

## **INFLUÊNCIA DO TEMPO, TEMPERATURA E UMIDADE NA QUALIDADE DAS AMOSTRAS DE CITOMETRIA DE FLUXO DE BANANEIRA.**

Ana Catarina Lima Oliveira<sup>1</sup>; Leila Aparecida Salles Pio<sup>2</sup>, Moacir Pasqual<sup>3</sup>, Sebastião de Oliveira e Silva<sup>4</sup>, Rafael Hansen Madail<sup>5</sup>, Renata Alves Lara Silva<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Mestranda em Fisiologia Vegetal – Universidade Federal de Lavras – e-mail: kata\_lima@yahoo.com.br; <sup>2</sup>Pós-doutoranda Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical e Universidade Federal de Lavras, Lavras – MG, CP-3037, email: leilapio.ufla@gmail.com; <sup>3</sup>Professor, Universidade Federal de Lavras, mpasqual@ufla.br.; <sup>4</sup>Pesquisador, Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical – Cruz das Almas – BA, e-mail: ssilva@cnpmf.embrapa.br. <sup>5</sup>Doutorando em Fisiologia Vegetal - Universidade Federal de Lavras, Lavras. <sup>6</sup>Mestranda em Fitotecnia - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

### **INTRODUÇÃO**

A banana é uma das frutas mais consumidas no mundo, possui alto valor nutritivo e socioeconômico, pois mobiliza um grande contingente de mão-de-obra, permite retorno rápido ao produtor e é geradora de divisas (Ganga, 2002).

Em 2008 o Brasil era o quarto maior produtor mundial de banana, produzindo mais de 7 milhões de toneladas de frutos por ano, em uma área de 513 mil hectares (FAO, 2010).

Embora exista um número expressivo de variedades de banana no Brasil, quando se considera preferência dos consumidores, produtividade, tolerância a pragas, porte adequado, resistência à seca e ao frio, restam poucas variedades com potencial agrônomo para utilização comercial. Estratégias alternativas de melhoramento genético da bananeira, fundamentadas na duplicação de cromossomos tem a função de gerar híbridos com características desejáveis pelo programa de melhoramento genético da cultura (Vakili, 1967; Stover e Buddenhagen, 1986).

A citometria de fluxo pode ser uma ferramenta que para avaliar o conteúdo de DNA em plantas que sofreram duplicação cromossômica. Vários fatores afetam esse tipo de análise, entre eles está o estado da amostra que é influenciado por fatores abióticos tais como tempo de armazenamento e pela temperatura e umidade as quais as amostras são submetidas.

Diante disso, objetivou-se com o presente trabalho avaliar a influência do tempo, temperatura e umidade de armazenamento na qualidade de análise de citometria de fluxo de bananeira diplóide 2803-01.

### **MATERIAL E MÉTODOS**

O experimento foi realizado no laboratório de Cultura de Tecidos da Universidade Federal de Lavras. As análises foram realizadas em bananeiras diplóides 2803-01 mantidas em vasos em casa de vegetação. Para a determinação do conteúdo de DNA, aproximadamente 70 mg de tecido foliar de plantas de bananeira foram triturados, em placa de Petri, contendo 1 mL dos seguintes tampões de extração LB01. A suspensão de núcleos foi aspirada através de duas camadas de gaze, com auxílio de uma pipeta plástica e filtrada através de uma malha de 50 µm. Todo esse processo foi realizado sobre um recipiente contendo gelo triturado. Posteriormente, as amostras foram coradas com 25 µl de Iodeto de Propídeo e armazenadas no escuro, dentro de um recipiente com gelo triturado e em seguida analisadas. O delineamento foi inteiramente casualizado com 3 repetições e o esquema fatorial foi em fatorial 7x2x2, sendo sete tempos de armazenamento (0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, e 7 dia(s)), duas temperaturas (4°C e 20°C) e duas condições de umidade (com e sem algodão umedecido com água destilada). Para cada amostra, 10 mil núcleos foram analisados utilizando-se escala logarítmica. A análise foi realizada no citômetro Facscalibur (Becton Dickinson), os histogramas e os coeficientes de variação (CV(s)) foram obtidos pelo software Cell Quest e analisados estatisticamente no software WinMDI 2.8.

O conteúdo de DNA nuclear (pg) das plantas foi estimado utilizando-se a razão entre as intensidades de fluorescência dos núcleos G1(núcleos que estão na fase G1 da Interfase) do padrão de referência (*P. sativum*) e dos núcleos G1 da amostra, multiplicando-se esta razão pela quantidade de DNA do padrão de referência (9,09 pg). Esses valores foram submetidos a análise de variância pelo teste F e, quando significativo os dados foram comparados pelo teste de médias Scott Knott ao nível de 5% de probabilidade.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na tabela 1 verifica-se que para a variável coeficiente de variação houve diferença significativa apenas para o fator umidade. Os outros valores apresentaram-se estatisticamente iguais, independente das condições as quais as amostras foram submetidas.

Quando colocadas na ausência de algodão umedecido e a temperatura ambiente (20°C) as análises das amostras mantidas por mais de três dias apresentaram de qualidade inferior aquelas que foram analisadas até o terceiro dia. Isso leva a inferir que a temperatura ambiente que neste caso foi mais elevada e em baixa umidade as amostras de plantas de bananeira devem ser armazenadas por no máximo três dias (Tabela 1). Porém os resultados de coeficiente de variação obtidos neste experimento, segundo (Marie e Brown, 1993), indicam a confiabilidade dos resultados pois CVs com valores entre 1-2% são considerados de alta qualidade e, próximos a 3%, como resultados de rotina. E em publicações

internacionais, coeficientes de variação menores que 5% são aceitáveis (Galbraith et al., 1983).

Tabela 1. Coeficientes de variação de amostras de folha de bananeira 2803-01 submetidas a diferentes tempos (dias), temperaturas e condições de umidade (CA – com algodão umedecido e SA – sem algodão umedecido). Lavras, MG, 2010.

Tempo (dia(s))	4°C		20°C	
	CA	SA	CA	SA
0	1,00 αAa	1,33 αAa	1,00 αAa	1,00 αAa
1	1,33 αAa	1,33 αAa	2,00 αAa	2,00 αAb
2	1,00 αAa	1,33 αAa	2,00 αAa	1,33 αAa
3	1,00 αAa	1,00 αAa	1,00 αAa	1,33 αAa
4	1,00 αAa	1,33 αAa	2,00 αAa	2,33 αAb
5	1,00 αAa	1,00 αAa	1,67 αAa	2,33 αAb
6	1,00 αAa	1,67 αAa	2,00 αAa	1,67 αAb
7	1,00 αAa	1,67 αAa	2,00 αAa	2,67 αAb

\*médias seguidas das mesmas letras minúsculas nas colunas, maiúsculas nas linhas e gregas entre temperaturas, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ).

Na tabela 2, pode-se observar os valores do conteúdo de DNA das amostras submetidas às diferentes condições abióticas já citadas. Houve diferença significativa entre as amostras armazenadas por um dia e na ausência de algodão umedecido, entre os diferentes tempos de armazenamento nas plantas também mantidas na ausência de temperatura nas duas temperaturas.

Nas amostras armazenadas por um período de um dia e na ausência de algodão umedecido, sendo este responsável por manter a umidade em níveis ideais, as plantas mantidas em temperatura ambiente (20°C) apresentaram conteúdo de DNA superior aquelas armazenadas a 4°C (Tabela 2).

Quando se considera apenas o efeito do tempo (dias) em amostras mantidas a 4°C na ausência de algodão o pior resultado foi verificado no último dia de avaliação, ficando o conteúdo de DNA muito inferior ao esperado para amostras de bananeira (1,12 pg) (Tabela 2).

Para amostras mantida a temperatura ambiente e sem algodão umedecido, observou-se resultados satisfatórios (próximos a 1,12 pg) para as amostras mantidas de 1 a 3 dias, sendo que estes resultados não diferiram estatisticamente (Tabela 2).

Tabela 2. Conteúdo de DNA (pg) de amostras de folha de bananeira 2803-01 submetidas a diferentes tempos (dias), temperaturas e condições de umidade (CA – com algodão umedecido e SA – sem algodão umedecido). Lavras-MG, UFLA, 2010.

Tempo (dia(s))	4°C		20°C	
	CA	SA	CA	SA
0	1,16 αAa	1,09 αAa	1,13 αAa	1,09 αAb
1	1,09 αAa	1,02 βAb	1,03 αAa	1,14 αAa
2	1,16 αAa	1,15 αAa	1,16 αAa	1,15 αAa
3	1,12 αAa	1,17 αAa	1,08 αAa	1,17 αAa
4	1,04 αAa	1,03 αAa	1,03 αAa	1,09 αAb
5	1,08 αAa	1,00 αAa	1,05 αAa	1,02 αAb
6	1,08 αAa	1,09 αAa	1,11 αAa	1,08 αAb
7	1,12 αAa	0,96 αBa	1,07 αAa	1,04 αAb

\*médias seguidas das mesmas letras minúsculas nas colunas, maiúsculas nas linhas e gregas entre temperaturas, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ).

## CONCLUSÕES

A presença de algodão umedecido garante a qualidade de análises de citometria de fluxo de bananeira 2803-01, independente do tempo de armazenamento (até 7 dias) e da temperatura (4°C ou 20°C).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- FAO, 2010. **Bananas Country**. Disponível em: <[http://www.cnpmf.embrapa.br/planilhas/Bananas\\_Mundo\\_2008.pdf](http://www.cnpmf.embrapa.br/planilhas/Bananas_Mundo_2008.pdf)> Atualizado em 16 dez 2009. Acesso em 15 set 2010.
- GALBRAITH, D.W.; HARKINS, K.R.; MADDON, J.M.; AYRES, N.M.; SHARMA, D.P.; FIROOZABADY, E. Rapid flow cytometric analysis of the cell-cycle in intact plant-tissues. **Science** v. 220, p. 1049-1051, 1983.
- GANGA, R.M.D. Resultados parciais sobre o comportamento de seis cultivares de banana (*Musa* spp) em Jaboticabal. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 17, 2002, Belém. **Anais...** Belém Embrapa/DDT, 2002.
- MARIE, D.; BROWN, S. A cytometric exercise in plant DNA histograms, with 2C values for 70 species. **Biol Cell**, v.78, p.41-51, 1993.
- STOVER, R.H. e BUDDENHAGEN, I.W. Banana breeding polyploidy. Disease resistance and productivity. **Fruits**, v.41, p.175-191. 1986.
- VAKILI, N.G. The experimental formation of polyploidy and its effect in the genus *Musa*. **American Journal of Botany**, New York, v.54, p. 24-36, 1967.