

DURABILIDADE DAS AMOSTRAS DE FOLHAS DE BANANEIRA PARA ANÁLISES EM CITOMETRIA DE FLUXO

Roselaine Cristina Pereira¹, Leila Aparecida Salles Pio², Ana Catarina Lima Oliveira³,
Roseneide Rocha dos Santos⁴, Moacir Pasqual⁵, Sebastião de Oliveira e Silva⁶

¹ Pós-doutoranda da Universidade Federal de Lavras-UFLA, Lavras – MG, CP-3037, e-mail: rcristinapereira@yahoo.com.br; ² Pós-doutoranda Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical e Universidade Federal de Lavras-UFLA, Lavras – MG, CP-3037, email: leilapio.ufla@gmail.com; ³ Mestranda em Fisiologia Vegetal – Universidade Federal de Lavras – e-mail: kata_lima@yahoo.com.br; ⁴ Aluna de graduação em Agronomia – Universidade Federal de Lavras e-mail: roserocha_2006@yahoo.com.br. ⁵ Professor, Universidade Federal de Lavras, mpasqual@ufla.br. ⁶ Pesquisador, Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical – Cruz das Almas – BA, e-mail: ssliva@cnpmf.embrapa.br.

INTRODUÇÃO

A citometria de fluxo é uma técnica que permite a quantificação de DNA de um grande número de amostra de forma rápida e prática.

Entretanto, vários fatores podem interferir nos valores das estimativas do conteúdo de DNA das amostras e, conseqüentemente, na confiabilidade dos resultados. Doležel et al. (2007) relataram que a existência de variação do conteúdo de DNA pode ser explicada por erros instrumentais ou metodológicos, interferência dos componentes citosólicos com os corantes de DNA, diferenças entre laboratórios e ou heterogeneidade taxonômica do material em estudo. Na literatura consultada é relatado que as análises para quantificar o conteúdo de DNA deve ser feita em material fresco e amostras recém-preparadas, contudo nem sempre é possível avaliar um grande número de amostras frescas e /ou recém-preparadas. Assim, uma das alternativas para contornar esse problema é o armazenamento das mesmas.

O armazenamento das amostras a serem analisadas no citômetro de fluxo sejustifica quando é necessário avaliar um grande número de amostras ou quando o preparo e avaliação da amostra é feito em diferentes locais.

Nesse contexto, o objetivo do presente trabalho foi de avaliar a confiabilidade das estimativas da quantidade de DNA em amostras armazenadas por diferentes períodos.

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 e Ouro, mantidas em vasos em casa de vegetação. Para a determinação do conteúdo de DNA, 70 mg de tecido foliar de plantas de bananeira e do padrão de referência *Pisum sativum* foram triturados juntos, em placa de Petri, contendo 1 mL de tampão LB01 gelado para a liberação

dos núcleos (Dolezel et al., 1989). 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. Em seguida as amostras foram coradas com 25 µml de Iodeto de Propídeo. As amostras foram armazenadas no escuro, dentro de um recipiente com gelo triturado e submetidas a diferentes períodos de armazenamento (5, 30, 60, 120 e 240 minutos) e em seguida analisadas. O Delineamento foi inteiramente casualizado com 3 repetições e o esquema fatorial foi em fatorial 2x5. Para cada amostra, 10 mil núcleos foram analisados utilizando-se escala logarítmica. A análise foi realizada no citômetro Facscalibur (Becton Dickinson), os histogramas obtidos com o software Cell Quest e analisados estatisticamente no software WinMDI 2.8 e as médias de intensidade de fluorescência foram analisadas pelo teste de Scott Knott, ao nível de 5% de probabilidade através do programa estatístico Sisvar.

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).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1 estão apresentados as estimativas da quantidade de DNA e os coeficientes de variação de amostras de folhas de bananeira diplóide 2803-01 submetidas a análise de citometria de fluxo em diferentes períodos de armazenamento da amostra preparada.

Tabela 1. Estimativas do conteúdo de DNA e Coeficiente Variação de folhas de bananeira diplóide 2803-01 submetido a análise de Citometria de Fluxo em diferentes períodos de armazenamento da amostra.

Período de armazenamento da amostra (minutos)	Índice de DNA (pg)	Coeficiente de Variação
5	1.19 c	0.99 a
30	1.09 c	1.05 a
60	0.9 b	1.56 a
120	1.00 b	2.36 a
240	0.76 a	3.47 c

*Médias seguidas pela mesma letra pertencem a um mesmo grupo e não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott Knott.

As estimativas do conteúdo de DNA não variou para as amostra avaliadas no período de 5 e 30 minutos após o preparo, os Cvs foram baixos demonstrando confiabilidade dos dados. Esses valores dos coeficientes de variação estão de acordo com os valores encontrados na literatura para estimativas com boa resolução, onde é relatado que o valor de CV deva ser 1- 2% (Marie e Brown, 1993; Ulrich e Ulrich ,1991). Já para Galbraith et al., (1983) coeficientes de variação menores que 5% são aceitáveis e geram estimativas confiáveis, entretanto, no presente trabalho CVs acima de 2%, obtidos com as amostras avaliadas com 120 e 240 minutos após o preparo, geraram estimativas de baixa confiabilidade.

Na Tabela 2 estão apresentadas as estimativas do conteúdo de DNA e do Coeficiente Variação de folhas de bananeira diplóide Ouro submetido a análise de citometria de fluxo em diferentes períodos de armazenamento da amostra.

Tabela 2. Estimativas do conteúdo de DNA e do Coeficiente Variação de folhas de bananeira diplóide Ouro submetido a análise de Citometria de Fluxo em diferentes períodos de armazenamento da amostra.

Período de armazenamento da amostra (minutos)	Índice de DNA (pg)	Coeficiente de Variação
5	1.08 b	1.04 a
30	1.10 b	1.32 a
60	1.07 b	1.29 a
120	0.95 a	2.39 b
240	0.84 a	4.70 c

*Médias seguidas pela mesma letra pertencem a um mesmo grupo e não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott Knott

As estimativas do conteúdo de DNA não variaram para as amostra de folhas de bananeira Ouro avaliadas no período de 5 e 60 minutos após o preparo, os Cvs foram inferiores a 1,5% indicando boa precisão das avaliações. Já para as amostras avaliadas de 120 a 240 minutos após o preparo das amostras os Cvs foram superior a 2% gerando, portanto, estimativas do conteúdo de DNA pouco precisas conforme comentado na literatura (Marie e Brown, 1993; Ulrich e Ulrich ,1991).

CONCLUSÕES

Amostras de folhas de bananeira avaliadas até 30 minutos após o preparo geram estimativas de conteúdo de DNA confiável para os diplóides avaliados.

Amostras de folhas de bananeira Ouro podem ser avaliadas até 60 minutos após seu preparo sem comprometimento da resolução dos dados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

DOLEZEL, J.; BINAROVA, P.; LUCRETTI, S. Analysis of nuclear DNA content in plant cells by flow cytometry. **Biologia Plantarum**, v. 31, p. 113-120, 1989.

DOLEZEL, J.; GREILHUBER, J.; SUDA, J. Flow cytometry with plants: an overview. In: DOLEZEL, J.; GREILHUBER, J.; SUDA, J (eds) Flow cytometry with plant cells. Wiley-Vch Verlag, Weinheim, p. 41-65, 2007.

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.

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.

ULRICH, I.; ULRICH, W. High-resolution flow cytometry of nuclear DNA in higher plants. **Protoplasma**, New York, v. 165, n.1/3, p.212-215, 1991.