

CONTEÚDO DE DNA (2C) E PLOIDIA DE ACESSOS DE *Solanum commersonii* (SOLANACEAE) DO BANCO ATIVO DE GERMOPLASMA DA EMBRAPA

RODRIGO NICOLAO¹; ARYANE CAMPOS²; SAULO MARÇAL DE SOUZA²
CAROLINE MARQUES CASTRO³ GUSTAVO HEIDEN³

¹Universidade Federal de Pelotas – rodrnicolao@gmail.com

²Universidade Federal de Juíz de Fora – saulo.marcal@ufjf.edu.br

²Universidade Federal de Juíz de Fora – arylene.campos@yahoo.com.br

³Embrapa Clima Temperado – caroline.castro@embrapa.br

³Embrapa Clima Temperado – gustavo.heiden@embrapa.br

1. INTRODUÇÃO

O conhecimento do conteúdo de DNA nuclear é importante para definir estratégias de pré-melhoramento nos programas de melhoramento genético de plantas (PELLICER; LEITCH 2014; SHILPHA et al. 2014). Por exemplo, a hibridação entre genitores com ploidia diferente geralmente causa falhas no pareamento cromossômico, pode resultar em progênie com níveis de ploidia diferentes daqueles dos pais e inférteis (SUDA ET AL. 2007; NORDEN et al. 2020). A quantidade de DNA nuclear (valor = 2C) ou o tamanho do genoma é mensurado em picogramas (1×10^{-9} g) ou em pares de megabases (Mbp, onde 1pg = ~978 Mbp, de acordo com Dolezel et al. 2007). O valor C refere-se à estabilidade da quantidade de DNA nuclear de um organismo em um complemento cromossômico monoploide, independentemente da ploidia. Uma vez que o conteúdo de DNA (2C) está relacionado ao nível de ploidia, a citometria de fluxo é uma alternativa mais rápida e eficiente em comparação a outros métodos como a contagem de cromossomos (DOLEZEL et al. 1997; DOLEZEL et al. 2007). Quantidades de DNA podem ser analisados com alta precisão, com coeficientes de covariação (CV) dos picos de DNA geralmente entre 1 a 5% (BENNETT; LEITCH 2011).

Solanum commersonii Dunal (Solanaceae) (Figura 1) é um parente silvestre da batata cultivada (*S. tuberosum* L.), nativo do sul da América do Sul, com distribuição geográfica na Argentina, Brasil, Paraguai e Uruguai (SPOONER et al. 2016). A espécie é alocada no pool gênico terciário da cultura, é incompatível sexualmente com a cultura, porém tem grande importância no melhoramento da cultura da batata (*S. tuberosum*), por conter características de resistência aos diversos estresses bióticos e abióticos (BASHIR et al. 2021).

Com vistas a fornecer subsídios para a curadoria de germoplasma e a tomada de decisão no pré-melhoramento e em programas de melhoramento genético da batata, o objetivo deste estudo foi estimar o conteúdo de DNA (2C) e inferir a ploidia de 24 acessos de *S. commersonii* conservados no Banco de Germoplasma de Batata da Embrapa Clima Temperado.

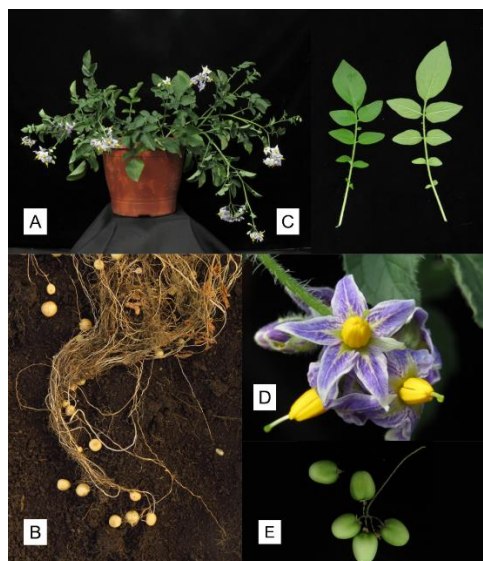


Figura 1. *Solanum commersonii*. Partes da planta provida de diferentes acessos: A) Hábito da planta (BGB459, *Klasen et al.* 7), B) Tubérculos (BGB001, *Delorge M.C.* 8), C) Folhas (BGB001, *Delorge M.C.* 8), D) Flor (BGB004, *Pereira A.S.* 21), E) Frutos (BGB004, *Pereira A.S.* 21).

2. METODOLOGIA

Uma planta por acesso foi cultivada a partir do plantio de tubérculo em vaso de 5L contendo substrato TurfaFértil® e nutrição suplementar recomendada para a cultura da batata. Foram coletadas folhas jovens (30 mg por acesso), que foram fragmentadas em 700 µL de tampão de extração WPB. A solução foi filtrada em uma tela de nylon (50 µm) e adicionada de 25 µL de tampão de extração com 1 mg/mL de iodeto de propídeo e 5 µL de RNase. A suspensão obtida permaneceu por 1 hora no escuro a temperatura ambiente. Para cada amostra 10.000 núcleos foram analisados usando escala logarítmica, em citômetro de fluxo CytoFLEX LX (Beckman Coulter). Folhas de *Pisum sativum* L. foram utilizadas como padrão interno (9,09 pg/2C) (DOLEZEL et al. 2007). Para cada acesso foram realizadas 3 leituras. O conteúdo 2C foi calculado usando o pico médio de 3 repetições por amostra e do padrão interno. Somente medidas com coeficientes de variação menores que 5% foram consideradas.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os coeficientes de variação encontrados para os picos G1 variaram de 3,04% a 5% nas amostras analisadas. Foram inferidos dois níveis de ploidia nos acessos analisados de *S. commersonii*: diploide (2x) - BGB003, BGB009, BGB011, BGB027, BGB030, BGB045, BGB048, BGB051, BGB055, BGB059, BGB063, BGB068, BGB072, BGB077, BGB455 e BGB460; e triploide (3x) - BGB008, BGB037, BGB053, BGB067, BGB085, BGB459, BGB470 e BGB490.

O conteúdo de DNA (2C) observado variou entre 1,96 a 3,67 pg (Tabela 1). A variação no conteúdo 2C de DNA nuclear foi de 1,96 a 2,03 pg nos diploides e 2,64 a 3,67 nos triploides. BGB003 apresentou o menor conteúdo de DNA entre os diploides (1,96 pg) e BGB067 (3,67 pg) o maior. Entre os triploides, BGB053 apresentou o menor valor (2,64 pg), enquanto BGB067 (3,67 pg) apresenta o maior valor medido.

Tabela 1. Acessos de batata-silvestre (*Solanum commersonii*) do Banco de Germoplasma de Batata (BGB) da Embrapa Clima Temperado. Código do acesso seguido pelo conteúdo de DNA (picogramas) e ploidia inferida.

Acesso	DNA pg	ploidia inferida	Acesso	DNA pg	ploidia inferida
BGB003	1,96	diploide	BGB059	1,97	diploide
BGB008	2,90	triploide	BGB063	2,03	diploide
BGB009	1,91	diploide	BGB067	3,67	triploide
BGB011	1,63	diploide	BGB068	1,92	diploide
BGB027	1,75	diploide	BGB072	1,89	diploide
BGB030	1,85	diploide	BGB077	1,95	diploide
BGB037	3,06	triploide	BGB085	3,05	triploide
BGB045	1,91	diploide	BGB455	1,61	diploide
BGB048	1,82	diploide	BGB459	2,86	triploide
BGB051	1,94	diploide	BGB460	1,55	diploide
BGB053	2,64	triploide	BGB470	2,89	triploide
BGB055	1,97	diploide	BGB490	2,84	triploide

A citometria de fluxo tem sido rotineiramente utilizada para estimar o conteúdo de DNA e a ploidia em programas de melhoramento genético de diversas culturas agrícolas, assim como em diferentes espécies, a exemplo de banana (*Musa acuminata* e *M. balbisiana*) (DOLEZEL et al. 1994), mirtilo (*Vaccinium elliottii*) (NORDEN et al. 2020), e gramíneas forrageiras (*Festuca ovina*) (Qui et al. 2020). Por exemplo, o pool gênico de espécies de batata é composto por diferentes grupos designados por combinação do número do balanço endospermico e ploidia que incluem 2x(1EBN), 2x(2EBN), 4x(2EBN), 4x(4EBN) and 6x(4EBN) (Bradeen et al. 2011; Spooner et al. 2014), desta forma, sendo a batata cultivada tetraploide, o conhecimento prévio dos valores de ploidia auxiliará a introgressão de diversidade genética a partir das espécies-silvestres aparentadas mais distantes, seja pela manipulação cromossômica, via gametas não-reduzidos (pólen ou óvulo 2n) ou pela utilização de espécie-ponte, assim como manter a estabilidade genética da progênie (MANSUELLI; CAMADRO 1997).

4. CONCLUSÕES

A citometria de fluxo possibilitou estimar a quantidade de DNA e estimar a ploidia de 24 acessos de *S. commersonii* do Banco de Germoplasma de Batata da Embrapa Clima Temperado.

Estudos citogenéticos futuros possibilitarão confirmar a ploidia inferida nos acessos de *S. commersonii* do Banco de Germoplasma de Batata da Embrapa Clima Temperado de modo favorecer o direcionamento dos cruzamentos visando a introgressão de características de interesse para o germoplasma da batata-cultivada.

AGRADECIMENTOS: Bolsa de doutorado CAPES, CAPES/PROAP, CNPq, Universal (429368/2016-0), PQ2 (314590/2020-0), FAPERGS 19/2551-0001703-0.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AVERSANO, R.; CONTALDI, F.; ERCOLANO, M.R.; GROSSO, V.; IORIZZO, M.; TATINO, F.; XUMERLE, L.; DAL MOLIN, A.; AVANZATO, C.; FERRARINI, C.; DELLEDONMNE, M.; SANSEVERINO, W.; CIGLIANO, R.A.; CAPELLA-

- GUTIERREZ, S.; GALBADON, T.; FRUSCIANTE, L.; BRADEEN, J.J.; CARPUTO, D. The *Solanum commersonii* genome sequence provides insights into adaptation to stress conditions and genome evolution of wild potato relatives. **The Plant Cell**, 27(4), 954-968. 2015.
- BASHIR, I.; NICOLAO, R.; HEIDEN, G. Wild potatoes: A genetic reservoir for potato breeding. In: Wild Germplasm for Genetic Improvement in Crop Plants. Academic Press, 2021. Cap.12, p.215 – 240.
- BENNETT, M.D.; LEITCH, I.J. Nuclear DNA amounts in angiosperms: Targets, trends and tomorrow. **Annals of Botany**, 107, 467–590. 2011
- BRADEEN, J.M.; HAYNES, K.G.; KOLE, C. Classical genetics and traditional breeding. **Genetics, Genomics and Breeding of Potato**, 2011. p 20–40.
- DOLEŽEL, J. Flow cytometry, its application and potential for plant breeding. In: LELLEY, T. Current topics in plant cytogenetics related to plant improvement. Vienna: **WUV-Universitätsverlag**, p.80–90. 1997
- DOLEŽEL, J.; DOLEŽELOVÁ, M.; NOVÁK, F.J. Flow cytometric estimation of nuclear DNA amount in diploid bananas (*Musa acuminata* and *M. balbisiana*). **Biologia Plantarum**, 36(3), 351–357. 1994.
- DOLEŽEL, J.; GREILHUBER, J.; SUDA, J. Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry. *Nature protocols*, 2(9), 2233-2244. 2007.
- MASUELLI, R.W.; CAMADRO, E.L. Crossability relationships among wild potato species with different ploidies and Endosperm Balance Numbers (EBN). **Euphytica** 94(2):227–235. 1997.
- NORDEN, E.H.; LYRENE, P.M.; CHAPARRO, J.X. Ploidy, fertility, and phenotypes of F1 hybrids between tetraploid highbush blueberry cultivars and diploid *Vaccinium elliotii*. *HortScience*, 55(3), 281-286. 2020.
- Otieno, S.A.; Collins, P.; Coombs, J.; Allen, C.; Douches, D.S. Screening for *Ralstonia solanacearum* Resistance in *Solanum commersonii*. *American Journal of Potato Research*, 98(1), 72-77. 2021.
- PELLICER, J.; LEITCH, I.J. The Application of Flow Cytometry for Estimating Genome Size and Ploidy Level in Plants. In: P. Besse (ed.) *Molecular Plant Taxonomy: Methods and Protocols*, Methods in Molecular Biology, p.279–307. 2014.
- QIU, Y.; HAMERNICK, S.; ORTIZ, J.B.; WATKINS, E. DNA content and ploidy estimation of *Festuca ovina* accessions by flow cytometry. **bioRxiv**. 2020.02.06.938100; doi: <https://doi.org/10.1101/2020.02.06.938100>. 2020.
- SHILPHA, J.; SILAMBARASAN, T.; LARGIA, M.J.V.; RAMESH, M. Improved in vitro propagation, solasodine accumulation and assessment of clonal fidelity in regenerants of *Solanum trilobatum* L. by flow cytometry and SPAR methods. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, 117(1), 125-129. 2014.
- SPOONER, D.M.; ALVAREZ, N.; PERALTA, I.E.; CLAUSEN, A.M. Taxonomy of wild potatoes and their relatives in Southern South America (*Solanum* sects. *Petota* and *Etuberosum*). **Systematic Botany Monographs**. 2016. 100:1–240+10 plates.
- SPOONER, D.M.; GHISLAIN, M.; SIMON, R.; JANSKY, S.H.; GAVRILENKO, T. Systematics, diversity, genetics, and evolution of wild and cultivated potatoes. **Botanical Review**. 80:283–383. 2014.
- SUDA, J.; KRON, P.; HUSBAND, B.C.; TRÁVNÍČEK, P. Flow cytometry and ploidy: applications in plant systematics, ecology and evolutionary biology. **Flow cytometry with plant cells: Analysis of genes, chromosomes and genomes**, 103-130. 2007.