

Análise do Guaranazeiro (*Paullinia cupana* var. *Sorbilis*) por Citometria de Fluxo Revela Elevado Conteúdo de DNA

Danival Vieira de Freitas¹, Firmino José do Nascimento Filho², Spartaco Astolfi-Filho¹, Carlos Roberto de Carvalho³

Introdução

Este trabalho apresenta a análise do tamanho do genoma de *Paullinia cupana* var. *sorbilis*, por meio de citometria de fluxo, visando compreender a sua complexidade e auxiliar os estudos genômicos. A citometria de fluxo é um método conveniente e robusto, empregado extensivamente para estimar o conteúdo de DNA e o tipo de ploidia em plantas, sendo relevante para estudos de melhoramento genético, fisiologia vegetal, ecologia e evolução. A quantificação do tamanho do genoma é crucial para a compreensão global de um organismo e, diante dos avanços biotecnológicos, o conhecimento do conteúdo de DNA tem sido importante para avaliar a cobertura de uma biblioteca genômica, estimar o número de cópia de um gene no genoma, e desenvolver estratégias para a clonagem de genes baseado no mapeamento do genoma.

A espécie de guaraná, *P. cupana* var. *sorbilis*, tem atraído considerável interesse científico em virtude de sua grande importância socioeconômica, por exemplo, o transcriptoma dessa espécie está sendo estudado por um consórcio apoiado pelo CNPq/MCT: a “Rede da Amazônia Legal de Pesquisas Genômicas - REALGENE”.

Material e Métodos

Material Vegetal

Para estimar o conteúdo de DNA do guaranazeiro, sementes pré-germinadas foram transportadas para o laboratório de Citogenética e Citometria Vegetal na Universidade Federal de Viçosa onde foram acondicionadas em câmara de germinação a 28 °C durante o desenvolvimento do trabalho. Sementes de *Vicia faba*, espécie padrão recomendada para estimar o conteúdo de DNA, também germinaram nas mesmas condições de *P. cupana* var. *sorbilis*.

¹Instituto de Ciências Biológicas, Lab. de Tecnologias de DNA, Universidade Federal do Amazonas, 69.077-000 Manaus AM.

²Setor de Genética e Melhoramento de Plantas, Embrapa/CPAA, Caixa Postal 319, 69048- 660 Manaus AM.

³Departamento de Biologia Geral, Lab. de Citogenética e Citometria de Plantas, Universidade Federal de Viçosa, 36.571-000 Viçosa MG

Mensuração do conteúdo 2C de DNA

Para o isolamento de núcleos, foi utilizado o método descrito por Saxena (1985), com modificações. Folhas jovens e vigorosas de guaranazeiro foram lavadas, acondicionadas em recipiente contendo água destilada e mantidas a 4 C. Após a assepsia, fragmentos de 2 cm² foram cortados em 1 mL de solução tampão de lise. A suspensão foi filtrada em uma tela com poros de 40 µm de diâmetro, e transferida para tubos. A suspensão nuclear foi corada com solução 15 µM de Iodeto de Propídio (IP), por 10 a 15 minutos, no escuro, e analisada por um citômetro de fluxo Partec II/III (Partec GmbH, Munster Germany), utilizando um laser de íon argônio de 480 nm (20 mW) com TK 560 e RG 610 filtros. Foi utilizado como padrão interno uma cultivar de *Vicia faba* (valor 2C = 26,6 pg DNA), cedidas pelo Dr Jaroslav Dolezel (Instituto de Botânica Experimental, Republica Tcheca).

Análise estatística dos dados

Em todo o experimento, aproximadamente, cerca de 10.000 núcleos

de cada amostra na fase G1 foram analisadas utilizando-se o programa FlowMax[®] Partec. Amostras com valores de coeficientes de variação acima de 3% foram desconsiderados. Os valores médios do conteúdo de DNA foram gerados como descrito acima, e os dados foram relatados como massa média de DNA (valor 2C) em picogramas.

Resultados e Discussão

A análise simultânea da suspensão de núcleos no citômetro de fluxo gerou histogramas com picos correspondentes à média dos núcleos em G1/G0 contendo DNA. Os resultados mostraram elevado conteúdo de DNA em *P. cupana* var. *sorbilis* (2C = 21,8 pg DNA) (Fig. 1), equivalente a cerca de $21,5 \times 10^9$ bp (o que corresponde a aproximadamente 3,5 vezes o tamanho do genoma humano). Este valor é muito superior ao conteúdo de DNA das demais espécies da família Sapindaceae analisadas, cujo valor 2C variam de 1,1 a 1,8 picogramas, o que indica ser uma planta de genoma mais complexo e com um maior nível de ploidia.

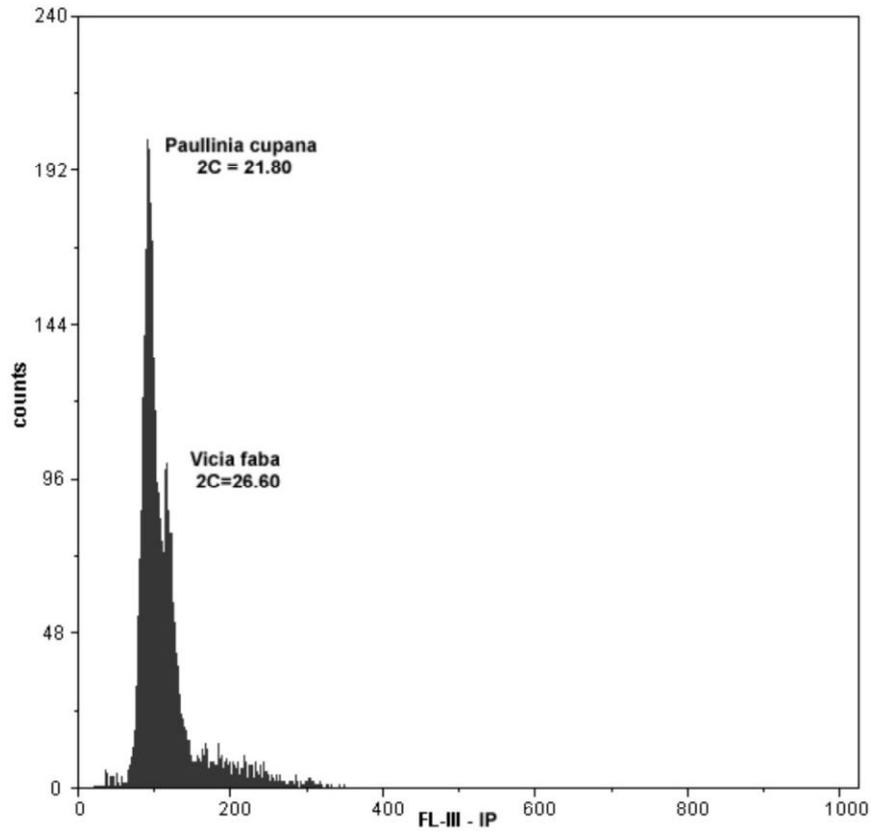


Figura 1. Histograma-DNA com picos G1/G0 resultado de processos simultâneos de suspensão nuclear de tecidos de folhas jovens de *Vicia faba* (padrão interno: 2C=26,60 pg) e *Paullinia cupana* var. *sorbilis* (2C=21,80 pg) corado com Iodeto de Propídio.

APOIO: MCT/CNPq - Projeto REALGENE.