

## CONTEÚDO DE DNA NUCLEAR DE TRÊS ESPÉCIES DE *Peperomia* OCORRENTES NO PARQUE ESTADUAL DO FORNO GRANDE - ES.

Ana Luiza Assis Semonato, Aline dos Santos Bergamin, Thalya Campelo Vitor, Mayla Bessa Scotá, Gustavo Fernandes Mariano, Elias Terra Werner, Milene Miranda Praça Fontes

Universidade Federal do Espírito Santo, Alto Universitário, S/N Guararema, 29500-000 - Alegre-ES, Brasil. [alassissemonato@gmail.com](mailto:alassissemonato@gmail.com), [alinebergamin258@hotmail.com](mailto:alinebergamin258@hotmail.com), [thalyavitor26@gmail.com](mailto:thalyavitor26@gmail.com), [mayla\\_scotta@hotmail.com](mailto:mayla_scotta@hotmail.com), [gustavo123mariano@hotmail.com](mailto:gustavo123mariano@hotmail.com), [elias.werner@ufes.br](mailto:elias.werner@ufes.br), [milenemiranda@yahoo.com.br](mailto:milenemiranda@yahoo.com.br)

### Resumo

Este estudo objetivou mensurar o conteúdo 2C de DNA nuclear em *Peperomia alata*, *P. glabella* var. *nigropunctata* e *P. stroemfeltii*, ampliando o conhecimento sobre o genoma do gênero *Peperomia*, que possui poucos relatos na literatura. A metodologia envolveu a citometria de fluxo, utilizando *Solanum lycopersicum* como referência, com suspensões nucleares preparadas a partir de tecido foliar jovem e analisadas em um citômetro BD Accuri C6. Os resultados obtidos foram 6,23 pg para *P. alata*, 4,65 pg para *P. glabella* var. *nigropunctata* e 4,08 pg para *P. stroemfeltii*. Conclui-se que esses dados são cruciais para a exploração de recursos genéticos, estudos citogenéticos, compreensão de mecanismos evolutivos e estratégias de conservação, especialmente em regiões biodiversas como a Mata Atlântica, destacando o potencial econômico e medicinal do gênero.

**Palavras-chave:** Citometria de Fluxo. Mata alântica. *Peperomias*.

**Área do Conhecimento:** Ciências Biológicas (Genética)

### Introdução

O gênero *Peperomia* Ruiz & Pav. (Piperaceae) é um dos mais diversos entre as angiospermas, com mais de 1.600 espécies distribuídas principalmente nas regiões tropicais e subtropicais, com ampla representatividade no Brasil e em outros países neotropicais (Wanke *et al.*, 2006). Pertencente à família Piperaceae, reconhecida por sua importância econômica, medicinal e ornamental (Sen e Rengaiian, 2022., Barroso *et al.*, 2002), *Peperomia* apresenta espécies com potencial para diversas aplicações, incluindo uso ornamental, estudos farmacológicos e conservação da biodiversidade. Apesar de sua relevância e diversidade, são escassos os estudos relacionados à citogenética do grupo, em especial aqueles voltados à quantificação do conteúdo de DNA nuclear.

O tamanho do genoma, expresso pelo conteúdo 2C de DNA nuclear, é uma característica fundamental para a compreensão da biologia de uma espécie, fornecendo informações valiosas para áreas como genética, taxonomia, biologia evolutiva e conservação. A variação no tamanho do genoma pode resultar de processos como poliploidia, duplicação completa do conjunto cromossômico ou alterações na quantidade de DNA repetitivo, que tratam-se de mecanismos centrais na especiação e adaptação das plantas às diferentes pressões ambientais (Leitch, 2013;). Nesse contexto, a citometria de fluxo destaca-se como uma ferramenta rápida, precisa e amplamente utilizada para a mensuração do conteúdo de DNA nuclear em plantas, permitindo a análise de milhares de núcleos em suspensão em poucos minutos (Loureiro *et al.*, 2023; Vraná, 2024). Além de estimar o tamanho do genoma, a citometria de fluxo possibilita a detecção de eventos de poliploidia, o monitoramento da estabilidade genética e a avaliação de variação somaclonal em plantas regeneradas por cultura de tecidos, sendo uma ferramenta rápida e reprodutível para análise de conteúdo de DNA (Escobedo *et al.*, 2018).

Apesar da importância ecológica e diversidade do gênero *Peperomia* no Brasil, não existem registros publicados sobre o conteúdo 2C de DNA nuclear para espécies que ocorrem no Parque Estadual do Forno Grande, no Espírito Santo. Essa unidade de conservação abriga diferentes espécies endêmicas e de interesse para conservação, tornando-se um local estratégico para estudos de

## A Ciência do NANO e seu impacto transformador no MACRO

diversidade genética e evolução. O parque está localizado na Mata Atlântica, um dos principais *hotspots* de biodiversidade do planeta, e a região abriga espécies de fauna com distribuição restrita e ameaçadas de extinção, o que reforça a urgência de pesquisas detalhadas (Louzada, 2009).

Considerando a escassez de dados genômicos para o gênero no Brasil e a relevância dessas informações para estratégias de conservação e manejo, este trabalho teve como objetivo mensurar o conteúdo 2C de DNA nuclear de três espécies de *Peperomia* *P. alata*, *P. glabella* var. *nigropunctata* e *P. stroemfeltii* coletadas no Parque Estadual do Forno Grande, e de indivíduos de *P. stroemfeltii* regenerados *in vitro*, por meio da organogênese. Os resultados obtidos poderão subsidiar estudos citogenéticos, auxiliar na exploração sustentável dos recursos genéticos e contribuir para a compreensão dos mecanismos evolutivos e da diversidade dentro do gênero.

### Metodologia

A citometria de fluxo para a quantificação do conteúdo de DNA nuclear foi conduzida no Laboratório de Citogenética e Citometria Vegetal da Universidade Federal de Viçosa (UFV). Para o estudo, foram coletadas amostras foliares de três indivíduos das espécies *Peperomia alata* Ruiz & Pav., *P. stroemfeltii* Dahlst. e *P. glabella* var. *nigropunctata* (Miq.) no Parque Estadual do Forno Grande. Além do material de campo, foram utilizadas plântulas de *P. stroemfeltii* Dahlst. que foram obtidas *in vitro* através da organogênese, utilizando diferentes meios de cultura.

O processamento das amostras seguiu um protocolo adaptado de Galbraith *et al.* (1983). Foram utilizados aproximadamente 50 mg de tecido foliar de folhas jovens das amostras de *Peperomia* e da espécie padrão, *Solanum lycopersicum* L., que possui um conteúdo de DNA 2C conhecido de 2,00 pg. Os fragmentos de tecido foram picados com lâmina de barbear em uma placa de Petri contendo tampão de lise OTTO-I (Otto, 1990) a 4 °C, que foi suplementado com 2 mM de ditiotretiol e 50 µg mL<sup>-1</sup> de RNase.

Após a fragmentação, a suspensão foi filtrada em uma peneira de nylon com poros de 50 µm e centrifugada a 100 ×g por 5 minutos. O precipitado foi ressuspensão em 100 µL de tampão OTTO-I e incubado por 10 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram coradas com 1,5 mL de uma mistura de OTTO-I:OTTO-II na proporção de 1:2 (Otto, 1990), contendo 2 mM de ditiotretiol, 50 µg mL<sup>-1</sup> de iodo de propídio (IP) e 50 µg mL<sup>-1</sup> de RNase.

A análise foi realizada em um citômetro de fluxo BD Accuri C6 (Accuri Cytometers, Bélgica), que está equipado com um laser para detecção em FL3 (>670 nm). O processamento dos histogramas foi feito usando o software BD CSampler. O tamanho do genoma de cada espécie foi calculado por meio da fórmula:  $2CD = (C1/C2) \cdot 2CS$ , onde 2CD é o conteúdo de DNA 2C da espécie analisada; C1 é o canal médio do pico G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> da espécie de *Peperomia*; C2 é o canal médio do pico G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> de *S. lycopersicum*; e 2CS é o conteúdo de DNA 2C do padrão, que é de 2,00 pg. Os valores foram calculados utilizando a espécie *Solanum lycopersicum* como padrão de referência (2C = 2,00 pg), conforme a fórmula:

$$2CD = (C1/C2) \cdot 2CS$$

Para as análises estatísticas, a normalidade dos resíduos e a homogeneidade das variâncias foram verificadas por meio dos testes de Shapiro-Wilk e Bartlett, respectivamente. Satisfeitas as premissas, os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), com nível de significância de 5% pelo teste F. Quando as diferenças foram estatisticamente significativas, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey (5%). Todas as análises estatísticas foram realizadas no software R, versão 4.4.2.

### Resultados

O conteúdo médio de DNA 2C obtido através da citometria de fluxo foi de 6,23 pg para *P. alata*, 4,65 pg para *P. glabella* var. *nigropunctata* e 4,08 pg para *P. stroemfeltii* (Tabela 1).

**Tabela 1.** Conteúdo de DNA nuclear (2C, em pg) de *Peperomia alata*, *P. glabella* var. *nigropunctata* e *P. stroemfeltii*, com valores médios e respectivos desvios padrão obtidos por citometria de fluxo.

| Espécies | Conteúdo 2C (pg) | Desvio Padrão (DP) |
|----------|------------------|--------------------|
|----------|------------------|--------------------|

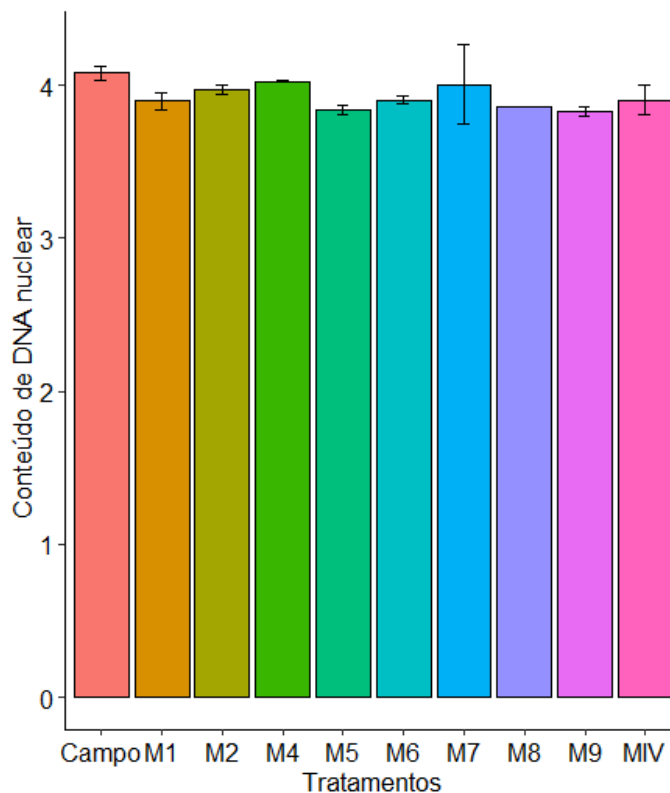
## A Ciência do NANO e seu impacto transformador no MACRO

|                                                        |        |      |
|--------------------------------------------------------|--------|------|
| <i>Peperomia Alata</i>                                 | 6,2288 | 0,08 |
| <i>Peperomia glabella</i><br>var. <i>nigropunctata</i> | 4,6523 | 0,02 |
| <i>Peperomia stroemfeltii</i>                          | 4,0844 | 0,05 |

Fonte: as autoras.

Para as plântulas de *P. stroemfeltii* cultivadas *in vitro*, o conteúdo 2C de DNA nuclear foi também mensurado. O conteúdo de DNA médio de todas as plantas regeneradas, independente do meio de cultura utilizado, foi de 3,93 pg com um desvio padrão de 0,11 pg, e os valores variaram de um mínimo de 3,81 pg a um máximo de 4,19 pg. Os resultados demonstraram que apesar da variação no número médio de conteúdo de DNA nuclear entre os indivíduos da mesma espécie regenerados *in vitro* e o material do campo, não houve diferença significativa entre eles.

**Figura 2-** Conteúdo 2C de DNA nuclear em espécies de *Peperomia* coletadas no campo e em plântulas de *P. stroemfeltii* cultivadas *in vitro*. As colunas representam a média do conteúdo de DNA de cada amostra, e as barras de erro indicam o desvio padrão (DP). O conteúdo de DNA é expresso em picogramas (pg).



Fonte: as autoras.

### Discussão

Os resultados obtidos revelaram que *Peperomia alata* apresenta um conteúdo de DNA nuclear de 6,23 pg, valor que se destaca como o mais elevado entre as amostras. Em contraste, *P. glabella* var. *nigropunctata* (4,65 pg) e *P. stroemfeltii* (4,08 pg) exibem valores menores e semelhantes entre si. Essa variação interna ao gênero reflete a ampla plasticidade genômica observada em angiospermas, fenômeno evidenciado em plantas ornamentais como *Pelargonium*, cujas espécies apresentam conteúdo de DNA nuclear variando de 0,84 pg a 6,69 pg (Plaschil *et al.*, 2022). Os valores estimados

## A Ciência do NANO e seu impacto transformador no MACRO

para as espécies de *Peperomia* analisadas situam-se na faixa já descrita para a família Piperaceae, em que diferenças interespecíes e variação na ploidia foram previamente relatadas em estudos com *Piper* (Samuel *et al.*, 1986). Essas diferenças podem estar associadas a mecanismos como a expansão ou eliminação de DNA repetitivo e reorganizações cromossômicas pós-poliploidia, processos evolutivos recorrentes em angiospermas (Wang *et al.*, 2021).

A utilização de plântulas regeneradas *in vitro* de *P. stroemfeltii* não comprometeu a precisão dos resultados, o que reforça evidências de que tecidos jovens cultivados em laboratório podem ser empregados de forma confiável em análises citométricas, desde que submetidos a protocolos adequados de cultivo e preparo (Dolezel; Bartos, 2005). Embora a plântula *in vitro* tenha exibido uma leve redução no conteúdo de DNA (3,93 pg) em comparação com a amostra de campo (4,08 pg), essa diferença sugere que o cultivo não induziu uma alteração significativa, o que é um ponto importante para o uso de cultura de tecidos na análise de genoma.

Estudos anteriores com espécies de *Peperomia* também apontaram considerável variabilidade no conteúdo de DNA nuclear, frequentemente associada a eventos de poliploidia (Samuel; Morawetz, 1992). A quantificação precisa do tamanho do genoma constitui uma ferramenta essencial para compreender a evolução genômica, a diversidade genética e as relações filogenéticas no grupo (Ashs, 2024).

Assim, os dados apresentados contribuem para ampliação do conhecimento citogenético do gênero *Peperomia*, fornecendo subsídios para estudos evolutivos e para estratégias de conservação de espécies em biomas de elevada biodiversidade, como a Mata Atlântica. O conhecimento do tamanho do genoma também é um recurso estratégico para programas de melhoramento genético, aplicações em biotecnologia e conservação *ex situ*.

### Conclusão

Este estudo mensurou o conteúdo 2C de DNA nuclear em três espécies de *Peperomia*. Os valores obtidos foram de 6,23 pg para *P. alata*, 4,65 pg para *P. glabella* var. *nigropunctata* e 4,08 pg para *P. stroemfeltii*. Além disso, a análise incluiu plântulas de *P. stroemfeltii* cultivadas *in vitro*, cujos valores de conteúdo de DNA se mostraram próximos aos das amostras de campo. Tais resultados representam uma contribuição significativa para o conhecimento citogenético do gênero *Peperomia*, que ainda é pouco documentado na literatura.

### Referências

- ADAMEK, K. et al. Genotyping-by-sequencing (GBS) reveals greater somatic mutations than simple sequence repeats (SSRs) in micropropagated cannabis plants. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, v. 1, n. 10, 2023.
- ADAN, A. et al. Flow cytometry: basic principles and applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, v. 37, n. 2, p. 163-176, 2017.
- AMERICAN SOCIETY FOR HORTICULTURAL SCIENCE (ASHS). Flow cytometry for estimating plant genome size: revisiting assumptions and best practices. 2024. Disponível em: <https://ashs.org/news/683785/Flow-Cytometry-for-Estimating-Plant-Genome-Size-Revisiting-Assumptions-and-Best-Practices.htm>. Acesso em: 4 out. 2024.
- BARROSO, G. M. et al. *Sistemática de angiospermas do Brasil*. 2. ed. Viçosa: Editora UFV, 2002. 309 p.
- BISWAS, P.; KUMAR, N. Application of molecular markers for the assessment of genetic fidelity of in vitro raised plants: current status and future prospects. In: *Molecular Marker Techniques: a potential approach of crop improvement*. 2023. p. 233-256.

## A Ciência do NANO e seu impacto transformador no MACRO

DOLEZEL, J.; BARTOS, J. Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. *Annals of Botany*, v. 95, n. 1, p. 99-110, 2005. DOI: 10.1093/aob/mci005.

ESCOBEDO-GRACIA-MEDRANO, R. M. et al. Using flow cytometry analysis in plant tissue culture derived plants. In: *Methods in Molecular Biology*, v. 1815, p. 317-332, 2018. DOI: 10.1007/978-1-4939-8594-4\_22.

FERNANDES, A. F. S. et al. *Tópicos especiais em genética e melhoramento III*. Alegre, 2020.

GALBRAITH, D. W. et al. Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissues. *Science*, v. 220, n. 4601, p. 1049-1051, 1983.

LEITCH, I. J.; LEITCH, A. R. Genome size diversity and evolution in land plants. In: LEITCH, I. J.; LEITCH, A. R. (eds.). *Plant genome diversity. Volume 2: physical structure, behaviour and evolution of plant genomes*. Vienna: Springer, 2012. p. 307-322.

LOUREIRO, J. et al. Flow cytometry of plant genomes. In: DOLEŽEL, J. et al. (eds.). *Flow cytometry in plant cell biology*. Totowa: Humana Press, 2011. p. 1-27.

LOUZADA, F. L. R. de O. et al. Fauna ameaçada de extinção nos Parques Estaduais Forno Grande e Pedra Azul, ES. In: ENCONTRO LATINO AMERICANO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 2009. Anais [...]. p. 1-5.

PLASCHIL, S. et al. The variability of nuclear DNA content of different *Pelargonium* species estimated by flow cytometry. *PLOS ONE*, v. 17, n. 4, p. e0267496, 2022. DOI: 10.1371/journal.pone.0267496.

PRAÇA-FONTES, M. M. et al. Revisiting the DNA C-values of the genome size-standards used in plant flow cytometry to choose the “best primary standards”. *Plant Cell Reports*, v. 30, p. 1183-1191, 2011.

SAMUEL, R.; MORAWETZ, W. Nuclear DNA measurements in diploid and polyploid species of *Peperomia* (Piperaceae). *Caryologia: International Journal of Cytology, Cytosystematics and Cyto genetics*, v. 45, n. 3-4, p. 353-358, 1992. DOI: 10.1080/00087114.1992.10797238.

SAMUEL, R.; SMITH, J. B.; BENNETT, M. D. Nuclear DNA variation in *Piper* (Piperaceae). *Canadian Journal of Genetics and Cytology*, v. 28, n. 6, p. 1041-1043, 1986.

SEN, S.; RENGAIAN, G. A review on the ecology, evolution and conservation of *Piper* (Piperaceae) in India: future directions and opportunities. *The Botanical Review*, v. 88, n. 3, p. 333-358, 2022.

SOARES, D. M. M. et al. Assessment of genetic stability in three generations of in vitro propagated *Jatropha curcas* L. plantlets using ISSR markers. *Tropical Plant Biology*, v. 9, p. 229-238, 2016.

VRÁNA, J. et al. Flow cytometry in plant research: a success story. In: NICK, P.; OPATRŇY, Z. (eds.). *Applied Plant Cell Biology*. Cham: Springer, 2024. p. 395-429.

WANKE, S. et al. Phylogeny of the genus *Peperomia* (Piperaceae) inferred from the trnK/matK region (cpDNA). *Plant Biology*, v. 8, p. 93-102, 2006.

WANG, X. et al. Genome downsizing after polyploidy: mechanisms, rates and selection pressures. *The Plant Journal*, v. 108, n. 5, p. 1217-1233, 2021. DOI: 10.1111/tpj.15525.

## *A Ciência do **NANO** e seu impacto transformador no **MACRO***

### **Agradecimentos**

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Espírito Santo (FAPES).