



Faculdade de Agronomia
Eliseu Maciel
Fundada em 1883

Current Agricultural Science and Technology

journal homepage: <http://periodicos.ufpel.edu.br/ojs2/index.php/CAST/index>



Estimativa da quantidade de DNA em morangueiro

Estimated DNA content in strawberry

Guimarães AG¹, Andrade Júnior VC², Pio LAS³ and Pasqual M⁴

¹ Eng^a Agr^a. Aluna de Mestrado em Produção Vegetal da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri-UFVJM, Rua Brasília, 582-Centro-Paraopeba/MG- Brasil, CEP: 35774-000, email: amandagguimaraes@yahoo.com.br.

² Eng^o Agr^o. Professor Titular na Área de Olericultura da UFVJM, email: valterjr@ufvjm.edu.br.

³ Eng^a Agr^a. Pós Doutorado na Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical em parceria com Universidade Federal de Lavras-UFLA- Lavras/MG, e-mail: leilapio.ufla@gmail.com.

⁴ Eng^o Agr^o. Professor Titular na Área de Cultura de Tecidos Vegetais da UFLA, email: mpassqual@dag.ufla.br.

RESUMO

A estimativa da quantidade de DNA é importante no melhoramento genético de plantas devido ser reconhecida para caracterização genômica, auxiliar estudos evolutivos, verificar níveis de ploidia em resultados de cruzamentos, entre outras finalidades. O objetivo deste trabalho foi estimar a quantidade de DNA de oito cultivares de morangueiro. Para a realização das análises foram usados discos foliares de cada cultivar retirados de folhas expandidas jovens e como padrão interno de referência folhas jovens de ervilha. Os dados analisados foram submetidos a análises estatísticas e foram gerados histogramas para cada cultivar analisada e coeficientes de variação. Para cada amostra foram analisados 10.000 núcleos. A cultivar Campinas foi a que apresentou maior valor de quantidade de DNA, não diferindo das cultivares Aromas, Camarosa, Diamante, Dover, Festival e Toyonoka. A cultivar Oso Grande apresentou menor quantidade, o que pode ser devido a um menor tamanho dos cromossomos desta variedade ou mutações devido a perdas cromossômicas, porém para se ter certeza é necessário fazer estudos futuros de análises citogenéticas.

Palavras-chave: Citometria de fluxo; Ploidia; Melhoramento genético.

ABSTRACT

The estimate of the amount of DNA is important in plant breeding due to be recognized for genomic characterization, auxiliary in evolutionary studies, to verify ploidy levels results in intersections, among other purposes. The aim of this study was to estimate the amount of DNA from eight strawberry cultivars. For the analyzes were used leaf discs taken from each cultivar from young and expanded leaves and as internal reference standard from young leaves of pea. Data were subjected to statistical analyses and histograms were generated for each analyzed cultivar and coefficients of variation. For each sample 10,000 nuclei were analyzed. The Campinas cultivar showed the highest amount of DNA, and did not differ from Aromas, Camarosa, Diamante, Dover, and Toyonoka Festival. Oso Grande cultivar showed the lowest amount of DNA, which may be due to smaller chromosome size or chromosomal mutations due to losses, but to be sure it is necessary to make future studies of cytogenetic analysis.

Key words: Flow cytometry; Ploidy; Breeding

INTRODUÇÃO

O morango é uma planta pertencente à família Rosaceae e ao gênero *Fragaria*, que compreende dezessete espécies silvestres classificadas com base no nível de ploidia, que são diplóides, tetraplóides hexaplóides e octoplóides, sendo o número cromossômico básico igual a sete ($x = 7$) (Rios, 2007).

As espécies octoplóides, ($2n = 8x = 56$) *Fragaria chiloensis* e *Fragaria virginiana*, resultaram através da hibridação natural, o híbrido *Fragaria x ananassa* Duch. ex Rozier, originando às cultivares comerciais atualmente cultivadas (Castro, 2004; Silva et al. 2007). Brighhurst (1990) sugeriu a fórmula genômica AAA'A'BBB'B' (2A2A'2B2B') aos octaplóides em função das evidências citológicas e genéticas que sugerem que essas espécies sejam poliplóides dissômicos, com comportamento meiótico similar ao dos diplóides.

Em 2010 a produção mundial foi de 4.356.834 toneladas, para uma área total plantada de 241.974 hectares e com uma produtividade média de $18 \text{ t} \cdot \text{ha}^{-1}$ (Fao, 2012). Os Estados Unidos é o primeiro colocado na produção mundial com aproximadamente 30% do total, sendo esta quase 4 vezes maior que a do segundo colocado, a Turquia. A maior produtividade dessa cultura também é obtida nos Estados Unidos, com $56 \text{ t} \cdot \text{ha}^{-1}$, seguido do Kuwait e da Espanha com 48 e $39 \text{ t} \cdot \text{ha}^{-1}$, respectivamente. O Brasil obteve produtividade média de apenas $8 \text{ t} \cdot \text{ha}^{-1}$ em 2010 (Fao, 2012).

O morangueiro é produzido e apreciado nas mais variadas regiões do mundo, sendo a cultura destacada pela alta rentabilidade por área e demanda intensa de mão-de-obra (Conti et al. 2002). Além de suas características sensoriais e nutricionais bem atrativas vêm ganhando importância tanto nos programas de melhoramento, quanto na apreciação pelos consumidores (Castro et al. 2004; Brackmann et al. 2011).

A caracterização das cultivares e a estimativa da variabilidade genética disponível para o melhoramento genético são informações úteis na escolha de genitores para cruzamentos entre genótipos divergentes. Para isso, há a necessidade de realizar esta distinção e

relacionar ao tamanho do genoma de cada um, para assim evitar a incompatibilidade reprodutiva (Ochatt, 2006). A caracterização morfológica é a maneira mais simples e de menor custo na busca de descritores que possibilitem caracterizar as cultivares, no entanto apresenta limitações como as grandes semelhanças fenotípicas entre estas (Oliveira et al. 2000).

A fim de realizar esse tipo de trabalho existem métodos mais modernos, como citometria de fluxo e marcadores moleculares (Schifino-Wittmann, 2001). A citometria de fluxo pode ser usada para mensurar a quantidade de DNA, ploidia, ciclo celular, complexidade das células, identificação de proteínas presentes no metabolismo de um determinado indivíduo, e assim possibilitar a seleção de genótipos pertencentes a uma mesma espécie que apresentam características desejáveis, como melhor adaptação ao clima local, para o melhoramento de plantas (Kim et al. 2003; Dolezel e Bartos, 2005).

A determinação do conteúdo de DNA nuclear em plantas tem sido reconhecida como um relevante parâmetro para caracterização genômica, podendo também auxiliar estudos evolutivos (Knight e Beaulieu, 2008), identificação de haplóides e duplohaplóides em culturas de anteras e ovários, verificar novos níveis de ploidia em resultados de cruzamentos, detectar aneuplóides (que se refere à perda ou adição de cromossomos inteiros isolados), identificar híbridos, polisomatia, sexo de plantas dióicas, acompanhar o desenvolvimento da semente e identificar o produto da fusão de protoplastos (Bennet e Leitch, 1995; Dolezel, 1997). Esta técnica envolve a análise das propriedades ópticas (dispersão da luz e fluorescência) de partículas que podem ser células, núcleos, cromossomos, dentre outras (Dolezel, 1997).

A citometria de fluxo é um método rápido para detecção de aneuploidia em *Musa*, para avaliar o grau de polisomatia, para vias de reprodução e para via cinética do ciclo celular (Barow e Meister, 2003; Roux et al. 2003; Matzk et al. 2000; Sandoval et al. 2003).

Este trabalho teve como objetivo estimar a quantidade de DNA nuclear em diferentes cultivares de morangueiro.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no laboratório de cultura de tecidos vegetais do Departamento de Agricultura pertencente à Universidade Federal de Lavras, em Lavras-MG.

Foram utilizadas plantas matrizes de morangueiro (*Fragaria x ananassa* Duch.), provenientes da empresa Multiplanta Biotecnologia Vegetal, localizada na cidade de Andradas-MG. As cultivares avaliadas foram de dias curtos: Camarosa, Campinas, Dover, Florida Festival, Oso Grande, Toyonoka, e de dias neutros: Aromas e Diamante (Howard e Albrechts, 1980; Chandler et al. 2006) conforme a Tabela 1.

Tabela 1. Relação dos genótipos utilizados como genitores no trabalho, país de origem e ano de lançamento das cultivares de morango. UFLA, Lavras, 2012

Cultivar	País de origem	Genitores	Ano
Aromas	USA	'Cal.87.1126'x'Cal.88.2701'	1991
Campinas	Brasil	Donner x Tahoe.	1960
Camarosa	USA	Douglas x 'Cal.85.218605'	1988
Diamante	USA	'Cal.87.1126'x'Cal.88.2701'	1992
Dover	USA	Florida Belle x 'Fla. 71189'	1973
Flórida Festival	USA	Rosa Linda x Oso Grande	1995
Oso Grande	USA	Parker x 'Cal.77.3603'	1981
Toyonoka	Japão	Himiko x Harunoka	1983

O plantio das matrizes foi feito em agosto de 2012 em vasos de 4 L com 100% de substrato Vida Verde Tropstrato® hortaliças (casca de pinus compostada, turfa e carvão vegetal). O delineamento estatístico utilizado foi o inteiramente casualizado com oito cultivares, seis repetições (sendo que cada parcela corresponde a uma planta). A adubação foi realizada semanalmente com 10 ml em cada vaso, com os sais e vitaminas do meio MS composição em (mg/l): Macronutrientes: CaCl₂.2H₂O 440; KH₂PO₄ 170; KNO₃ 1900; MgSO₄.7H₂O 370; NH₄NO₃ 1650; Micronutrientes: CoCl₂.6H₂O 0,025; CuSO₄.5H₂O 0,025; H₃BO₃ 6,2; KI 0,83; MnSO₄ 4H₂O 22,3; Na₂MoO₄.2H₂O 0,25; ZnSO₄.7H₂O 8,6; Fe(SO₄).7H₂O 27,8; Na₂EDTA.2H₂O 37,2; Orgânicos: Ácido nicotínico 0,5; Glicina 2,0; Mio-inositol 100; Piridoxina.HCl 0,5; Tiamina.HCl 0,5. A irrigação foi feita manualmente por regador diariamente de acordo com as necessidades da cultura.

Para a determinação do conteúdo de DNA foram utilizados discos foliares, com 6 mm de diâmetro, de folhas jovens totalmente expandidas das plantas mantidas em vasos em

casa de vegetação após 3 meses de plantio. Foi utilizado como padrão interno de referência folhas jovens de ervilha *Pisum sativum* (2C=9,09 picogramas (pg) de DNA). As amostras foram trituradas em uma placa de Petri contendo 1 mL de tampão de extração Marie gelado para a obtenção da suspensão nuclear (Dolezel, 1997). Após o processo de extração, a suspensão de núcleos foi aspirada através de duas camadas de gaze, com auxílio de uma pipeta de Pasteur e filtrada através de uma malha de 50 µm. Os núcleos foram corados pela adição de 25 µL de uma solução de 1mg/1mL de iodeto de propídeo e colocados no citômetro FacsCalibur (BD, Biosciences, San Jose, CA, USA).

Os histogramas foram obtidos com o software Cell Quest (Becton Dickinson e Companhia, San Jose, CA, USA) e os coeficientes de variação (CV) foram analisados no software WinMDI 2.8. Para cada amostra foram analisados 10.000 núcleos, sendo descartadas aquelas com coeficiente de variação (CV) maior que 3%.

A Figura 1 mostra a fórmula que estima o conteúdo de DNA nuclear das plantas.

$$DNA\ amostra = \left(\frac{G1\ amostra}{G1\ padrão} \right) \times DNA\ padrão$$

Figura 1. Fórmula referente ao cálculo do DNA nuclear das cultivares de morangueiros. DNA amostra= quantidade de DNA nuclear da amostra (pg); G1 amostra= posição do pico G1 da amostra; G1 padrão= posição do pico G1 de espécie padrão de referência utilizada; DNA padrão = conteúdo de DNA da espécie padrão de referência utilizada.

Os resultados foram submetidos à análise de variância pelo teste F com médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade utilizando o programa SISVAR (Ferreira, 2008).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os quadrados médios para a cultivar foram significativos a 5% de probabilidade pelo teste F, o que demonstra que houve diferenças entre as cultivares avaliadas (Tabela 2).

Tabela 2. Quadrados médios das cultivares de morangueiro e do erro, média geral e coeficiente de variação (CV%). UFLA, Lavras, 2012

FV	GL	QM
Cultivar	7	0,11*
Erro	40	0,013
Média	2,67	
CV (%)	4,20	

* significativo a 5% de probabilidade pelo teste F.

A significância para a quantidade de DNA indica que as cultivares comportaram-se diferentemente quanto ao tamanho do genoma. Essa ligeira variação pode ser devido a pequenas amplificações ou a deleções de seqüências de DNA nos cromossomos durante o processo de

hibridização, o que pode alterar o tamanho do genoma sem uma mudança simultânea no número de cromossomos (Willians et al. 1990).

A análise de comparação de médias entre as cultivares estudadas para a quantidade de DNA pode-se ser vista na Tabela 3.

Tabela 3. Estimativa da quantidade 2C de DNA obtida por citometria de fluxo e coeficiente de variação, de diferentes cultivares de morangueiro. UFLA, Lavras, 2012

Cultivares	DNA (pg) ¹	CV (%)
Aromas	2.62 a	1,31
Camarosa	2.75 a	1,25
Campinas	2.81 a	1,21
Diamante	2.70 a	1,44
Dover	2.71 a	1,36
Festival	2.74 a	1,11
Oso Grande	2.36 b	1,55
Toyonoka	2.69 a	1,48

¹ Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Os valores dos coeficientes de variação (CV) obtidos foram baixos, demonstrando a qualidade e a confiabilidade dos resultados nas estimativas da quantidade de DNA, uma vez que valores de até 2% são considerados de alta qualidade (Marie e Brow, 1993). Esses baixos níveis de coeficiente de variação possibilitam

detectar a ausência de um único par cromossômico, podendo diferenciar cultivares de mesma ploidia. (Dolezel e Bartos, 2005).

A estimativa da quantidade de DNA apresentou diferença apenas para a cultivar Oso Grande quando comparadas com as demais cultivares. Essa cultivar apresentou menor

quantidade de DNA (2,36 pg). Esse fato pode ser devido a um menor tamanho dos cromossomos desta cultivar, porém para se ter certeza é necessário fazer análises citogenéticas. Uma outra possibilidade para este resultado é que a cultivar Oso Grande pode ter perdido partes de cromossomos ao longo das gerações, visto que é uma planta que se propaga vegetativamente, e está susceptível a mutações (Roux et al. 2003). Estudos futuros em caracterização do núcleo interfásico e às informações cariotípicas complementares a quantificação do DNA nuclear serão importantes, pois esta diferença do conteúdo de DNA de alguns genótipos de mesma espécie pode ser atribuída ao conteúdo nucleotípico por meio de efeitos em parâmetros como volume nuclear e celular, tempo dos ciclos mitótico e meiótico e pequenos rearranjos cromossômicos (Nunes et al. 2009).

Loureiro et al. (2007) encontraram conteúdo de DNA para a espécie *Figus carica de* 0,7 pg, valores abaixo aos encontrados nas cultivares de morangueiro estudadas. Korban et al. (2009) encontraram diferenças significativas no conteúdo de DNA de espécies diplóides do gênero *Mallus*, o tamanho do genoma variou entre 1,44 e 1,72 pg. Baird et al. (1994) afirmaram que o genoma diplóide de pêsego é relativamente pequeno e foi estimado em $0,60 \pm 0,03$ pg, valores menores que no presente estudo nas cultivares de morangueiro. Para Greilhuber (2005) a velocidade do desenvolvimento do vegetal, depende em parte do tamanho do genoma, sendo os de menor conteúdo de DNA tem o desenvolvimento e ciclo celular mais rápidos, ou seja, plantas de ciclos reprodutivos curto (plantas anuais), têm em média genomas menores do que aquelas com ciclos longos, como plantas perenes.

Na Figura 2 é possível observar os histogramas para cada cultivar.

O primeiro pico de cada histograma corresponde a quantidade de DNA de células da fase G1 da intérfase das cultivares de morangueiro e o segundo pico corresponde a células da fase G1 da intérfase do padrão de referência interno. Observando a média da quantidade de fluorescência de ambos os picos e comparando com o índice de DNA do padrão

interno (9,09 pg de DNA) é possível obter a quantidade de DNA da amostra desejada, que neste caso é o morangueiro. Quanto menor a quantidade de DNA, mais a esquerda o pico se formará. No caso da cultivar Oso Grande existe um deslocamento do pico, embora discreto, para a esquerda em relação a todas as outras cultivares.

CONCLUSÃO

A cultivar Campinas foi a que apresentou maior valor de quantidade de DNA, não diferindo das cultivares Aromas, Camarosa, Diamante, Dover, Festival e Toyonoka. A cultivar Oso Grande apresentou menor quantidade de DNA, o que pode ser devido a um menor tamanho dos cromossomos desta variedade ou mutações devido a perdas cromossômicas, porém para se ter certeza é necessário fazer estudos futuros de análises citogenéticas.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq, Fapemig e Capes pela disponibilização de bolsas de estudo e recursos financeiros para desenvolvimento do projeto. A empresa Multiplanta Biotecnologia Vegetal Ltda pela doação das matrizes de morangueiro.

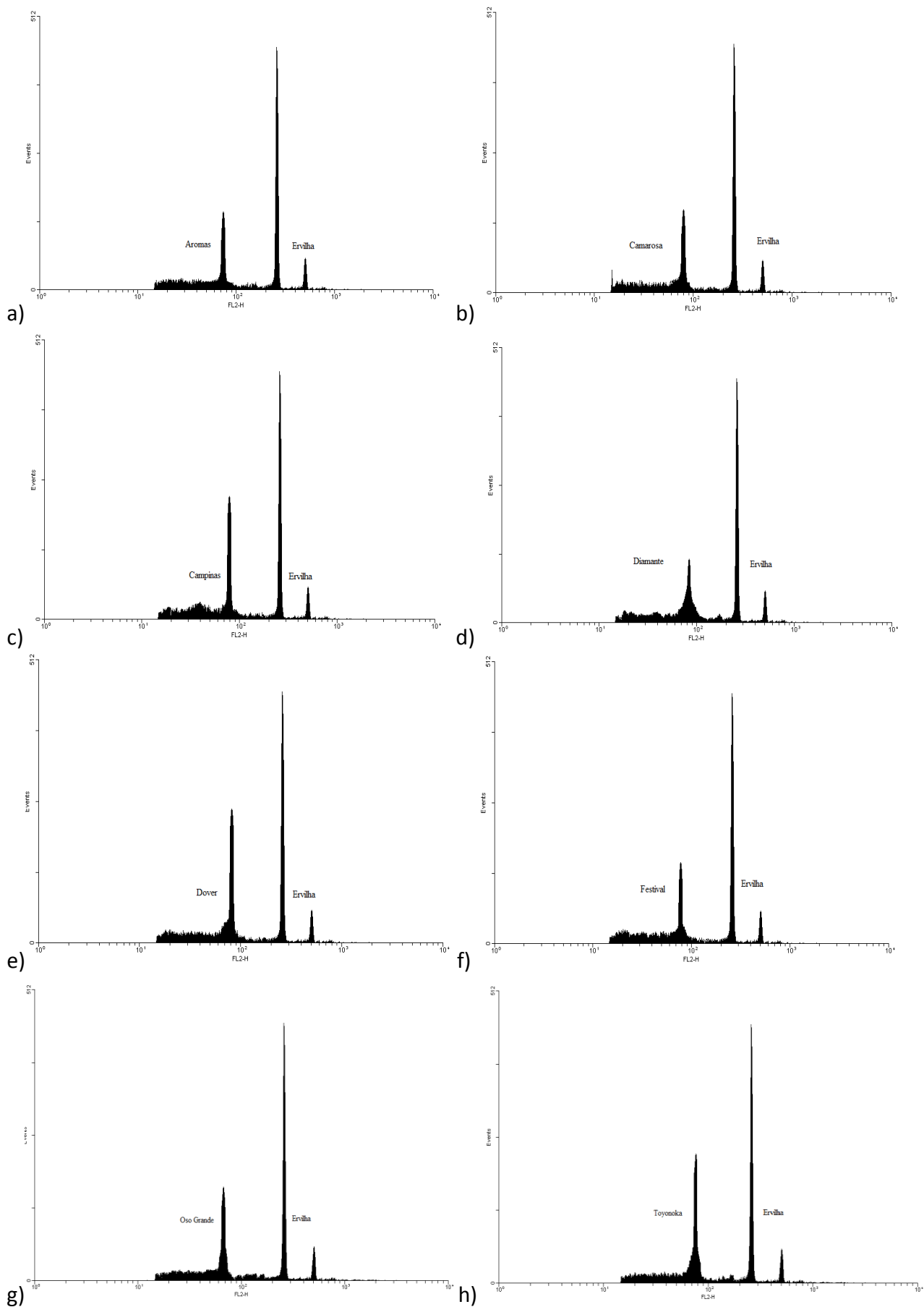


Figura 2. Histogramas de citometria de fluxo em núcleos de cultivares de morango (pico à esquerda) e ervilha (padrão de referência representado no pico à direita); a) Aromas, b) Camarosa, b) Campinas, d) Diamante, e) Dover, f) Festival, g) Oso Grande, h) Toyonoka. UFLA, Lavras, 2012.

REFERÊNCIAS

- Baird WV, Estager AS, Wells JK (1994) Estimating Nuclear DNA Content in Peach and Related Diploid Species Using Laser Flow Cytometry and DNA Hybridization. *Journal American Society for Horticultural Science*, 119: 1312–1316.
- Barow M e Meister A (2002) Lack of correlation between AT frequency and genome size in higher plants and the effect of nonrandomness of base sequences on dye binding. *Cytometry*, 47:1–7.
- Bennet MD e Leitch IJ (1995) Nuclear DNA amounts in angiosperms. *Annals of Botany*, 76:113-176.
- Brackmann A, Pavanello EP, Both V et al. (2011) Avaliação de genótipos de morangueiro quanto à qualidade e potencial de armazenamento. *Revista Ceres*, 58:542-547.
- Bringhurst RS (1990) Cytogenetics and evolution in American. *HortScience*, 25:879-881.
- Castro RL. Melhoria Genética do Morangueiro: Avanços no Brasil. In: Documentos 124: II Simpósio Nacional do Morango e I Encontro sobre Pequenas Frutas e Frutas Nativas do Mercosul, 2004, resumo...Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2004. p. 22-36.
- Chandler CK, Mertely JC, Peres N (2006) Resistance of selected strawberry cultivars to anthracnose fruit rot and botrytis fruit rot. *Acta Horticulturae*, 708:123-126.
- Conti JH, Minami K, Tavares FCA (2002) Produção e qualidade de frutos de morango em ensaios conduzidos em Atibaia e Piracicaba. *Horticultura Brasileira*, 20:10-17.
- Dolezel J (1997) Application of flow cytometry for the study of plants genomes. *Journal of Applied Genetics*, 38:285-302.
- Dolezel J e Bartos J (2005) Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. *Annals of Botany*, 95:99-110.
- Fao. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Faostat: Agricultural Production/strawberry. Disponível em : <<http://faostat.fao.org>>. Acessado em: 10 de setembro de 2012.
- Ferreira DF (2008) SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. *Revista Symposium*, 6:36-41.
- Greilhuber J (2005) Intraspecific Variation in Genome Size in Angiosperms: Identifying its Existence. *Annals of Botany*, 95:91-98.
- Howard CM e Albrechts EE (1908) 'Dover' Strawberry. *HortScience*, 15:540.
- Kim KM, Baenziger PS, Rybczunski JJ, Arumugathan K (2003) Characterization of ploidy levels of wheat microspore-derived plants using laser flow cytometry. *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant*, 39:663-668.
- Knight CA e Beaulieu JM (2008) Genome Size through Phenotype Space. *Annals of Botany*, 101:759-766.
- Korban SS, Wannarat W, Rayburn CM, Tatum TC, Rayburn AL (2009) Genome size and nucleotypic variation in *Malus* germplasm. *Genome*, v.52:148-155.
- Loureiro J, Rodriguez E, Dolezel J, Santos C (2007) Two new nuclear isolation buffers for plant DNA flow cytometry: a test with 37 species. *Annals of Botany*, 100:875–888.
- Marie D e Brown S (1993) A cytometric exercise in plant DNA histograms, with 2C values for 70 species. *Biology of the Cell*, 78: 41-51.
- Matzk F, Meister A, Schubert I (2000) An efficient screen for reproductive pathways using

mature seeds of monocot and dicots. *The Plant Journal*, 21:97–108.

Nunes JD, Torres GA, Davide LC, Campos JMS (2009) Chromosome banding and DNA content in tropical *Pinus* species. *Scientia Forestalis*, 37: 213-218.

Ochatt SJ. Flow cytometry: Ploidy determination, cell cycle analysis, DNA content per nucleus. In: *Medicago truncatula Handbook*, 2006, 13 p. Disponível em: <<http://www.noble.org/medicagohandbook/index.html>>. Acesso em 10 de julho de 2012.

Oliveira RP, Novelli VM, Machado MA (2000) Freqüência de híbridos em cruzamentos entre tangerina “Cravo” e laranja “Pêra”: análise de marcadores morfológicos e RAPD. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 35:1895-1903.

Rios SA. Melhoramento genético do morangueiro. In: Lacerda V (Ed.). *Morango: conquistando novas fronteiras*. Belo Horizonte: Epamig, 2007. v.28. p. 14-19.

Roux N, Toloza A, Radecki Z, Zapata-Arias FJ, Dolezel J(2003) Rapid detection of aneuploidy in *Musa* using flow cytometry. *Plant Cell Reports*, 21p.483–490.

Sandoval A, Hocker V, Verdeil JL (2003) Flow cytometric analysis of the cell cycle in different coconut palm (*Cocos nucifera* L.) tissues cultured in vitro. *Plant Cell Reports*, 22:25–31.

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

Silva AF, Dias MSC, Maro LAC. Botânica e fisiologia do morangueiro. In: Lacerda V (Ed.). *Morango: conquistando novas fronteiras*. Belo Horizonte: Epamig, 2007. v.28. p. 7-13.

Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 18:6531-6535.