



GLEICY KELLY DE OLIVEIRA

**DISTRIBUIÇÃO DE SEQUÊNCIAS CENTROMÉRICAS
DE *Solanum* NOS GENOMAS A, C e D DE ESPÉCIES
ALOPOLIPLOIDES**

**LAVRAS - MG
2017**

GLEICY KELLY DE OLIVEIRA

**DISTRIBUIÇÃO DE SEQUÊNCIAS CENTROMÉRICAS DE *Solanum* NOS
GENOMAS A, C e D DE ESPÉCIES ALOPOLIPLOIDES**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, área de concentração em Citogenética Vegetal, para a obtenção do título de Mestre.

Prof.^a Dr.^a Giovana Augusta Torres

Orientadora

Dr.^a Ludmila Cristina Oliveira

Coorientadora

**LAVRAS – MG
2017**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Oliveira, Gleicy Kelly de.

Distribuição de sequências centroméricas de *Solanum* nos
genomas A, C e D de espécies alopoliploides / Gleicy Kelly de
Oliveira. - 2017.

50 p. : il.

Orientador(a): Giovana Augusta Torres.

Coorientador(a): Ludmila Cristina Oliveira.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2017.

Bibliografia.

1. Solanum. 2. DNA repetitivo. 3. Centrômero. I. Torres,
Giovana Augusta. II. Oliveira, Ludmila Cristina. III. Título.

GLEICY KELLY DE OLIVEIRA

**DISTRIBUIÇÃO DE SEQUÊNCIAS CENTROMÉRICAS DE *Solanum* NOS
GENOMAS A, C e D DE ESPÉCIES ALOPOLIPLÓIDES**

**DISTRIBUTION OF CENTROMERIC SEQUENCES OF *Solanum* IN
GENOMES A, C AND D OF ALOPOLIPLOID SPECIES**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, área de concentração em Citogenética Vegetal, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 30 de JUNHO de 2017

Prof. Dr Saulo Marçal de Sousa - UFJF

Prof. Dr. César Augusto Brasil Pereira Pinto - UFLA

Prof.^a Dr.^a Giovana Augusta Torres UFLA

Orientadora

Dr.^a Ludmila Cristina Oliveira

Coorientadora

**LAVRAS - MG
2017**

Aos meus pais, irmã e avós, dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus, minha força e fortaleza.

Aos meus pais, que sempre me apoiaram incondicionalmente e NUNCA mediram esforços para que eu pudesse realizar os meus desejos. Por eles que sempre estiveram ao meu lado e suportaram todas as meus choros, reclamações e mudanças de humor. Vocês são a minha FORÇA e eu nunca saberei expressar todo o amor que tenho por vocês!

A minha irmã, por toda paciência, amor e carinho e amizade, cheguei onde estou porque você sempre esteve comigo.

A Dr^a Giovana pela orientação durante todo o mestrado. Por toda sua dedicação, confiança e paciência. Sua contribuição foi essencial para a minha formação acadêmica e pessoal.

A Ludmila, por todo seu apoio. A sua contribuição e disponibilidade para a realização desse trabalho foi essencial. Obrigada por todas as conversas, dúvidas e aprendizado. Sou muito grata por todo o seu apoio.

A todos os meus amigos do Laboratório de Citogenética da UFLA. Pelo convívio harmonioso e maravilhosa amizade. Por todas as idas à casa da goiaba, risadas, festinhas, troca de experiências. Foram momentos maravilhosos que passei ao lado de vocês.

A toda minha família, por todo apoio e compreensão.

A todas as minhas amigas e amigos, que sempre estiveram ao meu lado, e entenderam a minha ausência. A todos que sempre me ouviram, torceram e vibram comigo em todas as minhas realizações. Vocês também fazem parte dessa conquista. A torcida e o apoio de cada um de vocês foram essenciais para eu conseguisse chegar até aqui! Eu amo cada um (vocês sabem quem são).

A Professora Vânia por todo o apoio durante o mestrado, e aos membros da banca Professor Saulo Marçal e Professor César Brasil, por todas as contribuições.

Ao técnicos do Laboratório de Citogenética, Felipe e Iara, por toda atenção e disponibilidade.

A todos os professores e funcionários do Departamento de Biologia, por todo atendimento e colaboração para a minha formação pessoal e profissional.

Aos apáticos 2015/1 por tantos momentos vividos. Foram dois anos de muitos estudos e alegrias. O importante é que sempre estivemos juntos.

Aos meus professores da graduação Maria Cristina e Fernando que sempre me incentivaram para continuar a carreira de pesquisadora. Vocês foram e ainda são essenciais para a minha formação.

À UFLA e ao Programa de Pós Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, pela oportunidade de realização do mestrado.

A FAPEMIG pela concessão da bolsa de estudos, a Capes e CNPQ.

A cada um que sempre esteve ao meu lado, me apoiando e torcendo pelo meu sucesso profissional.

MUITO OBRIGADA!

“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante dos meus olhos.”

Isaac Newton

RESUMO

No gênero *Solanum*, são conhecidos os genomas A, P, B, C, D e E, com base no estudo de compatibilidade e homologia cromossômica em híbridos interespecíficos. A caracterização das sequências repetitivas dos centrômeros de espécies de alguns desses genomas tem revelado uma dinâmica bastante particular do DNA centromérico no gênero. O centrômero é um loco cromossômico formado, geralmente, por grandes conjuntos de DNA satélite e/ou elementos transponíveis, responsável pela segregação fiel do material genético durante a divisão celular. Repetições satélite centroméricas foram identificadas nas espécies *Solanum tuberosum*, *Solanum verrucosum* e *Solanum chomatophilum* (portadoras dos genomas A, A e P, respectivamente) e observadas a distribuição dessas sequências em espécies selvagens diploides de batata, portadoras dos genomas A, P, B, E. Entretanto essas repetições ainda não foram avaliadas nos genomas C e D, presentes apenas em espécies poliploides, em associação com o genoma A. Com esse intuito, o objetivo deste estudo foi verificar o padrão de distribuição e organização de sequências centroméricas características dos genomas A e P de *Solanum* nos cromossomos de espécies aloploiploides (portadoras dos genomas AC e AD), utilizando a técnica de FISH. As sequências centroméricas utilizadas como sondas, foram obtidas da espécie *S. tuberosum* (St49 e St18), *S. verrucosum* (Sv54, Sv123, Sv161.5) e *S. chomatophilum* (Sc83, Sc111, Sc9/108) e a sequência de rDNA 45S foi usada como controle positivo nos experimentos com sondas centroméricas. No genoma AC, as sondas St18 e St49, foram ausentes. Já no genoma AD a repetição St18, também esteve ausente e a sequência St49 presente na região centromérica de múltiplos cromossomos de AD. A sequência Sv54 gerou 4 sinais centroméricos no genoma AD e foi ausente no genoma AC. No genoma AD, Sv 161.5 evidenciou quatro sinais centroméricos em dois pares de cromossomos, enquanto no genoma AC, Sv 161.5 revelou dois sinais centroméricos em um par cromossômico. Sv 123, tanto no genoma AC quanto no genoma AD revelou dois sinais nos centrômeros em um par cromossômico. No genoma AC, a sonda Sc83 gerou sinais dispersos, não centroméricos, ao longo dos cromossomos. No genoma AD, essa mesma sonda revelou dois sinais centroméricos, em um par de cromossomos do complemento. No genoma AD, Sc92/108 revelou quatro sinais intensos nas regiões centroméricas de dois pares de cromossomos, enquanto no genoma AC não produziu sinal. Em AC, a sonda Sc 111, demonstrou sinais dispersos, com maior intensidade nos centrômeros. Já no genoma AD, a repetição Sc111 mostrou sinais dispersos em todos os cromossomos, como também sete sinais com maior intensidade em regiões centroméricas e não centroméricas, sendo que 4 sinais eram co-localizados com Sc92/108. De um modo geral, as sequências identificadas nos aloploiploides pertencem, em sua maioria, aos cromossomos do genoma A, com padrão semelhante ora o genoma A de *S. tuberosum*, ora ao de *S. verrucosum*. Nenhuma das sequências analisadas é candidata a pertencer ao genoma C, enquanto que para o genoma D a sequência Sc83 pode pertencer a esse genoma, com padrão similar ao genoma P.

Palavras-chave: DNA centromérico. *Solanum*. Espécies aloploiploides. Genomas AC e AD. DNA repetitivo.

ABSTRACT

In the genus *Solanum*, the genomes A, P, B, C, D and E are identified based on studies of compatibility and chromosomal homology in interspecific hybrids. Characterization of centromeric repetitive sequences in species with some of these genomes have been shown that the dynamic of centromeric DNA is very distinct in *Solanum*. The centromere is a chromosomal locus usually made up of large sets of satellite DNA and/or transposable elements, responsible for the accurate segregation of the genetic material during cell division. Centromeric satellite repeats were identified in the species *Solanum tuberosum*, *Solanum verrucosum* and *Solanum chomatophilum* (carriers of the A, A and P genomes, respectively) and the distribution of these sequences in wild diploid potato species with genomes A, P, B, E was described. However, these repeats have not yet been evaluated in genomes C and D, present only in polyploid species, in association with genome A. The aim of this study was to verify the distribution pattern and the organization of centromeric sequences in the genomes A and P of *Solanum*, in the chromosomes of allopolyploid species (carriers of the AC and AD genomes) using the FISH technique. The centromeric sequences used as probes were obtained from *S. tuberosum* (St49 and St18), *S. verrucosum* (Sv54, Sv123, Sv161.5) and *S. chomatophilum* (Sc83, Sc111, Sc9 / 108). The rDNA sequence 45S was used as a positive control in experiments with centromeric probes. In the AC genome, the St18 and St49 probes were absent. In the AD genome the St18 repeat was also absent and the St49 sequence was present in the centromeric region of multiple AD chromosomes. The Sv54 sequence generated 4 centric signals in the AD genome and was absent in the AC genome. Regarding the AD genome, Sv 161.5 revealed four centromeric signals on two chromosome pairs, while in the AC genome, Sv 161.5 showed two centromeric signals in one chromosomal pair. Sv 123, revealed in both AC and AD genomes two signals in the centromere in one chromosomal pair. In the AC genome, the Sc83 probe generated scattered, non-centromeric signals along the chromosomes. In the AD genome, this same probe revealed two centromeric signals in one chromosome pair of the complement. In the AD genome, Sc92/108 revealed four intense signals in the centromeric regions of two pairs of chromosomes, whereas in the AC genome there was no signal. In AC, the Sc 111 probe showed dispersed signals, with higher intensity in the centromere. In the AD genome, the Sc111 repeat showed scattered signals in all chromosomes, as well as seven signals with higher intensity in centromeric and non-centromeric regions, four of them co-localized with Sc92/108. In general, the identified sequences in allopolyploids belong mostly to chromosomes of genome A, with a pattern similar either to the genome A of *S. tuberosum* or *S. verrucosum*. None of the analyzed sequences is candidate to belong to genome C, whereas for genome D the sequence Sc83 can belong to this genome, with pattern similar to the genome P.

Keywords: Centromeric DNA. *Solanum*. Allopolyploid species. Genomes AC and AD. Repetitive DNA.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1-** Mapeamento por FISH de locos de rDNA 45S nas espécies *Solanum longiconicum* ($2n=4x=48$) e *Solanum agrimonifolium* ($2n=4x=48$), portadoras do genoma AC e *Solanum demissum* ($2n=6x=72$), e *Solanum guerreroense* ($2n=6x=72$), portadoras do genoma AD **32**
- Figura 2-** Mapeamento por FISH de repetições de sondas centroméricas na espécie *Solanum guerreroense* ($2n=6x=72$), portadora do genoma AD **35**
- Figura 3-** Mapeamento por FISH de repetições de sondas centroméricas nas espécies *Solanum longiconicum* e *S. agrimonifolium* ($2n=4x=48$), portadoras do genoma AC **38**
- Figura 4-** Mapeamento por FISH de repetições de sondas centroméricas nas espécies *Solanum gurreroense* e *S. demissum* ($2n=6x=72$), portadoras do genoma AD **39**
- Quadro 1-** Localização de sondas centroméricas de *Solanum tuberosum* (AA – Sondas St), *Solanum verrucosum* (AA – Sondas Sv), *Solanum comatophilum* (PP – Sondas Sc) nos cromossomos dos genomas A, P, B e E..... **26**
- Quadro 2-** Resumo das análises de FISH das repetições centroméricas isoladas de *S.tuberosum* (genoma A), *S.verrucosum* (genoma A) e *S. chomatophilum* (genoma P) em espécies alopoliploides portadoras do genoma AC e AD de *Solanum* **33**

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REFERENCIAL TEÓRICO	14
2.1 Sistemática e organização genômica em <i>Solanum</i>	14
2.2 DNA repetitivo em <i>Solanum</i>	19
3 MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1 Material vegetal	27
3.2 Preparo das lâminas.....	27
3.3 Hibridização <i>in situ</i> fluorescente (FISH)	28
3.3.1 Amplificação e marcação do rDNA 45S utilizado como sonda controle	28
3.3.2 Amplificação e marcação do DNA repetitivo centromérico	28
3.3.3 Hibridização e detecção das sondas	29
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
5 CONCLUSÕES	40
REFERÊNCIAS.....	41
ANEXO A	50

1 INTRODUÇÃO

Solanaceae é uma família de angiospermas que possui cerca de 90 gêneros e 3000 a 4000 espécies, das quais cerca de metade pertence ao gênero *Solanum*. Tem grande relevância econômica por possuir espécies muito utilizadas na alimentação mundial, como *S. tuberosum* L. (batata) e *S. lycopersicum* L. (tomate). A batata cultivada, *S. tuberosum* é o terceiro alimento mais importante do mundo depois do arroz e do trigo em termos de consumo humano. Existem mais de 4.000 variedades de batatas nativas, principalmente encontradas nos Andes e mais de 180 espécies de batata selvagem (CIP, 2016).

Na seção Petota do gênero *Solanum*, são descritos seis diferentes genomas denominados A, B, C, D, P, E, com base no estudo de compatibilidade e homologia cromossômica entre híbridos interespecíficos (MATSUBAYASHI, 1991). Na literatura, já foi citado outro possível genoma, nomeado como T, pertencente ao tomate (*S. lycopersicum* L.) (GONG et al., 2012, TORRES et al., 2011; ZHANG et al., 2014). O genoma A é considerado o mais básico, pois predomina nas espécies diploides e está presente em todas as espécies poliploides, tanto auto quanto aloploiploides (SPOONER et al., 2008). A diferenciação entre espécies poliploides se dá em virtude de seus genomas adicionais ao genoma A, que são estruturalmente diferenciados a um maior ou menor grau e são dadas fórmulas genômicas diferenciadas (MATSUBAYASHI, 1991). As espécies diploides podem conter genomas A, B, P e E, enquanto nas espécies poliploides, além dos autoploiploides do genoma A, encontramos combinações de A com B, P, C e D, sendo os dois últimos não identificados na condição diploide (SPOONER et al., 2008).

O conhecimento aprofundado da constituição e evolução desses diferentes genomas de *Solanum* passou a contar, a partir de 2011, com a publicação do sequenciamento do genoma da batata, realizado em um genótipo monoploide da batata cultivada *S. tuberosum* (DM1-3 – $2n=2x=24$, AA). O sequenciamento revelou a existência de cerca de 39031 genes codificadores de proteínas, e aproximadamente 62,2% (452,5 Mb) de DNA repetitivo, dos quais 29,4% era composto por retrotransposons do tipo LTR (PGSC, 2011). A partir desses dados, foram identificadas para o genoma A duas sequências satélite características das regiões subteloméricas (TORRES et al, 2011) bem como algumas sequências centroméricas (GONG et al, 2012). Em ambos os casos essas sequências foram estudadas também nos genomas B, P e E. Esses dados corroboram com a ideia de que as sequências repetitivas são

relevantes para as regiões funcionais do cromossomo, como telômeros e centrômeros (PLOHL, 2010).

O centrômero é a região dos cromossomos eucariotos que direciona a segregação das cromátides irmãs durante a divisão celular, garantindo a estabilidade genética. De maneira geral, é definido citologicamente como uma constrição primária nos cromossomos mitóticos, com exceção dos cromossomos holocêntricos, em que o centrômero se estende por todo o cromossomo. É o local onde ocorre a montagem do cinetócoro, estrutura proteica onde se ligam as fibras do fuso para assegurar a segregação fiel das cromátides durante a divisão celular (WANG; ZHANG; JIN, 2009). A característica marcante e definidora do centrômero é a presença de uma variante de histona H3 específica, a CenH3 que substitui a H3 canônica (PLOHL, MEŠTROVIĆ, MRAVINAC, 2014). A principal diferença entre a H3 canônica e a CenH3 está na cauda N-terminal da CenH3, que é altamente divergente, podendo variar substancialmente em comprimento e composição, até mesmo em organismos muito relacionados (JIANG et al., 2003).

Com relação à composição de DNA existe uma variabilidade interespecífica muito grande de sequências, em sua maioria composta por longos arranjos de diferentes famílias de DNA satélite e/ou elementos transponíveis (PLOHL, MEŠTROVIĆ, MRAVINAC, 2014). Em *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh todos os centrômeros contêm longos arranjos de uma sequência satélite de 180pb (NAGAKI et al., 2003). Em milho (*Zea mays* L.), os centrômeros apresentam tanto uma sequência satélite CentC (156pb) como o retrotransposon CRM (TY3/Gypsy) (JIANG et al., 2003). Em *Oryza sativa* L., espécie de arroz cultivada, os centrômeros são compostos de uma repetição satélite, CentO (155pb), e o retrotransposon CRR, também do tipo Ty3/Gypsy (CHENG et al., 2002). Importante ressaltar que apesar de serem do mesmo tamanho as sequências satélite do milho e do arroz são totalmente divergentes, e no caso do arroz não existe homologia nem mesmo com a repetição centromérica de 154pb identificada em *Oryza brachyantha* A. Chev e Roehr. (LEE et al., 2005).

Em *Solanum*, o isolamento de sequências associadas a CENH3, por meio de imunoprecipitação da cromatina (ChIP), revelou a existência de sequências específicas para determinados cromossomos do mesmo complemento cromossômico bem como centrômeros desprovidos de DNA repetitivo. Em um monoploide de *S. tuberosum* ($2n = 2x = 24$, AA), sete cromossomos apresentam sequências satélite cromossomo-específicas (St49, St18, St24, St57,

St3-58, St3-238, St3-294), enquanto os demais cinco cromossomos apresentam sequência com baixo número de cópias ou cópia única. (GONG et al, 2012). Em *Solanum verrucosum*, ($2n = 2x = 24$, AA), padrão semelhante foi observado, com quatro cromossomos compostos por seis sequências satélite cromossomo-específicas (Sv14, Sv44, Sv54, Sv123, Sv161.5, Sv161.6), um cromossomo com baixo número de cópias e cópia única, enquanto os demais sete não foram caracterizados (ZHANG et al., 2014). Em *S. chomatophilum* Bitter. ($2n=2x=24$, PP) foram identificadas quatro sequências repetitivas (Sc83, Sc111, Sc92/108, Sc92/108/111), distribuídas em 6-7 centrômeros dos cromossomos do complemento. Ao comparar dois acessos, a repetição Sc83 mostrou uma variação entre plantas para o número de sinais de FISH analisados. Ainda, o centrômero 2 de *S. chomatophilum* demonstrou a existência de três diferentes haplótipos associados a ele, sendo composto pelas repetições Sc111, Sc92/108 e Sc 92/108/111 (OLIVEIRA, 2015). Existência de haplótipos foi também reportada em três cromossomos de 17 cultivares de batata tetraploide. Os haplótipos observados variaram da ausência até todos os quatro homólogos apresentando as sequências St3.58, St24 e St57 (WANG et al, 2014).

Os trabalhos de Gong et al., (2012), Zhang et al., (2014) e Oliveira (2015) avaliaram a distribuição dessas sequências de DNA repetitivo centromérico em espécies diploides com genomas A, P, B, E e T, revelando que a maioria das sequências parece ter origem recente, com exceção de St49 e Sc83. Entretanto, a composição centromérica dos cromossomos dos genomas C e D, presentes apenas em espécies poliploides em associação com o genoma A, ainda não foi descrita. Informações acerca da distribuição e organização das sequências repetitivas centroméricas de espécies aloploides selvagens e a distribuição e organização dessas sequências nos diferentes genomas, podem contribuir para o melhor entendimento da complexidade e evolução dos centrômeros de forma geral, principalmente no gênero *Solanum*. Com esse intuito, o objetivo do trabalho foi verificar o padrão de distribuição e localização de sequências centroméricas características dos genomas A e P de *Solanum* nos cromossomos de espécies aloploides (portadoras dos genomas A, C e D).

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Sistemática e organização genômica de *Solanum*

O gênero *Solanum* L. é o gênero mais representativo da família Solanaceae, abrangendo cerca de 2000 espécies, incluindo a batata cultivada *Solanum tuberosum* (KNAPP et al., 2004). Hawkes em 1990 afirma que já foram identificadas cerca de 235 espécies de batata, sendo sete cultivadas e 228 selvagens, entretanto novos estudos com análises moleculares afirmam que existam cerca de 110 espécies selvagens (SPOONER, 2009). A maioria das espécies do gênero *Solanum* estão distribuídas no sul da América do Norte, norte do Chile e sul da Argentina, e são também encontradas no México e nos Andes (MATSUBAYASHI, 1991).

As espécies desse gênero são subdividas em duas seções: Petota (também conhecida como seção Tuberarium) representando as espécies que tuberizam e Etuberosum de espécies não tuberizantes, sendo a seção Petota a mais importante (HAWKES, 1994). A seção Petota, é ainda subdividida em 18 séries conhecidas como: Juglandifolia, Etuberosa, Morelliformia, Bulbocastana, Pinnatisecta, Commersoniana, Circaeifolia, Conicibaccata, Piurana, Acaulia, Demissa, Longipedicellata, Polyadenia, Cuneolata, Megistracoloba, Ingaefolia, Olmosiana e Tuberosa (HAWKES, 1956, 1958, 1963, 1978).

As espécies da seção Petota possuem número básico cromossômico $x=12$, com morfologia cromossômica muito similar e com níveis de ploidia variados. Cerca de 70% das espécies selvagens de *Solanum* são diploides ($2n=2x=24$), e os outros 30% são poliploides, sendo na maioria das vezes tetraploides ($2n=4x=48$) e hexaploides ($2n=6x=72$), existindo também algumas espécies triploides e pentaploides (GRAVILENKO, 2007 e PENDINEN et al., 2012).

Melo et al. (2011) realizaram um estudo citogenético com nove espécies do gênero *Solanum*, analisando o número e morfologia cromossômica, bem como a caracterização do tipo de núcleo e a localização de satélites. *S. dulcamara* L., *S. atropurpureum* Schrank., *S. gilo* Raddi., *S. melongena* L., *S. nitidibaccatum* Bitter., *S. paniculatum* L. mostraram ser diploides apresentando o mesmo número cromossômico ($2n = 2x = 24$), diferindo das espécies *S. nigrum* L. ($2n=6x=72$), *S. lancinatum* Ait. ($2n=8x=92$) e *S. luteum* Mill. ($2n=4x=48$). O cariótipo se mostrou simétrico em todas as espécies, com cromossomos

variando de submetacêntricos a metacêntricos. O trabalho mostrou uniformidade no tipo de núcleo interfásio (semi-reticulados) e variação no padrão de bandas CMA₃/DAPI. No mesmo trabalho foi realizada a técnica de FISH em apenas três espécies, das nove estudadas, evidenciando dois sítios de rDNA 45S em *S. luteum* ($2n=4x=48$) e quatro sítios de rDNA 45S em *S. nigrum* ($2n=6x=72$) e *S. lanciniatum* ($2n=8x=92$), no qual revelou resultados similares obtidos com a coloração CMA₃.

Em outro estudo, 17 espécies diploides de 4 subgêneros e 7 séries de *Solanum* foram avaliadas quanto a morfometria cromossômica. De maneira geral, os cromossomos dessas espécies são pequenos (menores que 4 µm). O cromossomo mais curto em média para as espécies avaliadas foi o de *Solanum palustre* Schldl. (1,12 µm) e o mais longo de *Solanum sisymbriifolium* Lam. (3,76µm). Todas as espécies analisadas possuíam um par de cromossomos com regiões satélites (RONs), anexados nos braços curtos e cariótipo simétrico. De acordo com os cariótipos avaliados, os cromossomos variaram entre metacêntricos (69%), submetacêntricos (24%) e subtelocêntricos (7%), contribuindo, portanto, para a caracterização das espécies em estudo, sugerindo relações taxonômicas entre as mesmas (ACOSTA et al., 2005).

Rego et al. (2009) também realizaram um estudo citotaxonômico em espécies brasileiras do gênero *Solanum*. Neste estudo ocorreu um predomínio de cromossomos metacêntricos e submetacêntricos nas espécies avaliadas, com maior número de cromossomos metacêntricos em *Solanum paniculatum* L. O bandamento CMA/DAPI mostrou que as regiões ricas em CG se localizaram em regiões terminais dos cromossomos, enquanto as regiões ricas em AT se localizaram em regiões centroméricas. Neste trabalho também foi realizada a técnica de FISH com sondas de rDNA 45S e 5S. Os sítios de rDNA 45S foram coincidentes com regiões C/CMA₃ (satélites), encontrados em um par de cromossomos, exceto em *Solanum corymbiflorum* (Sendtn.) Bohs. ($2n=24$), que apresentou dois pares. Os locos de rDNA 5S apareceram nos braços curtos de quase todas as espécies do estudo, e normalmente nos menores cromossomos do complemento. *S. trachytrichum* Bitter. ($2n=24$) e *S. gemellum* Sendtn. ($2n=24$), apresentaram 4 locos de rDNA 5S. Estes dados sugerem que os segmentos de rDNA 45S e 5S em *Solanum* não apresentam local e números conservados, como ocorre em outras espécies vegetais. Além disso, as espécies avaliadas apresentaram núcleos interfásicos não reticulados e condensação na prófase, em concordância com a

sugestão de Guerra (2000) de que pequenos cromossomos estão associados com essas características.

A batata cultivada, *Solanum tuberosum* é autotetraploide ($2n=4x=48$, AAAA) com pareamento cromossômico quadrivalente (SPOONER et al., 2008). Os cromossomos metafásicos da batata cultivada, *Solanum tuberosum*, são pequenos e morfologicamente muito parecidos, medindo cerca de 1.0 a 3.5 μm , tornando a análise e identificação dos mesmos muito complicada (DONG et al., 2000).

As espécies selvagens do gênero *Solanum* são espécies valiosas para o melhoramento genético, por possuírem genes de resistência a diversos fatores e a múltiplas doenças que atingem a batata cultivada *Solanum tuberosum* (DEJONG et al., 2001 e SPOONER et al., 2008). Muitas dessas características estão associadas a espécies poliploides, como *S. demissum* Lindl. ($2n=6x=72$, AADD'D'), que é fonte de resistência a requeima causada pelo oomiceto *Phytophthora infestans* (PLAISTED AND HOPPES, 1989 e SPOONER et al., 2008), *S. acaule* Bitter. que possui genes de tolerância a geada (SPOONER et al., 2008 e VEGA et al., 2000), bem como algumas espécies selvagens aloploiploides de batata que possuem genes de resistência a podridão mole e à podridão anelar bacteriana (JANSKEY, 2000 e SPOONER et al., 2008).

O surgimento de espécies vegetais poliploides pode estar relacionado com o cruzamento de espécies que produzam gametas não reduzidos (SCHIFINO-WITTMANN; DALL'AGNOL, 2001). Espécies poliploides são classificadas em autopoliploides, originados pela duplicação de um mesmo genoma, e aloploiploides, originados pela duplicação de genomas diferentes, normalmente após um evento de hibridação, e como poliploides segmentares, ou seja, aqueles originados pela duplicação dos genomas de espécies próximas apresentando uma certa homeologia cromossômica (SCHIFINO-WITTMANN, 2004). Um exemplo é a espécie *S. agrimonifolium* Rybd. ($2n=4x=48$), espécie selvagem da série Conicibaccata (seção Petota), que é um alotetraploide natural, com um genoma comum, e um genoma dissimilar, pouco diferente do genoma básico A, com fórmula genômica $A^{c^1}A^{c^1}C^a C^a$ (MATSUBAYASHI, 1991).

A determinação do tipo de ploidia e o desenvolvimento para o conceito do genoma para espécies da seção Petota, de *Solanum*, tem se baseado no pareamento cromossômico de híbridos interespecíficos e de espécies poliploides (PENDINEN et al., 2012). Com o objetivo

de padronizar as interpretações desses genomas, Matsubayashi (1991) reconheceu cinco genomas do gênero *Solanum* como A, B, C, D e P de espécies que tuberizam como *S. tuberosum* e *S. verrucosum* Schlechtd., e o genoma E de espécies que não tuberizam, como *Solanum etuberosum* Lindl. e *Solanum palustre* (SPOONER et al., 2008). Já foi citado na literatura o surgimento de outro genoma, nomeado como genoma T, pertencente ao genoma do tomate, *Solanum lycopersicum* L. (GONG et al., 2012; TORRES et al., 2011). Esses genomas foram classificados de diferentes formas anteriormente após análises de informações como taxas de cruzamentos em combinações interespecíficas, grau de homologia cromossômica (nos híbridos) e viabilidade e fertilidade dos híbridos (MARKS, 1955; HAWKES, 1958; IRIKURA, 1976; RAMANNA AND HERMSEN, 1979; MATSUBAYASHI, 1991)

O genoma A é o genoma mais básico dentre os genomas existentes, visto que várias espécies sul-americanas compartilham esse mesmo genoma, como é o caso da espécie *Solanum verrucosum* (MATSUBAYASHI, 1991). Os genomas, B, C, D, P e E foram nomeados de acordo com as iniciais da série nos quais foram previamente identificados: genoma B – série Longipedicellata Busakov; genoma C- série Conicibaccata Bitter; genoma D- série Demissa Busakov; genoma P- série Piurana Hawkes; genoma E- série Etuberosa (MATSUBAYASHI, 1991).

Em 1991, Matsubayashi identificou em análises dos genomas B, C, D e P que as espécies portadoras desses genomas são aloploidos, e esses genomas não foram identificados em nenhuma espécie diploide por meio de técnicas citogenéticas clássicas. Posteriormente estudos com técnicas citogenéticas moleculares, como GISH e análises bioinformáticas de dados de sequenciamento do gene para nitrato redutase e do gene Waxy (GBSSI- Granule- bound starch synthase) confirmaram a existência de algumas espécies diploides portadoras do genoma B (*S. jamesii* Torr. p. ex) e portadoras do genoma P (*S. chomatophilum* Bitter.) (PENDINEN et al., 2012; RODRIGUEZ; SPOONER 2009; SPOONER et al., 2008). Os genomas C e D foram encontrados apenas em espécies poliploides (SPOONER et al., 2008).

Pendinen et al. (2012) analisaram a composição genômica de espécies hexaploides da série Demissa (seção Petota), *S. demissum* ($2n=6x=72$, AADDD'D') e *S. hougassi* Corr. ($2n=6x=72$, AADDD'D'), com o objetivo de verificar se os genomas A, B e P estavam presentes

em espécies hexaploides desta série. A série de combinações de sondas com o genoma A (*Solanum verrucosum*, $2n=2x=24$, AA), B (*S. ehrenbergii* (Bitter) Rydb. ou *S. jamesii*) e P (*S. andreanum* Backer., *S. chomatophilum*, ou *S. piurae* Bitter) em acessos de *S. hougassi* revelou que essa espécie é um aloploiploide composta pelos três genomas (A, B e P)

Neste mesmo estudo, Pendinen et al. (2012) demonstraram que para a espécie *Solanum demissum* as sondas de genoma A hibridizaram fortemente em todos os cromossomos.. Estes resultados sugerem que *S. demissum* contém três conjuntos de cromossomos altamente homólogos e relacionados ao genoma A.

De acordo com Matsubayashi (1991), que renomeou os cinco genomas de *Solanum*, todos os membros da série Demissa são aloploiploides com fórmula genômica AADDD'D', embora outros citogeneticistas tenham dado símbolos diferentes para essa série. A batata cultivada *Solanum tuberosum* é uma espécie portadora do genoma A. De acordo com estudos filogenéticos realizados por Gong et al., (2012) baseado na análise de DNA plastidial de Spooner et al., (1993), Spooner e Castillo (1997), e Castillo e Spooner (1997), o genoma P é o mais próximo do genoma da batata cultivada, genoma A, seguido pelo genoma B, T e E.

Espécies poliploides de todas as séries taxonômicas de *Solanum*, exceto Etuberosa (genoma E), possuem um genoma comum, o genoma básico A (MATSUBAYASHI,1991). Essas espécies poliploides diferem umas das outras em virtude dos seus genomas adicionais, que são estruturalmente diferenciados a um menor e maior grau e são dadas formulas genômicas diferenciadas (MATSUBAYASHI,1991).

2.2 DNA repetitivo em *Solanum*

Sequências de DNA repetitivo referem-se a sequências de DNA presentes em múltiplas cópias do genoma. Essas sequências são encontradas em todos os eucariotos e podem representar até 90% do tamanho do genoma em algumas espécies de plantas superiores. As sequências de DNA repetitivo são consideradas importantes por gerar grandes diferenças entre genomas, que pode refletir em diferenças evolutivas entre espécies (MEHROTRA; GOYAL, 2014 e OLIVEIRA, 2015).

Um tipo de sequência de DNA repetitivo é o DNA satélite, que pode representar até 20% do DNA nuclear de uma planta, cerca de 50% de alguns genomas de insetos e roedores e menos de 5% em seres humanos. Elementos transponíveis, que também são um tipo de DNA repetitivo, são altamente abundantes em alguns genomas, cerca de 45% no genoma humano, 52% do genoma do gambá, podendo também atingir cerca de 85% de alguns grandes genomas de plantas, como o do milho (FLORES e RAMOS, 2012). Em *Arabidopsis thaliana*, por exemplo, foi identificada uma família de DNA satélite centromérica de 180 pb, altamente repetitiva. Essa família repetitiva constitui entre 2 e 5% do genoma de *Arabidopsis* e foi mapeada exclusivamente nas regiões centroméricas dos cinco pares de cromossomos de *A. thaliana* (NAGAKI et al., 2003).

Existem dois tipos de sequências repetitivas: as dispersas (elementos transponíveis) e as repetidas em tandem (JURKA et al., 2007). Os elementos transponíveis, propostos por Barbara Mc Clintock, são fragmentos de DNA que possuem capacidade de se mover e influenciarem na expressão gênica no local de inserção. Possuem comprimentos que vão até 30kb e estão espalhados na maioria dos cromossomos. São em sua maior parte elementos transponíveis inativos e, muitas vezes, cópias incompletas desses elementos, principalmente aqueles pertencentes à classe dos retroelementos. Já as sequências em tandem possuem unidades de repetição (monômeros) adjacentes umas às outras (JURKA et al., 2007).

Repetições em tandem são classificadas em microssatélites (monômero de 2-5 pb), minissatélites (monômero de 600-100 pb) e DNA satélite, cujos arranjos podem medir até 100 Mb com unidades de repetição com comprimento variável. As repetições em tandem do tipo DNA satélite são geralmente encontradas em posições específicas dos cromossomos que apresentam um papel funcional, podendo ser subteloméricas/teloméricas, intercalares, como nas regiões que codificam DNA ribossomal e centroméricas (MEHROTRA; GOYAL, 2014).

A principal característica das repetições de DNAs em tandem é o arranjo sequencial de suas unidades de repetição, ou monômeros de DNA satélite, que se organizam uma após as outras que podem ter tamanhos de até dezenas de megabases (PLOHL, 2010).

Sequências repetitivas estão envolvidas em vários processos tais como o movimento dos cromossomos e pareamento, condensação centromérica, recombinação cromossômica, coesão das cromátides irmãs, associação do cromossomo com o fuso mitótico, arranjo cromossômico, a interação de proteínas com a cromatina, a determinação da estrutura dos cromossomos, evolução cariotípica, regulação da expressão gênica e respostas genômicas a estímulos ambientais e mudanças fisiológicas (MEHROTRA; GOYAL, 2014).

O Consórcio para Sequenciamento do Genoma da Batata (PGSC) realizou em 2011 o sequenciamento de um genótipo monoploide (DM1-3), de *Solanum tuberosum* com a estimativa de cerca de 39031 genes codificadores de proteínas. O genoma apresentou cerca de 62,2% (452,5 Mb) de conteúdo repetitivo, sendo que 29,4% era composto por retrotransposons com longas repetições terminais (LTR)

Porções de DNA repetitivo são importantes constituintes da heterocromatina centromérica, telomérica e subtelomérica. Duas repetições satélite subteloméricas (CL14 e CL34) foram identificadas a partir da análise da fração repetitiva do genoma da batata. As repetições subteloméricas CL14 e CL34 são organizadas em matrizes longas com monômeros de 182pb e 339 pb, respectivamente. Através da técnica de hibridização *in situ* fluorescente (FISH), foi possível observar que as sequências CL14 e CL34 se localizaram da extremidade da maioria dos 24 cromossomos da batata. A repetição CL14 hibridizou em regiões subteloméricas nos cromossomos de algumas espécies do gênero *Solanum*, de diferentes genomas, incluindo o tomate (genoma T) que se divergiu da batata a aproximadamente 7 milhões de anos. Entretanto a repetição CL34 gerou sinais fracos ou foi ausente em algumas espécies, presente apenas em espécies intimamente relacionadas à batata. Este fato evidencia que essas sequências são organizadas de forma independente no genoma de *Solanum tuberosum* sendo CL14 uma repetição mais ancestral e CL34 uma repetição que surgiu recentemente já que ela esteve presente apenas em espécies intimamente relacionadas à batata, mostrando o potencial dinamismo dos domínios subteloméricos nos genomas eucarióticos (TORRES et al. 2011).

O estudo de elementos repetitivos no gênero *Solanum* é diverso. Tek e Jiang (2004) caracterizaram outro elemento repetitivo da espécie diploide *Solanum bulbocastanum* Dunal.,

uma região telomérica intercalar (ITR - Intercalary Telomeric Repeat), nomeada de pSbTC1. O isolado tem cerca de 2,8 kb com organização em tandem e longos arranjos de muitos megabases. Através da técnica de FISH foi possível observar que essas sequências em tandem estão localizadas em regiões centroméricas em várias espécies de batata. O estudo também afirma que essas sequências são altamente metiladas e associadas à heterocromatina centromérica. He et al. (2013) também exploraram a distribuição de sequências teloméricas em diferentes espécies diploides de *Solanum*. Este estudo mostrou que houve uma amplificação maciça de ITRs nas regiões centroméricas dos cromossomos de espécies de *Solanum* com os genomas B e P. Esses sinais intersticiais estavam presentes em pelo menos algum cromossomo do complemento na maioria das espécies avaliadas, entretanto não foi observado sinal intersticial em tomate. Cromossomos paquítenicos de *Solanum pinnatisectum* Dun. (genoma B) apresentaram uma proporção significativa de ITRs em suas contrições primárias. Outro dado relevante neste estudo é a associação de uma das sequências de DNA associadas a CenH3 em *Solanum tuberosum*, St 49 (GONG et al. 2012). St49 hibridizou com regiões de DNA telomérico em tomate, mais especificamente, dois locos sobrepostos a dois principais sinais de ITR, indicando que essa sequência é uma subfamília de ITRs em batata.

Com o intuito de avaliar o DNA repetitivo de batata, Tek et al. (2005) investigaram por análises citogenéticas e moleculares uma repetição em tandem, denominada Sobo, detectada apenas em uma espécie diploide de batata *Solanum bulbocastanum* Dunal. A repetição Sobo foi mapeada em um único local, na região pericentromérica do cromossomo 7 da espécie. Esse único loco abrange 360kb de um monômero de 4,7 kb. A análise molecular evidenciou que parte do monômero Sobo é similar a sequências LTRs de um retrotransposon presente no genoma da espécie, sugerindo que o monômero original pode ter surgido por recombinação de uma região genômica entre dois LTRs separados com outras sequências repetitivas.

O estudo de DNA repetitivo do tomate, tal como o da batata e outras espécies do gênero é uma das peças centrais na identificação genética de espécies do gênero *Solanum* (VAN DER HOEVEN et al., 2002). Hirakawa et al. (2014) realizaram o sequenciamento de todo o genoma de *Solanum melogena* L. (beringela). A estimativa é de cerca de 85446 genes presentes na espécie, apresentando um comprimento total de 586,8 Mb, 70% do seu genoma constituído de sequências de DNA repetitivo. Assim como os dados de sequenciamento do genoma da batata (PGSC, 2011), o tomate também teve seu genoma sequenciado em 2012 (TOMATO GENOME CONSORTIUM, 2012). As análises desse genoma revelaram um

tamanho genômico de 900 Mb, com uma estimativa de cerca de 18320 genes ortólogos. Em relação ao genoma da batata, o genoma do tomate mostrou 8,7% de divergência em relação aos nucleotídeos das regiões eucromáticas e mais de 30% de divergência nas regiões intergênicas e heterocromáticas (ricas em DNA repetitivo).

Em 1991, Lapitan, Ganal, Tanksley, realizaram uma pesquisa molecular e citogenética de sequências de DNA repetitivo em tomate, *Solanum lycopersicum*. Foram utilizados 1000 clones e foram isoladas quatro famílias de DNA repetitivo. Essas quatro principais famílias foram encontradas e caracterizadas em relação ao número de cópias, localização cromossômica e evolução na família Solanaceae. A classe TGRI (DNA satélite, altamente repetitivo) apresentou 77000 cópias do monômero de 162 pb, normalmente perto dos telômeros, centrômeros e em alguns locais intersticiais dos cromossomos. A classe de rDNA 45S, apresentou 2300 cópias do monômero de 9,1 Kb, com um loco único com sinal de hibridização intenso no final do cromossomo 2. A classe TGRII mostrou estar em regiões intercalares em quase todos os cromossomos com monômero de 133 Kb (média entre os elementos) e 4200 cópias. A quarta classe, TGRIII, foi encontrada em regiões intercalares, agrupadas em algumas regiões cromossômicas, nas regiões centroméricas e com cerca de 2100 cópias.

Algumas repetições teloméricas (TR) e subteloméricas (TGR1) foram investigadas por meio da técnica de fiber-FISH em tomate para analisar a organização molecular e citológica dessas sequências na espécie *Solanum lycopersicum*. A maioria dos telômeros é composta tanto por repetições teloméricas quanto subteloméricas separadas por um espaçador gênico e uma alta variação no tamanho de ambas as repetições. As fibras revelaram um comprimento de 223-1330 Kb, tanto nos blocos constituídos pelas repetições teloméricas, quanto para as subteloméricas, sugerindo que todos os cromossomos têm sua própria organização telomérica (ZHONG et al., 1998).

Outro trabalho realizado no sentido de estudar o DNA repetitivo de *Solanum* foi realizado por Stupar et al. (2002) que mostraram a existência de uma única classe de heterocromatina pericentromérica, nomeada 2D8. Essa repetição foi isolada de *Solanum bulbocastanum* e possuía 5,9kb. Consistia de uma sequência de DNA repetitivo em tandem, altamente homóloga com espaçadores intergênicos (IGS) dos genes de RNA ribossomal 18S e 25S. Este estudo evidencia a possibilidade de que os elementos 2D8 tenham derivado de espaçadores intergênicos, corroborando com estudos que encontraram evidências de

sequências relacionadas ao DNA ribossômico distribuídas por todo o genoma eucariótico. Este estudo também mostra que 2D8 possui uma evolução dinâmica, altamente variável na estrutura e número de cópias ao longo do gênero *Solanum*.

Um tipo especial de DNA repetitivo é o DNA centromérico. O DNA centromérico é o mais abundante em repetições em tandem encontradas em plantas e animais (MEHROTRA; GOYAL, 2014). Centrômeros são constrições primárias dos cromossomos eucarióticos, responsáveis pelo movimento cromossômico durante a mitose e meiose (FANG e SPECTOR, 2005). São locais de montagem do cinetócoro e ligação das fibras do fuso, permitindo assim a manutenção e segregação fiel dos cromossomos e cromátides durante a divisão celular, garantindo a estabilidade genética (JIANG et al., 2003). Os centrômeros funcionais contêm nucleossomos centroméricos especializados, associados à organização da cromatina, onde a histona 3 (H3) é substituída pela presença de uma variante (CenH3) localizada no centrômero (FANG e SPECTOR, 2005; JIANG et al., 2003).

Os cromossomos normalmente possuem uma única constrição primária, formando um cromossomo monocêntrico. Entretanto existem organismos que possuem mais de um centrômero, ou até mesmo não possuem uma constrição primária e seus cromossomos são constituídos por um centrômero disperso, em muitos subdomínios, ao longo de todo o comprimento cromossômico (DEMBURG, 2001). Cromossomos dicêntricos, por possuírem dois centrômeros, são muito instáveis, devido à formação de pontes na anáfase, ocasionando em cromossomos quebrados ou rearranjados. Entretanto, em alguns casos, esses cromossomos são estabilizados devido a inativação de um dos dois centrômeros, permitindo com que o cromossomo se comporte como monocêntrico (PLOHL, MEŠTROVIĆ, MRAVINAC, 2014). Essa inativação ainda não foi muito bem elucidada, porém, mudanças epigenéticas, como alterações nas histonas, causam essa inativação no milho (HAN et al., 2006) e trigo (ZHANG et al., 2010).

Os cromossomos holocêntricos são caracterizados pela ausência da constrição primária e apresentam normalmente a proteína centromérica, CenH3, distribuída ao longo do eixo de cada cromátide (SILVA, 2016). Nesses cromossomos existe uma placa cinetocórica com fibras do fuso unidas ao longo do comprimento total do cromossomo (PLOHL, MEŠTROVIĆ, MRAVINAC, 2014). Em *Luzula elegans* Lowe, foi realizada a primeira análise genômica de uma espécie vegetal holocêntrica, evidenciando que o DNA satélite pode ser um importante determinante centromérico nessa espécie (HECKMANN et al., 2013). A

forte relação da CenH3 com a funcionalidade centromérica inicialmente desfocou a importância do DNA constituinte dos centrômeros, entretanto o DNA que compõe os centrômeros, muitas vezes compostos por longos arranjos de DNA satélite, são importantes e representam uma função conservada em alguns organismos eucarióticos (JIANG et al., 2003).

Gong et al., (2012) realizaram estudos sobre a caracterização de sequências de DNA associadas com a CENH3 em batata (*Solanum tuberosum*). Eles observaram que *S. tuberosum* (genoma A) possui características peculiares, por possuir sequência cromossomo específica para alguns dos 12 cromossomos da batata. Foram encontradas sete sequências centroméricas repetitivas em *S. tuberosum*. Foi observado que cinco centrômeros (Cen4, CEN6, Cen10, Cen11 e Cen12) não possuíam repetições satélite, mas continham principalmente sequências simples e de baixo número de cópias, incluindo genes ativos. Entretanto, seis centrômeros da batata (CEN1, Cen2, CEN3, Cen5, Cen7 e Cen8) são compostos por arranjos de repetições satélite específica para cada cromossomo, um arranjo raro em comparação com outros eucariotos.

Outro trabalho que contribuiu para o melhor entendimento da complexidade centromérica na batata foi realizado por Zhang et al., (2014) com *S. verrucosum* (genoma A), uma espécie selvagem proximamente relacionada à *S. tuberosum* e já proposta como seu ancestral. Neste trabalho foi observado que *S. verrucosum* possuía tanto centrômeros compostos por DNA repetitivo como por DNA de cópia única ou com baixo número de cópias. Foram encontradas nove sequências centroméricas repetitivas. Os centrômeros dos cromossomos 2, 4, 7 e 10 apresentam essencialmente DNA satélite. Os centrômeros dos mesmos cromossomos em *S. tuberosum* são compostos tanto por DNA repetitivo (2 e 7) quanto por DNA não repetitivo (4 e 10) e as sequências que os compõem não apresentam homologia com aquelas em *S. verrucosum* (GONG et al., 2012). Zhang et al., (2014) consideram a hipótese de que as repetições presentes nos centrômeros 4 e 10 de *S. verrucosum* tenham invadido o genoma da espécie após sua divergência de *S. tuberosum*, que teria por sua vez mantido a composição do DNA centromérico com cópias únicas. Cinco diferentes repetições satélites estão presentes nos genomas das duas espécies e sequências homeólogas de cópia única foram encontradas em comum apenas no centrômero do cromossomo 9, revelando sua rápida evolução entre espécies proximamente relacionadas.

Oliveira (2015) também analisou sequências repetitivas centroméricas de espécies de *Solanum*. Foram avaliadas sequências repetitivas centroméricas em *Solanum chomatophilum*

($2n=2x=24$), portadora do genoma P (mais próximo ao genoma A) através de dois acessos da espécie. Foram identificadas quatro sequências repetitivas, com comprimentos de 600 pb a 3 kb, comprimentos estes incomuns para repetições localizadas nos centrômeros. As análises de FISH mostraram que essas repetições compõem de 6-7 centrômeros. Foi observado que houve variação na distribuição dessas sequências quando elas foram mapeadas para os dois acessos da espécie em estudo. Além da diferença na distribuição dessas sequências nos acessos utilizados, Oliveira (2015) observou que existia divergência entre cromossomos homólogos e também entre plantas de um mesmo acesso. Observou-se também que todas as sequências centroméricas isoladas de *S. chomatophilum* foram encontradas no genoma A, porém ausentes nos outros genomas, com exceção de uma sequência que foi encontrada no genoma E.

Nesses trabalhos, foram feitos experimentos de imunoprecipitação da cromatina (ChIP), com uso da CenH3 para o isolamento do DNA centromérico dessas três espécies. A dinâmica evolutiva das sequências centroméricas dessas três espécies foi avaliada em espécies selvagens de *Solanum* portadoras de outros quatro genomas (genomas B, P, T e E), entretanto esses dados não foram observados em espécies poliploides, portadoras dos genomas C e D. Os resultados obtidos nos três trabalhos apontam para diferenças significativas na composição do DNA centromérico, mesmo em espécies muito relacionadas (ZHANG et al. 2014; GONG et al., 2012; OLIVEIRA, 2015).

No Quadro 1 pode ser observado um esquema de distribuição das sondas centroméricas localizadas nas espécies *S. tuberosum* ($2n=4x=48$, AAAA), *S. verrucosum* ($2n=2x=24$, AA) e *S. chomatophilum* ($2n=2x=24$, PP) e a localização das mesmas nos cromossomos e também sua distribuição em espécies portadoras dos genomas B, P e E, de acordo com os trabalhos de Zhang et al. 2014, Gong et al., 2012 e Oliveira, 2015.

Quadro 1: Localização de sondas centroméricas de *Solanum tuberosum* (AA – Sondas St), *Solanum verrucosum* (AA – Sondas Sv), *Solanum chomatophilum* (PP – Sondas Sc) nos cromossomos dos genomas A, P, B e E 26

Sondas	<i>S. tuberosum</i> (genoma A)	<i>S. verrucosum</i> (genoma A)	<i>S. chomatophilum</i> (genoma P)	<i>S. jamesii</i> (genoma B)	<i>S. palustre</i> e <i>etuberosum</i> (genoma E)
Sv 14	Ausente	cen 4	Ausente	Ausente	Ausente
Sv 44	Ausente	cen 4	Ausente	Ausente	Ausente
Sv 161.5(St 24)	cen 1	cen 7	Ausente	Ausente	Sinal 2
Sv 161.6 (St 57)	cen 7	cen 7	Ausente	Ausente	Ausente
Sv 54	cen 9	cen 2 e 10	cen 2 (sinal único)	Ausente	Ausente
Sv 123	Ausente	cen 2 e 10	cen 1, 2 e outro desconhecido.	Ausente	Ausente
Sv 98	Todos os cromossomos	Todos os cromossomos	Ausente	Ausente	Ausente
Sv 43	Todos os cromossomos	Todos os cromossomos	7 cromossomos	Ausente	Ausente
Sv 132	Todos os cromossomos	Todos os cromossomos	Ausente	Todos os cromossomos	Todos os cromossomos
St 49	cen 5 e uma localização não centromérica em outro par	Múltiplos centrômeros	Múltiplos centrômeros	Múltiplos centrômeros	cen 5 e uma localização não centromérica em outro par
St 18	cen 9	Cen desconhecido	Sinais dispersos em todos os cromossomos	Ausente	Sinal 2
St 24	cen 1	Cen desconhecido	Ausente	Ausente	Ausente
St 57	cen 7	cen 7	Ausente	Ausente	Ausente
St 3-58	cen 2	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
St 3-238	cen 8	Ausente	Sinais dispersos em todos os cromossomos	Ausente	Ausente
St 3-294 °	cen 3	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
Sc 83	Todos cromossomos (não específicos para os centrômeros)	Ausente	Acesso A: Cen desconhecido Acesso B: cen 3 e uma cópia de cen desconhecido	Ausente	6 centrômeros
Sc 111	cen 3 e 9	Ausente	Acesso A: Cen 2 Acesso B: Ausente	Ausente	Ausente
Sc 92/108	Todos cromossomos	Ausente	Acesso A: cen 1, e uma cópia do cen 2 Acesso B: Uma cópia do cen 1	Ausente	Ausente
Sc 92/108/111	Ausente	cen 2 e 10	Acesso A: Ausente Acesso B: cen 2	Ausente	Ausente

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material vegetal

Para os experimentos de localização das sequências centroméricas foram usadas espécies aloploidoides portadoras dos genomas AC e AD. As espécies tetraploides portadoras do genoma C utilizadas foram: *Solanum agrimonifolium* Rybd. ($2n=4x=48$, $A^{c1} A^{c1} C^a C^a$) e *Solanum longiconicum* Bitter. ($2n=4x=48$, $A^{c1} A^{c1} C^1 C^1$). As espécies hexaploides portadoras do genoma D utilizadas foram: *Solanum guerreroense* Correll. ($2n=6x=72$, $AADDD^sD^s$) e *Solanum demissum* Lindl. ($2n=6x=72$, $AADDD^dD^d$). Para obtenção das sondas a partir de amplificação via PCR e validação das sondas foram utilizadas as espécies diploides *Solanum tuberosum* (monoploide), *Solanum verrucosum* e *Solanum chomatophilum*.

As sementes foram plantadas em vasos, em casa de vegetação na Universidade Federal de Lavras- UFLA, para obtenção de raízes de todas as espécies para preparo de lâminas e folhas das espécies diploides para extração de DNA genômico.

3.2 Preparo das lâminas

Para obtenção dos cromossomos mitóticos, raízes com cerca de 1 cm foram coletadas de vasos mantidos em casa de vegetação e submetidas a tratamento com solução de 8-hidroxiquinoleína 3mM, com o tempo de exposição de 2-4 horas em temperatura ambiente, no escuro.

Após o tratamento, as raízes foram fixadas em 3 etanol : 1 ácido acético gelado e mantidas a -20 °C. Após a lavagem das pontas de raízes para retirada do fixador, as mesmas foram submetidas à digestão enzimática em solução de pectinase Onozuka R10 0,7%, celulase 0,7%, pectoliase 1% e citohelicase 1% a 37 °C, por cerca de 2 horas.

As lâminas foram montadas pela técnica de secagem à chama. Após a avaliação em microscópio de campo claro, lâminas com maior número de metáfases com boa morfologia cromossômica foram selecionadas para os experimentos de hibridização *in situ* fluorescente.

3.3 Hibridização *in situ* fluorescente (FISH)

3.3.1 Amplificação e marcação do rDNA 45S utilizado como sonda controle

A sequência de rDNA 45S foi usada como sonda para caracterizar esse sítio nas espécies em estudo e para servir como controle positivo nos experimentos com sondas centroméricas nos cromossomos das espécies portadoras do genoma AC ou do genoma AD.

Bactérias transformadas com o vetor contendo a sequência 45S de trigo foram cultivadas em meio LB contendo antibiótico ampicilina selecionador. A partir de colônias isoladas dessa cultura foi feita cultura em meio líquido e extração do plasmídeo com uso do Kit Plasmid Mini (Quiagen).

A sonda 45S foi marcada com biotina por meio da técnica de “Nick Translation”. Cada reação de marcação teve 1 µg de DNA da sonda, tampão de reação (0.5 M Tris HCl pH 7,5, 50 mM MgCl₂), nucleotídeos (dATP, dCTP e dGTP a 0.5 mM cada), nucleotídeo marcado (0.33 mM dTTP + 0.16 mM dUTP marcado com biotina), 0.02 U de DNase I e 0.5 U de DNA Polimerase I em um volume final de 50 µL. O produto da reação foi visualizado em eletroforese em gel de agarose 1% para confirmação do tamanho do(s) fragmento(s) e verificação do padrão de amplificação.

3.3.2 Amplificação e marcação do DNA repetitivo centromérico utilizados como sonda

As sondas centroméricas utilizadas neste estudo, identificadas em *S. tuberosum* e *S. verrucosum*, ambas com genoma A, e em *S. chomatophilum*, genoma P, foram escolhidas em função de suas ocorrências em genomas mais distantes do genoma A, como E e B, além da maior distribuição no genoma A. Foram verificados o padrão de distribuição de duas repetições identificadas em *S. tuberosum* (St18 e St 49) por Gong et al. (2012), três repetições identificadas em *S. verrucosum* (Sv54, Sv123 e Sv 161.5) por Zhang et al. (2014) e três repetições identificadas em *S. chomatophilum* (Sc 83, Sc 111 e Sc 92/108) por Oliveira (2015).

As sondas foram amplificadas por reações de PCR utilizando primers cujas sequências estão disponibilizadas nos artigos. As reações de amplificação foram feitas usando DNA genômico isolado de folhas jovens do clone monoplóide DM1-3 516R44 (*S. tuberosum* grupo

phureja), de *S. verrucosum* e *S. chomatophilum* usando o Kit para extração de DNA genômico QIAGEN (Valencia, CA). A reação de PCR foi feita em 25 µL de mix contendo tampão de reação 1x; MgCl₂ 3 mM, dNTPs 0.25 mM, primers 0.4 µM, 0.02 U de Platinum Taq Polymerase (Invitrogen), 10 ng de DNA genômico. As condições de amplificação programadas em termociclador foram 95°C por 5 min; 32 ciclos (30 seg a 95°C, 1min a 57°C, 45 seg -1 min a 72 °C dependendo do tamanho do fragmento); 5 min a 72 °C. Os produtos da reação foram visualizados em eletroforese em gel de agarose 1% para confirmação do tamanho do(s) fragmento(s) e verificação do padrão de amplificação.

Os produtos de PCR foram marcados com biotina-16-UTP ou digoxigenina-11-dUTP (Roche Diagnostic, Indianapolis) por meio de reação “nick translation” padrão. A reação foi feita em 50 µL de mix contendo tampão de reação 1x; 1 µg do produto de PCR; nucleotídeos dATP, dCTP e dGTP 0.5 mM; dTTP 0.33 mM; dUTP marcado com biotina ou digoxigenina 0.17 mM; 4 x 10⁻¹ U de DNase I e 0.25 U de DNA Polymerase I, a 15°C for 1,5 h. O tamanho dos fragmentos (entre 100 e 500 pb) foi confirmado em eletroforese em gel de agarose.

3.3.3 Hibridização e detecção das sondas

Os cromossomos obtidos nas preparações feitas com meristemas das espécies poliploides (genoma C e D) foram desnaturados com formamida 70% em SSC 2x, por cerca de 1,5 min a 85 °C e desidratados em séria alcóolica: etanol 70% (-20 °C); 90% and 100% por 5 minutos cada. A mistura de hibridização (Formamida 50%, SSC 2x, sulfato de dextran 10%, 50-100 ng de sonda marcada) foi desnaturada por 10 minutos a 95 °C e resfriada em gelo por pelo menos 5 minutos. A mistura de hibridização foi aplicada sobre a preparação cromossômica, coberta com lamínula 22 X 40 mm e colocada em câmara úmida de um dia para o outro.

A detecção das sondas foi feita com o uso dos anticorpos antibiotina conjugada com alexafluor 488 e antidigoxigenina conjugada com rodamina (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) após lavagens estringentes com tampão SSC 2x e TNT. Os cromossomos foram contracorados com DAPI (diamidínefenilindole) em meio de montagem “antifade” VectorShield (Vector Laboratories, Burlingame, CA). As lâminas foram analisadas em microscópio de epifluorescência Nikon eclipse E400, com uso dos filtros para DAPI (Excitação:330-385nm; Emissão:420nm), Alexafluor488 (Excitação:510-550nm;

Emissão:590nm) e Rodamina (Excitação: 400-410nm; Emissão:455nm). As imagens foram avaliadas em microscópio de epifluorescência Olympus BX60 com câmara monocromática refrigerada, capturadas com uso do software NIS Elements BR, e processadas no Adobe Photoshop CS6.

As sondas centroméricas de *S.tuberosum*, *S.verrucosum* foram inicialmente hibridizadas em metáfases das suas espécies originais, para a validação das sondas obtidas por amplificação de PCR (ANEXO A). As sondas utilizadas de *S.chomatophilum* foram as mesmas utilizadas no trabalho original e cedidas pelo autor (OLIVEIRA, 2015).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os genes ribossomais 45S estão organizados em tandem, formando blocos com centenas ou milhares de cópias, que podem corresponder a até 10% do genoma de plantas. São sequências de DNA muito úteis para estudos cromossômicos, por serem de fácil identificação nos cromossomos por meio de hibridização *in situ*, e por terem ampla distribuição ao longo de diferentes grupos taxonômicos pelo fato de serem muito conservadas (GUERRA, 2004). Em função dessas características, a sequência 45S foi caracterizada nas quatro espécies aloploides de *Solanum* usadas nesse estudo, para servir como controle positivo para os experimentos de hibridização com as sondas centroméricas isoladas em espécies diploides com genoma A ou P. Das espécies portadoras do genoma AC, *S. longiconicum* ($2n=4x=48$, AACCC), apresentou 4 sítios de rDNA 45S (dois maiores e dois menores), enquanto *S. agrimonifolium* ($2n=4x=48$, AACCC), apresentou apenas 2 sítios (figura 1, A e B). Já no genoma AD, as duas espécies utilizadas *S. demissum* ($2n=6x=72$) e *S. guerreroense* ($2n=6x=72$), apresentaram 4 sítios de rDNA 45S (figura 1, C e D). Chiarini (2014) observou a distribuição da sonda de rDNA 45S em populações diploides ($2n=2x=24$) e poliploides ($2n=4x=48$, $2n=6x=72$) de *Solanum elaeagnifolium*. Nas espécies poliploides, o autor mostrou que o número de marcas de 45S correspondia ao nível de ploidia. De um modo geral, a distribuição de sequências de rDNA 45S e 5S em espécies poliploides de *Solanum* não segue um padrão específico e não precisa necessariamente estar associado ao nível de ploidia, como nas espécies *S. luteum* ($2n=48$) e *S. nigrum* ($2n=72$) e *S. laciniatum* ($2n=92$), que apresentaram dois, e quatro sítios, respectivamente (Melo, 2009). Não foram encontrados trabalhos sobre a distribuição de rDNA 45S nas espécies utilizadas no presente estudo. Nossos resultados se assemelham ao descrito de que o número de sítios de 45S das espécies *S. agrimonifolium*, *S. guerreroense* e *S. demissum* não corresponde necessariamente ao nível de ploidia.

A partir do padrão de distribuição de 45S nas quatro espécies foi possível demonstrar a ausência de sinal para algumas sequências centroméricas. No genoma AC, as sondas St18 e St49 (*S. tuberosum*), Sv54 (*S. verrucosum*) e Sc92/108 (*S. chomatophilum*) foram ausentes (figura 3, B e J; Quadro 2), sendo identificadas apenas a sonda 45S. No genoma AD a repetição St18, também esteve ausente (figura 2, B). O quadro 2 apresenta o resumo do padrão de hibridização das sondas usadas no presente trabalho e nos trabalhos prévios em que foram caracterizadas nos genomas A de *S. tuberosum* e *S. verrucosum*, para permitir a

inferência sobre a dinâmica das sequências nos genomas C e D que compõem os aloploidos juntamente com o genoma A.

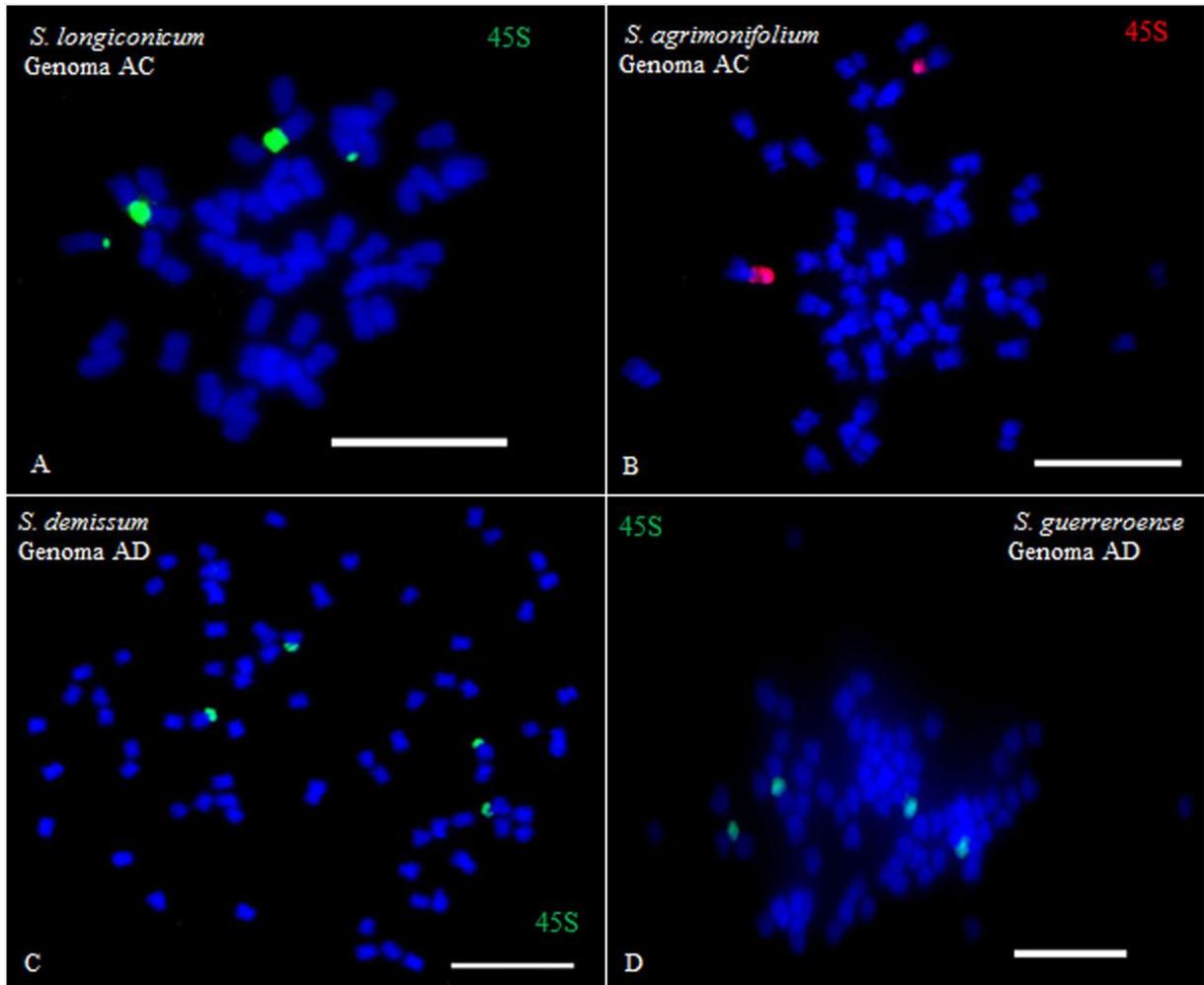


Figura 1: Mapeamento por FISH de locos de rDNA 45S (verde em A, C e D; vermelho em B) em cromossomos contracolorados com DAPI nas espécies (A) *Solanum longiconicum* ($2n=4x=48$) e (B) *Solanum agrimonifolium* ($2n=4x=48$), portadoras do genoma AC e (C) *Solanum demissum* ($2n=6x=72$) e (D) *Solanum guerreroense* ($2n=6x=72$), portadoras do genoma AD. Barras= 10μm. Fonte: Do autor (2017)

Quadro 2: Resumo das análises de FISH das repetições centroméricas isoladas de *S.tuberosum* (GONG et al, 2012), *S.verrucosum* (ZHANG, et al 2014) e *S. chomatophilum* (OLIVEIRA, 2015) em espécies do genoma A (previamente identificadas) e em espécies alopoliploides portadoras do genoma AC e AD de *Solanum* do presente trabalho.

Sondas	<i>S. tuberosum</i> (2n=24,AA)	<i>S. verrucosum</i> (2n=24,AA)	Genoma AC (2n=48)	Genoma AD (2n=72)
St18	Específica para Cen 9	Um par cromossômico não identificado	Ausente	Ausente
St49	Específica para Cen 5 e não centromérica em outro par cromossômico	Sinal centromérico e/ou pericentromérico em múltiplos cromossomos	Ausente	Sinal centromérico e/ou pericentromérico em múltiplos cromossomos
Sv54	Específica para Cen 9	Específica para Cen 2 e Cen 10	Ausente	4 sinais
Sv161.5	Específica para Cen 1	Específica para Cen 7	2 sinais	4 sinais
Sv123	Ausente	Específica para Cen 2 e Cen10	2 sinais	2 sinais
Sc83	Ausente	Sinais em todos os cromossomos, não específicos para os centrômeros	Sinais dispersos não específicos para os centrômeros	2 sinais
Sc111	Específica para Cen 3 e Cen 9	Ausente	Ausente	4 sinais (colocalizados com 4 sinais de Sc92/108)
Sc92/108	Sinais dispersos em todos os cromossomos (mais abundantes nos centrômeros)	Ausente	Sinais dispersos em todos os cromossomos, com maior intensidade em alguns centrômeros	Sinais dispersos em todos os cromossomos e 7 sinais mais intensos nos centrômeros

A sequência St18 não está presente nos genomas AC e AD avaliados (Figura 2, B; Quadro 2). Para o genoma A, em *S. tuberosum*, St18 foi específica para o centrômero 9, enquanto em *S. verrucosum* hibridizou apenas em um par de cromossomos diferente do 9. Nos genomas P e B gerou sinais fracos dispersos em todos os cromossomos. Essa repetição pode estar relacionada a retrotransposons do tipo LTR, uma provável fonte para o surgimento de novas repetições satélite centroméricas em batata (GONG et al., 2012), como é o caso da repetição satélite Sobo isolada de *S. bulbocastanum* amplificada a partir de um retrotransposon (TEK e JIANG, 2004). As evidências são de que St18 seja uma repetição recente, que pode ter sido amplificada de forma independente nas duas espécies do genoma A em que foram identificadas (GONG et al., 2012), em eventos posteriores à formação dos alopoliploides em estudo que apresentam genoma A (AC e AD).

A sequência St49 está ausente no genoma AC e presente na região centromérica de múltiplos cromossomos de AD (Figura 2, C; Quadro 2). A repetição centromérica St49 está presente na região centromérica dos genomas A, B, P e E, o que indica se tratar de uma sequência antiga. No genoma T do tomate, a hibridização se deu na região telomérica dos cromossomos e os estudos de similaridade mostraram que St49 pertence a um grupo amplo de satélites com sequências ricas em AT e com motivos teloméricos (GONG et al., 2012). O padrão de hibridização nos dois genomas A (*S. tuberosum* e *S. verrucosum*) foi bastante distinto, sendo a sequência específica para o centrômero 5 e não centromérica em outro par para *S. tuberosum* e centromérica e/ou pericentromérica em múltiplos cromossomos para *S. verrucosum*, assim como observado no genoma AD nesse estudo (Figura 2, C; Quadro 2). Isso indica maior distanciamento entre os genomas A dos alopoliploides, maior proximidade do genoma A de AD com o genoma A de *S. verrucosum* e ausência da sequência no genoma C.

A sequência Sv54 gerou 4 sinais centoméricos no genoma AD (figura 2, F) e foi ausente no genoma AC (Quadro 2). Em *S. tuberosum* Sv54 é específica para o centrômero 9, enquanto que para *S. verrucosum* é específica para os centrômeros 2 e 10. No genoma P, o mais próximo do genoma A, foi detectada em um par cromossômico não identificado e nos genomas B e E estava ausente (ZHANG et al., 2014). Nesse genoma, os 4 sinais gerados podem estar presentes nos cromossomos que pertencem ao genoma A já que eles coincidem com os 4 sinais característicos do genoma A de *S. verrucosum*.

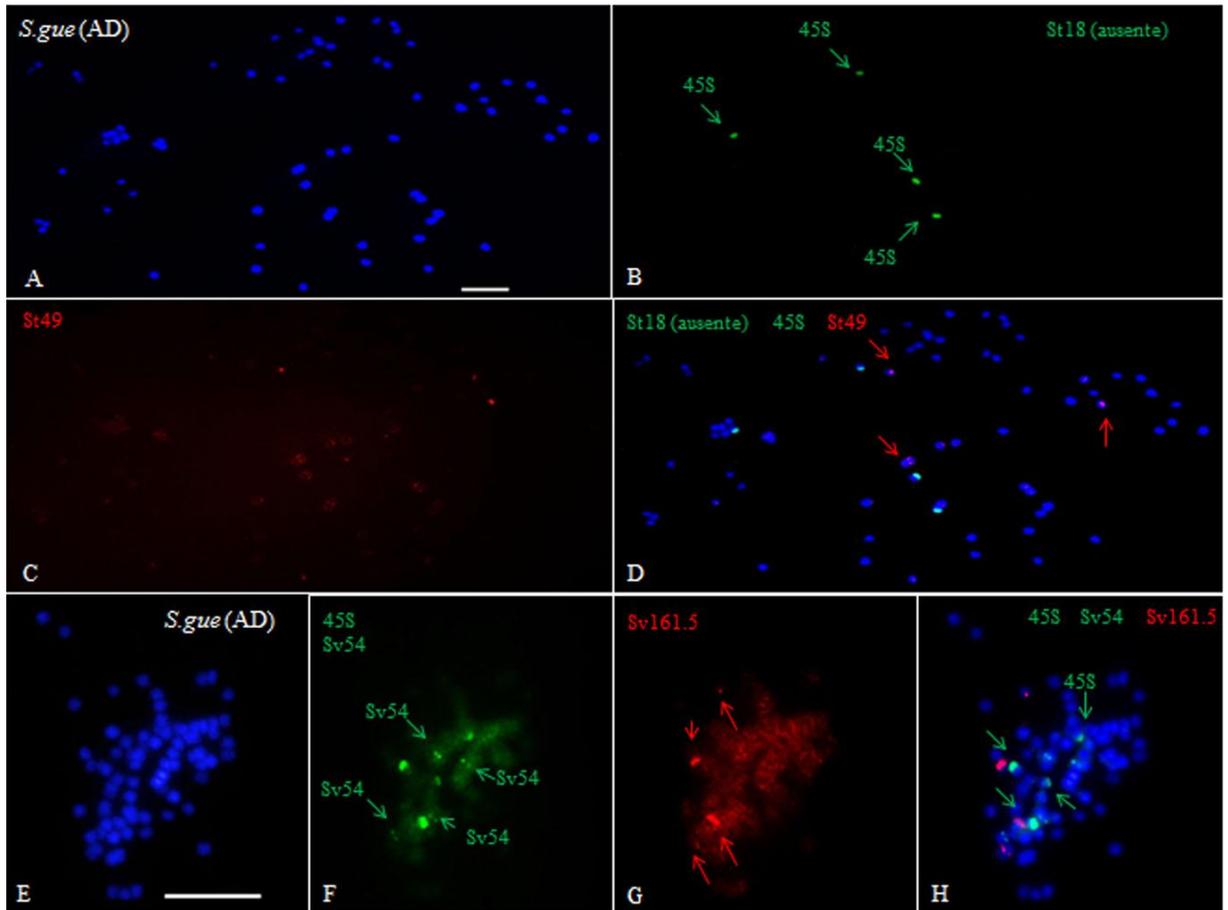


Figura 2: Mapeamento por FISH de repetições de sondas centroméricas na espécie *Solanum guerreroense* ($2n=6X=72$), portadora do genoma AD. Cromossomos da espécie corados com DAPI (A, E,); sinais de FISH gerados pela sonda centromérica St18 e DNAr 45S (B); sinais de FISH gerados pela sonda centromérica St49 (C); sobreposição dos sinais de FISH gerados pelas sondas centroméricas St18, St49 e 45S com DAPI no genoma AD (D); sinais de FISH gerados pela sonda centromérica de Sv54 (F); sinais de FISH gerados pela sonda centromérica de Sv161.5 (G); sobreposição dos sinais de FISH gerados pelas sondas centroméricas Sv54, Sv161.5 e 45S com DAPI no genoma AD (H). Barras= 10 μ m. Fonte: Do autor (2017)

No genoma AD, Sv 161.5 evidenciou quatro sinais centroméricos em dois pares de cromossomos, sendo dois blocos de sinais maiores e dois menores (figura 2, G), enquanto no genoma AC, Sv 161.5 revelou dois sinais centroméricos em um par cromossômico (figura 3, C). Essa repetição é específica para o centrômero 7 de *S. verrucosum* e para o centrômero 1 de *S. tuberosum*, sendo considerada pelos autores como uma sequência recente, presente apenas no genoma A (ZHANG et al., 2014). Assim, as marcas geradas nos genomas AC e AD, provavelmente pertencem aos cromossomos do genoma A, sendo que no genoma AD pode ter havido uma amplificação ou duplicação cromossômica.

A terceira sonda obtida de *S. verrucosum*, Sv 123, tanto no genoma AC (figura 3, F) quanto no genoma AD (figura 4, B), revelou dois sinais nos centrômeros em um par cromossômico. No genoma A de *S. verrucosum* essa sequência foi específica para os centrômeros 2 e 10, no genoma P esteve presente em três pares cromossômicos (1, 2 e um desconhecido) enquanto que no genoma A de *S. tuberosum* estava ausente (ZHANG et al., 2014). Portanto, os centrômeros observados pertencem ao genoma A mais próximo do genoma de *S. verrucosum*.

O trabalho de Oliveira (2015) demonstrou a existência de 4 clusters (Sc83, Sc92, Sc111, Sc108) componentes dos centrômeros de *S. chomatophilum* ($2n=2x=24$, PP) em dois acessos da espécie. No genoma AC, a sonda Sc83 gerou sinais dispersos, não centroméricos, ao longo dos cromossomos (figura 3, G). No genoma AD, essa mesma sonda revelou dois sinais centroméricos bem distintos, em um par de cromossomos do complemento (figura 4, C). Essa sequência não está presente no genoma A de *S. tuberosum* e produz sinais dispersos nos cromossomos do genoma A de *S. verrucosum*, enquanto que nos dois acessos avaliados de *S. chomatophilum*, Sc83 foi identificada em dois centrômeros. Dessa forma, no genoma AC o padrão para Sc83 é semelhante ao genoma A de *S. tuberosum* e no genoma AD é semelhante ao genoma P de *S. chomatophilum*, indicando que essa sequência pode estar presente em cromossomos do genoma D, em face ao padrão bastante diferenciado das duas espécies com genoma A.

No genoma AD, Sc92/108 revelou quatro sinais intensos nas regiões centroméricas de dois pares de cromossomos (figura 4, F), enquanto a repetição Sc111 mostrou uma localização dinâmica, com sinais dispersos em todos os cromossomos, como também sete sinais com maior intensidade em regiões centroméricas e não centroméricas (figura 4, G). Os quatro sinais gerados pela sonda Sc92/108, se co-localizaram com quatro dos sete sinais

resultantes da hibridização da sonda Sc111 no genoma AD (figura 4, H), indicando se tratar de um bloco composto por Sc92/108/111, como no cen2 do acesso B de *S. chomatophilum* descrito por Oliveira (2015). Através de fiber-FISH, o autor pode confirmar que essas duas repetições estariam associadas a mesma fibra de cromatina, sendo, portanto, parte de um mesmo monômero. Oliveira (2015) mostrou que o monômero composto por Sc92/108/11 foi localizado nos centrômeros 2 e 10 dos cromossomos de *S. verrucosum*, mesmo resultado no genoma AD do presente estudo, indicando se tratar de cromossomos do genoma A do alotetraploide.

No genoma AC, Sc92/108 não produziu sinal (figura 3, J) e a sonda Sc111 revelou sinais dispersos, porém com cerca de 6-8 sinais com maior intensidade nos centrômeros (figura 3, K). Esse resultado coincide com o descrito para *S. tuberosum* por Oliveira (2015), em que a distribuição de Sc92/108 foi independente de Sc111, uma vez que a repetição Sc92/108 foi ausente no genoma AC e a repetição Sc111 gerou sinais dispersos em todos os cromossomos.

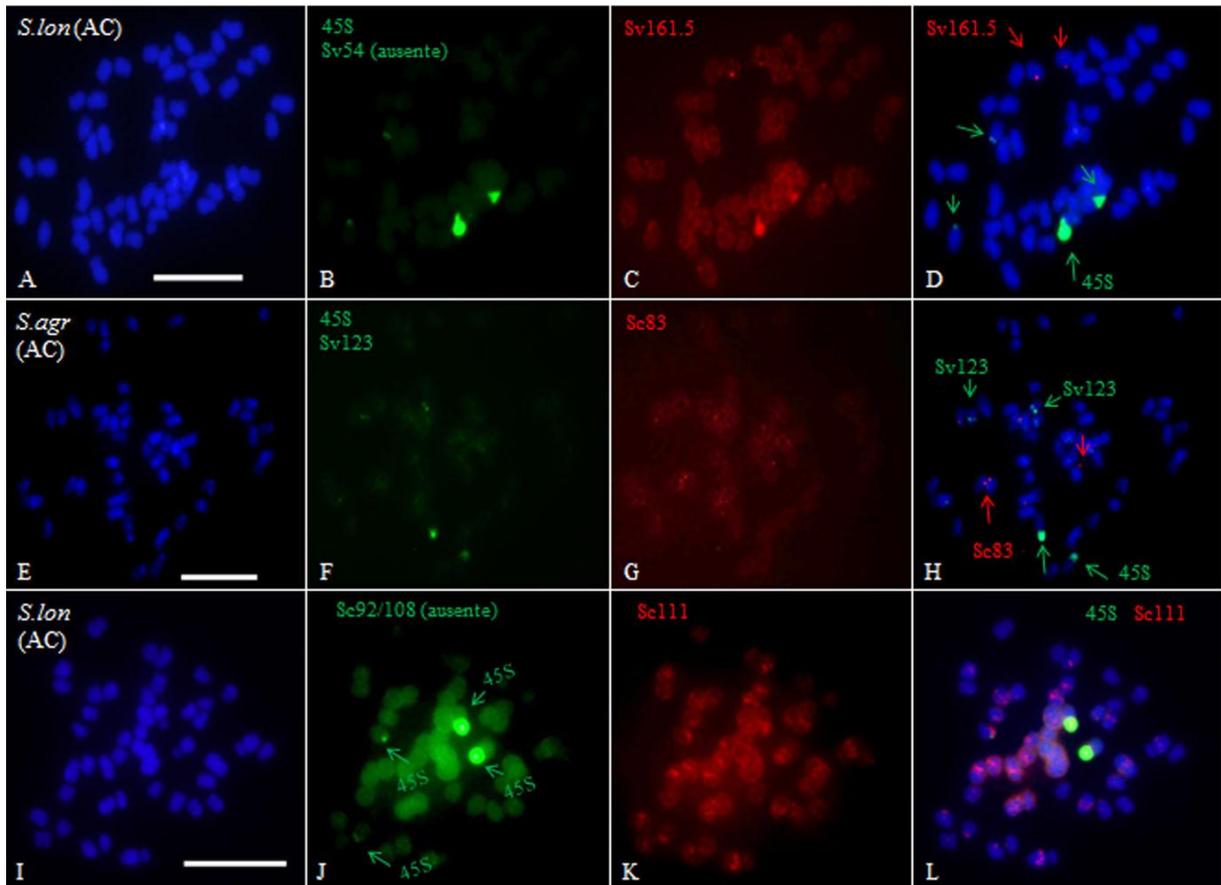


Figura 3: Mapeamento por FISH de repetições de sondas centroméricas nas espécies *Solanum longiconicum* e *S. agrimonifolium* ($2N=4X=48$), portadoras do genoma AC. Cromossomos das espécies corados com DAPI (A, E,I); sinais de FISH gerados pela sonda centromérica SV54 e DNAr 45S (B); sinais de FISH gerados pela sonda centromérica Sv 161.5 (C); sobreposição dos sinais de FISH gerados pelas sondas centroméricas Sv54, Sv161.5 e 45S com DAPI (D); sinais de FISH gerados pela sonda centromérica SV123 e DNAr 45S (F); sinais de FISH gerados pela sonda centromérica de Sc83 (G); sobreposição dos sinais de FISH gerados pelas sondas centroméricas Sv123, Sc83 e 45S com DAPI (H); sinais de FISH gerados pela sonda centromérica Sc92/108 e DNAr 45S (J); sinais de FISH gerados pela sonda centromérica Sc111 (K) sobreposição dos sinais de FISH gerados pelas sondas centroméricas Sc111, Sc92/108 e 45S com DAPI (L). Barras= 10 μ m. Fonte: Do autor (2017)

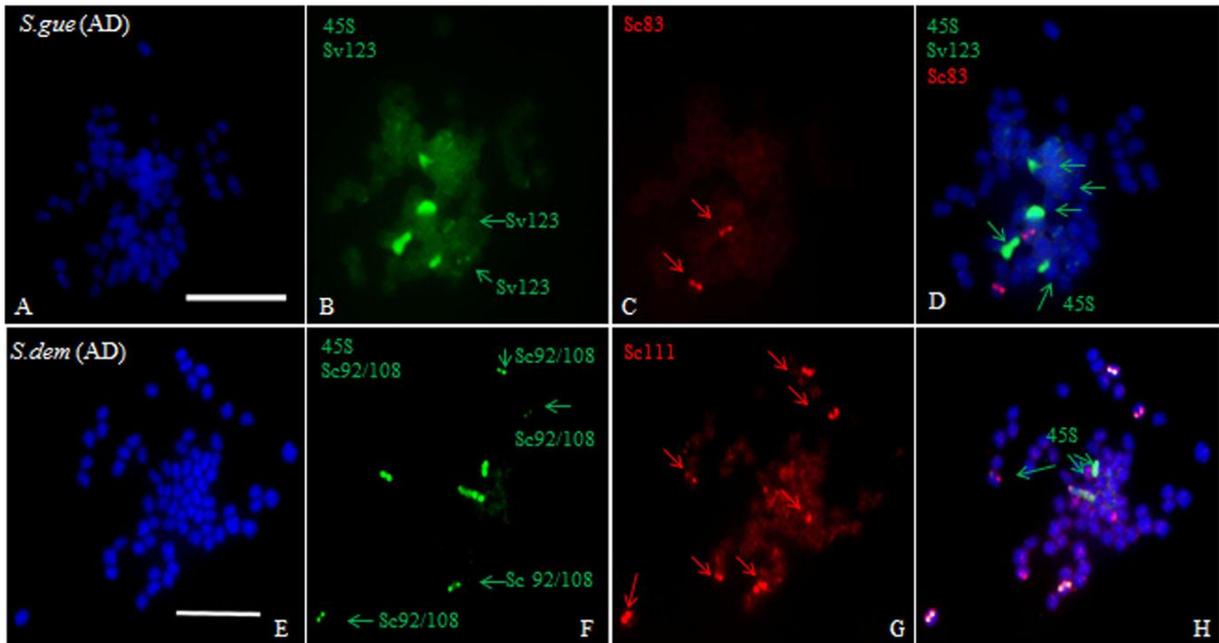


Figura 4: Mapeamento por FISH de repetições de sondas centroméricas nas espécies *Solanum gurreroense* e *S. demissum* ($2n=6X=72$), portadoras do genoma AD. Cromossomos das espécies corados com DAPI (A, E); sinais de FISH gerados pela sonda centromérica Sv123 e DNAr 45S (B); sinais de FISH gerados pela sonda centromérica de Sc83 (C); sobreposição dos sinais de FISH gerados pelas sondas centroméricas Sv123, Sc83 e 45S com DAPI no genoma AD (D); sinais de FISH gerados pela sonda centromérica Sc111 e DNAr 45S (F); sinais de FISH gerados pela sonda centromérica de Sc92/108 (G); sobreposição dos sinais de FISH gerados pelas sondas centroméricas Sc111, Sc92/108 e 45S com DAPI no genoma AD (L). Barras= 10 μ m. . Fonte: Do autor (2017)

5 CONCLUSÕES

A sequência St18 surgiu no genoma A após a formação dos aloploidos AC e AD, e as sequências St49, Sv54 e Sc111 surgiram no genoma A após a formação dos aloploidos AC.

As sequências identificadas nos aloploidos pertencem, em sua maioria, aos cromossomos do genoma A, com padrão semelhante ora o genoma A de *Solanum tuberosum*, ora ao de *Solanum verrucosum*.

Nenhuma sequência é candidata a pertencer ao genoma C, enquanto que para o genoma D, Sc83 pode pertencer a este genoma, com padrão similar ao genoma P.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACOSTA, M. CRISTINA, MARCELO GUERRA, AND EDUARDO A. MOSCONE. "Karyological relationships among some South American species of *Solanum* (Solanaceae) based on fluorochrome banding and nuclear DNA amount." **Plant systematics and evolution** v. 298.8:1547-1556. 2012.

CASTILLO, Raul O.; SPOONER, David M. Phylogenetic relationships of wild potatoes, *Solanum* series *Conicibaccata* (sect. *Petota*). **Systematic Botany**, p. 45-83, 1997.

CHENG, Zhukuan et al. Functional rice centromeres are marked by a satellite repeat and a centromere-specific retrotransposon. **The Plant Cell**, v. 14, n. 8, p. 1691-1704, 2002.

CHIARINI, F. E. Variation in rDNA loci of polyploid *Solanum elaeagnifolium* (Solanaceae). **New Zealand Journal of Botany**, v. 52, n. 3, p. 277-284, 2014.

CIP - INTERNATIONAL POTATO CENTER. **Potatos Facts an Figuries**. Disponível em: <<http://cipotato.org/potato/facts/>>. Acesso em: 20 abr. 2017.

DE JONG, H.; PROUDFOOT, K. G.; MURPHY, A. M. The germplasm release of F87084, a fertile, adapted clone with multiple disease resistances. **American journal of potato research**, v. 78, n. 2, p. 141-149, 2001.

DERNBURG, Abby F. Here, There, and Everywhere: Kinetochore Function on Holocentric Chromosomes. **The Journal of Cell Biology**, v. 153, n. 6, p. F33-F38, 2001.

DONG, F. et al. Development and applications of a set of chromosome-specific cytogenetic DNA markers in potato. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 101, n. 7, p. 1001-1007, Março, 2000.

FANG, YUDA; SPECTOR, DAVID L. Centromere positioning and dynamics in living Arabidopsis plants. **Molecular biology of the cell**, v. 16, n. 12, p. 5710-5718, 2005.

GAVRILENKO, TATIJANA. Potato cytogenetics. **Potato biology and biotechnology: Advances and perspectives**, v. 10, p. 203-216, 2007.

GONG, ZHIYUN et al. Repeatless and repeat-based centromeres in potato: implications for centromere evolution. **The Plant Cell**, v. 24, n. 9, p. 3559-3574, 2012.

GUERRA, M. Hibridização in situ: princípios básicos. **FISH: Conceitos e Aplicações na Citogenética. Sociedade Brasileira de Genética: Ribeirão Preto**, p. 1-32, 2004.

GUERRA, Marcelo. Patterns of heterochromatin distribution in plant chromosomes. **Genetics and molecular biology**, v. 23, n. 4, p. 1029-1041, 2000.

HAN, Fangpu; LAMB, Jonathan C.; BIRCHLER, James A. High frequency of centromere inactivation resulting in stable dicentric chromosomes of maize. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 9, p. 3238-3243, 2006.

HAWKES, J. G. Biosystematics of the potato. In: **The potato crop**. Springer US. p. 15-69. 1978.

HAWKES, J. G. et al. Origins of cultivated potatoes and species relationships. **Potato genetics.**, p. 3-42, 1994.

HAWKES, J. G. Kartoffel. I. Taxonomy, cytology and crossability. **Handbuch Pflanzenzüchtung**, v. 3, p. 1-43, 1958.

HAWKES, John Gregory et al. A revision of the tuber-bearing Solanums. **Record of the Scottish Plant Breeding Station, Pentlandsfield, Roslin, Midlothian 1963.**, p. 76-181., 1963.

HAWKES, John Gregory et al. **The potato: evolution, biodiversity and genetic resources.** Belhaven Press, 1990.

HAWKES, John Gregory. TAXONOMIC STUDIES ON THE TUBER-BEARING SOLANUMS. 1: SOLANUM TUBEROSUM AND THE TETRAPLOID SPECIES COMPLEX. In: **Proceedings of the Linnean Society of London.** Blackwell Publishing Ltd. p. 97-144, 1956

HE, LI et al. Interstitial telomeric repeats are enriched in the centromeres of chromosomes in Solanum species. **Chromosome research**, v. 21, n. 1, p. 5-13, 2013.

HECKMANN, S. et al. Holocentric chromosomes of *Luzula elegans* are characterized by a longitudinal centromere groove, chromosome bending, and a terminal nucleolus organizer region. **Cytogenetic and genome research**, v. 134, n. 3, p. 220-228, 2011.

HIRAKAWA, HIDEKI et al. Draft genome sequence of eggplant (*Solanum melongena* L.): the representative solanum species indigenous to the old world. **DNA research**, p. dsu027, 2014.

IRIKURA, Y. Cytogenetic studies on the haploid plants of tuber-bearing *Solanum* species, 2: Cytogenetical investigations on haploid plants and interspecific hybrids by utilizing haploidy. **Research Bulletin of the Hokkaido National Agricultural Experiment Station**, 1976.

JANSKY, Shelley. Breeding for disease resistance in potato. **Plant breeding reviews**, v. 19, p. 69-156, 2000.

JIANG, J; BIRCHLER J. A.; PARROTT, W.A.; DAWE, R.K. A molecular view of plant centromeres. **Trends in Plant Science**, 8 (12): 570-575, 2003.

JURKA, J.; KAPITONOV, V.V.; KOHANY, O.; JURCA, M.V. Repetitive sequences in complex genomes: structure and evolution. **Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.** 8:241-259, 2007.

KNAPP, SANDRA et al. Solanaceae model for linking genomics with biodiversity. **Comparative and functional genomics**, v. 5, n. 3, p. 285-291, 2004.

LAPITAN, Nora LV; GANAL, Martin W.; TANKSLEY, Steven D. Organization of the 5S ribosomal RNA genes in the genome of tomato. **Genome**, v. 34, n. 4, p. 509-514, 1991.

LEE, HYE-RAN et al. Chromatin immunoprecipitation cloning reveals rapid evolutionary patterns of centromeric DNA in *Oryza* species. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 33, p. 11793-11798, 2005.

LÓPEZ-FLORES, I.; GARRIDO-RAMOS, M. A. The repetitive DNA content of eukaryotic genomes. In: **Repetitive DNA**. Karger Publishers, 2012. p. 1-28.

MARKS, G. E. Cytogenetic studies in tuberous *Solanum* species I. Genomic differentiation in the group demissa. **Journal of Genetics**, v. 53, n. 2, p. 262-269, 1955.

MATSUBAYASHI, M. Phylogenetic relationships in the potato and its related species. In: TSUCHIYA, T.; GUPTA, P. K. (Ed). **Chromosome engineering in plants: genetics, breeding, evolution**. Amsterdam: Elsevier Science. p. 93-118. 1991.

MEHROTRA, Shweta; GOYAL, Vinod. Repetitive sequences in plant nuclear DNA: types, distribution, evolution and function. **Genomics, proteomics & bioinformatics**, v. 12, n. 4, p. 164-171, 2014.

MELO, C. A F. et al. Karyotype analysis for diploid and polyploid species of the *Solanum* L.. **Plant Systematics and Evolution**, v. 293, n. 4, p. 227–235, 2011.

NAGAKI, Kiyotaka et al. Chromatin immunoprecipitation reveals that the 180-bp satellite repeat is the key functional DNA element of *Arabidopsis thaliana* centromeres. **Genetics**, v. 163, n. 3, p. 1221-1225, 2003.

OLIVEIRA, LUDMILA CRISTINA. **DNA repetitivo centromérico e disperso em espécies de Solanum**. 2015. 113 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas)-Universidade Federal de Lavras-UFLA. Lavras- MG. 2015

PENDINEN, GALINA et al. Genomic in situ hybridization reveals both auto-and allopolyploid origins of different North and Central American hexaploid potato (*Solanum* sect. *Petota*) species. **Genome**, v. 55, n. 6, p. 407-415, 2012.

PLAISTED, R. L.; HOOPES, R. W. The past record and future prospects for the use of exotic potato germplasm. **American Potato Journal**, v. 66, n. 10, p. 603-627, 1989.

PLOHL, Miroslav. Those mysterious sequences of satellite DNAs. **Periodicum biologorum**, v. 112, n. 4, p. 403-410, 2010.

PLOHL, Miroslav; MEŠTROVIĆ, Nevenka; MRAVINAC, Brankica. Centromere identity from the DNA point of view. **Chromosoma**, v. 123, n. 4, p. 313-325, 2014.

POTATO GENOME SEQUENCING CONSORTIUM et al. Genome sequence and analysis of the tuber crop potato. **Nature**, v. 475, n. 7355, p. 189-195, 2011.

RAMANNA, M. S.; HERMSEN, JG Th. Genome relationships in tuber-bearing *Solanums*. In: **Linnean Society symposium series**. 1979.

REGO, L. N. A. A. et al. Cytotaxonomical study in Brazilian species of *Solanum*, *Lycianthes* and *Vassobia* (Solanaceae). **Plant systematics and evolution**, v. 279, n. 1-4, p. 93-102, 2009.

RODRÍGUEZ, Flor; SPOONER, David M. Nitrate Reductase Phylogeny of Potato (*Solanum* sect. *Petota*) Genomes with Emphasis on the Origins of the Polyploid Species. **Systematic Botany**, v. 34, n. 1, p. 207-219, 2009.

SCHIFINO-WITTMANN, M. T.; DALL'AGNOL, M. Gametas Não Reduzidos No Melhoramento De Plantas. *Ciência Rural*, v. 31, n. 1, p. 169–175, 2001.

SCHIFINO-WITTMANN. Poliploidia e seu impacto na origem e evolução das plantas silvestres e cultivadas. *Rev. Bras. Agrocienc*, v. 10, n. 2, p. 151–157, 2004.

SILVA, ANDRÉ SECO MARQUES DA. **Estrutura centromérica e adaptações meióticas em espécies holocêntricas do gênero *rhynchospora* (cyperaceae)**. 2016. 144f. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) – Universidade Federal de Pernambuco. UFPE. Recife , PE, 2016.

SPOONER, David M. DNA barcoding will frequently fail in complicated groups: an example in wild potatoes. **American Journal of Botany**, v. 96, n. 6, p. 1177-1189, 2009.

SPOONER, David M. et al. Genomic origins of potato polyploids: GBSSI gene sequencing data. **Crop Science**, v. 48, n. Supplement_1, p. S-27-S-36, 2008.

SPOONER, David M.; ANDERSON, Gregory J.; JANSEN, Robert K. Chloroplast DNA evidence for the interrelationships of tomatoes, potatoes, and pepinos (*Solanaceae*). **American Journal of Botany**, p. 676-688, 1993.

SPOONER, David; CASTILLO, Raul. Reexamination of series relationships of South American wild potatoes (Solanaceae: Solanum sect. Petota): evidence from chloroplast DNA restriction site variation. **American Journal of Botany**, v. 84, n. 5, p. 671-671, 1997.

STUPAR, ROBERT M. et al. Highly condensed potato pericentromeric heterochromatin contains rDNA-related tandem repeats. **Genetics**, v. 162, n. 3, p. 1435-1444, 2002.

TEK, Ahmet L. et al. Sobo, a recently amplified satellite repeat of potato, and its implications for the origin of tandemly repeated sequences. **Genetics**, v. 170, n. 3, p. 1231-1238, 2005

TEK, AHMET L.; JIANG, JIMING. The centromeric regions of potato chromosomes contain megabase-sized tandem arrays of telomere-similar sequence. **Chromosoma**, v. 113, n. 2, p. 77-83, 2004.

TOMATO GENOME CONSORTIUM et al. The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. **Nature**, v. 485, n. 7400, p. 635-641, 2012.

TORRES, GIOVANA. A. et al. Organization and evolution of subtelomeric satellite repeats in the potato genome. **G3: Genes, Genomes, Genetics**, v. 1, n. 2, p. 85-92, 2011.

VAN DER HOEVEN, RUTGER et al. Deductions about the number, organization, and evolution of genes in the tomato genome based on analysis of a large expressed sequence tag collection and selective genomic sequencing. **The Plant Cell**, v. 14, n. 7, p. 1441-1456, 2002.

VEGA, Sandra E.; PALTA, Jiwan P.; BAMBERG, John B. Variability in the rate of cold acclimation and deacclimation among tuber-bearing Solanum (potato) species. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 125, n. 2, p. 205-211, 2000.

WANG, G.; ZHANG, X.; JIN, W. An overview of plant centromeres. **Journal of Genetics and Genomics**, 36: 529-537; 2009.

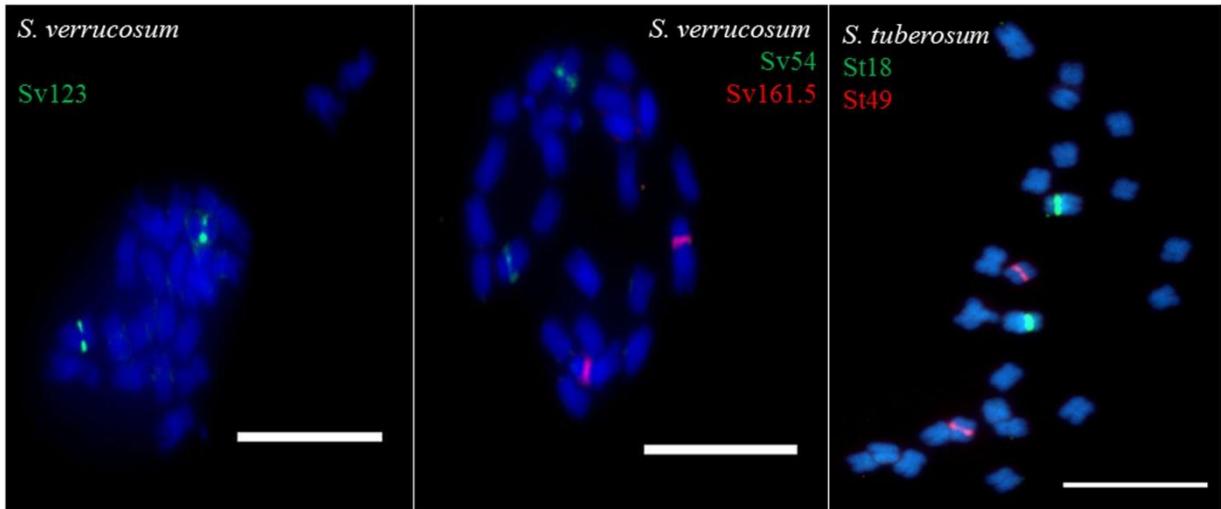
WANG, Linsheng et al. Three potato centromeres are associated with distinct haplotypes with or without megabase-sized satellite repeat arrays. **Genetics**, v. 196, n. 2, p. 397-401, 2014.

ZHANG, H. et al. Boom-Bust Turnovers of Megabase-Sized centromeric DNA in Solanum Species: Rapid Evolution of DNA Sequences Associated with Centromeres. **Plant Cell**. 26(4):1436-1447. 2014.

ZHANG, Wenli et al. Centromere inactivation and epigenetic modifications of a plant chromosome with three functional centromeres. **Chromosoma**, v. 119, n. 5, p. 553-563, 2010.

ZHONG, Cathy Xiaoyan et al. Centromeric retroelements and satellites interact with maize kinetochore protein CENH3. **The Plant Cell**, v. 14, n. 11, p. 2825-2836, 2002.

ANEXO A - Confirmação da hibridização das sondas centroméricas de *Solanum tuberosum* e *Solanum verrucosum*.



Barras: 10 μ m. Fonte: Do autor (2017).