimar a porcentagem de fragmentos gerados na área de interesse (aproximadamente 500 pares de base) (Figura 2).

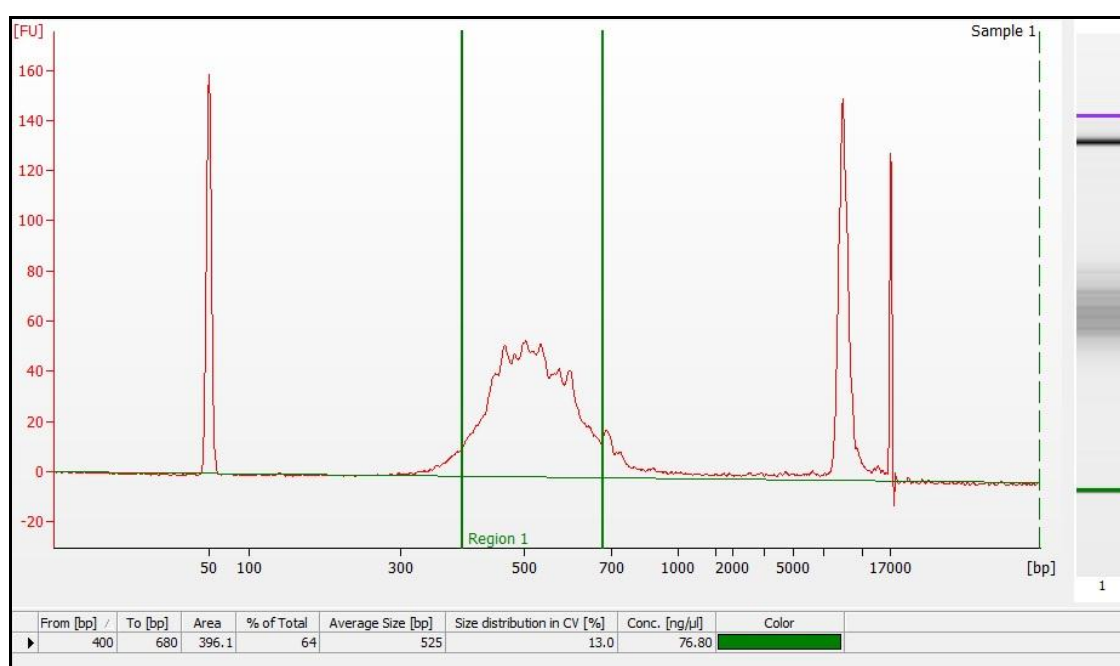


Figura 2 - Resultado da corrida no Bioanalyzer para verificação do tamanho dos fragmentos de uma biblioteca RAD.

3.1.3.5 Análises de Bioinformática

Os arquivos fastq de cada amostra foram devidamente processados, submetidas ao trimming e identificada cada uma por seu Barcode específico.

Os arquivos foram submetidos ao pacote de programas computacionais Stacks (Catchen et al., 2011), desenvolvido para processar diversas análises de dados provenientes de RAD-seq. O software analisa desde os dados crus até o fornecimento de dados para o estudo da diversidade genética inter e

intrapopulacional. Tem capacidade de processamento de RAD-tags gerados por restrições enzimáticas e utiliza o modelo estatístico de máxima verossimilhança para identificação dos SNPs e exclusão dos erros de sequenciamento. A função `Process_Radtags` desfaz o multiplex e promove o controle de qualidade. Foi escolhido o parâmetro para presença de três ou mais sequências idênticas para constituir uma RAD-tag. As tags são reconhecidas pelas sequências presentes no início de cada fragmento. Em seguida, foi usado o `Ustacks`, que constrói os locos, fornecendo os SNPs, alelos e tags presentes em cada amostra de um sequenciamento de novo. O `Cstacks` fez a montagem do catálogo de locos provenientes dos SNPs, e o `Sstacks` fez a comparação de cada amostra contra o catálogo. Por último, foi utilizada a função `populations`, que forneceu as matrizes de genótipos e os parâmetros populacionais para a análise de diversidade.

Por meio do pacote `populations`, foram obtidas as heterozigosidades observadas (estimada pela proporção de heterozigotos observados em um dado loco), homozigosidades observadas (estimada pela proporção de homozigotos observados em um dado loco), o número de alelos privados para cada população, o número de indivíduos que compartilham o mesmo alelo dentro de cada população, o número e a porcentagem de sítios polimórficos e a média da frequência do alelo mais frequente em cada locus (P).

Vale ressaltar que para o caso das análises levando em consideração as 13 populações, foram exigidos que pelo menos 8 das 13 populações compartilhassem do mesmo locus para ser considerado na análise. No caso da análise levando em consideração todos os indivíduos dentro de populações, cada indivíduo foi considerado uma população, sendo, neste caso, exigido que 30 dos 39 indivíduos compartilhassem do mesmo locus para ser considerado na análise.

As matrizes de distância foram obtidas utilizando o método de máxima verossimilhança, uma vez que apresenta mais vantagens devido ao método de busca exaustiva e produz maior número de árvores. Além disso, foi utilizado o software `FigTree v1.4.2` para plotagem dos dendrogramas com valor das distâncias em cada braço para comparar as populações estudadas.

3.1.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1.4.1 Teste com Enzimas

A enzima AseI apresentou o melhor padrão de digestão quando comparada com as outras, tendo sido obtidos 6 milhões de fragmentos quando utilizado o BGD-PARÁ e 7 milhões de fragmentos quando utilizado o CRD, enquanto as enzimas BglII e EcoRV apresentaram números de fragmentos em torno de 2 milhões (Figura 3).

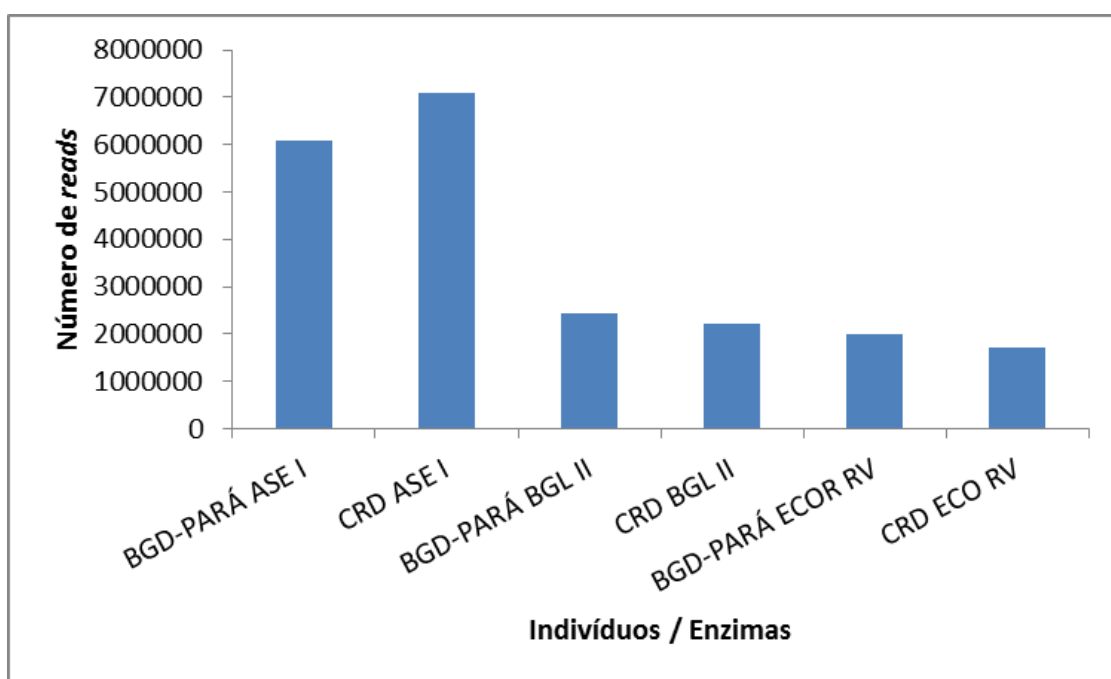


Figura 3 – Número de fragmentos gerados utilizando as enzimas AseI, BglII e EcoRV nos acessos BGD-PARÁ e CRD.

Nota-se também um melhor perfil de digestão para a enzima AseI, Figura 4, quando comparada com a BglII e EcoRV em gel de agarose a 1%, mostrando maior quantidade de fragmentos de tamanho desejado (500bp)

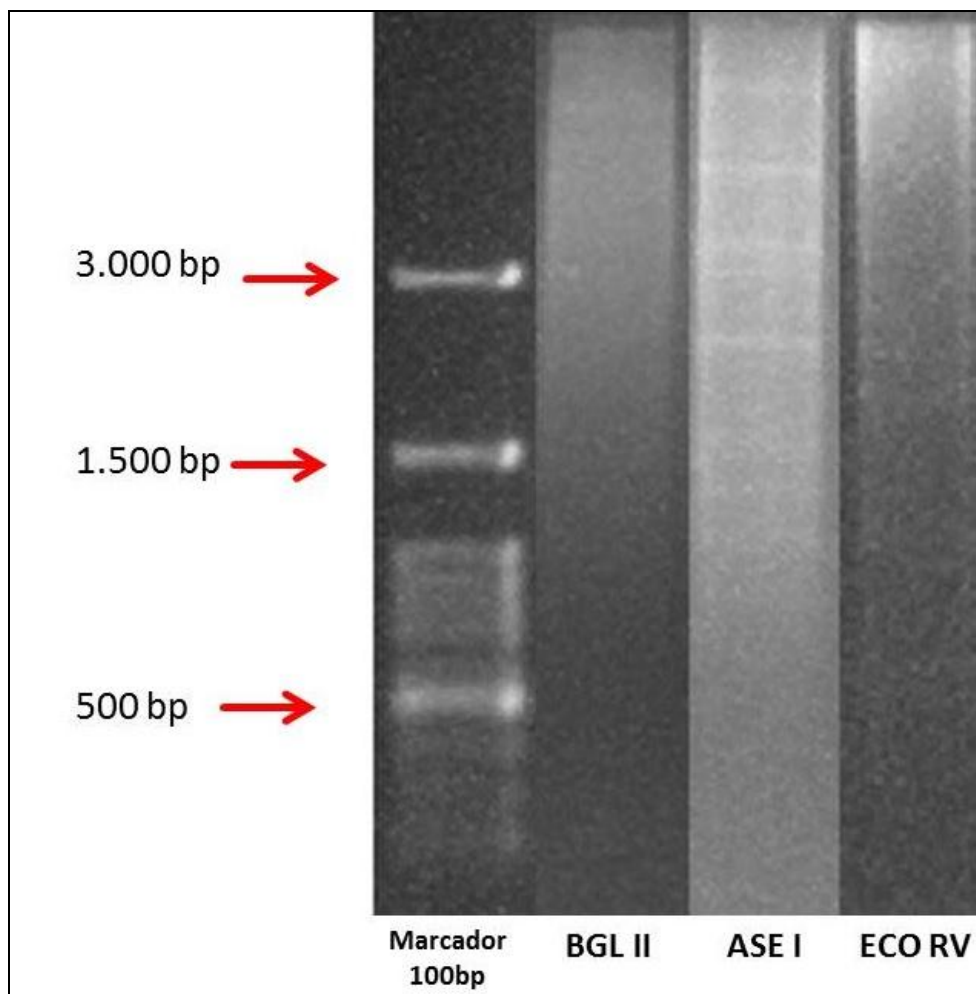


Figura 4 – Produto de reação enzimática utilizando uma amostra de DNA genômico de BGD submetido a enzimas BglII, AseI e EcoRV, em gel de agarose a 1%.

Posteriormente, procedeu-se à análise de diversidade entre as populações BGD-PARÁ e CRD, contendo apenas um indivíduo, através do software Stacks, utilizando o método de novo, sem um genoma de referência para identificação de sítios variantes (Tabela 4)

Para fazer a comparação entre as populações visando à obtenção dos variantes, o software utilizou os próprios fragmentos gerados no sequenciamento para montar um genoma de referência via análise *de novo* a fim de alinhar os fragmentos de cada população para posterior identificação do polimorfismo entre os acessos.

A Tabela 4 mostra que tanto para o número de sítios, sítios variantes e sítios polimórficos, a enzima AseI foi a que se destacou entre as três avaliadas.

Tabela 4 – Resumo das bibliotecas (AseI, BglII e EcoRV) quanto ao número de sítios, sítios variantes, sítios polimórficos e porcentagem de sítios polimórficos entre dois acessos de coco anão (BGD-PARÁ e CRD) através do software Stacks.

	AseI		BglII		EcoRV	
	BGD-PARÁ	CRD	BGD-PARÁ	CRD	BGD-PARÁ	CRD
Sítios	70.527.698	71.161.650	30.980.388	25.149.234	21.786.490	11.921.102
Sítios variantes	20.307		11.125		9.923	
Sítios Polimórficos	13.005	13.399	6.445	6.581	5.232	5.937
Sítios Polimórficos (%)	0,0184	0,0188	0,0208	0,0262	0,0240	0,0497

Nota-se também que, quando se utiliza a enzima AseI, tanto o número de sítios, como o número de sítios polimórficos se fazem presentes em maior escala na população CRD, o que era de se esperar, uma vez que esta população se destacou em estudo de variabilidade genética utilizando marcadores microssatélites, desenvolvido na UENF por Azevedo (2015), em que tal população se destacou pela distância dos demais grupos formados na clusterização (Figura 4).

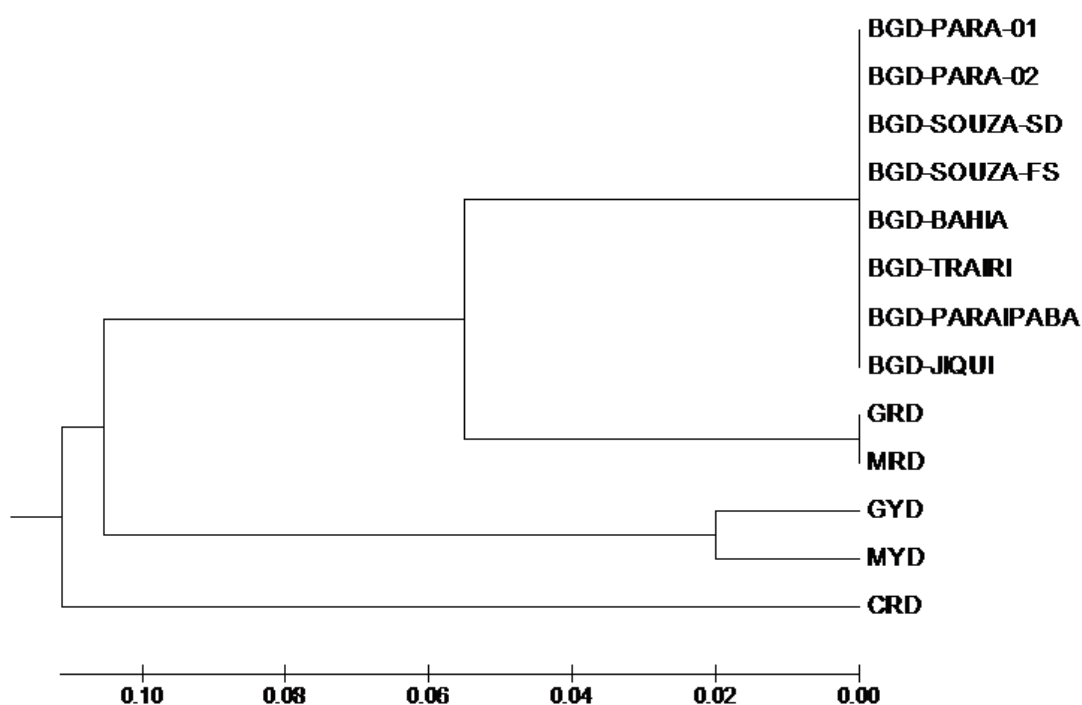


Figura 4 – Dendrograma de agrupamento de populações de coco anão utilizando UPGMA desenvolvido por Azevedo (2015).

A Tabela 5 mostra que a enzima AseI se destacou no que diz respeito ao número de variantes por tag, pois enquanto a AseI tem 4822 tags com apenas um variante, as enzimas BglII e EcoRV conseguiram capitalizar apenas 2012 e 1618 tags, respectivamente. Isto também mostra que a enzima AseI é excelente para a montagem de bibliotecas RAD em coco, uma vez que os fragmentos gerados pela sua digestão aumentaram a probabilidade de encontrar variantes ao longo do genoma (Tabelas 5 e 6).

Tabela 5 – Dados de número de variantes por *tag* para cada enzima utilizada no ensaio de digestão.

AseI			BglII			EcoRV		
Variantes	<i>Tag's</i>	Total	Variantes	<i>Tag's</i>	Total	Variantes	<i>Tag's</i>	Total
1	4822	4822	1	2012	2012	1	1618	1618
2	1986	3972	2	983	1966	2	726	1452
3	1502	4506	3	718	2154	3	505	1515
4	426	1704	4	385	1540	4	327	1308
5	310	1550	5	248	1240	5	237	1185
6	231	1386	6	128	768	6	149	894
7	126	882	7	85	595	7	85	595
8	86	688	8	30	240	8	56	448
9	32	288	9	31	279	9	4	396
10	17	170	10	10	100	10	5	210
11	13	143	11	5	55	11	7	77
12	6	72	12	4	48	12	5	60
13	5	65	13	3	39	13	8	104
14	2	28	14	3	32	14	3	42
15	1	15	15	2	30	15	2	30
16	1	16	16	0	0	16	1	16
			17	1	17			
Total = 20307			Total = 11125			Total = 9923		

3.1.4.2 Análise de Diversidade via RAD-Sequencing

O padrão da corrida para as 39 amostras (13 populações contendo três indivíduos em cada), com base no número de reads, e a percentagem de bases superiores a Q30 foram considerados satisfatórios (Tabela 6). O número de reads foi balanceado quando considerados os indivíduos dentro de cada população, com exceção da população BGD-Jiqui, em que foi observado um desbalanceamento para tal parâmetro: BGD-Jiqui1 com 241.774 reads, BGD-Jiqui2 com 3.463.734 reads e BGD-Jiqui3 com 784.930 reads. As causas para tal desbalanceamento podem ser uma falha na distribuição do pool das bibliotecas

na flowcell do sequenciador ou então um erro associado à pipetagem das alíquotas de biblioteca de cada indivíduo para a formação do pool, mas esse desbalanceamento não comprometeu as análises.

Tabela 6 – Identificação das amostras com os respectivos valores dos parâmetros de qualidade.

Amostra	Número de Reads	% Bases \geq Q30
BGD BAHIA1	2.113.698	84,68
BGD BAHIA2	4.413.630	85,58
BGD BAHIA3	2.635.380	85,77
BGD SOUZA DANTAS1	4.345.846	84,65
BGD SOUZA DANTAS2	3.635.082	83,43
BGD SOUZA DANTAS3	2.607.990	82,42
BGD FIG. SOUZA1	4.047.998	85,07
BGD FIG. SOUZA2	2.743.800	84,95
BGD FIG. SOUZA3	2.673.742	83,55
BGD JIQUI 1	241.774	84,82
BGD JIQUI 2	3.463.734	84,79
BGD JIQUI 3	784.930	84,75
BGD PARA NOVO1	4.345.358	84,09
BGD PARA NOVO2	3.923.592	85,45
BGD PARA NOVO3	5.492.654	85,26
BGD PARA VELHO1	3.128.998	83,23
BGD PARA VELHO2	5.617.824	84,96
BGD PARA VELHO3	4.148.896	84,03
BGD PARAIPABA1	3.713.408	83,35
BGD PARAIPABA2	3.799.164	84,78
BGD PARAIPABA3	4.940.080	84,60
BGD TRAIRI 1	3.517.284	84,32
BGD TRAIRI 2	6.810.380	85,34
BGD TRAIRI 3	5.365.852	84,71
CRD1	7.057.118	84,82
CRD2	4.155.538	84,61
CRD3	4.071.856	84,55
MRD1	7.936.188	85,07
MRD2	7.734.270	84,96
MRD3	4.856.652	84,98
MYD1	4.878.434	84,64
MYD2	3.793.636	84,15
MYD3	3.196.100	82,07
RD GRAMAME1	7.081.102	85,53
RD GRAMAME2	5.909.760	84,86
RD GRAMAME3	5.623.910	85,45
YD GRAMAME1	5.372.278	84,43
YD GRAMAME2	4.799.862	83,84
YD GRAMAME3	3.583.568	83,39

Foram analisadas 13 populações contendo três indivíduos dentro, procedentes de diferentes regiões produtoras de coco, utilizando o pacote *populations* do *Stacks* (Tabela 7). Foram detectados, em média, 164.013 sítios variantes, ou seja, sítios em que a referência difere dos indivíduos, independentemente da variação entre eles. Entre esse total de sítios variantes, foram encontrados, em média, 27.873 sítios polimórficos, ou seja, sítios com conteúdo informativo que permite diferenciar as populações, bem como os indivíduos pertencentes a cada uma.

O valor médio obtido para o número de alelos privados foi de 8.390, tendo variado de 2.773 (BGD-Jiqui) a 36.237 (GYD). Alelos privados são aqueles que se referem à contagem dos alelos presentes em apenas uma das subvariedades amostradas (Marshall e Brown, 1975), sendo sua presença diretamente relacionada com o tamanho da amostra. Desta forma, podemos inferir que o número de indivíduos utilizados na análise foi suficiente para distinguir as populações de forma precisa.

A média do número de indivíduos dentro de cada população que compartilham o mesmo locus foi de 1,8, tendo variado entre 1,07 (BGD-Jiqui) a 2,28 (MRD). O valor baixo para a população BGD-Jiqui pode ser explicado pelo desbalanceamento dos reads obtidos no sequenciamento, uma vez que os indivíduos que tiveram menores números de reads contribuíram pouco na captação de alelos comuns dentro da população.

Em relação à porcentagem de sítios polimórficos, pode-se dizer que está diretamente relacionada ao número de sítios encontrados para cada população. Foi observada média de 0,093% de sítios polimórficos, sendo encontrada uma variação de 0,06% a 0,19% para BGD-Jiqui e GYD, respectivamente.

A utilização das frequências alélicas provenientes de diferentes loci tem sido comum para quantificar a distância entre os indivíduos com parentesco próximo. Além disso, outras medidas também se tornam de extrema valia para o bom entendimento das relações genéticas entre os indivíduos, casos da homoziguidade e da heteroziguidade observadas.

Tabela 7 – Estimativa do número de alelos privados, número de indivíduos por locus, número de sítios polimórficos, porcentagem de sítios polimórficos, média da frequência do alelo mais frequente em cada locus (P), heterozigiosidade observada e homozigiosidade observada para 13 populações de coco anão.

Acessos	Nº Alelos Privados	Nº Ind. /Locus	Sítios Polim.	Sítios Polim. (%)	P	Het. Obs.	Hom. Obs.
BGD-Jiqui	2773	1,07	12689	0,06	0,94	0,0587	0,9413
BGD-Paraipaba	5734	1,85	26342	0,08	0,94	0,0689	0,9311
BGD-Souza-SD	6693	1,53	29122	0,10	0,93	0,0813	0,9187
BGD-Souza-FS	5906	1,49	25155	0,09	0,93	0,0748	0,9252
BGD-Bahia	7003	1,58	32193	0,13	0,92	0,0962	0,9038
BGD-PARÁ N	5335	1,99	26449	0,08	0,94	0,0651	0,9349
BGD-PARÁ V	5138	1,79	25229	0,08	0,94	0,0648	0,9352
BGD-Trairi	4803	1,98	24859	0,07	0,95	0,0616	0,9384
MRD	4488	2,28	22990	0,07	0,95	0,0566	0,9434
MYD	6863	1,71	25547	0,09	0,94	0,07	0,93
GRD	4844	2,17	29160	0,09	0,94	0,0705	0,9295
CRD	13265	2,07	25137	0,08	0,94	0,0629	0,9371
GYD	36237	1,92	57483	0,19	0,89	0,1331	0,8669
Média	8390,92	1,80	27873,4	0,093	0,93	0,0742	0,9258

Ainda em relação à Tabela 7, a média da frequência do alelo mais frequente em cada locus foi de 0,93, variando de 0,89 a 0,95 para GYD e MRD, respectivamente. Esta estimativa representa o grau de fixação com base nas frequências alélicas encontradas em cada população. Desta maneira, pode-se inferir que as populações se encontram em um alto grau de fixação. Quando consideramos a média das subvariedades para tal estimativa, notamos que os anões verdes, anões amarelos e anões vermelhos apresentam os valores de 0,94, 0,91 e 0,94, respectivamente.

Pela análise com base nos sítios variantes, Tabela 7, verificou-se que para as estimativas de homozigiosidade observadas para cada população amostrada, a média foi de 0,9258, com os valores variando de 0,9038 a 0,9434

para BGD-Bahia e MRD, respectivamente. A alta homoziguidade das populações é perfeitamente esperada, bem como o elevado valor do alelo mais frequente com base nas frequências alélicas pelo fato de se tratar de uma planta autógama com uma taxa de autofecundação de 94,3% (Bourdeix, 1988).

Em confluência com a homoziguidade observada, percebe-se que a heteroziguidade observada também acompanha a tendência observada para homoziguidade, apresentando média de 0,0742, com valores variando de 0,0566 a 0,1331 para MRD e GYD, respectivamente.

Pela análise de agrupamento utilizando o método de máxima verossimilhança, Figura 5, considerando os indivíduos agrupados em suas respectivas populações, nota-se formação de três grupos (amarelo, verde e vermelho), apresentando variabilidade entre as populações analisadas em acordo com suas respectivas subvariedades.

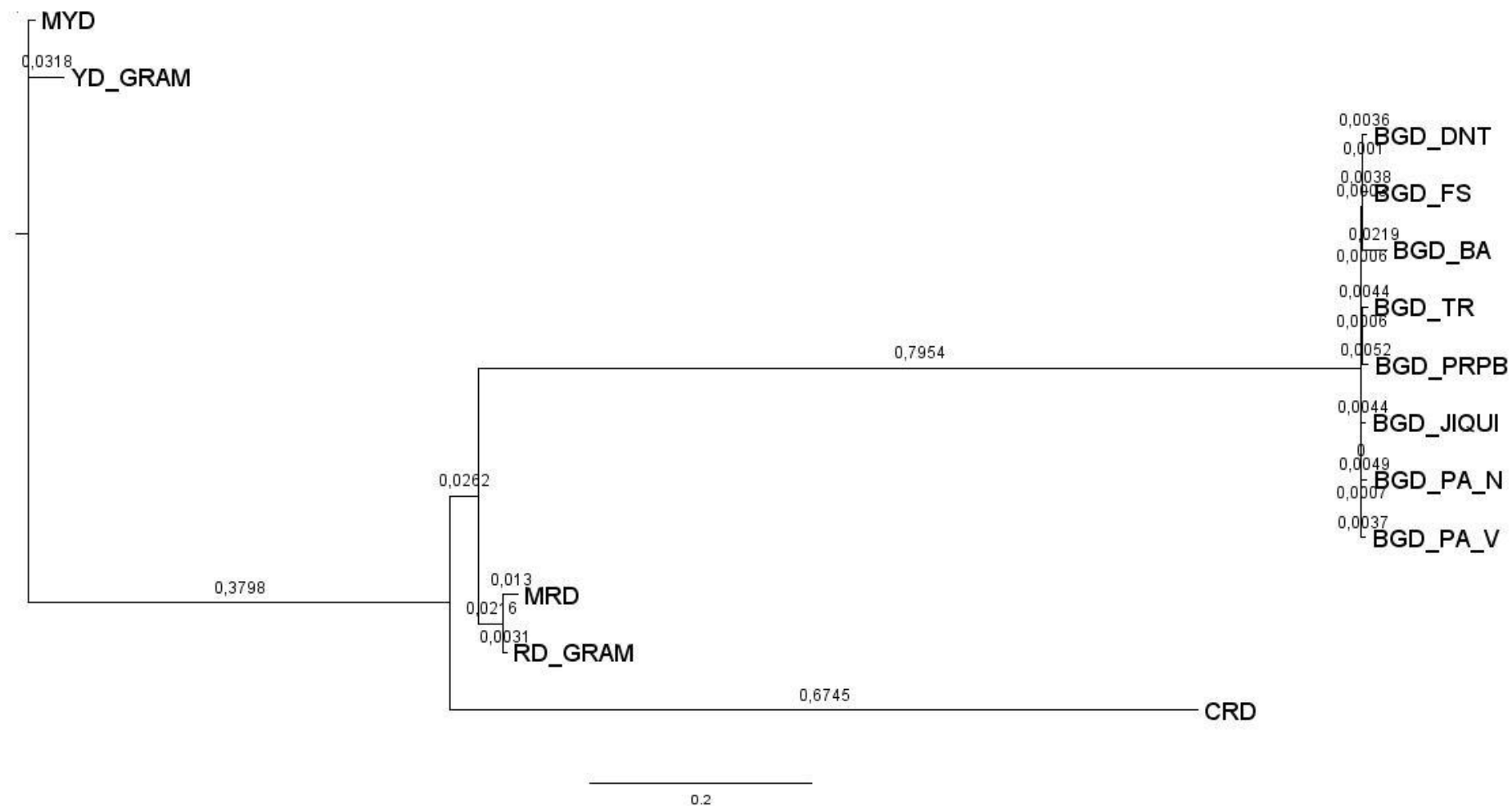


Figura 5 – Dendrograma das 13 populações de coco anão agrupadas pelo método da máxima verossimilhança.

As cores de cada grupo no dendrograma correspondem à sua subvariedades, sendo o grupo dos anões amarelos, anões verdes e os anões vermelhos. Nota-se que as populações tendem a se agrupar não pela sua localidade de coleta, mas, sim, pela sua subvariedade. Considerando as duas populações de anão amarelo, MYD e YDGram, nota-se que elas diferem entre si em alto grau, mantendo-se distantes de acordo com a chave apresentada.

Quando se observa o grupo de anões vermelhos, percebe-se que as populações MRD e RDGram foram agrupadas na mesma chave, muito próximas uma da outra, o que não se observa para a população CRD, denotando que esta população tem alelos específicos que a diferenciam das outras populações de anão vermelho. Tal resultado pode estar relacionado com o fato de a população CRD ter alelos que a diferenciam das demais populações de anão, não só pela cor, mas também pela localização geográfica, dando indícios de que tal população possa ter sido submetida a um processo de seleção natural ou não aleatória, contribuindo para uma possível deriva genética. O pequeno valor da distância entre as populações MRD e RDGram significa que, apesar de tais populações serem advindas de localidades geográficas distintas, há indícios de que elas não se diferenciaram o bastante entre si.

Com relação aos acessos do grupo verde, nota-se uma variabilidade muito baixa entre as populações, não sendo possível observar formação de grupos secundários dentro da chave pelo baixo valor das distâncias entre elas.

Quando se parte para a análise de agrupamento levando em consideração somente as populações de anão verde a fim de tornar a diferenciação entre tais populações mais clara, Figura 6, nota-se a formação de três grupos: um grupo com o acesso BGD-PARAIPÁBA; um grupo com os acessos BGD-JIQUI e BGD-TRAIRÍ; e por fim, um grupo com os acessos BGD-PARÁ N, BGD-SSOUZA DANTAS, BGD-FIGUEIREDO SOUZA, BGD-PARÁ V e BGD-BHAIA, tendo este último apresentado maior distância entre os outros acessos .

Alguns trabalhos também envolvendo estudo de variabilidade genética de coqueiro anão utilizando marcadores moleculares foram desenvolvidos. Azevedo (2015) conduziu um trabalho que tinha como objetivo a identificação de cultivares pela técnica de fingerprint, utilizando marcadores microssatélites. Os resultados foram consonantes com o presente trabalho, mesmo quando se compara a variabilidade genética, sendo que a genotipagem via sequenciamento utilizando RAD-Sequencing foi mais eficaz na captação de alelos que contribuem para discriminar os acessos, revelando uma diversidade, mesmo que pequena, mas antes não captada pelos marcadores microssatélites.

Em trabalho desenvolvido com base em dados morfoagronômicos no intuito de estudar a variabilidade genética em populações de coco anão, Cambuí et al. (2007) conseguiram a divisão de seis cultivares em três grupos: o primeiro grupo com os acessos GRD, MYG e GYD, o segundo grupo formado pelos acessos MRD e BGD-Jiqui e o terceiro grupo com o acesso CRD, condizendo com os resultados obtidos no presente trabalho, principalmente em relação ao CRD, que se manteve isolado no agrupamento.

Noël et al. (2011), em estudo utilizando microssatélites para avaliar a diversidade genética de acessos de coco anão verde na Costa do Marfim, também verificaram formação de três grupos distintos, indicando também variabilidade quando se comparam acessos de anão verde, vermelho e amarelo. Resultados semelhantes foram encontrados por Meerow et al. (2003), que também utilizaram marcadores microssatélites para mostrar que o anão vermelho da Malásia se distingue do anão verde da Malásia, tendo os autores concluído que os acessos de anão amarelo não puderam ser separados dos demais acessos em estudo.

Perera et al. (2000) afirmam que os coqueiros anões possivelmente tenham evoluído durante um longo período de domesticação de uma pequena população de coqueiros gigantes, indicando que este evento pode ser a razão para os baixos níveis de diversidade genética em anões, não somente no Brasil, mas no mundo. Isto implica menor distância genética entre os acessos de coqueiro anão do Brasil e, conseqüentemente, maior nível de relacionamento genético quando se avaliam esses acessos utilizando marcadores que representam uma região específica do genoma do coco.

O presente trabalho mostra que, mesmo com o uso de marcadores que detectam polimorfismo de nucleotídeo único, caso do RAD-Sequencing, a amplitude da variabilidade não aumentou o suficiente para assegurar a recomendação de cruzamentos específicos, caso da obtenção de híbridos intrasubvarietais entre acessos de anão verde visando à obtenção de híbridos a fim de explorar a heterose. Em contrapartida, mesmo se considerarmos o sistema reprodutivo do coqueiro anão verde como uma planta enquadrada como autógama preferencial ou semidireta, a natureza se encarregou de disponibilizar plantas com cerca de 95% dos locos fixados (Bourdeix, 1988), ou seja, linhagens que podem ser utilizadas em cruzamentos com outras populações a fim de explorar a heterose, caso do cruzamento entre anão verde x anão vermelho e anão verde x anão amarelo ou até mesmo cruzamentos intrasubvarietais dentro de anões vermelhos e anões amarelos, mostrando ser viável e promissora a obtenção de híbridos provenientes de cruzamentos entre indivíduos geneticamente mais distantes, explorando ao máximo o efeito heterótico e o ganho com seleção de materiais com boas características agronômicas.

3.1.5 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos, podemos concluir que:

- A enzima AseI se mostrou a mais eficiente na captação de sítios polimórficos, utilizando marcadores RAD-Sequencing;

- Como esperado, as populações amostradas de coco anão estão com elevado nível de homozigose, justificando seu uso na obtenção de híbridos.
- As populações amostradas se agruparam seguindo uma tendência de acordo com a cor, sendo separadas dentro dos grupos dos anões verdes, amarelo e vermelho.
- A genotipagem via sequenciamento evidenciou a baixa variabilidade intrasubvarietal de anão verde do Brasil, mas revelou uma grande variabilidade intersubvarietal (anão verde, anão vermelho e anão amarelo).
- Os sítios polimórficos obtidos via marcadores RAD-Seq foram efetivos na identificação de materiais contrastantes que podem ser usados na obtenção de híbridos tanto inter quanto intrasubvarietais, maximizando a heterose e aumentando a produtividade, possibilitando geração de híbridos uniformes e com alto potencial agrônômico.

3.2 AVALIAÇÃO DE HÍBRIDOS INTER E INTRASUBVARIETAIS DE COCO ANÃO (*COCOS NUCIFERA* L.) VIA FENOTIPAGEM DIGITAL

3.2.1 INTRODUÇÃO

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

O coqueiro apresenta grande variabilidade na produtividade, variando de 30 a 400 frutos/planta/ano, dependendo das condições de crescimento e das cultivares utilizadas, sendo a Índia o primeiro país do mundo a explorar o vigor híbrido em coco, utilizando cruzamentos “anão x anão” (Iyer et al., 1981; Patel, 1937). Apresentando menor porte, facilitando a tomada de dados e o manejo, a

variedade anã é a mais utilizada em programas de melhoramento e também para produção de híbridos (Nuce De Lamothe e Rognon, 1977).

As perspectivas para a cultura são promissoras, uma vez que há mercado potencialmente forte a ser explorado com a água de coco, haja vista que sua industrialização (envasamento) permite o aumento da vida útil do produto, ocasionando seu crescimento no mercado (Ribeiro et al., 1999).

Trabalhos feitos em várias partes do mundo (Akpan, 1994; Zushun, 1994; Bourdeix et al., 1992) mostram a importância de obter cultivares de coqueiro adaptadas à diversas condições edafoclimáticas.

Existe um grande interesse dos principais países produtores de coco na avaliação e seleção de híbridos com o intuito de solucionar problemas na produção, como o desenvolvimento de híbridos resistentes a pragas e doenças, bem como híbridos adaptados a diferentes condições edafoclimáticas (Aldaba, 1995).

A área cultivada, com coqueiros, no mundo, em 2011, foi de 11,5 milhões de hectares, com uma produção de aproximadamente 60 milhões de toneladas. Já o Brasil se destaca com uma produção de aproximadamente três milhões de toneladas de coco, com uma área plantada de 270 mil hectares, contabilizando uma produtividade de aproximadamente 11 toneladas por hectare (FAO, 2011).

No Brasil, a grande maioria dos coqueirais estão localizados na região Nordeste, onde são encontradas populações de coco gigante com mais de 80 anos de idade. Estas populações podem representar uma excelente fonte de germoplasma para um programa de melhoramento. Apesar de estas populações terem divergido e se adaptado a diversas condições ambientais, dando origem a ecótipos de coco anão (Ribeiro et al., 1999), poucos trabalhos foram desenvolvidos com o intuito de aferir a variabilidade genética inter e intrapopulacional (Azevedo, 2015; Jucá et al., 2002).

O Estado do Rio de Janeiro apresenta grande potencial produtivo para o coco, tendo hoje uma área plantada de 4.458 hectares e uma produção total de 70.069 frutos. Desta forma, temos que a produção total de coco no estado do Rio de Janeiro alcança aproximadamente 105 toneladas, contabilizando, desta forma, uma produtividade de 23,3 toneladas por hectare.

Os cruzamentos dialélicos são comumente empregados para avaliação da capacidade específica de combinação (CEC) e capacidade geral de

combinação (CGC) (Griffing, 1956; Cruz et al., 2004), mas sua praticidade é reduzida quando o número de linhagens é elevado. Para contornar este problema, melhoristas têm optado pelo método de topcrosses, proposto por DAVIS (1924). Esta metodologia consiste em avaliar o mérito relativo de um grande número de linhagens em cruzamentos com testadores, eliminando aquelas de desempenho agrônômico inferior, tornando mais racional e eficiente o programa de híbridos (NURMBERG et al., 2000).

A seleção do testador ideal irá depender dos objetivos de cada programa, podendo estar fundamentada na alta ou baixa frequência de alelos favoráveis, base genética ampla ou estreita, capacidade geral ou específica de combinação, rendimento per se, número de testadores utilizados e grau de parentesco com os materiais avaliados (Hallauer & Miranda Filho, 1995; Castellanos et al., 1998; Santos et al., 2001). Um bom testador, para qualquer programa de desenvolvimento de híbridos, deve oferecer simplicidade no uso, gerar informação que classifique corretamente o potencial relativo das linhagens em cruzamento e maximizar o ganho genético (Duarte et al., 2003).

Apesar de a biologia reprodutiva do coqueiro colocar restrições severas ao seu melhoramento genético através de melhoramento convencional - longo tempo de geração de híbridos (Sangaré, 1988), ausência de propagação vegetativa e também produzir poucas sementes (Dhamodaram et al., 1991) – o processo na obtenção de híbridos superiores se torna altamente viável, uma vez que o coqueiro tem um longo período vegetativo por se tratar de uma planta perene por natureza. Assim, o melhoramento genético do coqueiro se baseia na seleção de materiais para cruzamento, visando a aumentar a heterose, principalmente pela produção de híbridos F1 entre cultivares anãs. Estes híbridos são superiores a seus pais, possivelmente pela heterose resultante da complementaridade dos seus componentes de rendimentos (Harries, 1991).

O presente trabalho tem como objetivo identificar acessos de coqueiro que tenham boa capacidade específica de combinação (CEC) através de um delineamento Topcross, desenvolver híbridos de coco anão com alto potencial para produção de água, além de determinar um número ótimo de repetições e plantas dentro de parcela na avaliação de ensaios envolvendo acessos de coco anão.

3.2.2 REVISÃO

3.2.2.1 Origem e Botânica

O coqueiro (*Cocos nucifera* L.) é uma palmeira perene cujo centro de origem remonta ao Sudeste Asiático, tendo sido introduzida no Brasil pelos colonizadores portugueses, em meados do século XVI (Costa et al., 2005).

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

De acordo com Purseglove (1975) e Daher et al. (2002), dentro do gênero *Cocos*, existem duas variedades, a saber: a variedade gigante (*var. typica*) e a anã (*var. nana*), ambas apresentando a mesma constituição cromossômica $2n=2x=32$. Além disso, segundo Lynage (1950), as variedades podem ser cruzadas entre si, originando híbridos de características intermediárias, fato muito interessante para programas de melhoramento.

3.2.2.2 Importância Econômica

O coqueiro é considerado uma planta multiuso, uma vez que praticamente todas as partes da planta são aproveitadas pelo homem, desde o consumo in natura dos frutos verdes (água de coco) e dos frutos secos (uso culinário) até a utilização de outras partes como a madeira para construções de móveis, casas e construções rurais. Os produtos oriundos dos frutos como a copra, óleo, ácido láurico, leite de coco, farinha, água de coco, fibra e ração animal, entre outros produtos e subprodutos, são as partes mais utilizadas no comércio nacional e internacional do coco. (Aragão et al., 1999).

Segundo a FAOSTAT (2010), a cocoicultura está difundida em cerca de 90 países da região intertropical do globo terrestre, sendo a Indonésia o maior produtor mundial, com 19.500.000 toneladas, e as Filipinas e a Índia produzindo 15.319.500 e 10.894.000 toneladas, respectivamente.

O Brasil ocupa o 4º lugar no mundo, com uma produção superior a 3.000.000 toneladas, em uma área colhida de aproximadamente 267.449 milhões de hectares (FAO, 2008).

De acordo com os dados do IBGE (2013), foram cultivados cerca de 264.540 hectares de coco no qual foram colhidos 254.784 hectares. Com 221.250 hectares e produção em torno de 1.406.104 frutos, a região Nordeste se destaca com os estados do Ceará, Sergipe e Pernambuco com a produção de frutos correspondendo, respectivamente, a 290.988, 246.380 e 170.760 mil frutos, contribuindo de forma efetiva no sistema de produção de coco no Brasil.

3.2.2.3 Recursos Genéticos do Coco

O *Bioversity International* é uma organização de pesquisa que visa ao desenvolvimento, trabalhando com parceiros em todo o mundo, utilizando e conservando a biodiversidade agrícola e florestal, visando à nutrição, sustentabilidade e ecossistemas produtivos e resistentes. Desta forma, o CGIAR (Grupo Consultivo de Pesquisa Agropecuária Internacional) decidiu, em 1992, através da *Bioversity International*, incluir o coqueiro no cenário internacional para fins de pesquisas na área de recursos genéticos, dando origem à Rede Internacional de Recursos Genéticos de Coco (COGENT). Esta rede de pesquisas contou com 15 países no início e rapidamente tornou-se uma rede de pesquisas, tendo hoje 39 países membros em cinco sub-redes: A) Sudeste e Leste da Ásia, B) Sul da Ásia, C) Pacífico Sul, D) África e Oceano Índico e E) América Latina e Caribe, além de outros produtores de coco. O banco de dados da rede de coco CGRD (The International Coconut Genetic Resources Database) tem um cadastro com cerca de 1.416 acessos caracterizados conservados em 25 locais, correspondendo a 23 países (Batugal; Jayashree, 2005).

No Brasil, há três coleções de germoplasma de coco, localizadas 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 vitro* um total de 27 acessos (Ramos et al., 2004).

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

Com a finalidade de enriquecer o BAG de coco da Embrapa Tabuleiros Costeiros, foram feitos trabalhos de prospecção e coleta de novos ecótipos ao longo de todo o litoral nordestino, sendo que, através deste trabalho, foram introduzidas as populações de Gigante da Praia do Forte (GBrPF). Outras populações de coco gigante oriundas da Fazenda Estiva, Merepe, São José de Mipibu e Baía Formosa também foram introduzidas. Em relação ao grupo dos cocos anões, foram inseridos os acessos verde Jequi (AVeBrJ), amarelo de Gramame (AVG) oriundo do Rio Grande do Norte e da Paraíba (Siqueira et al., 1995).

3.2.2.4 Variabilidade Genética do Coqueiro

A variabilidade genética do coqueiro disponível nas atuais coleções de germoplasma apresenta boa amplitude passível de ser explorada por melhoristas em diversos programas de melhoramento, permitindo, assim, o desenvolvimento de novas cultivares. Ademais, a variabilidade genética disponível entre populações de coqueiro gigante e anão possibilita a produção de indivíduos

recombinantes, passíveis de serem portadores de características de interesse (Batugal et al., 2005).

Daher et al. (2002) afirmam 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 futuras hibridações.

3.2.2.5 Delineamento Topcross para Estimar a Capacidade Combinatória

A avaliação de linhagens com base no seu comportamento em combinações híbridas é uma das etapas mais importantes e dispendiosas do programa de híbridos. Entre os métodos desenvolvidos para facilitar essa avaliação, destaca-se o uso de topcross, que representa o cruzamento de linhagens com um testador comum de base genética ampla, para avaliação da capacidade geral de combinação, ou base restrita, para avaliação da capacidade específica de combinação (Sawazaki et al., 2000).

A avaliação de um grande número de linhagens é impraticável se forem considerados todos os híbridos possíveis entre linhagens de dois grupos heteróticos. Estudos minuciosos como os de Bernardo (1991) mostraram que a correlação entre as médias dos topcrosses nas gerações n e n' de endogamia é $r_{G(n,n')} [(1+F_n)(1+F_{n'})]^{1/2}$, em que F_n e $F_{n'}$ correspondem aos coeficientes de endogamia das gerações n e n' de endogamia das linhagens. Essa correlação entre topcrosses de progênies S3 e progênies S8 (homozigose) é de 0,97.

Segundo Davis (1924), Lindstron (1931) e Jenkins(1932), o uso de topcrosses para avaliação de um grande número de famílias consiste em cruzar todas as progênies com um ou mais testadores, avaliando-os, a posteriori, com base no seu desempenho per se, haja vista que foram cruzados com um parental comum. Desta forma, é possível selecionar progênies mais promissoras e de maior interesse para o programa.

Para escolher os testadores a serem utilizados em um topcross, há de se considerar que, dependendo da natureza genética, cada testador pode ser usado para testar as progênies de diferentes formas (Hallauer; Miranda Filho, 1995).

Quando se leva em consideração a base genética do testador (ampla ou estreita), a escolha do testador é de fundamental importância, como observado nos trabalhos de Lonquist; Roubough (1958) e Rawling; Thompson (1962)

De acordo com Hallauer e Lopez-Perez (1979), a escolha dos testadores também deverá levar em consideração o tipo de material em teste (grupos definidos vs. grupos misturados ou miscelânea) e tipos de híbridos de interesse (híbridos simples, duplos e/ou triplos), o grau de parentesco com o material a ser avaliado (aparentado vs. não aparentado) e produção (alta produção vs. baixa produção).

Jayabose et al. (2008) conduziram um trabalho na Índia visando identificar os melhores híbridos resultantes de cruzamentos de “anão x anão” baseados na heterobeltiose, tendo concluído que os híbridos mostraram desempenho agrônomico superior em relação aos respectivos parentais para quatro características agrônomicas de interesse comercial.

3.2.2.6 Fenotipagem Digital

A ênfase na fenotipagem de precisão representa uma mudança significativa para os desenvolvedores tradicionais de variedades, uma vez que este processo está engajado na simplicidade, velocidade, precisão e acurácia na obtenção dos dados, fazendo com que melhoristas comecem a pensar nesta estratégia como um investimento a fim de tornar o processo menos oneroso e mais efetivo, aumentando assim a eficiência de um programa de melhoramento genético de plantas (Cabrera-Bosquet et al., 2012).

Atualmente, a obtenção de imagens digitais com boa resolução pode ser feita por câmeras digitais, de modo rápido e simples. Richardson et al. (2001) obtiveram alta correlação ($r^2 = 0,99$) entre a taxa de cobertura do solo pela grama, pela análise da imagem de câmera digital de 1.280 x 960 pixels (pixel é a menor unidade que compõe uma imagem digital, e que contém os atributos de cor de cada ponto), e a taxa de cobertura calculada.

Autores com Dias (2008), Filho et al. (1999) e Rezende (2005) afirmam que a utilização dos recursos de processamento e análise de imagem digital (PADI) é um processo empírico e adaptativo, pois depende de cada tipo de imagem, quais características da imagem estão disponíveis e, principalmente,

qual objetivo se deseja alcançar. Apesar da existência de diversos procedimentos documentados em trabalhos já publicados, a afirmação feita no início deste parágrafo mostra uma lacuna no PADI de grande interesse: a possibilidade de automatizar de alguma forma a escolha e a utilização dos recursos de PADI para um determinado objetivo.

A análise de crescimento, segundo Pereira e Machado (1987), representa a referência inicial da análise da produção das espécies vegetais, requerendo como informações a quantidade de material produzido pela planta (fitomassa) e outros parâmetros que irão diferenciar os indivíduos (altura da planta, diâmetro de colmo etc.), obtidas em intervalos regulares durante o desenvolvimento fenológico da planta. Tais parâmetros são de grande utilidade para a avaliação e a diferenciação entre acessos (Tavares-Júnior et al., 2002).

3.2.3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.3.1 Material Genético

Para o estudo da capacidade específica de combinação (CEC) através do topcross, foram selecionadas populações com base na representatividade tanto a nível comercial, como também populações já estabelecidas ao longo de todo o território brasileiro. Tais populações foram selecionadas também por deterem maior distância genética, a fim de se obter maior heterose, otimizando, desta forma, o ganho com a seleção. Foram utilizados dados obtidos por um estudo de divergência conduzido na UENF utilizando marcadores microssatélite (Azevedo, 2015), tendo sido avaliadas 17 populações de coco provenientes de diferentes regiões produtoras do Brasil, incluindo os estados do Pará, Ceará, Rio Grande do Norte, Sergipe, Piauí e Bahia, além de uma população oriunda do México.

Foram utilizados seis acessos de coco anão do Brasil (BGD-Bahia, BGD-Jiqui, BGD-Pará, BGD-Paraipaba, BGD-Souza e BGD-Trairi), três acessos de anão vermelho (MRD, RD-Gramame e CRD) e um acesso de anão amarelo (YD-Gramame), Quadro 1, cruzando com um testador (BGD-Jiqui), o que permitiu

inferir sobre a capacidade específica de combinação (CEC), uma vez que o coqueiro anão é uma planta predominantemente autógama, tendo, em tese, a maioria dos seus locos em homozigose. As populações estão descritas na Tabela 1 com as siglas utilizadas para cada população, seu nome e o local de coleta do pólen.

Quadro 1- Descrição das populações de coqueiro no topcross com as siglas, nome das populações e o local da coleta do pólen.

Sigla	População	Local de Coleta
BGD-Jiqui	Anão-verde-do-Brasil-de-Jiqui	COHIBRA - PE
BGD-Paraipaba	Anão-verde-do-Brasil-de-Paraipaba	COHIBRA - CE
BGD-Souza-SD	Anão-verde-do-Brasil-de-Souza (Souza Dantas)	Souza Dantas-Paraíba
BGD-Bahia	Anão-verde-do-Brasil-da-Bahia	Pombal – BA
BGD-PARÁ	Anão-verde-do-Brasil-do-Pará-2	Pará (Área Velha)
BGD-Trairi	Anão-Verde-do-Brasil-do-Trairi	COHIBRA-CE
MRD	Anão-Vermelho-da-Malásia	EMBRAPA -SE
GRD	Anão-Vermelho-de-Gramame	COHIBRA - CE
CRD	Anão-Vermelho-de-Camarões	COHIBRA - CE
GYD	Anão-Amarelo-de-Gramame	COHIBRA - CE

3.2.3.2 Obtenção dos Híbridos Topcrosses

A produção das sementes de coco foi feita em novembro de 2013, com apoio e supervisão da empresa COHIBRA (Tecnologia em Coqueiro Híbrido), localizada em Fortaleza, cidade de Amontada – CE, onde existe toda uma infraestrutura necessária para os cruzamentos em uma área localizada em Petrolina-PE, com cerca de dez hectares de matrizes BGD-Jiqui, que foram preparadas para receber o pólen dos respectivos doadores citados na Tabela 1.

A coleta do pólen de cada acesso de coco (6 BGD, 3 RD e 1 YD) foi feita em suas respectivas localidades de maneira sincronizada, com o intuito de se proceder à polinização no mesmo espaço de tempo para que não houvesse

atraso entre um cruzamento e outro, o que poderia comprometer a uniformidade na hora da germinação das sementes e, conseqüentemente, no ensaio experimental.

A preparação das plantas matrizes (BGD-Jiqui) para receber o pólen foi feita de maneira meticulosa e sistemática a fim de garantir que não houvesse contaminação de pólen na hora da polinização. A área foi dividida em talhões de dez fileiras contendo, em média, 150 plantas matrizes por fileira, tendo cada talhão recebido uma identificação com o cruzamento destinado para aquela área.

O pólen de cada acesso foi coletado em seus respectivos locais e acondicionado em isopor com gelo para envio a Petrolina-PE, onde foi feita a polinização (Figura 1).



Figura 1 - (A) Armazenamento do pólen em geladeira, previamente identificado, em sacos plásticos hermeticamente fechados; (B) Emasculação das plantas no campo de matrizes e proteção da inflorescência em Petrolina-PE; (C) Preparo do pólen em picetas plásticas separado por acesso; (D) Aplicação do pólen nas flores femininas das plantas matrizes em seus respectivos talhões; (E) Identificação das plantas polinizadas de acordo com o cruzamento; e (F) Verificação de “pegamento” do pólen nas flores femininas.

Feita a polinização, esperou-se o prazo de aproximadamente 11 meses (dezembro de 2014) para a colheita das sementes e implantação de um germinadouro com canteiros identificados pelos seus respectivos cruzamentos no próprio local para obtenção das mudas (Figura 2).



Figura 2 – Germinadouro de sementes oriundas dos cruzamentos localizado em Petrolina-PE.

O germinadouro foi dimensionado com largura de aproximadamente um metro, 20 centímetros de profundidade e comprimento de 20 metros (Figura 2). As sementes foram distribuídas na posição vertical nos canteiros, observada uma densidade de 10 a 15 sementes/m², permitindo, assim, que, depois de germinadas, permanecessem no germinadouro até que apresentassem desenvolvimento suficiente para que fossem levadas ao campo.

3.2.3.3 Avaliação dos Híbridos Topcrosses

A avaliação dos híbridos foi feita pela parceria entre a Universidade Estadual do Norte Fluminense – Darcy Ribeiro e a empresa REGON.

Após dez meses em viveiro, as plantas seguiram de caminhão, em setembro de 2015, de Petrolina-PE para São Matheus-ES, onde a empresa REGON tem área comercial e mão de obra especializada para avaliação e manutenção do ensaio de híbridos obtidos.

O delineamento utilizado foi o de blocos ao acaso com 10 repetições e 4 plantas por parcela. O experimento foi constituído de 10 tratamentos, sendo 9 híbridos intravarietais e 1 testemunha resultante do cruzamento BGD-Jiqui x

BGD-Jiqui, que tem características agronômicas de interesse. Foi utilizado o espaçamento de 7,5m x 7,5m entre plantas, totalizando aproximadamente 3 ha.

3.2.3.3.1 Características avaliadas

As características juvenis foram avaliadas em outubro de 2015, conforme segue abaixo:

- Altura de plantas (AP) – Medida do comprimento da planta desde a base do coleto até a ponta da folha;
- Diâmetro de colmo (DC) – Medida do diâmetro do colmo na base do coleto;
- Comprimento da folha 3 (CF) – Comprimento desde a inserção do pecíolo no estipe até o último folíolo; e
- Largura da folha 3 (LF) – Largura da folha considerando o ponto mais largo dos folíolos soldados.

3.2.3.4 Análise e Processamento de Imagens Digitais

As características avaliadas foram analisadas com o auxílio da técnica de fenotipagem digital, conforme metodologia validada e descrita por Cortes et al. (2014). Para isso, foi utilizada uma câmera digital *Sony DSCHX 300*, utilizando duas fotografias completas por planta: uma fotografia do perfil da planta, em que foram mensuradas as características AP, DC e CF, e outra fotografia da folha da planta, em que foi mensurada a LF.

Cada planta foi marcada com uma etiqueta fixada no solo para facilitar a identificação no processo de análise e processamento das imagens. Além disso, foi utilizado um marco de medida conhecida (20 cm), fixado no solo próximo ao caule das plantas avaliadas (Figura 3). As imagens foram processadas e analisadas com ajuda do software *ImageJ v1.50c*.

3.2.3.5 Validação das imagens digitais

Para a validação da imagem digital aplicada na estimação das características avaliadas, foram amostradas 50 plantas dentro do experimento. Uma vez identificadas as 50 plantas, foram feitas as mensurações digital e manual, com o auxílio de um paquímetro para mensurar o diâmetro do colmo (DC), fita métrica para mensurar a altura da planta (AP) e o comprimento da folha (CF) e uma régua para mensurar a largura da folha (LF). Os dados das medições manual e digital foram comparados utilizando o software SIGMAPLOT, versão 12.0, com o intuito de verificar se a metodologia da análise digital das imagens difere estatisticamente da metodologia da tomada de dados manual, feita tradicionalmente. Foi feita uma análise descritiva para estimar os parâmetros média, Intervalo de confiança, coeficiente de variação e coeficiente de determinação, o que permitiu inferir sobre a diferença na tomada de dados utilizando metodologias distintas.



Figura 3 – Tomada de dados para processamento e análise de imagem digital.

3.2.3.6 Análises Estatísticas

As análises estatísticas das características morfoagronômicas foram feitas com auxílio dos programas *Statistical Analysis System – SAS 9.1* e foi considerada a média das 4 plantas dentro da parcela, adotando-se o seguinte modelo para análise de variância:

$$Y_{ij} = \mu + B_j + G_i + e_{ij}$$

em que,

Y_{ij} é a observação no k-ésimo bloco, avaliada no i-ésimo genótipo;

μ é a média geral do ensaio;

B_j é o efeito do bloco k;

G_i é o efeito do genótipo i e; e

e_{ij} é o erro aleatório associado à observação Y_{ij} .

Os esquemas das análises de variâncias e as esperanças dos quadrados médios estão apresentados no Quadro 2.

Foi calculada a Diferença Mínima Significativa – DMS para cada uma das características avaliadas, utilizando a seguinte equação:

$$DMS = t \sqrt{\frac{2QMR}{r}}$$

Em que:

t = valor tabelado à 5% de probabilidade;

QMR = quadrado médio do resíduo da análise de variância; e

r = número de observações das médias avaliadas.

Quadro 2 - Esquema das análises de variância conjunta dos híbridos Topcrosses, envolvendo as respectivas esperanças dos quadrados médios E(QM), graus de liberdade (GL) e o teste F.

F.V.	G.L.	E (QM)	F
Blocos	r-1	$\sigma^2 + g\sigma^2b$	
Genótipos(G)	g-1	$\sigma^2 + r\emptyset g$	QMG/QMR
Resíduo(R)	$(g-1)(r-1)$	σ^2	

Para verificar se houve diferenças estatísticas entre os híbridos, foi feita uma análise de variância, em que se utilizou a informação da média das 4 plantas que constituíram a parcela. Assim como na análise de variância, também foram estimados alguns parâmetros como a Variabilidade Genotípica ($\emptyset g$), a Variância Fenotípica (σ_f^2), o Coeficiente de variação experimental (C.V.), o coeficiente de determinação genotípica com base na média das parcelas (H^2), o coeficiente de variação genotípico (CV_g) e o Índice de Variação (I_v), conforme os estimadores abaixo:

- $\emptyset_g = \frac{Qm_g - Qm_e}{r}$
- $\sigma_f^2 = \frac{Qm_g}{r}$
- $CV_g (\%) = \left(\frac{\sqrt{\sigma_g^2}}{x} \right) . 100 ;$
- $H^2 = \frac{\sigma_g^2}{\sigma_f^2} ;$
- $C.V. = \left(\frac{QM_{erro}}{x} \right) . 100 ; e$
- $I_v (\%) = 100 . \left(\frac{CV_g}{CV_e} \right)$

Em que:

Qm_g = Quadrado médio de genótipos;

Qm_r = Quadrado médio do erro; e

Ainda em relação à Tabela 1, os valores do coeficiente de determinação foram considerados ótimos para as características AP, LF e DC, sendo maior valor para LF e considerado muito bom para CF. Tal fato denota que os dados se ajustaram bem à reta, Figura 4, e que a metodologia digital pode ser utilizada para leitura biométrica destas características.

Cabe ressaltar que, apesar de o experimento ainda estar em fase inicial de desenvolvimento, os valores dos parâmetros obtidos na validação refletem uma boa precisão experimental, além de se mostrarem muito promissores em relação à tomada de dados, uma vez que, quando são utilizados procedimentos manuais, o processo se torna demorado, com necessidade de um grande número de pessoas e, conseqüentemente, mais oneroso, impossibilitando, muitas vezes, seu uso para fenotipagem.

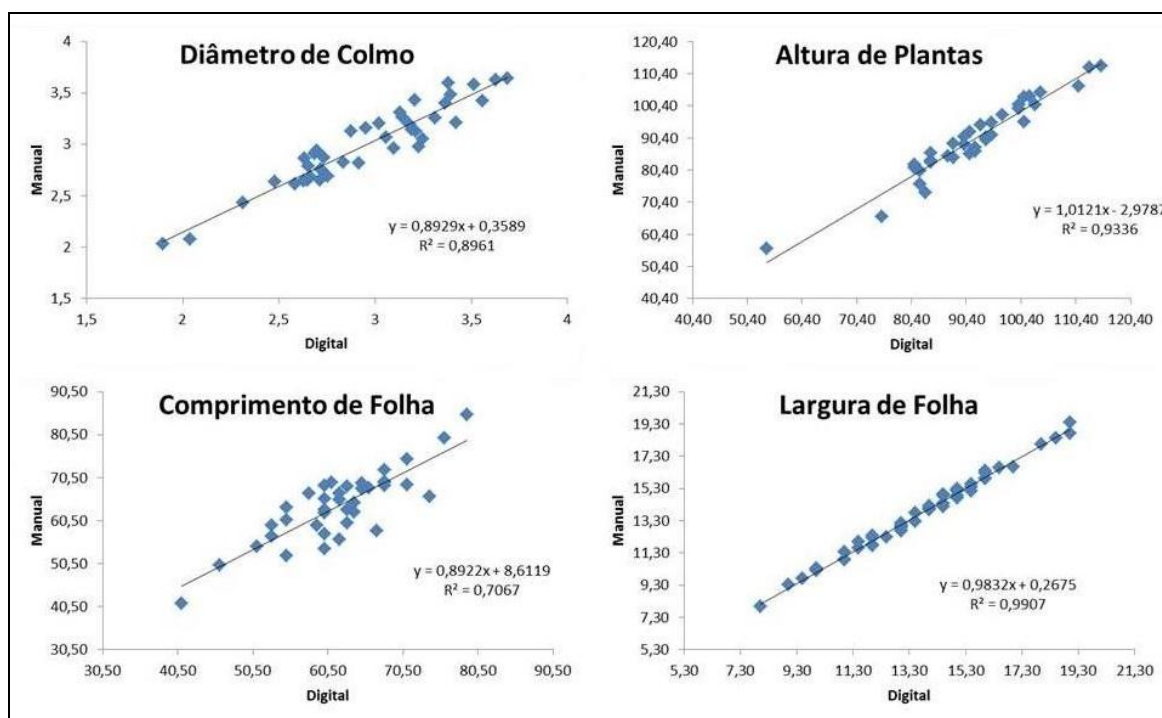


Figura 4 – Análise de regressão para validação da tomada de dado digital para Diâmetro de colmo (DC), Altura de Plantas (AP), Comprimento de Folhas (CF) e Largura de Folhas (LF).

Nota-se também que quando se compara a diferença entre as tomadas de dados manuais e digitais ao longo das plantas mensuradas para as quatro características (DC, AP, CF e LF), quanto maior o número de plantas utilizadas menor a estimativa do diferencial em porcentagem (Figura 5).

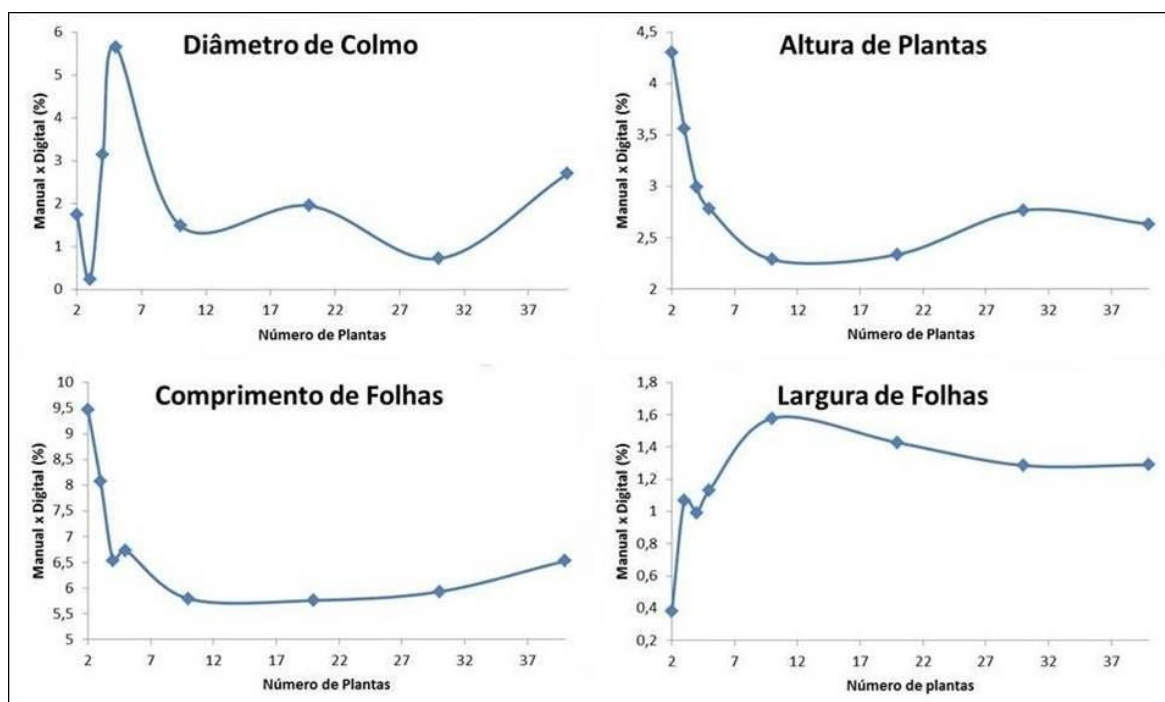


Figura 5 – Diferencial percentual entre tomada de dados digital e manual, utilizando médias contendo de 2 a 40 plantas.

Para as características AP, CF e LF, a amplitude na variação do diferencial percentual tende a se estabilizar quando são avaliadas em torno de 4 plantas, ou seja, a partir deste ponto, as diferenças entre as mensurações através das médias se mantêm constantes, indicando boa precisão na tomada digital. Já para a característica DC, percebe-se maior amplitude quando o número de indivíduos que compõem a média gira em torno de quatro. Este resultado pode estar relacionado ao fato de as plantas ainda estarem na fase juvenil, e que para tal característica a idade vegetativa ainda expressa grande variabilidade, aumentando a amplitude do diferencial percentual.

3.2.4.2 Análise de Variância

Os valores dos quadrados médios para as fontes de variação da análise de variância estão representados na Tabela 2.

Segundo Falconer (1987), a variância causada pelo ambiente que, por definição, capitaliza toda a variabilidade de origem não genética pode ter diversas causas, além de depender muito da natureza do organismo a ser estudado. Ainda segundo o autor, a variância causada pelo ambiente é uma fonte de erro, que

reduz a precisão experimental, uma vez que o objetivo do melhorista ou pesquisador é justamente reduzi-la.

De acordo com o trabalho de Sobral et al. (2010), em que foi avaliado o comportamento agrônomo e a populações de coco anão, os valores de coeficientes de variação encontrados no presente trabalho são considerados muito bons, Tabela 2, principalmente pela natureza das características avaliadas e também pelo estágio de desenvolvimento das plantas, uma vez que elas estão ainda na fase inicial de desenvolvimento.

Tabela 2 - Estimativa dos quadrados médios para quatro características morfoagronômicas (Altura de Plantas-AP, Comprimento de Folha-CF, Diâmetro do Colmo-DC e Largura da Folha-LF) avaliadas em São Matheus-ES, com as estimativas da variabilidade genética (σ_g), variância fenotípica (σ_f^2), coeficiente de variação experimental (CV), herdabilidade com base na média das parcelas (H^2), coeficiente de variação genotípico (CV_g) e Índice de variação (I_v).

F.V	G.L.	QM			
		AP	CF	DC	LF
Bloco	9	99,76	113	0,51	5,65
Tratamento	9	178,94*	117,2*	0,44**	1,81 ^{ns}
Erro	81	73,96	52,47	0,08	1,50
Total	99				
Média (cm)		96,59	72,24	3,35	13,83
σ_g		10,49	6,43	0,03	0,03
σ_f^2		17,89	11,72	0,04	0,18
CV		8,90	10,02	8,55	8,85
CVg		3,35	3,51	58,02	1,2
I_v (%)		37,64	35,02	678,59	13,55
H^2 (%)		58	55	75	17

*,** e ^{ns} Significativo a 5%, 1% e não significativo respectivamente, pelo teste F.

Ainda em relação à Tabela 2, entre as quatro características avaliadas, apenas para diâmetro de colmo (DC), ocorreram diferenças significativas entre os acessos a 1% de probabilidade pelo teste F. Para as características altura de plantas (AP) e comprimento de folhas (CF), foram observadas diferenças significativas pelo teste F a 5% de probabilidade, também indicando variabilidade. Para a característica largura da folha (LF), não houve diferença significativa pelo mesmo teste F, indicando, assim, baixa variabilidade para tal característica, ou seja, maior homogeneidade para tal característica, o que condiz com a realidade

do experimento, haja vista que o experimento está com 7 meses da germinação das sementes até a avaliação de tais características.

Em trabalhos feitos com a finalidade de estudar a variabilidade genética entre acessos de coco anão, como os de Cambui (2007), Pedroso et al. (2007) e Ramos et al. (2007), também foram encontradas diferenças significativas para a maioria das características avaliadas, indicando variabilidade entre os acessos, tornando extremamente viável e justificável, sob a perspectiva do melhoramento, o cruzamento entre esses acessos para explorar o máximo a heterose e, como consequência, obter híbridos com alto potencial agronômico.

De acordo com Faleiros (2011), para conhecer quais fatores estão envolvidos em cada característica visando ao melhoramento, torna-se necessário lançar mão de analisar o CVg, juntamente com o CVe, por meio da relação entre tais parâmetros, ou seja, o índice de variação de cada característica, que deve ser maior que a unidade, indicando, assim, presença de variabilidade genética.

O índice de variação, que quantifica a predominância da variância genética sobre a ambiental, foi considerado baixo para as características AP, CF e LF, mostrando que essas características, até o momento, foram muito influenciadas pelo ambiente, portanto, nas fases de avaliação precoce de plantas originadas de cruzamento entre acessos de coco anão, elas podem ser consideradas características pouco indicadas para seleção de genótipos superiores.

Foi observado alto valor para o índice de variação para DF, significando que a maior parte da variação encontrada para tal característica é de natureza genética, sendo uma característica promissora para seleção de genótipos superiores.

Os valores de herdabilidade no sentido amplo foram considerados relativamente altos (>55%), conforme classificação proposta por Falconer (1987), para as características AP (58%), CF (55%) e DC (75%). Contudo, a menor magnitude apresentada foi para LF (17%), denotando baixa variabilidade genética, aumentando a contribuição da variância fenotípica para tal característica, conforme Tabela 2.

Considerando agora o ranqueamento dos híbridos topcrosses, Tabela 3, considerando as quatro características (AP, CF, DC e LF), nota-se que os híbridos se diferenciaram entre si, evidenciando diferença entre eles já em fase juvenil das plantas. Isso já evidencia a manifestação da heterose obtida pelo

cruzamento entre as populações com o testador (BGD-Jiqui) e também ressalta a importância do referido trabalho, tanto do ponto de vista do melhoramento, cuja principal função é lançar variedades aos produtores e ampliar a variabilidade genética, quanto do ponto de vista comercial, uma vez que estes híbridos poderão estar disponíveis para uso de produtores que têm como fonte de renda a cocoicultura.

Nota-se que, já na fase inicial, a maioria dos híbridos interpopulacionais, ou seja, híbridos resultantes de cruzamento entre indivíduos de duas populações distintas estão com médias superiores ao híbrido intrasubvarietal (híbrido resultante do cruzamento entre indivíduos de uma mesma variedade), utilizado como testemunha para as quatro características avaliadas.

Apesar de os estudos dos resultados da genotipagem mostrarem pouca ou quase nenhuma variabilidade entre as populações de anão verde, os resultados da fenotipagem digital são muito promissores pelo fato de termos híbridos resultantes de cruzamentos entre populações de anão verde x anão verde, caso do BGD-Souza x BGD-Jiqui, que tendem a superar a maioria dos outros híbridos, de acordo com as características AP, CF e LF, mas não podemos afirmar a superioridade desses cruzamento pelo fato de as plantas ainda estarem na fase juvenil.

Nota-se que, mesmo quando não observamos uma variabilidade genética tão alta, caso de DC, ainda, assim, conseguiu-se identificar híbridos que superam a testemunha, casos do YD-GRAM, RD-GRAM e RD-CAM.

Ainda em relação à Tabela 3, observam-se, de acordo com o DMS calculado, diferenças significativas entre os tratamentos para todas as características.

De acordo com trabalho desenvolvido por Jucá et al. (2002), em que foi estudado o comportamento vegetativo de seis cultivares de coco anão (Anão-Vermelho-da-Malásia (MRD), Anão Verde de Jiqui (BGD-Jiqui), Anão Vermelho de Gramame (RD-Gramame), Anão Vermelho de Camarões (CRD), Anão Amarelo de Gramame (YD-Gramame) e Anão Amarelo da Malásia (MYD)), notou-se que, para a maioria das características avaliadas, a cultivar BGD-Jiqui se destacou, fato este não observado no presente trabalho, Tabela 2, uma vez que, quando utilizado como genitor, o desempenho agrônômico dos híbridos não se assemelhou quando comparado com o desempenho *per se* dos seus

respectivos parentais. Tal fato pode estar ligado ao efeito heterótico promovido pelo cruzamento entre BGD-Jiqui e os demais acessos utilizados no delineamento topcross, mostrando indícios de variabilidade genética existente entre populações de anão verde, que justifiquem o uso de híbridos, resultando em maiores produtividades por área cultivada, adotando-se o mesmo manejo cultural.

Tabela 3 – Ranqueamento das médias das quatro características morfoagronômicas (Altura de Plantas-AP, Comprimento de Folha-CF, Diâmetro do Colmo-DC e Largura da Folha-LF) avaliadas em São Matheus-ES e seus respectivos valores de DMS pelo teste t.

Trat	AP	Trat	CF	Trat	DC	Trat	LF
BGD-SOUZ	104,34	BGD-SOUZ	80,27	YD-GRAM	37,54	RD-GRAM	14,45
RD-GRAM	103,02	RD-GRAM	74,29	RD-GRAM	36,62	BGD-BA	14,29
YD-GRAM	98,32	BGD-TRAI	73,32	RD-CAM	34,77	BGD-PARA	14,11
BGD-TRAI	95,35	BGD-BA	72,59	BGD-JIQU	33,47	BGD-SOUZ	13,96
RD-CAM	95,28	BGD-PARA	71,45	BGD-PPB	32,81	BGD-TRAI	13,87
BGD-PARA	95,23	BGD-PPB	71,33	BGD-BA	32,61	RD-CAM	13,80
BGD-BA	95,10	YD-GRAM	71,05	BGD-PARA	32,36	BGD-PPB	13,65
BGD-PPB	94,76	RD-CAM	70,39	RD-MAL	32,20	BGD-JIQU	13,64
BGD-JIQU	92,60	BGD-JIQU	68,88	BGD-SOUZ	32,08	RD-MAL	13,62
RD-MAL	91,41	RD-MAL	68,49	BGD-TRAI	31,14	YD-GRAM	12,93
D.M.S*	7,69		6,47		0,25		1,09

Com o intuito de determinar o número ótimo de repetições e o número de plantas dentro de parcela para conseguir conduzir um experimento com tamanho reduzido de área, foi feita uma simulação com os dados obtidos no ensaio (Tabela 4). Foi observada significância através do erro padrão estimado quando se considerou o tamanho da parcela contendo duas plantas para três características avaliadas (AP, CF e DC), sendo que, quando se variou o número de repetições, as significâncias se comportaram com maior flutuabilidade, com AP, CF e DC apresentando significância a partir de 6, 9 e 8 repetições, respectivamente. O fato de a característica LF ter sido não significativa nos impossibilitou calcular o número ótimo de plantas dentro de parcela nem o número de repetições.

Estas estimativas são de extrema importância, tanto no ponto de vista experimental quanto orçamentário, já que qualquer modificação no desenho experimental acarretará alterações nas estimativas dos parâmetros genéticos e

também no tamanho da área experimental, o que implica alterações no custo para implementar um ensaio.

Considerando o presente ensaio com 10 tratamentos, 10 repetições, 4 plantas por parcela e um espaçamento entre plantas de 7,5 m em arranjo triangular, chegamos a uma área útil de aproximadamente 2 hectares. Quando fixamos 2 plantas por parcela e variamos o número de repetições, podemos concluir que, para a característica AP, em que se observou significância a partir de 6 repetições com parcelas contendo 2 plantas, o tamanho da área experimental necessária seria de 0,58 hectares, implicando redução de 70% da área útil. Já para as características CF e DC, considerando suas respectivas significâncias, notamos que a redução foi de 55% e 60%, respectivamente.

É notório que o fato de o experimento ainda estar em fase inicial não nos permite estabelecer um número mínimo de repetições e de plantas dentro da parcela para conseguir diferenciar indivíduos e ou populações com uma confiabilidade aceitável, porém, quando consideramos um experimento dessa magnitude e a mão de obra necessária para tomada de dados, é extremamente importante diminuir ao máximo a área experimental.

Tabela 4 – Valores de erro padrão e respectivas significâncias utilizando diferentes números de planta dentro de parcela e números de repetições para as quatro características (AP, CF, DC e LF) avaliadas, em São Matheus-ES.

Nº Plantas	Número de Repetições									
	Altura de Planta									
	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
1	11,19 ^{ns}	9,85 ^{ns}	7,73 ^{ns}	6,95 ^{ns}	5,88 ^{ns}	5,23 ^{ns}	4,69 ^{ns}	4,43 ^{ns}	4,14 ^{ns}	
2	10,14 ^{ns}	6,80 ^{ns}	5,30 ^{ns}	4,93 ^{ns}	4,57*	4,05*	4,01**	3,65**	3,50**	
3	6,49 ^{ns}	4,79 ^{ns}	3,95*	3,63*	3,48*	3,19*	3,55 ^{ns}	3,23*	3,04**	
4	5,21 ^{ns}	3,90 ^{ns}	3,22 ^{ns}	3,07*	2,93**	2,80*	3,17 ^{ns}	2,87 ^{ns}	2,71*	
	Comprimento de Folha									
	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
1	8,17 ^{ns}	6,57 ^{ns}	6,19 ^{ns}	5,58 ^{ns}	4,83 ^{ns}	4,33 ^{ns}	3,95 ^{ns}	3,71 ^{ns}	7,78 ^{ns}	
2	8,26 ^{ns}	5,59 ^{ns}	4,60 ^{ns}	4,29 ^{ns}	3,95 ^{ns}	3,56 ^{ns}	3,43 ^{ns}	3,19*	2,97**	
3	4,97 ^{ns}	4,02 ^{ns}	3,36 ^{ns}	3,05 ^{ns}	2,83 ^{ns}	2,63 ^{ns}	2,84 ^{ns}	2,65*	2,43**	
4	4,20 ^{ns}	3,54 ^{ns}	2,88*	2,83 ^{ns}	2,68 ^{ns}	2,50 ^{ns}	2,69 ^{ns}	2,43 ^{ns}	2,29*	
	Diâmetro de Colmo									
	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
1	0,36 ^{ns}	0,28 ^{ns}	0,23 ^{ns}	0,21 ^{ns}	0,21 ^{ns}	0,18 ^{ns}	0,16 ^{ns}	0,15 ^{ns}	0,31 ^{ns}	
2	0,30 ^{ns}	0,21 ^{ns}	0,18 ^{ns}	0,16 ^{ns}	0,14 ^{ns}	0,13 ^{ns}	0,12*	0,11**	0,10**	
3	4,97 ^{ns}	4,02 ^{ns}	3,36 ^{ns}	3,05 ^{ns}	2,83 ^{ns}	2,63 ^{ns}	2,84 ^{ns}	2,65*	2,43**	
4	0,23 ^{ns}	0,15*	0,14*	0,12**	0,12*	0,11*	0,10**	0,09**	0,08**	
	Largura de Folha									
	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
1	1,44 ^{ns}	1,06 ^{ns}	0,98 ^{ns}	0,88 ^{ns}	0,84 ^{ns}	0,81 ^{ns}	0,76 ^{ns}	0,75 ^{ns}	1,60 ^{ns}	
2	0,77 ^{ns}	0,98 ^{ns}	0,76 ^{ns}	0,66 ^{ns}	0,61 ^{ns}	0,64 ^{ns}	0,62 ^{ns}	0,58 ^{ns}	0,54 ^{ns}	
3	0,61 ^{ns}	0,51 ^{ns}	0,46 ^{ns}	0,40 ^{ns}	0,41 ^{ns}	0,42 ^{ns}	0,46 ^{ns}	0,43 ^{ns}	1,69 ^{ns}	
4	0,64 ^{ns}	0,70 ^{ns}	0,51 ^{ns}	0,43 ^{ns}	0,42 ^{ns}	0,40 ^{ns}	0,44 ^{ns}	0,41 ^{ns}	0,38 ^{ns}	

*,** e ^{ns} Significativo a 5%, 1% e não significativo respectivamente, pelo teste F.

3.2.5 CONCLUSÕES

A análise de variância revelou diferenças significativas entre os acessos avaliados, além de mostrar desenvolvimento maior em relação à testemunha (BGD-Jiqui) para todas as características avaliadas. Os parâmetros genéticos estimados dão indícios de que há variabilidade genética suficiente para selecionar indivíduos com alto potencial agrônômico.

Resultados similares podem ser obtidos variando o número de plantas dentro de parcelas e número de repetições, conforme demonstrado em estudo de simulação.

Pelos resultados obtidos no presente trabalho, as seguintes conclusões foram possíveis:

- 1- A precisão da metodologia digital em relação à metodologia manual indica que as características morfológicas podem ser estimadas através da análise e processamento de imagens digitais, com rapidez, precisão, pouca mão de obra e menos onerosa.
- 2- O desempenho agrônômico dos híbridos topcrosses apresentou variabilidade genética para 3 das 4 características avaliadas na fase inicial de desenvolvimento.
- 3- A testemunha (BGD-Jiqui) teve desempenho inferior a alguns híbridos obtidos, evidenciando uma suposta manifestação da sua heterose em relação à principal cultivar de coco anão plantada no Brasil atualmente.
- 4- Embora os dados tenham sido coletados na fase juvenil de desenvolvimento, existe grande expectativa de que haja diferenças na capacidade combinatória entre as diferentes populações de coco anão. Este fato indica a possibilidade de serem desenvolvidos híbridos de coqueiro oriundos de cruzamentos intersubvarietais.
- 5- Pode-se chegar a resultados satisfatórios com diferenciação entre acessos e menos oneroso se for utilizado menor número, tanto de plantas dentro de parcela, quanto repetições em ensaios de competição envolvendo combinações híbridas de coco anão.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akpan, E. E. J. Evaluation of tall coconut (*Cocos nucifera* L.) genotypes within the nigerian coconut germplasm bank. *Oléagineux*, Paris, v.49, n.1, p.13-20, 1994.
- Aldaba, F. R. Coconut production in the Philippines: problems and prospects. *Plantations Recherche Development*, Paris, v.2, n.5, p.15-21, 1995.
- Aragão, W.M., Boaventura, R.F., Aragão, R.R.B., Barros, K.B.R. (2001) Variabilidade e correlações entre caracteres morfológicos reprodutivos em cultivares de coqueiro-anão (*Cocos nucifera* L., var. nana). *Agrotropica* 13: 27-32.
- Aragão, W.M., Ribeiro, F.E., Tupinambá, E.A., Siqueira, E.R. de (2002) Variedades e híbridos de coqueiro. In: Aragão, W.M. (Org.). *Coco: pós-colheita*. 29ed. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros.
- Aragão, W.M., Ribeiro, F.E., Tupinambá, E.A., Siqueira, E.R. de (2003) Variedades e híbridos. In: Fontes, H.R., Ribeiro, F.E., Ferreira, J.M. (Org.) *Coco: produção, aspectos técnicos*. Aracaju; Brasília: Embrapa Tabuleiros Costeiros; Embrapa Informação Tecnologia.
- Azevedo, A. O. N. (2015) Legitimidade de híbridos de coqueiro anão via DNA fingerprint. Tese (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) -

Campos dos Goytacazes - RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 61p.

Azevedo, C. D. O. (2014) Diversidade genética de populações de coqueiro (*Cocos nucifera* L.) via marcadores SSR. Tese (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Campos dos Goytacazes - RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 58p.

Baird, N. A., P. D. Etter, T. S. Atwood, M. C. Currey, A. L. Shiver et al., 2008 Rapid SNP discovery and genetic mapping using sequenced RAD markers. PLoS ONE 3: e3376.

Batugal, P. e Bourdeix, R. (2005) Conventional Coconut Breeding. In: Batugal, P., Rao, V.R., Oliver, J. (eds) Coconut Genetic Resources. International Plant Genetic Resources Institute – Regional Office for Asia, the Pacific and Oceania (IPGRI-APO). Serdang, Selangor DE, Malaysia, 1-10p.

Baudoin, L. and Lebrun, P. (2002) The development of a microsatellite kit and dedicated software for use with coconuts. Burotrop. Bull. 17: 16-20.

Bernardo, R. Correlation between testcross performance of lines at early and late selfing generations. Theoretical and Applied Genetics, v. 82, p. 17-21, 1991.

Bourdeix, R. (1988) Genetic determinism in dwarf coconut germ colour. Oleagineux 43:371–374.

Bourdeix, R., Konan, J.L. and N'Cho, Y.P. (2005) Coconut: A guide to traditional and improved varieties. Editions diversiflora. Montpellier, France. 104p.

BORDEIX, R.; CHO, Y. P.; SANGARE, A; BAUDOIN, L.; DELAMOTHE, M. D. L'hybride de cocotier PB 121 amélioré, croisement du Nain Jaune Malais et de géniteurs Grand Ouest-Africain sélectionnés. Oléagineux, Paris, v.47, n.11, p.619-633, 1992.

Cabrera-Bosquet, L., Crossa, J., von Zitzewitz, J., Serret, M.D., Luis Araus, J., 2012. High-throughput phenotyping and genomic selection: the frontiers of crop breeding converge. J. Integr. Plant Biol. 54, 312–320.

- Cambui, É.V.F. (2007) DIVERSIDADE GENÉTICA ENTRE CULTIVARES DE COQUEIRO ANÃO (*Cocos nucifera* L., VAR. NANA). Tese (Mestrado em Agroecossistemas) - Aracaju - SE, UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE, 67p.
- Castellanos, J. S.; Hallauer, A. R.; Cordova, H. S. Relative performance of testers to identify elite lines of corn (*Zea mays* L.). *Maydica*, Bergamo, v. 43, n. 3, p. 217-226, 1998
- Castro, C.P. (2007) COMPORTAMENTO DE CULTIVARES DE COQUEIRO ANÃO (*Cocos nucifera* L.) NOS TABULEIROS COSTEIROS. Tese (Mestrado em Agroecossistemas) - Aracaju - SE, UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE, 87p.
- Catchen, J., Amores, A., Hohenlohe, P., Cresko, W., Postlethwait. Stacks: building and genotyping loci de novo from short-read sequences. *G3: Genes, genomes, genetics*, v. 1, p.171-182, 2011.
- Costa, R.S.C DA; Nascente, A.S.; Ribeiro, G.D., Ferreira, M.DAS.G.R. (2005). Cultivo do Coqueiro em Rondônia. Ed. Téc. NASCENTE, A.S. EMBRAPA Rondônia. Versão Eletrônica: ISSN 1807-1805. Porto Velho, Rondônia.
- Cortez, D. F. M., Santa-Catarina, R., Barros, G. B. A., Santana, F. A., Ramos, H. C. C., Thiebaut, J. T. L., Silveira, S. F., Ferregueti, G. A., Perreira, M. G. (2014) Estimation of agronomic traits in papaya using digital images analysis. *Anais da XIV Mostra de Pós-Graduação da UENF, Ciência, Tecnologia e Desenvolvimento Social*. Campos dos Goytacazes, RJ.
- Cruz, C. D.; Regazzi, A. J.; Carneiro, P. C. S. Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético. 3. ed. Viçosa: UFV, 2004.v.1.
- Daher, R. F.; Pereira, M. G.; Tupinambá, E. A.; Amaral Júnior, A. T.; Aragão, W. M.; Rebeiro, F. E.; Oliveira, L. 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.

- Davey, J. W., Hohenlohe, P. A., Etter, P. D., Boone, Q., Catchen, JM, and Blaxter, M. L. (2011). Genome-wide genetic marker discovery and genotyping using next-generation sequencing. *Nat. Rev. Genet.* 12,499-510. doi: 10.1038/nrg3012.
- Davis, R.L. Report of the plant breeder. Puerto Rico Agricultural Experimental Station Annual Reporter, Puerto Rico, p.14-15, 1924
- DIAS, F. C. Uso do software Image J para análise quantitativa de imagens de microestruturas de materiais, Dissertação de Mestrado, INPE, São José dos Campos, 2008.
- Dhamodaran, S., Viraktamath, B.C. and Iyer, R.D. 1991. Heterosis breeding in coconut – past, present and future. *J. Plantn. Crops* 19 (2): 70-80.
- Duarte, I. A.; Ferreira, J. M.; Nuss, C. N. Potencial discriminatório de três testadores em top crosses de milho. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v.38, n.3, p.365-372, mar.2003.
- Elshire, R.J., J.C. Glaubitz, Q. Sun, J.A. Poland, K. Kawamoto, E.S. Buckler, and S.E. Mitchell. 2011. A robust, simple genotyping-by-sequencing (GBS) approach for high diversity species. *PLoS One* 6:e19379.
- Etter P.D., et al. Local de novo assembly of RAD paired-end contigs using short sequencing reads. *PLoS ONE* 2011;6:e18561.
- Falconer, O.S. Introdução à genética quantitativa. Viçosa : UFV, 1987. 279p.
- Filho, O. M.; Neto, H. V. Processamento Digital de Imagens, Brasport, ISBN 8574520098, Rio de Janeiro, 1999.
- FAOSTAT - Culturas ano 2011: <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx> em 11/2013 página mantida pela FAO.
- Fontes, H.R., Ferreira, J.M.S., Siqueira, L.A. (2002) Sistema de produção para a cultura do coqueiro. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros. 63p. (Embrapa Tabuleiros Costeiros. Sistemas de Produção, 01). Disponível em <http://www.cpatc.embrapa.br>

- Food and Agriculture Organization of the United Nations – FAO. (2008). Database agricultural – Production - Crops Primary – Coconut, July 20.
- Griffing, J.B. Concept of general and specific combining ability in relation to diallel systems. *Australian Journal of Biological Science*, v.9, p. 463-493, 1956.
- Gunn, B.F., Baudouin, L., Olsen, K.M. (2011). Independent Origins of Cultivated Coconut (*Cocos nucifera* L.) in The Old World Tropics. *PLoS ONE* 6(6): 1 - 8. doi:10.1371/journal.pone.0021143.
- Harries, H.C., Clement, C.R. (2013) Long-distance dispersal of the coconut palm by migration within the coral atoll ecosystem. *Annals of botany*, 6p.
- Hallauer, A.R.; Miranda Filho, J.B. Quantitative genetics in maize breeding. 2.ed. Ames: Iowa State University Press, 1995. 468p.
- Hallauer, A.R.; Lopez-Perez, E. Comparisons among testers for evaluating lines of corn. *Proceedings of Annual Hybrid Corn Industry Research Conference*, Chicago, v. 34, p. 57 - 75, 1979.
- Harries, H.C. The promise, performance and problems of F1 Hybrid coconuts. In: SILAS, E.G.; Aravindakshan, M.; JOSE, A. L. Coconut breeding and management. Vellanikkara: Kerala Agricultural University, 1991. .39-44p.
- Iyer, R.D., Rao, E.V.V.B., Sukumaran, C.K. and Jacob, P.M. 1981. Towards an ideal plant type concept in coconut. pp. 29-37. In: *Proc of Annual. Symp. Plantn. Crops. PLACROSYMIV.* (Ed.) S. Vishveshwara.
- Jayabose, C., Ganesh, S, Mohanan, K.V. and Arulraj, S. 2008. Estimation of heterosis of economical important characters of coconut (*Cocos nucifera* L.) hybrids. *J. Plantn. Crops* 36 (3): 151-154.
- Jenkins, M. T.; Brunson, A. M. Methods of testing inbred lines of maize in crossbred combinations. *Journal of American Society of Agronomy*, Madison, v. 24, n. 7, p. 523-530, 1932.
- Jucá, M.P., Gaíva, H.N., Pereira, W.E., Mileski, A. (2002) Comportamento vegetativo de seis cultivares de coqueiro-anão (*Cocos nucifera* L.). *Revista Brasileira de Fruticultura*, 24: 463 - 467.

- Linsdstron, E.W. Prepotency of inbred lines on commercial varieties of maize. American Society of Agronomy Journal, Madison, v.23, p.652-661, 1931.
- Loiola, C.M. (2005) Seleção de cultivares de coqueiro com menor porte. Monografia. (Bacharelado em Agronomia) - São Cristóvão - SE, Universidade Federal de Sergipe, 22p.
- Lonnquist, J. H.; Rumbaugh, M. D. Relative importance of test sequence for general and specific combining ability in corn breeding. Agronomy Journal, Madison, v. 50, p. 541-544, 1958.
- Lyanage, D.V. (1950). Sex life of the coconut palm. Ceylon Coconut Quaterly. 2:33-3.
- Martinez, R.T., Baudouin, L., Berger, A., Dolle, M. 2010. Characterization of the genetic diversity of the Tall coconut (*Cocos nucifera* L.) in the Dominican Republic using microsatellite (SSR) markers. Tree Genetics & Genomes 6: 73– 81.
- Meerow AW, Wisser RJ, Brown JS, Kuhn DN, Schnell RJ, Broschat TK (2003). Analysis of genetic diversity and population structure within Florida coconut (*Cocos nucifera* L.) germplasm using microsatellite DNA, with special emphasis on the Fiji Dwarf cultivar. Theor. Appl. Genet., 106: 715-726.
- Ministério da Agricultura, Pesca e Agropecuária - MAPA (2010). Boletim informativo. <http://www.mapa.br> acessado em 27/06/2010
- Noël, Konan K. Jean et al. Microsatellite gene diversity within Philippines dwarf coconut palm (*Cocos nucifera* L.) resources at Port-Bouët, Côte d'Ivoire. Scientific Research and Essays, v. 6, n. 28, p. 5986-5992, 2011.
- Nuce De Lamothe, M., Rognon, F. (1977) Les cocotiers nains à Port – Bouët Nain Jaune Ghana, Nain Rouge Malais, Nain vert Guiné Equatoriale, Nain Rouge Cameroun. Oléagineux, 32(8-9): 367-373.
- Nurmburg, P.L.; Souza, J.C.; Ramalho, M.A.P.; Ribeiro,P.H.E. Desempenho de híbridos simples como testadores de linhagens de milho em top crosses. In:

CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS, 1., 2000, Goiânia. Resumos... (CD-Rom)

- Patel, J. S. (1937). Coconut breeding. Proc. Assoc. £("011. Biol., 5 : 1-16.
- Ramachander, P. R. and Bavappa , K. V. A . (1972). Selected index in arecanut. Indian J. Geller. 32 : 73-76.
- Paterniani E, Sawazaki E, Gallo PB, Luders RR, Da Silva RM (2003) Parâmetros genéticos em um composto de milho e potencial para seleção recorrente. Anais do 2º Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas. Porto Seguro, Bahia.
- Pedroso GT, Santos HCAC dos (2007) Características da Inflorescência de cultivares de coqueiro nas épocas de seca e chuvosa do ano. Editora Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, 15p.
- Pereira, A. R.; Machado, E. C. Análise quantitativa do crescimento de vegetais. Campinas: Instituto Agronômico, 1987. 33 p. (IAC. Boletim técnico, 114).
- Perera, L., Russell, J.R., Provan, J., Powell, W. (2000) Use of microsatellite DNA markers to investigate the level of genetic diversity and population genetic structure of coconut (*Cocos nucifera* L .). Genome, 43: 15–21.
- Poland, J.A.; Brown, P.J.; Sorrells, M.E.; Jannink, J.L. Development of high-density genetic maps for barley and wheat using a novel two-enzyme genotyping-by-sequencing approach. PLoS One 2012, 7, e32253.
- Purseglove, J.W. (1975) Tropical Crops- Monocotyledons Vol. 1 & 2. Longman Ltd. London 607 p.
- Rego Filho, L de M.; Barros, J.C.; Celestino, R.C.A. A cultura do coco verde: perspectivas, tecnologias e viabilidade. Niterói: PESAGRO-RIO, 1999, 48p.
- Rowe HC, Renaut S and Guggisberg A (2011). RAD in the realm of the next-generation sequencing technologies. Molecular Ecology 20: 3499-3502.
- Ribeiro, F.E., Soares, A.R., Ramalho, M.A.P. (1999) Divergência genética entre populações de coqueiro-gigante-do-brasil. Pesquisa Agropecuária Brasileira, 34: 1615–1622.

- Ribeiro, F.E. (2002) Coqueiro. In: Bruckner, C.H. (Ed.). Melhoramento de fruteiras tropicais. Viçosa, MG: UFV, 444 p.
- Ramos, V.H.V et al. Comportamento de cultivares de coqueiros anão e híbridos no Distrito federal. Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal, v. 26, n. 2, p. 363- 365, 2004.
- Ramos, M. I. L.; Siqueira, E. M. A.; Isomura, C. C.; Barbosa, A. M. J.; Arruda, S. F. Bocaiuva (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd) improved Vitamin A status in rats.. Journal of Agricultural and Food Chemistry, Washington, v. 55, n. 8, p. 3186-3190, 2007.
- Rawlings, J. O., and D. L. Thompson. 1962. Performance level as criterion for the choice of maize testers. Crop Sci. 2:217–20.
- Rezende, S. O. Sistemas inteligentes: fundamentos e aplicações, ed Manole, Barueri, 2005.
- Richardson, M.D., D.E. Karcher, and L.C. Purcell. 2001. Quantifying turfgrass cover using digital image analysis. Crop Sci. 41:1884–1888.
- Siqueira, L.A., Aragão, W.M., Tupinambá, E.A. (2002) A introdução do coqueiro no Brasil: Importância agrônômica e histórica. Aracaju-SE: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 24 p. (Documentos).
- Sangaré, A.; LE Saint, J.P.; Nuce de Lamothe, M. Hybrides de cocotiers prometteurs PB-121, PB-132, PB-214. Oléagineux, v.43, n.5., p. 204-213, 1988.
- Santos, M.X.; Pollak, L.M.; Carvalho, H.W.L.; Pacheco, C.A.P.; Gama, E.G.; Guimarães, P.E.O.; Andrade, R.V. Heterotic responses of tropical elite maize accessions from Latin America with Brazilian testers. Scientia Agricola, Piracicaba, v.58, n.4, p.767-775, 2001.
- Sawazaki, E.; Paterniani, M. E. A.G.Z.; Castro, J.L.; Gallo, P.B.; Galvão, J.C.G.; Saes, L. A. Potencial de linhagens locais de milho-pipoca para síntese de híbridos. Bragantia, Campinas, v. 59, n. 2, p. 143-151, 2000.

- Siqueira, E.R., Ribeiro, F.E., Aragão, W.M., Tupinambá, E.A. (1998) Melhoria Genética do coqueiro. In: Ferreira, J.M.S., Warwick, D.R.N., Siqueira, L.A. A cultura do coqueiro no Brasil. 2ªed. Brasília: Spi, p. 57-64.
- Siqueira, L. A. de; Siqueira, E.R.; Ribeiro, F.E. Comportamento de híbridos de coqueiro no Nordeste do Brasil. Plantation Recherche Development, Paris, v.2, n.1, 48-53, 1995.
- Sobral, K.M.B. (2010) Divergência genética entre acessos de coqueiro anão para caracteres morfológicos e agronômicos na baixada litorânea de sergipe. Tese (Mestrado em Agroecossistemas) – São Cristóvão – SE, Universidade Federal de Sergipe, 98p.
- Tavares-Júnior, J.E.; Favarin, J.L.; Dourado-Neto, D.; Maia, A.H.N.; Fazouli, L.C.; Bernardes, M.S. Análise comparativa de métodos de estimativa de área foliar em cafeeiro. Bragantia, Campinas, v.61, n.2, p.199-203, 2002.
- Teulat, B., Aldam, C., Trehin, R., Lebrun, P., Barker, J.H.A., Arnold, G.M., Karp, A., Baudouin, L., Rognon, F. (2000) Analysis of genetic diversity in coconut (*Cocos nucifera* L.) populations from across the geographic range using sequence-tagged microsatellites (SSRs) And RFLPs. Theoretical Applied Genetics 100: 764-771.
- United Nations Conference on Trade and Development (UNCTAD), 2013.
- Yu, C.H, Chang, H.C., and Huang, G.L. (2006), "A study of service quality, customer satisfaction and loyalty in Taiwanese leisure industry", Journal of American Academy of Business, Cambridge, Vol. 9 No. 1, pp.126-132
- Zushun, M. A NEW COCONUT HYBRID, wy78f1. Oléagineux, Paris, v.49, n.2, p.49-54, 1994.