

TAMPÕES DE EXTRAÇÃO E UTILIZAÇÃO DE RNASE NA QUALIDADE DE ANÁLISES DE CITOMETRIA DE FLUXO DE BANANEIRA.

Ana Catarina Lima de Oliveira¹, Leila Aparecida Salles Pio², Roselaine Cristina Pereira³, Gabriela Ferreira Nogueira⁴, Moacir Pasqual⁵, Sebastião de Oliveira e Silva⁶.

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

INTRODUÇÃO

A banana é um dos produtos alimentares mais produzidos no mundo atualmente, com mais de 130 países produtores, sendo muito importante, pois se torna grande geradora de fonte e renda empregando milhões de pessoas em todo o território nacional. O melhoramento desta espécie visa à obtenção de híbridos resistentes a doenças e com maior produtividade, neste sentido a duplicação cromossômica permite a geração de plantas autotetraplóides que, depois de avaliadas e selecionadas, são utilizadas em cruzamento com diplóides melhorados. Para avaliar o nível de ploidia pode-se utilizar a técnica de citometria de fluxo. Neste tipo de técnica o tampão para conservação dos núcleos mostra-se de grande importância (Stover e Buddenhagen, 1986; Bakry et al., 2007).

A solução tampão adequada é aquela que permite o isolamento e manutenção da integridade dos núcleos da amostra a ser analisada. Têm sido usados vários tampões no isolamento de núcleos de células vegetais (Galbraith et al., 1983). A sua composição é determinada pela necessidade de inibir a atividade das nucleases, de preservar a integridade dos núcleos e de fornecer condições ótimas para a coloração do DNA. Os tampões mais utilizados apresentam geralmente, cation Mg^{2+} (Galbraith et al., 1983; Arumuganathan e Earle 1991) ou poliaminas (de Laat et al., 1987; Dolezel et al., 1989), que tem a função de estabilizar a cromatina. O Triton X-100 é geralmente usado em todos os tampões como detergente não iônico. Por vezes, são adicionados ao tampão, agentes redutores (mercaptoetanol, PVP, etc.) que têm como função inibir a ação de compostos fenólicos (Endemann et al. 2002; Galbraith et al. 2002). A RNase é utilizada para inativar as moléculas de RNA, permanecendo apenas o DNA para ser submetido as análises.

Na literatura há poucos relatos que comparam a eficiência dos diferentes tampões de extração nuclear. Não existe um único tampão que funcione otimamente para todos os tipos de tecidos e ou espécies vegetais, assim, é necessário estudos prévios comparando a eficiência dos diferentes tampões para cada espécie estudada. Com isso, é possível a escolha adequada do tampão colaborando para uma maior precisão experimental.

Com este trabalho objetivo-se avaliar a eficiência de diferentes tampões de extração na presença ou não de RNase em análises de citometria de fluxo de bananeiras diplóides 2803-01, Ouro, Lidi e TH03-01.

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 Ouro, Lidi e TH03-01 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, Galbraith, Tris, Otto 1 e Otto 2. 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, em metade dos tratamentos foi adicionado 5 µml de RNase para determinar o efeito desta enzima na quantidade de DNA do material analisado e em seguida todas as amostras foram coradas com 25 µl de Iodeto de Propídeo e armazenadas no escuro, dentro de um recipiente com gelo triturado e em seguidas analisadas. O delineamento foi inteiramente casualizado com 4 repetições e o esquema fatorial foi em fatorial 5x4x2. Para cada amostra, 10 mil núcleos foram analisados utilizando-se escala logarítmica. A análise foi realizada no citômetro Facscalibur (Becton Dickinson), os histogramas 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 comprados pelo teste de médias Scott Knott ao nível de 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Houve diferenças significativas para os fatores tampão e RNase para a variável índice de DNA, onde os valores obtidos nos diferentes tampão na presença de RNase não apresentaram diferenças estatísticas (Tabela 01).

Em alguns tampões como o Otto 1 e Otto 2, os resultados foram tão ruins, não sendo possível observar a formação do pico, portanto, sem condições de avaliar o índice de DNA (Figura 1). Resultado este conflitante com Dolezel e Bartos (2005), onde eles relataram as vantagens da utilização dos tampões OTTO devido a presença de ácido cítrico, este facilita a acessibilidade da cromatina e homogeneiza a sua estrutura, eliminando diferenças na intensidade de coloração entre populações de núcleos com o mesmo conteúdo de DNA, mas com diferentes estados de compactação da cromatina, além de ser um importante agente anti-oxidante.

Os índices de DNA foram maiores nos tampões LB01 e Otto 2. A diferença nos índices de DNA indica que a constituição do tampão de extração interfere na quantidade de DNA, alterando o resultado.

Tabela 1. Conteúdo de DNA (pg) de amostras de folha de bananeira submetidas a diferentes tampões de extração e presença ou ausência de RNase. Lavras-MG, UFLA, 2010.

Tampão	Conteúdo de DNA (pg)	
	Com RNase	Sem RNase
Galbraith	0,95 aA	0,83 bA
Tris	0,91 aA	0,76 bB
LB01	1,19 aA	1,07 aA
Otto 1	-	0,70 b
Otto 2	-	1,02 a

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

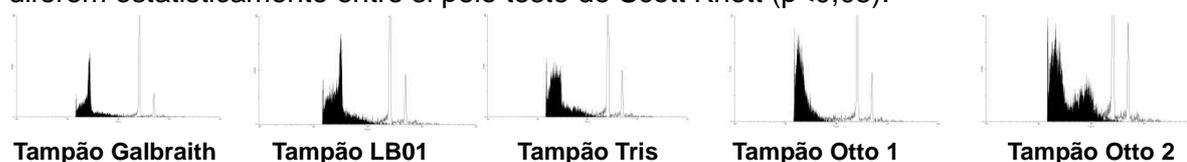


Figura 1. Histogramas de citometria de fluxo da cultivar Ouro submetidas a diferentes tampões de extração na ausência de RNase. Lavras-MG, UFLA, 2010.

Na figura 1 é possível observar que os tampões Galbraith e LB01 apresentaram melhores picos nos histogramas, enquanto que os tampões Tris, Otto 1 e Otto 2 apresentaram picos grossos, com altos coeficientes de variação, indicando falta de precisão nos resultados obtidos.

CONCLUSÕES

A presença de RNase não causou diferença significativa entre os tampões, já quando se considera a ausência das mesmas o tampão recomendado para utilização é o LB01, sendo que os tampões Otto 1 e 2 não permitiram a quantificação do DNA mesmo na presença de RNase em análises de citometria de fluxo de bananeiras.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARUMUGANATHAN, K. E EARLE, E. Estimation of nuclear DNA content of plants by flow cytometry. **Plant Molecular Biology Reporter**, New York, v. 9 (3): p. 229-233, 1991.
- BAKRY, F.; REBERDIERE, N.P.; PICHOT, S.; JENNY, C. In liquid medium colchicines treatment induces non chimerical doubled-diploids in a wide range of mono- and interspecific diploid banana clones. **Fruits**, v. 62, p. 3-12. 2007.
- DE LAAT, A.; GÖHDE, W.; VOGELZANG, M. Determination of ploidy of single plants and plant population by flow cytometry. **Plant Breeding**, v. 99, p. 303-307, 1987.
- DOLEZEL, J.; BARTOS, J. Plant DNA flow cytometry and estimation of DNA genome size. **Annals of Botany**, v. 95, p. 99-110. 2005.
- 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.
- ENDEMANN, M.; HRISTOFOROGLU, K.; STAUBER, T. E.; WILHELM, E. Assessment of age-related polyploidy in *Quercus robur* L. somatic embryos and regenerated plants using DNA flow cytometry. **Biologia Plantarum**, v. 44, n. 3, p. 339-345, 2002.
- 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.
- STOVER, R. H.; BUDDENHAGEN, I. W. **Banana Breeding**: polyploidy, disease resistance and productivity. **Fruits**, Paris, v. 41, n. 3, p. 175-191, 1986.