

CITOMETRIA DE FLUXO EM BANANEIRA: DOSES E TEMPO DE EXPOSIÇÃO AO IODETO DE PROPÍDEO

Leila Aparecida Salles Pio¹, Ana Catarina Lima Oliveira², Aline Monticelli Cardoso³, Moacir Pasqual⁴, Sebastião de Oliveira e Silva⁵, Camila Aparecida Lopes⁶

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

INTRODUÇÃO

A citometria de fluxo é uma técnica que envolve a análise das propriedades óticas (dispersão da luz e fluorescência) de partículas (células, núcleos, cromossomos, organelas) que fluem em uma suspensão líquida (Dolezel, 1997). Esse princípio pode ser usado, por exemplo, para medir a quantidade de DNA de uma célula (Dolezel e Bartos, 2005). Em plantas, é possível obter milhões de núcleos em suspensão a partir de poucas gramas de tecido foliar em um procedimento relativamente simples que envolve a maceração desse tecido em uma solução tampão que mantém a integridade nuclear (Galbraith et al., 1983). A coloração dessa amostra com corantes específicos para o DNA (DAPI, iodeto de propídeo, brometo de etídeo) permite ao aparelho estimar a quantidade de DNA.(Dolezel e Bartos, 2005).

Por ser uma técnica relativamente nova, são necessários alguns experimentos para definir o melhor protocolo a ser utilizados em materiais vegetais. Neste contexto este trabalho teve como objetivo definir a melhor dose e tempo de exposição de amostras de folhas de bananeira Ouro ao corante Iodeto de Propídeo.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no laboratório de Cultura de Tecidos da Universidade Federal de Lavras.. Para a determinação do conteúdo de DNA, aproximadamente 70 mg de tecido foliar de plantas de bananeira cultivar Ouro e de *Pisum sativum* (padrão de referência interno) foram triturados juntos, em placa de Petri, contendo 1 mL de tampão LB01 gelado para a liberação dos núcleos (Dolezel et al., 1998). 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 . Em seguida as amostras foram coradas com 4 doses de Iodeto de Propídeo em solução de 1 mg/1 mL (5, 15, 25 e 35 μmL). As amostras foram armazenadas no escuro, dentro de um recipiente com gelo triturado e analisadas em 5 períodos de exposição (1, 15, 30, 75 e 90 minutos). O Delineamento foi inteiramente casualizado com 4 repetições e o esquema fatorial foi em fatorial 4x5. 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

A tabela 1, se refere aos dados de coeficiente de variação obtidos dos picos G1. Quanto menor o coeficiente de variação menor é a largura do pico e maior é a precisão dos experimentos. Por esses resultados é possível verificar que os tempos de exposição muito prolongados, ao Iodeto de Propídeo, mais de 75 minutos, causaram um aumento no coeficiente de variação, tornando os resultados menos precisos. As doses de Iodeto de Propídeo não apresentaram diferenças significativas, exceto para o tempo de exposição de 90 minutos em que a dose de 15 μl foi a que apresentou melhor resultado.

Tabela 1. Coeficiente de Variação dos Picos G1 de histogramas obtidos por citometria de Fluxo em folhas de bananeira Ouro.

Tempo de exposição ao Iodeto de Propídeo (minutos)	Doses de Iodeto de Propídeo (μl)			
	5	15	25	35
1	1,07 a A	0,82 a A	1,83 b B	1,00 a A
15	0,93 a A	0,74 a A	0,75 a A	0,71 a A
30	0,77 a A	0,81 a A	0,73 a A	0,76 a A
75	1,52 b A	1,40 b A	1,53 b A	1,21 a A
90	3,25 c C	1,57 b A	2,62 c B	3,06 b C

*Médias seguidas pela mesma letra minúscula na vertical e maiúscula na horizontal pertencem ao mesmo grupo e não diferem estatisticamente, pelo teste Scott Knott, a 5% de probabilidade.

Pela Tabela 2 é possível verificar que o conteúdo de DNA variou bastante, de 0,79

Tempo de exposição ao Iodeto de Propídeo (minutos)	Doses de Iodeto de Propídeo (μm)			
	5	15	25	35
1	1,02 b A	1,17 b B	1,24 b B	1,31 c B
15	1,01 b A	1,19 b B	1,32 b B	1,26 c B
30	1,19 c A	1,11 b A	1,20 b A	1,23 c A
75	0,79 a A	0,9 a A	0,89 a A	1,06 b B
90	0,82 a A	1,00 a B	0,91 a B	0,82 a A

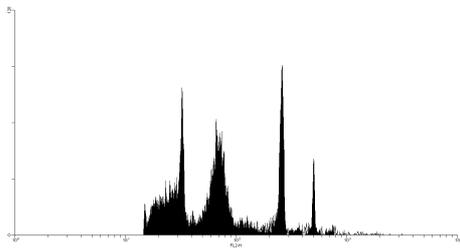
até 1,32 pg, conforme os tratamentos. Esse resultado não era esperado, visto que se trata do mesmo material vegetal. Doses maiores de iodeto de propídeo proporcionaram um aumento no conteúdo de DNA. Tempos de exposição menores também proporcionaram um acréscimo no conteúdo de DNA.

Tabela 2. Índices de DNA dos Picos G1 de histogramas obtidos por citometria de Fluxo em folhas de bananeira Ouro

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na vertical e maiúscula na horizontal pertencem ao mesmo grupo e não diferem estatisticamente, pelo teste Scott Knott, a 5% de probabilidade

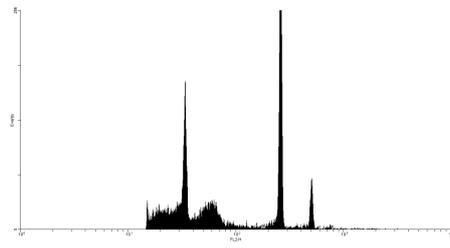
Na Figura 1 é possível observar diferenças nos histogramas obtidos. No tempo de 1 minuto de aplicação do iodeto na amostra, o mesmo ainda não teve tempo de reagir e os picos não ficaram bons, com o primeiro pico relativamente fino (G1) e o segundo muito grosso (G2), com coeficiente de variação alto. Os picos seguintes do histograma são dos picos G1 e G2 do padrão de referência. Pode-se observar que o índice de DNA está alterado (1,26 pg). Para o tempo de exposição de 30 minutos foi o melhor resultado, com

pico G1 com CV 0,64 e índice de DNA de 1,19 pg. Para a amostra com tempo de exposição ao iodeto por 75 minutos o CV aumentou para 1,66 e o índice de DNA diminuiu para 0,79 pg. Já para o tempo de exposição de 90 minutos, o CV aumentou mais um pouco (1,77) e o índice de DNA ficou em torno de 0,9 pg, Concluindo assim que o tempo de exposição ao iodeto de Propídeo interfere na estimativa do índice de DNA e na precisão do experimento. A dosagem de iodeto de propídeo não apresentou muitas diferenças nos resultados.



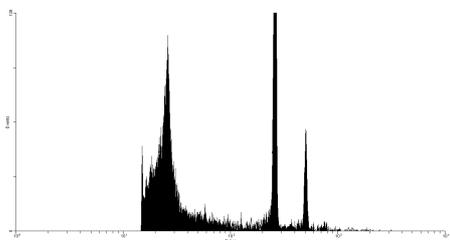
Tempo 1 Dose 15

	CV	ID (pg)
Banana pico 1	0,78	1,26
Banana pico 2	1,89	2,44
Ervilha	0,62	9,09



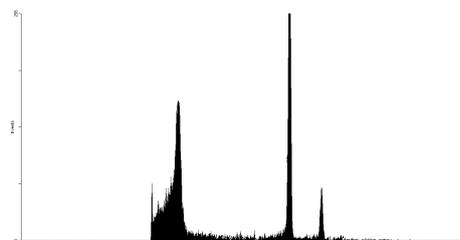
Tempo 30 Dose 15

	CV	ID (pg)
Banana pico 1	0,64	1,19
Ervilha	0,34	9,09



Tempo 90 Dose 05

	CV	ID (pg)
Banana pico 1	1,67	0,9
Ervilha	0,46	9,09



Tempo 75 Dose 05

	CV	ID (pg)
Banana pico 1	1,66	0,76
Ervilha	0,23	9,09

Figura 1 –Histogramas de citometria de Fluxo em plantas de bananeira cultivar Ouro.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitem concluir que o tempo de exposição ao iodeto de propideo interferem nos resultados, sendo que períodos muito prolongados como 75 e 90 minutos e o período de 1 minuto diminuem a precisão do experimento e a dosagem de iodeto não interferiu nos resultados.

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. Applications of flow cytometry for the study of plant genomes. **Journal of Applied Genetics**, v. 38, n. 3, p. 285-302, 1997.

DOLEZEL, J.; BARTOS, J. Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. **Annals of Botany**, v. 95, p. 99-110, 2005.

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.