

## DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE DNA NUCLEAR DE ESPÉCIES DE BROMELIACEAE DA MATA ATLÂNTICA

**Nunes, ACP<sup>1</sup>, Favoreto<sup>2</sup>, FC, Carvalho CR<sup>3</sup>, Lima, ABP<sup>4</sup>, Clarindo, WR<sup>5</sup>**

<sup>1</sup>Estudante do curso de Engenharia Florestal, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Espírito Santo, CEP 29500-000, Alegre-ES, Brasil, andreicaque@yahoo.com.br

<sup>2</sup>Universidade Federal do Espírito Santo/Depto de Produção Vegetal, CEP 29500-000, Alegre-ES, Brasil, fernandafavoreto@hotmail.com

<sup>3</sup>Universidade Federal de Viçosa/Depto de Biologia Geral, CEP 36570-000, Viçosa-MG, Brasil, ccarvalh@ufv.br

<sup>4</sup>Universidade Federal do Espírito Santo/Depto de Produção Vegetal, CEP 29500-000, Alegre-ES, Brasil, albarcelos@hotmail.com

<sup>5</sup>Universidade Federal do Espírito Santo/Depto de Produção Vegetal, CEP 29500-000, Alegre-ES, Brasil, welbiologo@gmail.com

**Resumo-** A família Bromeliaceae está distribuída nas subfamílias Bromelioideae, Tillandsioideae e Pitcairnioideae. As delimitações referidas para a classificação desses grupos não é satisfatória, necessitando-se assim, de amostragem e análise genômica de outras espécies. Dentro desse contexto, o presente trabalho objetiva subsidiar essas análises pela determinação do conteúdo de DNA nuclear de espécies de bromeliáceas ocorrentes na Mata Atlântica, por meio da ferramenta biotecnológica de citometria de fluxo. A suspensão nuclear, proveniente do retalhamento da amostra e do padrão, foi analisada em citômetro de fluxo, gerando histogramas com coeficientes de variação inferiores a 5%. A metodologia aplicada foi adequada, uma vez que gerou núcleos bem corados estequiometricamente e intactos para análise. Os resultados evidenciaram que *B. horrida* apresenta o valor médio mais baixo de conteúdo de DNA,  $2C = 0,77 \pm 0,01$  pg e *T. loliaceae* o valor médio mais alto,  $2C = 3,34 \pm 0,03$  pg. Os resultados sugerem que *Tillandsia loliacea* pode ser poliplóide e que espécies do mesmo gênero se diferenciam no valor do conteúdo de DNA em virtude de rearranjos cromossômicos.

**Palavras-chave:** Bromeliaceae, tamanho do genoma nuclear, citometria de fluxo

**Área do Conhecimento:** Ciências Biológicas

### Introdução

A família Bromeliaceae ocorre nas zonas tropical e subtropical do continente Americano, apresentando cerca de 58 gêneros e 3.172 espécies (PALMA-SILVA et al., 2004). O Brasil possui aproximadamente 50% dessas espécies ocorrendo nas regiões da Mata Atlântica, Restinga, Escudo das Guianas, Caatinga, Cerrado, Campos Rupestres e Regiões Semi-áridas (COTIAS-DE-OLIVEIRA et al., 2005; CEITA et al., 2008). Assim, nosso país está entre um dos mais importantes em termos de diversidade na família (LUTHER, 2000).

Um dos aspectos mais importantes da família é a relação envolvendo amplas interações ecológicas nos ambientes onde vivem. Muitas bromélias fornecem néctar volumoso e concentrado para espécies de beija-flores da Mata Atlântica (VERSIEUX, 2009) e proporcionam micro-ambientes propícios ao crescimento de outras espécies vegetais, sendo denominadas “*nurse plants*”. As bromeliáceas apresentam também fitotelma, que quando preenchido pela água da chuva e colonizado por organismos

aquáticos recebem o nome de fitotelmatas. Desse modo as bromélias são consideradas amplificadoras da biodiversidade, uma vez que disponibilizam água e nutrientes para outros organismos (VERSIEUX, 2009).

As bromeliáceas são distribuídas, tradicionalmente, nas subfamílias Bromelioideae, Tillandsioideae e Pitcairnioideae. Se por um lado o posicionamento da família Bromeliaceae não levanta dúvidas nos sistemas de classificação, por outro, as delimitações referidas para esses grupos não são satisfatórias (GIVNISH et al., 2007). Com base em análises filogenéticas, Givinish et al. (2007) propuseram uma nova distribuição para as bromeliáceas, em que os diferentes clados pertencentes à Pitcairnioideae foram divididos, resultando em oito novas subfamílias, a saber: Brocchinioideae, Bromelioideae, Hechtioideae, Lindmanioideae, Navioideae, Pitcairnioideae, Puyoideae e Tillandsioideae. Entretanto não se considera tal classificação como imutável, em virtude da não conclusão das pesquisas relacionadas à filogenia da família, necessitando-se assim, de amostragem e análise genômica de outras espécies (GIVNISH et al., 2007).

A determinação da quantidade de DNA nuclear tem grande importância para taxonomia, ecologia, biodiversidade e evolução das bromélias. Ela pode ser feita pelo método da citometria de fluxo, o qual analisa partículas em suspensão individualmente, em alta velocidade, fornecendo os sinais acumulados de cada partícula em tempo real e não necessita de células em divisão. Ebert e Till (1997) utilizaram essa ferramenta para medir o tamanho do genoma nuclear 1C de 47 espécies de 10 gêneros da subfamília Pitcairnioideae. Ramírez-Morillo e Brown (2001) também utilizaram as análises citométricas de fluxo para mensurar e comparar o tamanho do genoma nuclear de espécies de *Cryptanthus* (Bromelioideae),  $2n = 34$  ou 36 cromossomos, com outras bromélias conhecidas por apresentarem  $2n = 50$  cromossomos na família Bromeliaceae. Sgorbati et al. (2004), por meio dessa mesma ferramenta, analisaram a diversidade genética e biologia reprodutiva de *Puya raimondii* Harms (Bromeliaceae), com fins de se obter subsídios para adoção de estratégias de conservação da mesma.

Apesar dessas pesquisas os estudos de citometria de fluxo são extremamente escassos na família Bromeliaceae. Objetivando contribuir com dados de tamanho do genoma, o presente trabalho foi conduzido com o propósito de mensurar o conteúdo de DNA nuclear de espécies de Bromeliaceae da Mata Atlântica por meio da citometria de fluxo.

## Metodologia

Diferentes espécies de bromeliáceas foram cultivadas na casa vegetação do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo (CCA-UFES), e as sementes de *Solanum lycopersicum* (padrão da citometria de fluxo,  $2C = 1,96$  pg) (DOLEŽEL et al., 1992, MEISTER; BARROW, 2007) foram gentilmente cedidas por Jaroslav Doležal (Instituto Experimental de Botânica, República Tcheca). Todas as plantas foram cultivadas em casa de vegetação sob condições ambientais adequadas (temperatura, umidade, fotoperíodo, intensidade de luz). As análises de citometria de fluxo foram realizadas no Laboratório de Citogenética e Citometria, Departamento de Biologia Geral (UFV, Brasil).

A extração dos núcleos de cada espécie de Bromeliaceae (amostra) e *S. lycopersicum* (padrão interno), foi realizada de acordo com Galbraith et al. (1983). Fragmentos foliares, de  $2 \text{ cm}^2$ , foram retalhados em placa de Petri contendo 0,5 ml do tampão de extração nuclear OTTO I (OTTO, 1990; DOLEŽEL; GÖHDE, 1995), a  $4^\circ \text{C}$ , suplementado

com 2 mM de ditioneitol e  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  de RNase (Sigma®). A suspensão foi ajustada para 1 ml com o mesmo tampão, filtrada em malha de nylon (Partec®) de  $30 \mu\text{m}$ , em um tubo de microcentrífuga (Eppendorf®), e então centrifugada (ALC® microCentrifugette® 4214) a  $100 \text{ xg}$  por 5 min. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* resuspendido e incubado por 5 – 20 min. em  $100 \mu\text{L}$  do tampão de extração nuclear OTTO-I. A suspensão nuclear foi corada com 1,5 ml de solução OTTO-I:OTTO-II (OTTO, 1990; DOLEŽEL; GÖHDE 1995) na proporção de 1:2 (LOUREIRO et al., 2006) e, finalmente, filtrada em malha de nylon de  $20 \mu\text{m}$  (Partec®).

Para a determinação do tamanho do genoma nuclear o tampão OTTO I:OTTO II (1:2), (LOUREIRO et al., 2006) foi suplementado com 2,0 mM de ditioneitol (Sigma®),  $75 \mu\text{M}$  de iodeto de propídio (IP, excitação/emissão nos comprimentos de onda: 480-575/550-740 nm, SHAPIRO, 2003) e  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  RNase (DOLEŽEL et al., 1992, MEISTER, 2005). A suspensão nuclear foi corada durante 10 – 40 min. no escuro. O tamanho do genoma de cada espécie de Bromeliaceae foi estabelecido relativamente ao pico de *S. lycopersicum* pela aplicação da proporção de suas intensidades relativas de fluorescência. O valor do conteúdo de DNA 2C (picogramas – pg) foi convertido para pares de base (bp), considerando que 1 pg de DNA corresponde a  $0,978 \times 10^9$  bp (DOLEŽEL et al., 2003).

As suspensões foram analisadas em um citômetro de fluxo Partec PAS® (Partec® GmbH, Munster, Germany), equipado com uma fonte de laser (488 nm) e luz UV (388 nm). A fonte de laser foi usada para excitação do IP, em que sua fluorescência emitida pelos núcleos foi coletada pelo filtro RG 6100 nm. O equipamento foi calibrado e alinhado usando microesferas e soluções padrão de acordo com as recomendações do fabricante (Partec®). O programa FlowMax® (Partec®) foi usado para a análise dos dados.

Seis repetições independentes, contabilizando mais de 10.000 núcleos analisados, foram realizadas para cada análise. O coeficiente de variação (CV), denotado para a distribuição dos picos do padrão *S. lycopersicum* e das amostras, foi automaticamente calculado pelo programa FlowMax® (Partec®). O desvio padrão (s) e a média do tamanho do genoma também foram calculados para cada espécie de Bromeliaceae.

## Resultados

O procedimento de citometria de fluxo caracterizado pelo uso do tampão de extração OTTO-I por 10 min e coloração OTTO-I:OTTO-II

por 35 min, gerou suspensões nucleares que proveram histogramas com picos  $G_0/G_1$  com CVs entre 2,05 e 4,3%.

Baseado na comparação do pico relativo ao DNA nuclear do padrão interno *S. lycopersicum* em relação aos picos de cada amostra, valores médios do tamanho do genoma nuclear 2C foram mensurados para cada espécie de Bromeliaceae. *B. horrida* Regel apresentou o valor mais baixo,  $2C = 0,77 \pm 0,01$ pg, e *T. liliaceae* Martius ex Schultes f. o valor mais alto,  $2C = 3,34 \pm 0,03$  pg (tabela 1).

Os resultados evidenciaram, que algumas espécies do mesmo gênero apresentaram valores de conteúdo de DNA nuclear distintos, como *Tillandsia liliaceae* (3,34 pg) e *Tillandsia stricta* (1,20 pg), *Billbergia sp.* (0,95 pg), *Billbergia horrida* (0,77 pg), *Aechmea ramosa* (1,37 pg) e *Aechmea nudicaulis* (0,78 pg) (Tabela 1).

(2005) CVs < 5% são considerados apropriados para esse tipo de análise.

Loureiro et al. (2006) compararam os tampões Galbraith, LB01, Tris.MgCl<sub>2</sub> e Otto, utilizado nesse trabalho, em sete espécies vegetais com o conteúdo de DNA 2C variando de 1,30 pg a 26,90 pg, com a intenção de selecionar o tampão de isolamento apropriado para dada espécie e tecido. O autor concluiu que os tampões LB01 e Otto (1992) são, de maneira geral, os mais eficientes dentre os quatro analisados, sendo que, a aplicação do tampão Otto foi eficaz, especialmente, em espécies com menor conteúdo de DNA nuclear. Esse dado confirma, que a utilização desse tampão no presente estudo, resultou em baixos CVs, uma vez que as bromélias possuem conteúdo de DNA relativamente baixo.

Tabela 1 – Valores médios de conteúdo de DNA nuclear (pg) e desvio padrão (s), mensurado pela citometria de fluxo, de dezesseis espécies de bromeliáceas da Mata Atlântica.

Espécie	Conteúdo de DNA nuclear 2C (pg) $\pm$ s			bp ( $\times 10^9$ ) <sup>a</sup>
<i>Billbergia sp.</i>	0,95	$\pm$	0,01	0,92
<i>Pseudononea sagenarius</i>	1,00	$\pm$	0,02	0,98
<i>Bromelia antiacantha</i>	0,81	$\pm$	0,01	0,79
<i>Alcantarea sp.</i>	0,85	$\pm$	0,00	0,83
<i>Aechmea ramosa</i>	1,37	$\pm$	0,02	1,34
<i>Aechmea nudicaulis</i>	0,78	$\pm$	0,00	0,76
<i>Vriesea sp.</i>	1,08	$\pm$	0,01	1,05
<i>Canistropsis billbergioides</i>	1,00	$\pm$	0,01	0,98
<i>Billbergia horrida</i>	0,77	$\pm$	0,01	0,75
<i>Cryptanthus sp.</i>	1,33	$\pm$	0,02	1,30
<i>Vriesea racinae</i>	1,19	$\pm$	0,01	1,16
<i>Tillandsia liliaceae</i>	3,34	$\pm$	0,03	3,27
<i>Neoregelia sp.</i>	0,98	$\pm$	0,00	0,96
<i>Billbergia euphemiae</i>	0,89	$\pm$	0,01	0,87
<i>Tillandsia stricta</i>	1,20	$\pm$	0,00	1,17
<i>Vriesea scalaris</i>	1,11	$\pm$	0,01	1,09

<sup>a</sup> Conteúdo de DNA 2C convertido para bp (pares de base), considerando que 1pg de DNA corresponde a  $0,978 \times 10^9$  bp (DOLEŽEL et al., 2003)

## Discussão

O baixo CV encontrado no presente trabalho, entre 2,05 e 4,30%, pode ser explicado pelo uso do tampão Otto, o qual possui compostos como ácido cítrico. Esse composto atua na integridade da estrutura da cromatina favorecendo a coloração estequiométrica do DNA nuclear. Os valores do parâmetro estatístico CV são utilizados na citometria de fluxo para determinação do protocolo mais adequado. De acordo com Doležal e Bartoš

Anteriormente a este trabalho, a literatura reportou algumas análises de citometria de fluxo na família Bromeliaceae. Ebert e Till (1997) utilizaram essa ferramenta para medir o tamanho do genoma nuclear 1C de 47 espécies de 10 gêneros na subfamília Pitcairnioideae. Os valores encontrados variaram de  $1C = 0,30$  pg para *Pitcairnia* L'Héritier a  $1C = 0,93$  pg referente à *Fosterella* L.B.Sm. No presente estudo, nenhuma espécie da subfamília Pitcairnioideae teve seu genoma mensurado e os valores variaram de  $2C =$

0,77 pg para *B. horrida* Regel e  $2C = 3,34$  pg para *T. liliaceae* Martius ex Schultes f (Tabela 1).

Com exceção de *Cryptanthus* sp., todas as demais espécies tiveram o tamanho do genoma mensurado pela primeira vez. Dessa forma, o valor de conteúdo de DNA nuclear de *Cryptanthus* sp. obtido ( $1,33 \pm 0,02$  pg) é relativamente semelhante aos valores encontrados por Ramírez-Morillo e Brown (2001) para *C. acaulis* (Lindley) Beer ( $1,38 \pm 0,0283$  pg).

Zonneveld et al. (2005) mensuraram o tamanho do genoma nuclear de duas espécies de bromeliáceas, *Tillandsia cyanea* Linden ex K. Koch,  $2C = 2,2$  pg e *Tillandsia usneoides* (Linnaeus) Linnaeus,  $2C = 2,5$  pg. Os valores obtidos foram distintos dos valores encontrados para as espécies do gênero *Tillandsia* analisadas no presente estudo (tabela 1). No entanto, a maior diferença de conteúdo de DNA entre espécies do mesmo gênero foi evidenciada no presente trabalho. Os resultados mostraram que, surpreendentemente, *Tillandsia liliaceae* ( $2C = 3,34$  pg) apresenta um acréscimo de 2,14 pg ou 178,33% de conteúdo de DNA nuclear em relação a *Tillandsia stricta* ( $2C = 1,20$  pg). A partir desses dados, surge-se que, *Tillandsia liliaceae* é uma espécie poliplóide, em virtude de um maior conteúdo de DNA, em comparação com outra espécie do mesmo gênero. Segundo Cotias-de-Oliveira (2000), o subgênero *Diaphoranthema* (*Tillandsia*) apresenta tendência a poliploidia, o que reforça a hipótese da origem poliplóide de *Tillandsia liliaceae*.

Outras espécies do mesmo gênero também apresentaram diferentes conteúdos de DNA, como *Billbergia* sp. (0,95 pg), *Billbergia horrida* (0,77 pg), *Aechmea ramosa* (1,37 pg) e *Aechmea nudicaulis* (0,78 pg). Essas espécies possuem  $2n = 50$  cromossomos, segundo estudos citogenéticos, que constataram que o número cromossômico básico para a família Bromeliaceae é  $2n = 50$  cromossomos, com algumas exceções como, *Cryptanthus* spp.  $2n = 34$  cromossomos e certas espécies do gênero *Orthophytum* com  $2n = 100$  e  $2n = 150$  cromossomos (COTIAS-DE-OLIVEIRA et al., 2000, 2005; ASSIS et al., 2004; GITAÍ et al., 2005; CEITA, et al., 2008). A relativa distinção nos conteúdos de DNA nuclear dessas espécies pode ser resultado de um rearranjo distinto no DNA nuclear de cada uma, uma vez que todas possuem número cromossômico idêntico.

## Conclusão

A metodologia aplicada na citometria fluxo foi adequada, uma vez que gerou núcleos corados estequiometricamente e intactos para análise, resultando em CV inferiores a 5%.

Constatou-se que o genoma das espécies da família Bromeliaceae é relativamente pequeno, uma vez que apresenta valores inferiores a maioria das Angiospermas.

Os resultados obtidos demonstraram que, *Tillandsia liliaceae* pode ser uma espécie poliplóide, por apresentar um acréscimo de 2,14 pg no valor de conteúdo de DNA em relação a *Tillandsia stricta*. Além disso, propôs-se que *Billbergia* sp. e *Billbergia horrida*, assim como *Aechmea ramosa* e *Aechmea nudicaulis*, sofreram rearranjos distintos no DNA cromossomal ao longo da evolução.

Espera-se que esses dados genômicos possam contribuir para os estudos de evolução, taxonomia, pesquisas moleculares e servir como referência para pesquisas de citometria de fluxo na família Bromeliaceae.

## Agradecimentos

Agradecemos ao CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico e a FAPES – Fundação de Apoio a Pesquisa no Espírito Santo, pelo suporte financeiro.

## Referências

- CEITA, G.O; JGA, A; MLS, G.; ALPC, Cotias-de-Oliveira. Cytogenetics of Brazilian species of Bromeliaceae. **Botanical Journal of the Linnean Society**. v. 158, p.189-193, 2008.
- COTIAS-DE-OLIVEIRA, A.L.P; JGA, A.; MC, B.; JCS, A.; MLS, G. Chromosome numbers in Bromeliaceae. **Genetics and Molecular Biology** v. 23 p.173-177, 2000.
- COTIAS-DE-OLIVEIRA, A.L.P.; JGA, A; MC, B. Chromosomal Evolution of Bromeliaceae. **Cytologia**. v.70, p.129-133, 2005.
- DOLEŽEL, J; S, S.; S, L. Comparasion of three DNA fluorochromes for flow cytometric estimation of nuclear DNA content in plants. **Plant Physiol**. v. 85 p. 625-31, 1992.
- DOLEŽEL, J; W, G. Sex determination in dioecious plants *Melandrium album* and *M. rubum* using high-resolution flow cytometry. **Cytometry**. v. 19, p.103-106, 1995.
- DOLEŽEL, J;J, B; H, V; J, G. Nuclear DNA and genome size of trout and human. **Cytometry**. v. 51, p. 127–128, 2003.
- DOLEŽEL, J;J, B. Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. **Annals of Botany**. v. 95, p. 99-110, 2005.

- EBERT, I; W, T. Nuclear genome size in Pitcairnioideae (Bromeliaceae) with emphasis on the genus *Pitcairnia*. Abstracts, Angiosperm Genome Size Discussion Meeting. Pp. 15. Royal Botanical Gardens, Kew. p. 11–12 September 1997.
- GALBRAITH, D.W; KR, H.; JM, M.; NM, A.; DP, S.; E, F. Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissues. **Science**. v. 220, p. 1049-1051, 1983.
- GIVNISH, T.J; KC, M.; PE, B.; KJ, S. Phylogeny, adaptive radiation, and historical biogeography of Bromeliaceae inferred from ndhF sequence data. **Aliso**. v. 23 p. 3-26, 2007.
- LOUREIRO, J; E, R.; J, D.; C, S. Comparasion of four nuclear isolation buffers for plant DNA flow cytometry. **Annals of Botany**. v.98, p. 679-89, 2006.
- LUTHER, H.E. An alphabetical list of bromeliad binomials. The Bromeliad Society Inc. Oregon. p. 4, 2000.
- MARIE, D; SC, B. A cytometric exercise in plant DNA histograms, with 2C values for 70 species. **Biology of the cell**. v. 78, p. 41-51, 1993.
- MEISTER, A. Caculation of binding length of base-specific DNA dyes by comparasion of sequence and flow cytometry data. Application to *Oryza sativa* and *Arabidopsis thaliana*. **Journal of Theoretical Biology**. v. 232, p.93-97, 2005.
- MEISTER, A; M, B. DNA base composition of plants genomes. In: DOLEŽEL, J., GREILHUBER, J., SUDA, J. (eds.). **Flow cytometry with Plant Cells**. pp 177-215. Wiley-VCH, 2007.
- OTTO, F.J. DAPI staining of fixed cells for high-resolution flow cytometry of nuclear DNA. *In* Methods in cell biology, Edited by Z. Darzynkiewicz, H.A. Crissman and J.P. Robinson. San Diego: Academic Press, v. 33, pp. 105-110, 1990.
- PALMA-SILVA, C; DG, S.; E, Kaltchuk-Santos; MH, Bodanese-Zanettini. Chromosome numbers, meiotic behavior and pollen viability of species of *Vriesea* and *Aechmea* genera (Bromeliaceae) native to Rio Grande do Sul, Brazil. **American Journal of Botany**. v 91, p. 804-807, 2004.
- RAMÍREZ-MORILLO, I.M; GK, B. The origin of the low chromosome number in *Cryptanthus* (Bromeliaceae). **Systematic Botany**. v. 26, p. 722-726, 2001.
- SGORBATI, S; M, L.; E, G.; G, B.; G, G.; U, B.; M, M.; S, C.; AB, I.; LV, G.; S, S. A. Survey of genetic diversity and reproductive biology of *Puya raimondii* (Bromeliaceae), the endangered queen of the Andes. **Plant Biology**. v. 6 p. 222-230, 2004.
- SHAPIRO, H.M. Pratical flow cytometry. Wiley-Liss- New Jersey, 2003.
- VERSIEUX, L.M. Sistemática, Filogenia e Morfologia de *Alcantarea* (Bromeliaceae). Tese (Doutor em Botânica). Instituto de Biociências. Universidade de São Paulo, 2009.
- ZOLDO, V; D, P.; SC, B.; O, P.; S, IJAK-YAKOVLEV. Genoma size and base composition of seven *Quercus* species: inter- and intra-population variation. **Genome**. v. 41, p.162-168, 1998.
- ZONNEVELD, B.J.M.; IJ,L.; MD, B. First Nuclear DNA Amounts in more than 300 Angiosperms. **Annals of Botany**. doi: 10.1093/aob/mci170, 2005.