

MILENE MIRANDA PRAÇA

**REAVALIAÇÃO DOS VALORES DE CONTEÚDO DE DNA DOS
PADRÕES DE REFERÊNCIA INTERNACIONALMENTE
UTILIZADOS EM QUANTIFICAÇÕES GENÔMICAS DE PLANTAS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2009

MILENE MIRANDA PRAÇA

**REAVLIAÇÃO DOS VALORES DE CONTEÚDO DE DNA DOS PADRÕES
DE REFERÊNCIA INTERNACIONALMENTE UTILIZADOS EM
QUANTIFICAÇÕES GENÔMICAS DE PLANTAS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 15 de Julho de 2009.

Prof. Wellington Ronildo Clarindo
(Co-Orientador)

Wagner Campos Otoni
(Co-Orientador)

Prof. Cosme Damião Cruz

Pesq. Eveline Teixeira Caixeta

Prof. Carlos Roberto de Carvalho
(Orientador)

**A Deus,
Ao meu esposo Vinícius e meus filhos Davi e Mateus.**

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, pela oportunidade de realização do curso.

À Fundação de Apoio e Amparo a Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo apoio financeiro fundamental para realização desse trabalho.

Ao Prof. Carlos Roberto de Carvalho, pela orientação, ensinamentos, dedicação, amizade, apoio e, principalmente, pela confiança e paciência.

Ao Prof. Wellington Ronildo Clarindo, pela amizade, colaboração, sugestões no desenvolvimento do trabalho e pelos momentos de descontração muito agradáveis.

À Prof^a. Silvia das Graças Pompolo, Prof. Wagner Campos Otoni e Dr^a. Eveline Teixeira Caixeta, pelas avaliações no exame de qualificação e pelos ensinamentos.

Ao Prof. Cosme Damião Cruz, pelo auxílio nas análises estatísticas e pela contribuição na interpretação dos resultados.

Ao Dr. Jaroslav Doležel do instituto de Botânica Experimental da República Theca, pelo fornecimento das sementes das plantas utilizadas neste trabalho.

A todos os professores, pelos valiosos ensinamentos que contribuíram para o meu crescimento profissional.

Àqueles que são a base dessa conquista: meus pais e meus irmãos, pelo amor incondicional, pela preocupação e dedicação com a minha formação e pelo exemplo de vida que sempre foi sinônimo de luta.

Aos amigos do Laboratório de Citogenética e Citometria do DBG, Isabella, Cristiane, Thaís, Guilherme, Fernanda e Iara, pelo exemplo de vida, pela contribuição técnica e científica, pelo convívio harmonioso e muito descontraído e especialmente pela amizade.

À Maria Andréia, Isane e Fernanda “Poia”, pela amizade e agradável convívio por alguns períodos no Lab. de Citogenética.

Aos amigos Tatiana, Fabrício, Isabela, Carol e Deíse, pela amizade, pelos momentos de descontração e por interessarem sempre pelo meu trabalho.

À Edna e Rita, pelo apoio nos assuntos burocráticos.

Ao “Zé Chico” e “Sr. Pintinho”, pelo auxílio profissional e amizade.

A todos os amigos conquistados no curso de Genética e Melhoramento.

A todos os meus familiares, tios, primos e minha linda Vovó Judite, pelas orações.

Ao meu esposo Vinícius, pelo amor, incentivo e apoio nos momentos decisivos do meu trabalho e à sua família pelo carinho.

Ao meu “filhotinho” Davi, pelo sorriso e alegria contagiante, pelo carinho e por ser sempre o meu ponto de partida para novas conquistas e ao Mateus, que está para chegar.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para realização deste trabalho.

A Deus, pelo dom da vida e por permitir e iluminar todos os passos desta conquista.

BIOGRAFIA

MILENE MIRANDA PRAÇA, filha de José Fernandes Praça e Maria Libânia Miranda Praça, nasceu no dia 14 de Dezembro de 1979, em Viçosa - Minas Gerais.

Em 1999, ingressou-se na Universidade Federal de Juiz de Fora, graduando-se Bacharel e Licenciada em Ciências Biológicas em Junho de 2003.

Durante o período de graduação, foi bolsista de Treinamento Profissional no programa de extensão “Escola da Natureza” do laboratório de Ecologia e bolsista PIBIC/CNPq do Departamento de Biologia, onde desenvolveu atividades de pesquisa em Citogenética Vegetal.

Em Agosto de 2003, ingressou no Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento na Universidade Federal de Viçosa, em nível de mestrado, submetendo-se à defesa de tese em Julho de 2005.

Em Agosto de 2005, ingressou no Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento na Universidade Federal de Viçosa, em nível de doutorado, submetendo-se à defesa de tese em Julho de 2009.

SUMÁRIO

	PÁGINA
RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	x
1- INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Determinação do conteúdo de DNA em plantas.....	1
1.2. Citometria de fluxo.....	2
1.3. Citometria de Imagem.....	4
1.4. A escolha dos padrões.....	8
2. OBJETIVOS.....	14
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	16
3.1. Material.....	16
3.2. Métodos.....	16
3.2.3. Citometria de fluxo.....	17
3.2.3.1. Preparo da suspensão nuclear de folhas.....	17
3.2.3.2. Preparo da suspensão nuclear de gânglios de <i>D. melanogaster</i>	17
3.2.3.3. Processamento e análise no citômetro de fluxo.....	18
3.2.3.4. Estimação do conteúdo de DNA.....	18
3.2.3. Citometria de imagem.....	19
3.2.3.1. Obtenção de raízes e preparo das lâminas.....	19
3.2.3.2. Hidrólise e coloração pela reação de Feulgen.....	20
3.2.3.3. Obtenção das imagens digitais.....	20
3.2.3.4. Análise dos dados.....	21
3.2.4. Análises estatísticas.....	22
4. RESULTADOS.....	24
4.1. Citometria de fluxo.....	24
4.2. Citometria de imagem.....	48

5. DISCUSSÃO.....	62
5.1. Citometria de fluxo.....	62
5.2. Citometria de imagem.....	69
6. CONCLUSÕES.....	72
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	74

RESUMO

PRAÇA, Milene Miranda, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2009. **Reavaliação dos valores de conteúdo de DNA dos padrões de referência internacionalmente utilizados em quantificações genômicas de plantas.** Orientador: Carlos Roberto de Carvalho. Co-orientadores: Wellington Ronildo Clarindo e Wagner Campos Otoni.

A aplicação das técnicas de citometria de fluxo (CF) e de imagem (CI) tem possibilitado a caracterização de genomas de várias espécies. Esses trabalhos vêm fornecendo relevantes informações a estudos evolutivos, moleculares e para o melhoramento de plantas. Para que uma espécie tenha seu DNA mensurado, necessita-se de padrões de referência que tenham seu conteúdo de DNA bem estabelecido. No entanto, observa-se na literatura que esses padrões apresentam diferentes valores de DNA. Isto tem gerado mensuramentos errôneos do genoma de várias espécies vegetais. Considerando a necessidade de obter padrões com valor 2C de DNA estabelecido para análises citométricas em plantas, em virtude das discrepâncias de valores citados na literatura para uma mesma espécie, o presente estudo teve como objetivo reavaliar os valores de conteúdo de DNA de alguns dos principais padrões de referência utilizados internacionalmente. Para tanto, as espécies *Raphanus sativus* L., *Solanum lycopersicum* L., *Glycine Max* (L.) Merr., *Zea mays* L., *Pisum sativum* L., *Vicia faba* L. e *Allium cepa* L. foram comparadas citometricamente entre si e com espécies que possuem o genoma seqüenciado: *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. e *Drosophila melanogaster*. Meig. A obtenção de CVs abaixo de 4,46% e 4,97% evidenciou que as metodologias de CF e CI, respectivamente, foram adequadamente aplicadas. Inicialmente, comparou-se por CF as plantas padrões duas a duas, do menor para o maior conteúdo de DNA, e observou-se que a quantidade de DNA mensurada foi diferente da quantidade previamente descrita. Após realizar essas comparações, calculou-se o conteúdo de DNA para todos os

padrões, com base no índice, utilizando cada um desses como um padrão de referência primária. Os valores encontrados também foram diferentes dos valores descritos previamente. No entanto, por análise multivariada, observou-se uma proximidade com os valores de referência da literatura. Quando os dados foram comparados com os resultados obtidos pelos quatro laboratórios pesquisados por Dolezel et al (1998), observou-se que formaram agrupamentos os laboratórios que utilizaram o mesmo padrão primário ou a mesma metodologia. Quando comparou-se apenas os valores de DNA obtidos no presente estudo, observou-se, pelo teste de *Dunnnett*, que os padrões *R. sativus* e também *D. melanogaster* proporcionaram o maior número de diferenças em relação aos valores de referência. Esses resultados foram confirmados com os dados da CI. As outras espécies proporcionaram o mesmo número de igualdades. Sendo assim, esses novos valores obtidos, principalmente com *A. thaliana*, espécie que teve seu DNA seqüenciado, poderiam formar um grupo de “*Gold standard*” para plantas.

ABSTRACT

PRAÇA, Milene Miranda, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2009.

Reassessment of DNA content values for reference standards internationally used in genomic quantification of plants. Adviser: Carlos Roberto de Carvalho. Co-Advisers: Wellington Ronildo Clarindo and Wagner Campos Otoni.

The application of flow (FC) and image (IC) cytometry techniques have enabled the genome characterization of various plant species. Such works have provided relevant information for evolution and molecular studies, and for plant breeding. In order to quantify the DNA of a species, standard references with well-established DNA content are necessary. However, it can be observed that the species used as standard are described with different DNA values in the literature, which has caused inaccurate genome measurement of various plant species. Considering the importance of establishing standards for cytometric analyses in plants, in view of the disparate values cited in the literature for the some specie, the present study aimed at reassessing the DNA content values of some of the standard references mostly used worldwide. For this purpose, the species *Raphanus sativus* L., *Solanum lycopersicum* L., *Glycine Max* (L.) Merr., *Zea mays* L., *Pisum sativum* L., *Vicia faba* L. and *Allium cepa* L. were cytometrically compared among themselves, and with *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. and *Drosophila melanogaster* Meig., which are species with known genome sequences. CVs below 4.46% and 4.97% showed that FC and IC methodologies were properly employed. At first, plant standards were compared pairwise, and it was observed that the measured DNA amounts were different than those previously described. After these comparisons, the DNA content was calculated for all standards, based on the index, using each one as a primary reference standard. There was no conformity between the obtained results and the values described previously. However, through multivariate analyses using

the data obtained by FC, similarity was detected between these results and the reference values found in the literature. When the data was compared with the results found by the different laboratories researched by Dolezel et al. (1998), it could be observed that they constituted groups with the laboratories that used the same primary standard of methodology. When compared only to the DNA values obtained at the present study, by the *Dunnett* test, it was noticed that *R. sativus* and *D. melanogaster* provided the largest number of differences in relation to the reference values. These results were corroborated by the IC data. The other species supplied the same number of similarities. This way, the newly rendered values, especially that of *A. thaliana*, whose DNA has been sequenced, could form a group of plant “*Gold standards*”.

1 – INTRODUÇÃO

1.1 – Determinação do conteúdo de DNA em plantas

A quantificação do conteúdo de DNA em plantas tem sido reconhecida como um relevante parâmetro para caracterização genômica, com aplicabilidade em estudos evolutivos, biodiversidade (Knight e Beaulieu 2008), biologia celular, ecologia, fitogeografia, melhoramento, sistemática e taxonomia vegetal (Doležel et al. 2007, Kolář et al. 2009). Além disso, fornece informações úteis para o planejamento de projetos de seqüenciamento e em trabalhos envolvendo marcadores moleculares (Bennett e Leitch 2005). De acordo com Price e Johnston (1996) e Hardie et al. (2002), um conjunto de dados que apresente a extensão da variedade do tamanho do genoma entre e intra espécies é importante no estudo da distribuição de sua variabilidade, na frequência da magnitude dos eventos iniciais que geraram esta mudança de conteúdo, na plasticidade e fluidez do genoma vegetal e na evolução do conteúdo de DNA. A estimação do tamanho de DNA nuclear é também importante no mapeamento de genomas, em destaque o mapeamento genético e a elaboração de estratégias para a clonagem e o isolamento de genes baseados em mapas (Grattapaglia e Bradshaw 1994).

O tamanho do genoma de plantas tem sido estimado por dois métodos principais: a citometria de fluxo (CF) e a citometria de imagem (CI) (Moscone et al. 2003, Noirot et al. 2005). De acordo com Greilhuber (2008), ambas são confiáveis na determinação do conteúdo de DNA nuclear.

1.2 – Citometria de fluxo

A CF pode ser caracterizada como uma microfotometria fluorescente dinâmica (Greilhuber 2008), que envolve a análise das propriedades ópticas (dispersão da luz e fluorescência) de partículas (células, protoplastos, núcleos e cromossomos) em suspensão (Doležel et al. 2007). A medida em fluxo da fluorescência emitida permite análises a alta velocidade (10^2 - 10^3 partículas por segundo) e garante que essas partículas sejam selecionadas aleatoriamente em toda a população, sem qualquer subjetividade associada (Doležel 1997). A análise do conteúdo de DNA baseia-se na intensidade de fluorescência relativa de núcleos ou células em suspensão, corados com um fluorocromo específico (Doležel e Bartoš 2005).

A CF avalia a intensidade relativa de fluorescência dos núcleos isolados a partir de células obtidas de tecidos vegetais ou animais, resultando em um histograma típico. Esse histograma apresenta um pico maior (número de núcleos na fase G_1/G_0 do ciclo celular) e um pico menor (número de núcleos na fase G_2), enquanto a região entre os dois picos corresponde ao número de núcleos em fase S (Galbraith et al. 1983, Price et al. 2000, Doležel e Bartoš 2005).

A metodologia de CF foi originalmente desenvolvida no fim dos anos 50, para contagem e análise rápida de células sanguíneas. Com a evolução da técnica e com o aparecimento de novos marcadores fluorescentes, a utilização dessa instrumentação generalizou-se a outras áreas e a estudos com outras células, como vegetais e microbianas (Doležel 1997, Doležel e Bartoš 2005).

Os trabalhos pioneiros de CF em plantas eram limitados pelas dificuldades em se obter células isoladas em suspensão com núcleos adequados para processamento no citômetro (Doležel 1997). Somente após o desenvolvimento de metodologias que tornaram o processo de obtenção de material nuclear relativamente rápido, a determinação do valor C em plantas passou a apresentar diversas aplicações, que vão desde pesquisas básicas para o melhoramento e produção de sementes, mas também a determinação de ploidia, identificação de mixoplóides e aneuplóides, estudos de células proliferativas e de mecanismos de reprodução (Doležel e Bartoš 2005, Clarindo et al. 2008, Carvalho et al. 2008).

O conteúdo de DNA nuclear estimado por CF é obtido com suspensões de núcleos e/ou células permeáveis, coradas com fluorocromos DNA-específicos, e a quantidade de luz emitida é quantificada (Doležel e Bartoš 2005). Segundo Doležel et al. (2007) a posição do pico G₁/G₀ no histograma da amostra analisada é comparada com a posição do pico de uma amostra padrão, que tem seu conteúdo de DNA já estabelecido. Desse modo, o tamanho do genoma nuclear é determinado em picogramas (pg) de DNA ou, pode ser convertido em mega pares de bases (Mpb); sendo que 1 pg de DNA representa 978 Mpb (Doležel et al. 2003).

Os fluorocromos intercalantes, sem preferência por pares de base, têm sido sugeridos para determinar o tamanho do genoma nuclear de uma espécie (Doležel et al. 1992, Doležel e Bartoš 2005). Segundo Michaelson et al. (1991) e Yanpaisan et al. (1999), o iodeto de propídeo (IP) é o fluorocromo mais indicado para a determinação da quantidade de DNA nuclear, tanto em plantas como animais, por ser intercalante e pelos menores coeficientes de variação obtidos na sua utilização. Entretanto, Price e Johnston (1996) relataram que o IP não cora especificamente o DNA, mas também a dupla fita de RNA; por isso a acurácia da determinação do conteúdo de DNA depende do uso de RNase.

Pelo fato do DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) corar preferencialmente seqüências de DNA ricas em bases AT, é menos rigoroso do que o IP nas quantificações de DNA genômico (Price e Johnston 1996). Entretanto, muitos pesquisadores ainda usam esse corante, por possuírem citômetros com fonte de luz HBO (luz de arco de mercúrio), nos quais a fluorescência emitida pelo DAPI é fácil de excitar e mensurar (Doležel e Bartoš 2005).

A mitramicina, a cromomicina, o Hœchst e o DAPI são exemplos de fluorocromos base específicos. A mitramicina além de ser base específica CG, permite a detecção de pequenas diferenças na quantidade de DNA provenientes de diferenças na proporção AT:CG (Michaelson et al. 1991). O mesmo resultado é obtido com DAPI (Doležel 1997).

De acordo com Doležel (1991), além dos corantes, a fonte de luz utilizada nas análises por CF também têm influenciado os resultados obtidos. Esse autor relata dois tipos de fonte de luz do citômetro de fluxo: *laser* e luz HBO. Doležel (1991) e Nunez (2001) descreveram que os *lasers* possuem alto poder de radiação, estabilidade e monocromaticidade, os quais eliminam a

necessidade de excitação dos filtros de luz. Segundo Price e Johnston (1996), nas análises para as quantificações absolutas de DNA genômico eles são mais comumente usados. Além disso, citômetros de fluxo a *laser* são os mais empregados, por gerarem luz monocromática visível, a mais utilizada em conjunto com o fluorocromo IP (Price e Johnston 1996). De acordo com Wilkerson (2004), é importante saber o comprimento de onda que a fonte de *laser* irá excitar, porque o fluorocromo usado irá depender desse aspecto.

Outro aspecto relevante da análise citométrica da quantidade de DNA em plantas diz respeito ao coeficiente de variação (CV). Segundo Doležel e Bartoš (2005), na CF a variação é normalmente expressada pelo CV. Marie e Brown (1993) consideram o CV um critério essencial nas avaliações dos métodos citométricos. Eles estabeleceram uma linha de referência a qual consideram um CV variando entre 1 e 2% para análises de qualidade em células vegetais e um CV de 3% como um valor para análises de rotina. Doležel (1997) relatou que a CF é uma técnica caracterizada por ser de alta resolução, cujo CV dos picos normalmente variam entre 1 e 3%. Entretanto, quando se trata de quantificações que incluem estimativas do tamanho do genoma, o autor descreve que esses valores não são reproduzíveis, provavelmente por variações dentro e entre os acessos analisados. Além disso, CVs baixos são difíceis de obter em espécies ricas em metabólitos secundários, como relatado por Pinto et al. (2004). Sendo assim, Doležel e Bartoš (2005) aceitaram como admissíveis valores de CV menores que 5%, uma vez que tal precisão é difícil de ser conseguida em algumas plantas.

1.3 – Citometria de Imagem

Com o surgimento da citometria de imagem (CI) e da CF, a citogenética vegetal foi ampliada. A associação dessas metodologias introduziu um novo escopo de estudo, principalmente pela possibilidade de aplicação no melhoramento, estudos filogenéticos e evolutivos de plantas e programas de seqüenciamento genômicos. Dentro desta linha de pesquisa, uma ampla fonte de dados pode ser obtida e associada como o número cromossômico (Rossi et al. 2008, Carvalho et al. 2008), a autopoloidia e alopoloidia (Praça et al. 2009), a estabilidade genômica em cultura de tecidos (Clarindo et al. 2008), o estudo de

ciclo celular com e sem tratamentos (Sandoval et al. 2003). Estes dados também podem ser utilizados nas avaliações de variabilidade intra e interespecífica (Volgmayr e Greilhuber 1998, Vilhar et al. 2001).

Segundo Greilhuber (2008), o termo citometria refere-se ao cálculo de medidas em células e tecidos, e surgiu a partir da necessidade de quantificar substâncias celulares. As medidas que apresentam maior interesse são as espaciais, como área e comprimento, e as densitométricas, obtidas pela quantificação da absorvância/transmitância.

A CI, conhecida inicialmente como citofotometria, surgiu com os experimentos realizados por Caspersson, em 1936, nos quais foi quantificado o DNA nuclear não corado, por meio do cálculo da absorvância da luz UV pela célula. Estes primeiros trabalhos, baseados na forte absorção de luz UV pelos ácidos nucléicos, indicaram que o DNA estava altamente concentrado nos núcleos celulares. Com o surgimento dos primeiros microfotômetros, foi possível quantificar vários componentes celulares e atividade enzimática por meio do cálculo da absorvância de células coradas ou não. Posteriormente, núcleos tratados por meio da reação de Feulgen começaram a ser utilizados em estudos de quantificação do DNA nuclear (Chieco e Derenzini 1999, Vilhar et al. 2001).

Os métodos microfluorométricos e fotométricos também foram utilizados para quantificar o conteúdo de DNA de cromossomos individuais, tratados pela reação de Feulgen, e obtidos de cultura de linfócitos de roedores e de humanos. Estes procedimentos foram realizados com microscópios acoplados com fotômetros e com campo ajustável em torno do objeto. Os dados eram plotados em gráficos após análises estatísticas (Gaillard et al. 1968, Nitsch et al. 1970). Contudo, a execução desse tipo de análise já havia sido considerada por Swift (1966) como sendo uma quantificação trabalhosa, dispendiosa e os dados gerados eram difíceis de serem interpretados.

Com o advento das vídeo-câmeras digitais e com o avanço tecnológico dos computadores, passou-se a ter uma instrumentação adequada para os estudos em CI com custos mais acessíveis e sem a necessidade de técnicos especializados na aferição constante do equipamento (Wied et al. 1983). O sistema de análise de imagens passou a substituir os equipamentos anteriormente utilizados, determinando a ampla disseminação da CI como

técnica para a quantificação de DNA (Vilhar et al. 2001). A introdução definitiva dessa metodologia pode ser verificada principalmente pelo uso confiável na rotina patológica dentro da área médica, por possibilitar o diagnóstico de tumores malignos, e em estudos de ploidia e ciclo celular (Mellin 1990, Bocking et al. 1995, Cohen 1996, Vilhar et al. 2001).

O principal aspecto dessa metodologia tem sido concentrado na união de esforços internacionais, entre laboratórios, para o estabelecimento de critérios confiáveis de preparação das amostras e de calibração dos equipamentos, conduzindo a um controle de qualidade da reação de Feulgen e da calibração dos equipamentos (Greilhuber 2008).

O conteúdo de DNA celular pode ser calculado a partir da medida da absorbância de núcleos intactos (Chieco e Derenzini 1999) ou cromossomos (Abreu et al. 2008, Rosado et al. 2009) preparados em lâminas e corados por meio da reação de Feulgen (Feulgen e Rossenbeck 1924). Essa técnica de coloração permite a quantificação do valor 2C pelo fato do cromóforo ligar-se estequiometricamente à fita dupla de DNA sob condições controladas (Greilhuber 2008).

Segundo Greilhuber (2008), a reação de Feulgen é específica para DNA, pois com a hidrólise ácida as bases púricas são removidas das desoxirriboses, deixando grupos aldeídos livres quando o anel de açúcar se abre. Esse autor relatou que na ribose a abertura do anel é menos freqüente do que na desoxirribose. Sendo assim, somente os radicais aldeídos formados na cadeia de DNA se ligam às moléculas de fucsina básica, presentes no reativo de Schiff.

Testes de rotina têm sido realizados no sentido de estabelecer uma curva ótima de hidrólise do DNA, uma vez que é um passo determinante para a sua coloração e, conseqüentemente, para a sua quantificação. No procedimento originalmente descrito por Feulgen e Rossenbeck (1924), recomendou-se a hidrólise em ácido clorídrico 1M a 60°C, durante 4 minutos. Porém, estudos posteriores indicaram que a hidrólise mais adequada era alcançada quando realizada com ácido clorídrico 5M, em temperatura ambiente (20 - 25°C) com variação de tempo entre 45 a 60 minutos, tanto para material fresco quanto para fixado, com o argumento de que esse processo minimiza a formação de fragmentos de DNA muito pequenos, que podem sair do núcleo (Kjellstrand 1977, Bocking et al. 1995). Dois outros aspectos importantes para a

formação de grupamentos aldeído no núcleo, e que podem interferir na quantificação, são o grau de compactação da cromatina e a fixação da amostra a ser analisada (Greilhuber 2008).

O conteúdo de DNA nuclear tem sido calculado por meio da determinação da densidade óptica integrada (DOI) (Kiss et al. 1992). As imagens observadas ao microscópio são capturadas por uma vídeo-câmera e digitalizadas. Em seguida, essa imagem, em pixels, é convertida para uma escala de profundidade de bits conhecida (previamente calibrada com filtros de densidade óptica), e processada pelo programa de análise de imagens em valores de DOI (Hardie et al. 2002).

A quantificação de DNA analisada por CI requer cuidados especiais com a calibração e controle da parte óptica e da aquisição das imagens digitais. Essas imagens são normalmente processadas em programas de análise específicos, que realizam o cálculo da densidade óptica integrada (DOI) das regiões celulares (Chieco et al. 2001).

A maioria das análises realizadas via CI têm utilizado câmeras analógico-digitais com luz monocromática, ou de câmeras policromáticas (RGB), mas, nesse último caso, com a utilização apenas do canal de comprimento de onda na faixa verde. No caso de imagens monocromáticas, estudos citométricos de material obtido em humanos e plantas têm utilizado, principalmente, a escala de valor do pixel com 8 (256 tons de cinza) ou 12 bits (4096 tons de cinza) (Rosado et al. 2009). As regiões de interesse, como aquelas que contêm núcleos, são diferenciadas do *background* e processadas para a determinação da DOI por intermédio da seguinte equação:

$$DOI = \sum_{i=1}^n -\log \left[\frac{lf_i}{lb_i} \right]$$

DOI: densidade óptica integrada

n: número total de pixels no núcleo

lf_i: intensidade dos pixels do núcleo

lb_i: intensidade dos pixels da área limpa da lâmina.

A CI utiliza-se dos valores de pixels para efetuar o cálculo instantâneo da DOI (Hardie et al. 2002), evitando o procedimento de aquisição de imagens em diferentes pontos de um mesmo núcleo, minimizando os problemas relacionados a falta de linearidade das amostras. Esses foram atribuídos às diferenças de relevo da superfície nuclear que, por não ser plana, faz com que o cromóforo apresente distribuição não homogênea. Conseqüentemente, a medida de absorbância obtida num determinado ponto poderia não estar correlacionada com o conteúdo de DNA nuclear (Chieco e Derenzini 1999).

1.4 – A escolha dos padrões

Um dos aspectos mais relevantes que tem sido observado nas análises por CF e CI consiste na utilização de células de referência (padrão), que possuem o conteúdo 2C absoluto de DNA conhecido. A seleção de um padrão apropriado para análises citométricas é importante para a estimativa do tamanho do genoma nuclear (Doležel et al. 2007). Tanto núcleos de plantas quanto de animais têm sido utilizados como referências para quantificações de DNA (Doležel 1997).

Quando células de referência são utilizadas para quantificar um conjunto de espécies, tem-se um padrão de referência primária. Neste caso, inicia-se a quantificação do DNA da espécie alvo utilizando o padrão primário. Após determinar o seu conteúdo de DNA, essa espécie alvo passa a ser o padrão para outra espécie e assim sucessivamente. No entanto, se uma espécie que possui seu DNA nuclear previamente quantificado é utilizada para calibrar outra espécie, ela é um padrão de referência somente (Doležel et al. 1998, Doležel et al. 2007).

De acordo com Doležel et al. (2007), um padrão de referência pode ser endógeno, como por exemplo, ser padrão diplóide para estudos de endopoliploidia em uma espécie, ou pode ser adicional, entre espécies não relacionadas. Neste caso, o padrão deve conter características similares a amostra desconhecida, para que possam ser mensuradas em uma mesma via de processamento (Doležel e Bartoš 2005).

Um padrão apropriado deve ter valores de DNA próximos da planta analisada, mas sem sobreposição aos picos 2C e 4C. Quanto mais próximos os

genomas analisados, maior a linearidade entre os picos nos histogramas (Doležel e Bartoš 2005). Além disso, deve ser geneticamente estável; com tamanho de genoma constante, sendo este determinado com precisão; facilmente manipulado e disponível em quantidades suficientes (Doležel et al. 2007). Esses requisitos nem sempre podem ser satisfeitos, e em virtude disso a escolha e o uso dos valores 2C de referência têm sido negligenciados pela maioria dos laboratórios, onde diferentes autores utilizam diferentes padrões (Doležel e Bartoš 2005).

O padrão pode ser externo, quando processado e analisado separadamente da amostra teste; ou interno, quando a amostra teste e padrão são processados e analisados simultaneamente (Motley et al. 2000). Além disso, há um terceiro tipo de padrão denominado padrão pseudo-interno, no qual os núcleos da amostra e do padrão são isolados e corados separadamente, misturados e analisados simultaneamente no citômetro (Johnston et al. 1999, Doležel e Bartoš 2005).

O padrão externo tem sido aceito somente quando a demanda de precisão nas análises é baixa, assim como em análises de ploidias de DNA (Doležel et al. 2007). As flutuações na calibragem do equipamento entre uma análise e outra tem sido a principal desvantagem de se utilizar um padrão externo (Motley et al. 2000). Essa desvantagem tem sido superada com o uso do padrão interno, no qual o processamento desse e da amostra é realizado em conjunto, sendo igualmente afetados durante a preparação e coloração (Doležel 1997, Motley et al. 2000, Noirot et al. 2000, Noirot et al. 2003b).

Quando o padrão interno é utilizado deve-se levar em consideração a presença de metabólitos secundários nas plantas (Doležel et al. 2007). Esses metabólitos podem agir como uma barreira para a ligação do fluorocromo ao DNA, modificando a forma e posição dos histogramas (Loureiro et al. 2006b). Greilhuber (2005), Price et al. (2000) e Noirot et al. (2000, 2002, 2003a, 2005) mencionaram que algumas diferenças na quantidade de DNA ocorrem em virtude da interferência desses compostos na acessibilidade do corante ao DNA. De acordo com Noirot et al. (2000) e Campa et al. (2005a, b) a quantidade desses metabólitos oscila intra e interespecificamente.

Alguns autores têm documentado o uso de núcleos de células animais como padrão de referência para espécies de plantas (Grattapaglia e Bradshaw

1994, Azmi et al. 1997). Os mais utilizados tem sido suspensão de eritrócitos obtidos de ave, truta, leucócitos e fibroblastos humanos (Johnston et al. 1999, Motley 2000). Esses padrões foram quantificados, em sua maioria, utilizando *Gallus domesticus* como padrão primário, que foi determinado quimicamente por Rasch et al. (1971) (Johnston et al. 1999, Bennett et al. 2003). O uso desses padrões tem sido justificado como sendo de fácil obtenção além de poderem ser armazenados por algum período (Motley et al. 2000). No entanto, a quantificação do DNA de seus genomas tem apresentado variação entre diferentes amostras. Johnston et al. (1999) relataram dificuldades no uso dos eritrócitos de *G. domesticus* como padrão de referência. Ao estimar o conteúdo de DNA de duas amostras de diferentes sangues dessa espécie, esses autores encontraram valores de 2,49 e 3,01 pg DNA/2C. Outro problema foi relacionado ao pico de fluorescência, o qual não foi o mesmo em diferentes preparações com a mesma amostra. O valor encontrado diferiu ainda da literatura mais citada (Galbraith et al. 1983) que publicaram o valor de 2,33 pg DNA/2C.

De acordo com Prince et al. (1980), apesar de células/núcleos animais serem considerados padrões de confiança em análises com células animais, por razões técnicas, o uso de padrões com células/núcleos vegetais são mais adequados para estimar a quantidade de DNA em plantas. Para este tipo de material, a falta de padrões com conteúdo de DNA bem estabelecido tem sido uma das principais fontes de erro na quantificação de DNA (Johnston et al. 1999, Doležal e Bartoš 2005).

Duas espécies animais foram utilizadas por Bennett et al. (2003) como padrões para plantas: o nematóide *Caenorhabditis elegans* e *Drosophila melanogaster*. Essas espécies possuem o diferencial de terem seu genoma seqüenciado, com valor 1C de 100,25 Mpb para *C. elegans* (<http://www.wormbase.org/>) e 180 Mpb para *D. melanogaster* (Adams et al. 2000), aproximadamente. Bennet et al. (2003) mostraram a vantagem de utilizar essas duas espécies comparando seu genoma com *Arabidopsis thaliana*, a primeira planta seqüenciada que poderia ser reconhecida como um padrão absoluto para outras plantas. No entanto, o tamanho do genoma desta espécie foi inicialmente subestimado e utilizá-la como padrão poderia resultar em quantificações de DNA incorretas. Somente após a comparação desta planta com *D. melanogaster* e *C. elegans*, foi possível observar um aumento no

tamanho do genoma para 153 Mpb e 157 Mpb, respectivamente, quando comparado com o valor 1C de 125 Mpb obtido pelo Projeto Genoma da *Arabidopsis* (Arabidopsis Genome Initiative, 2000).

Em virtude do pequeno tamanho de seus genomas, *C. elegans*, *D. melanogaster* e *A. thaliana* podem não ser bons padrões de referência, pois poderiam ser uma fonte de erro ao ser comparado com genomas maiores (Johnston et al. 1999, Doležel e Bartoš 2005). Porém, estas espécies poderiam ser utilizadas como padrão de referência primária para estabelecer um conjunto de plantas-padrões por meio de comparações entre os genomas (Bennett e Leitch 2005). Segundo Doležel e Bartoš (2005), esta comparação é importante, uma vez que poderia ser estabelecido um grupo de “*Gold standard*”, quantificados com base em um genoma que foi seqüenciado.

Uma das primeiras comparações entre um grupo de diferentes espécies padrão foi realizada por Doležel et al. (1998). Esses autores mensuraram o DNA de espécies de plantas, que possuem cultivares ou linhagens conhecidas, em quatro diferentes laboratórios, utilizando os fluorocromos IP e DAPI, citômetros de fluxo com fonte à *laser* ou luz HBO e densitometria por Feulgen. No entanto, não realizaram a comparação com padrão primário de genoma seqüenciado, como *C. elegans*, *D. melanogaster* e *A. thaliana*. As espécies utilizadas por esses autores foram comparadas uma contra a outra conforme uma cascata, iniciada com *A. thaliana* (0,37 pg de DNA 2C, determinado por esses autores antes da correção por Bennett et al. 2003) até *Allium cepa* (33,55 pg de DNA 2C). Os quatro laboratórios obtiveram resultados próximos, porém quando as análises realizadas em citômetros de fluxo com fonte à *laser* e luz HBO foram comparadas a diferença alcançou 9,6%. Os valores de DNA obtidos para os padrões diferiram em até 15,9% dos valores previamente determinados por Doležel et al. (1992).

Outro estudo foi conduzido por Johnston et al. (1999) e envolveu dois laboratórios. Nesse estudo, as plantas analisadas constituíam variedades diferentes das utilizadas por Doležel et al. (1998), porém fazem parte de um grupo de padrões recomendados por Bennett e Leitch (1995). O estudo revelou problemas em utilizar eritrócitos de galinha como padrão, e comparado aos valores de DNA obtidos por Doležel et al. (1998), houve discrepâncias nos

resultados. Nota-se, então, um desacordo entre os diferentes laboratórios que utilizam padrões vegetais em análises de quantificações genômicas.

Em virtude da falta de um grupo de plantas “ideais”, com o valor C determinado em um mesmo laboratório, com metodologias de CF e CI, muitos pesquisadores têm utilizado plantas com diferentes valores de conteúdo de DNA estabelecidos por diferentes autores (Tabela 1). A comparação do DNA de uma espécie desconhecida com o DNA dessas plantas pode causar erros no mensuramento. Uma alternativa para contornar esse problema foi estabelecer a espécie *Pisum sativum* (9,09 pg) como um bom padrão em estudos de citometria em vegetais (Doležel et al. 2007). Essa planta apresenta vantagens como valor C médio e próximo ao da maioria das plantas de interesse agrônômico, pobre em heterocromatina e inibidores de coloração (Doležel et al. 1998, Johnston et al. 1999, Doležel et al. 2007), é facilmente disponível e germina com rapidez, além de responder bem a diferentes tampões de isolamento (Loureiro et al. 2006a). *P. sativum* tem sido utilizada em 15% dos estudos de quantificação do tamanho do genoma (Doležel et al. 2007), no entanto, para esta espécie também se encontram diferentes valores de DNA na literatura, como observado na Tabela 1. Sendo assim, existe a necessidade de estabelecer um grupo de padrões com o conteúdo de DNA bem definido, que alcance a quantidade de DNA da maioria das espécies vegetais (Bennett e Leitch 2005).

Tabela 1 – Valores 2C de DNA relatados para diferentes plantas padrão (sem distinção de cultivares) utilizadas para estimação do tamanho de genoma em plantas.

Padrão	Valor 2C (pg)	Referência
<i>Arabidopsis thaliana</i>	0,32	Bennett et al. (2003)
	0,33	Vilhar et al. (2001)
	0,256	Arabidopsis Genome Initiative (2000)
	0,39	Doležel et al. (1998)
	0,35	Marie e Brown (1993)
	0,30	Arumaganathan e Earle (1991)
<i>Raphanus sativus</i>	1,02	Vilhar et al. (2001)
	1,26	Doležel et al. (1998)
	1,11	Doležel et al. (1992)
	1,09	Arumaganathan e Earle (1991)
<i>Solanum lycopersicum</i> *	2,00	Obermayer et al. (2002)
	1,96	Doležel et al. (1992)
	1,88 a 2,07	Arumaganathan e Earle (1991)
<i>Glycine max</i>	2,34	Vilhar et al. (2001)
	2,65	Doležel et al. (1998)
	2,50	Doležel et al. (1994)
	2,31	Arumaganathan e Earle (1991)
<i>Zea mays</i>	5,32	Vilhar et al. (2001)
	5,73	Johnston et al. (1999)
	5,67	Doležel et al. (1998)
	5,72	Doležel et al. (1992)
	4,75 a 5,63	Arumaganathan e Earle (1991)
<i>Pisum sativum</i>	9,73	Obermayer et al. (2002)
	8,84	Vilhar et al. (2001)
	9,39	Johnston et al. (1999)
	9,09	Doležel et al. (1998)
	9,07	Doležel et al. (1992)
	9,02	Greilhuber e Ebert (1994)
8,18 a 9,11	Arumaganathan e Earle (1991)	
<i>Vicia faba</i>	25,59	Vilhar et al. (2001)
	26,66	Johnston et al. (1999)
	27,00	Doležel et al. (1998)
	26,90	Doležel et al. (1992)
<i>Allium cepa</i>	30,83	Vilhar et al. (2001)
	32,97	Johnston et al. (1999)
	34,89	Doležel et al. (1998)
	34,76	Doležel et al. (1992)
	33,50	Bennett e Smith (1976)

**Solanum lycopersicum* anteriormente nomeada *Lycopersicon esculentum*.

2 – OBJETIVOS

Considerando a necessidade de estabelecer padrões de confiança para análises citométricas em plantas, em virtude das discrepâncias de valores citados na literatura (Bennett e Leitch 2005), o presente estudo teve como objetivo reavaliar os valores do conteúdo de DNA de alguns dos principais padrões de referência utilizados internacionalmente. Para tanto, as espécies *Raphanus sativus*, *Solanum lycopersicum*, *Glycine max*, *Zea mays*, *Pisum sativum*, *Vicia faba* e *Allium cepa* foram comparadas citometricamente entre si, conforme sugerido por Doležel e Bartoš (2005) e com *Arabidopsis thaliana* e *Drosophila melanogaster*, espécies que possuem o genoma seqüenciado.

Os objetivos específicos foram:

- Por citometria de fluxo:
 - Adaptar as metodologias de extração e coloração nuclear a partir de tecidos foliares;
 - Mensurar o conteúdo de DNA nuclear das espécies descritas acima utilizando diferentes valores de DNA descritos por Doležel et al. (1992), Doležel et al. (1994) e Doležel et al. (1998) como referência;
 - Comparar estatisticamente os valores de DNA, em pg, obtidos para os padrões escolhidos *R. sativus*, *S. lycopersicum*, *G. max*, *Z. mays*, *P. sativum*, *V. faba* e *A. cepa* entre si e com núcleos de *A. thaliana* e *D. melanogaster*;

- Por citometria de imagem:
 - Adaptar as técnicas de maceração enzimática, dissociação celular e secagem ao ar para obtenção de preparações nucleares em lâmina;

- Adequar as preparações nucleares para serem submetidas à Reação de Feulgen nas análises quantitativas;
- Calibrar o sistema de microscopia e o de análise de imagens para obtenção de dados passíveis de serem resolvidos com CV abaixo de 5%, conforme recomendações de Haroske et al. (2001);
- Comparar os valores de DNA, em pg, obtidos para os padrões escolhidos *R. sativus*, *S. lycopersicum*, *G. max*, *Z. mays*, *P. sativum*, *V. faba* e *A. cepa* entre si e com núcleos de *A. thaliana*;
- Correlacionar os valores de DNA, em pg, obtidos pela CF e CI das espécies analisadas no presente estudo.

3 – MATERIAL E MÉTODOS

3.1 – Material

As sementes de *Raphanus sativus* L. 'Saxa', *Solanum lycopersicum* L. 'Stupicke polni tyckove rane', *Glycine Max* (L.) Merr. 'Polanka', *Zea mays* L. 'CE-777', *Pisum sativum* L. 'Ctirad', *Vicia faba* L. 'Inovec' e *Allium cepa* L. 'Alice', foram gentilmente cedidas pelo Dr. Jaroslav Doležel do Laboratório de Citogenética Molecular e Citometria, do Instituto Experimental Botânico-Sokolovska- República Tcheca. As sementes de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. 'Columbia' (2C = 0,32 pg, Bennett et al. 2003) foram cedidas pelo Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO) da Universidade Federal de Viçosa (UFV). Fêmeas selvagens de *Drosophila melanogaster* Meig. "Iso-1" (2C = 0,36 pg, Rasch et al. 1971, Adams et al. 2000, Bennett et al. 2003) foram obtidas do Laboratório Experimental de Drosófila da UFV.

O trabalho foi realizado no Laboratório de Citogenética e Citometria do Departamento de Biologia Geral.

3.2 – Métodos

As plantas foram adequadamente mantidas, multiplicadas e monitoradas em casa de vegetação. Tomou-se o cuidado de plantar as sementes das espécies em períodos que possibilitassem a obtenção de todas as folhas em uma mesma fase, ou pelo menos nos estágios mais jovens. Essas folhas foram, então, coletadas para análise em citômetro de fluxo e as plantas adultas proveram sementes, que germinadas em laboratório forneceram raízes para serem submetidas à técnica de CI.

3.2.3 – Citometria de fluxo

3.2.3.1 – Preparo da suspensão nuclear de folhas

Folhas jovens (2 cm²) dos padrões *A. thaliana*, *R. sativus*, *S. lycopersicum*, *G. max*, *Z. mays*, *P. sativum*, *V. faba* e *A. cepa* foram fragmentados aos pares e em ordem crescente de quantidade de DNA (ver tabela 1). O processo de retalhamento das folhas (Galbraith et al. 1983) foi realizado com uma lâmina de barbear por 30 s, em uma placa de Petri (60 x 15 mm) com 0,5 mL do tampão de lise OTTO-I (0,1 M de ácido cítrico - Merck KGaA[®], 0,5% de Tween 20 - Merck KGaA[®]) (Otto 1990), suplementado com 2,0 mM de dithiothreitol (Sigma[®]) e 50 µg mL⁻¹ de RNase (Sigma[®]). Na suspensão nuclear foram adicionados mais 0,5 mL do tampão de lise OTTO-I e o homogeneizado foi filtrado em filtro de nylon de 30 µm de diâmetro de poro (Partec[®]) dentro de um tubo de 2 mL de microcentrífuga (Eppendorf[®]), e então centrifugado à 100g por 5 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspenso e incubado por 5 min em 100 µL de OTTO-I. A suspensão nuclear foi corada com 1,5 mL de solução tampão OTTO-II (400 mM Na₂PO₄.12H₂O, Merck[®]) (Otto 1990) suplementada com 75 µM de iodeto de propídeo (IP) (Sigma[®]), 2,0 mM de ditiotretol (Sigma[®]) e 50 µg mL⁻¹ de RNase (Doležel et al. 1992; Meister 2005). A coloração foi realizada no escuro durante 20 – 40 min e, após, filtrou-se a suspensão nuclear em filtro de nylon de 20 µm de diâmetro de poro (Partec[®]) em um tubo (Partec[®]) para análise em citômetro de fluxo.

3.2.3.2 – Preparo da suspensão nuclear de gânglios de *D. melanogaster*

Gânglios cerebrais de *D. melanogaster* foram retirados em uma solução fisiológica (Arboreto[®]). Usando um microscópio estereoscópico, os gânglios foram cuidadosamente extraídos com auxílio de agulhas e transferidos para uma nova gota de solução fisiológica, a fim de evitar contaminação com outros tecidos. O material foi transferido para um grinder (Kontes Glass Company[®]) contendo 100 µL de tampão de lise OTTO I (Otto, 1990) suplementado 50 µg mL⁻¹ de RNase (Sigma[®]), com pH 2,3. Esse material foi triturado com auxílio de

um pistilo e, após, a suspensão foi ajustada para 1 mL com o mesmo tampão, filtrado em filtro de 30 µm de diâmetro de poro (Partec[®]) em tubo de microcentrífuga (Eppendorf[®]) e centrifugado à 100 g por 5 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuscitado e incubado por 5 min em 100 µL de OTTO-I. A suspensão nuclear foi corada com 1,5 mL de solução tampão OTTO-II (Otto 1990; Doležel e Gohde 1995) suplementada com 75 µM IP e 50 µg mL⁻¹ de RNase (Doležel et al. 1992). A coloração foi realizada no escuro durante 20 – 40 min e, filtrou-se a suspensão nuclear em filtro de nylon de 20 µm de diâmetro de poro (Partec[®]) em um tubo (Partec[®]) para análise em citômetro de fluxo (Lopes et al. 2009).

A suspensão nuclear contendo núcleos de gânglios foi misturada com suspensões nucleares de *A. thaliana* e *R. sativus*, a fim de realizar a comparação dos menores conteúdos de DNA avaliados na presente pesquisa. Os valores obtidos foram utilizados para as subseqüentes quantificações.

3.2.3.3 – Processamento e análise no citômetro de fluxo

As suspensões nucleares obtidas das folhas das plantas padrão e do gânglio de *D. melanogaster* foram analisadas em um citômetro de fluxo Partec PAS[®] (Partec[®] GmbH, Munster, Germany) equipado com fonte de luz a laser (488 nm). A fluorescência do IP emitida pelos núcleos foi coletada por um filtro RG 610 nm. O equipamento foi calibrado e alinhado usando microesferas e soluções padrão de acordo com recomendações do fabricante. Duas repetições independentes foram realizadas em três dias diferentes, totalizando seis repetições, sendo mais de 10.000 núcleos analisados em cada.

3.2.3.4 – Estimação do conteúdo de DNA

Os valores de DNA utilizados como referência foram descritos por Doležel et al. (1992), Doležel et al. (1994) e Doležel et al. (1998), uma vez que as plantas analisadas correspondem às mesmas variedades utilizadas pelos referidos autores.

Todos os histogramas de intensidade de fluorescência relativa foram avaliados no programa FlowMax Partec[®]. A razão entre as médias dos picos

G_0/G_1 das duas amostras analisadas simultaneamente foi calculada e convertida em pg de DNA.

O tamanho do genoma nuclear foi calculado a partir das leituras dos núcleos em G_0/G_1 , de acordo com a fórmula:

$$V = \left(\frac{L_1}{L_2} \right) \cdot pg$$

em que:

V: valor do conteúdo de DNA nuclear 2C (pg) da amostra.

L_1 : leitura média do pico G_0/G_1 da amostra.

L_2 : leitura média do pico G_0/G_1 do padrão.

pg: valor do conteúdo de DNA do padrão, em pg.

Os valores da leitura média do pico G_0/G_1 dos padrões foram corrigidos para o canal 100.

3.2.3 – Citometria de imagem

3.2.3.1 – Obtenção de raízes e preparo das lâminas

Sementes de *A. thaliana*, *R. sativus*, *S. lycopersicum*, *G. max*, *Z. mays*, *P. sativum*, *V. faba* e *A. cepa* foram germinadas em placas de Petri contendo papel filtro embebido em água destilada, à 30 °C. Após atingirem 0,5 a 1 cm, as raízes foram fixadas em solução de metanol: ácido acético (Merck®) 3:1 (v/v) por 24 h (Vilhar et al. 2001, Abreu et al. 2008). Esta solução foi trocada por álcool 95% como sugerido por Greilhuber e Ebert (1994). As raízes foram então maceradas por 30 min, a 34 °C, com uma solução de pectinase (Sigma®) diluída em água destilada, na proporção de 1:30 (enzima:água) (Clarindo e Carvalho 2006). As raízes foram lavadas por 10 min em água destilada, fixadas novamente com álcool 95% e estocadas à -20 °C.

Para o preparo da lâmina, raízes de duas espécies (em ordem crescente de quantidade de DNA nuclear) foram fragmentadas em paralelo, sem sobreposição na mesma lâmina (Greilhuber e Ebert 1994). Estas foram preparadas por dissociação celular conforme descrito por Carvalho et al. (2007). Com auxílio de um bisturi, as raízes foram dissociadas sob microscópio

estereoscópico e, simultaneamente, foram gotejadas três gotas de solução fixadora. Subsequentemente, as lâminas foram secadas ao ar e em placa aquecedora, a 50 °C, por 10 min. Em seguida, foram colocadas em solução fixadora de formaldeído 4% (Merck®), conforme recomendado por Greilhuber (2008), por 12 h, a 25 °C.

3.2.3.2 – Hidrólise e coloração pela reação de Feulgen

Após a fixação, as lâminas foram lavadas em água destilada, secadas ao ar e hidrolisadas em HCl 5 M (Merck®) por 45 min a 25 °C. Esta etapa foi realizada conforme recomendações de Greilhuber (2008), com modificações de tempo e temperatura para obtenção da curva ótima de hidrólise. A coloração foi realizada com o reativo de Schiff (Merck®) por 14 h a 4 °C. Após isso, as lâminas foram lavadas três vezes (três min cada) em água sulfurosa 0,5% (Merck®), uma vez em água destilada e novamente secadas ao ar. Os locais da lâmina que continham os meristemas foram cobertos com óleo de imersão (Carl Zeiss = L 25, índice de refração = 1,525) e depois selados com lamínula previamente limpa e esmalte incolor.

3.2.3.3 – Obtenção das imagens digitais

As lâminas foram observadas em fotomicroscópio Olympus™; modelo BX 60, com objetiva de imersão UPlanFI de 40 X, com abertura numérica de 0,75, equipado com acessórios de análise de imagem. Filtros de densidades neutras que ajudaram a homogeneizar a incidência de luz e outro filtro de interferência verde (IF550) foram utilizados.

Condições de calibração e iluminação foram feitas segundo Köhler, citado por Hardie *et al.* (2002), garantindo condições ópticas necessárias e reproduzíveis da intensidade luminosa.

As imagens foram capturadas diretamente por uma vídeo-câmera monocromática com sensor *charge coupled device* (CCD) de 12 bits, do kit de análise de imagem Cool SNAP™, acoplada ao microscópio e a um computador equipado com placa digitalizadora.

As análises foram realizadas usando o Programa Image Pro-Plus® 6.1 (Media Cybernetics®), no qual uma tabela de calibração com valores de densidade conhecidos foram empregados para processar as imagens. A curva de calibração foi padronizada com filtros Edmund Industrial Optics, de densidade óptica (DO) conhecida (escala DO = 0,03; 0,04; 0,06; 0,09; 0,15; 2,5).

O programa Image Pro-Plus® 6.1 (Media Cybernetics) foi usado para segmentar as imagens nucleares e a intensidade de luz do *background* de referência foi automaticamente determinado para a área que circunda o núcleo (Vilhar et al. 2001). A calibração e avaliação do sistema de análise de imagem foram realizadas com base em três testes: estabilidade (Vilhar e Dermastia 2002); linearidade (Chieco et al. 2001, Hardie et al. 2002), obtida com um conjunto certificado de filtros de densidade neutra: 0,15; 0,30; 0,40; 0,60; 0,90 e 2,50 (Edmund Industrial Optics®); e uniformidade (Puech e Giroud 1999), realizadas com filtros escalonados em 11 densidades discretas (Edmund Industrial Optics®).

O sistema para análise das imagens estabilizou-se após 12 min, em seguida calculou-se um $R^2 = 0,9978$ para o teste de linearidade e um CV = 0,68% para o teste de uniformidade.

3.2.3.4 – Análise dos dados

Os valores de densidade óptica integrada (DOI) foram obtidos de dez núcleos em prófases e dez núcleos em telófases, conforme descrito por Vilhar et al. (2001). Três lâminas de cada combinação (amostra/padrão) foram utilizadas na obtenção dos dados. Para a determinação da DOI foram utilizadas regiões da lâmina contendo núcleos e regiões com ausência de material celular. A partir das médias das telófases e prófases foram calculados os valores 2C e 4C para os núcleos. O programa calculou a DOI automaticamente.

De acordo com o sugerido por Vilhar et al. (2001), dois critérios empregados na pesquisa médica para controle da qualidade dos dados obtidos na CI, foram aqui utilizados para plantas: o CV e a razão 4C/2C. O primeiro requer CV dos núcleos 2C ou 4C, por lâmina, menor que 5% (Haroske et al.

2001). O segundo determina que a razão entre os valores 2C e 4C esteja entre 1,8 e 2,2 (Bocking e Nguyen 2004).

3.2.4 – Análises estatísticas

a- Padrões de agrupamentos ou de similaridades de resultados obtidos por diferentes laboratórios:

Realizou-se análise multivariada com base em Componentes Principais e agrupamento pelo método Tocher e UPGMA (ligação média entre grupos), com distância Euclidiana média padronizada, para os dados obtidos por CF. Os dados foram comparados com os valores obtidos por Doležel et al. (1992) e por diferentes laboratórios pesquisados por Doležel et al. (1998). Esses autores não realizaram testes ou não forneceram os dados obtidos com CI e por esse motivo, no presente estudo, não se realizou as análises propostas acima para esta metodologia.

Para realização do teste com CF os laboratórios pesquisados foram separados conforme descrito na tabela 2.

Tabela 2 – Abreviatura dos laboratórios de acordo com os padrões primários, utilizados nas análises multivariadas

	Laboratórios	Padrão primário (DNA/2C)
	L1	1- <i>P. sativum</i> (9,09)
	L1'	2- <i>A. cepa</i> (33,5)
	L2	1
Doležel et al. (1998)	L2'	2
	L3	1
	L3'	2
	L4	1
	L4'	2
Doležel et al. (1992)	R1	-

Os valores de DNA de referência utilizados para *A. thaliana* e *D. melanogaster* foram descritos por Bennett et al. (2003).

b- Identificação de padrões mais apropriados:

Os valores médios do tamanho do genoma nuclear obtidos por CF e CI, para todos os padrões, foram estatisticamente comparados pelo teste de *Dunnnett* ($P < 0.05$).

c- Relação entre valores do conteúdo de DNA obtidos por meio das técnicas de CF e CI:

Avaliou-se a relação entre os valores obtidos por meio da correlação linear de Pearson e a possibilidade de predição de valores de CI a partir de CF, por regressão polinomial.

Todas as análises foram processadas no programa estatístico GENES (Cruz 1997).

4 – RESULTADOS

4.1 – Citometria de fluxo

Os procedimentos de extração e coloração dos núcleos com IP, para a determinação da quantidade de DNA nuclear via CF, gerou histogramas com resolução que diferenciou as fases G_0/G_1 e G_2 . Somente um histograma de cada análise está relatado (Figuras 1 a 9), uma vez que as repetições apresentaram perfil semelhante.

Os histogramas gerados exibiram um pico principal correspondente aos núcleos na fase G_0/G_1 do ciclo celular, um pico menor correspondente à fase G_2 e uma região entre os dois picos referente aos núcleos em fase S. O número de núcleos está representado pelo eixo vertical, e a intensidade de fluorescência relativa pelo eixo horizontal (Figuras 1 a 9).

O CV em todas as análises variou de 1,07 a 4,46% (Tabelas 3 a 12). Nas análises processadas para *A. thaliana* e *D. melanogaster*, o maior CV dos picos G_0/G_1 foi 2,89% e 3,12%, respectivamente; para *A. thaliana* e *R. sativus*, 4,46% e 3,95%; *D. melanogaster* e *R. sativus*, 3,99% e 3,84%; *R. sativus* e *S. lycopersicum*, 3,77% e 3,28%; *S. lycopersicum* e *G. max*, 3,58% e 2,83%; *G. max* e *Z. mays*, 3,19% e 3,16%; *Z. mays* e *P. sativum*, 4,20% e 2,58%; *P. sativum* e *V. faba*, 2,88% e 2,54% e *V. faba* e *A. cepa*, 3,06% e 3,55%.

O índice corresponde à razão da intensidade de fluorescência emitida dos núcleos em G_0/G_1 da amostra pelos núcleos em G_0/G_1 do padrão. Os valores relativos (índice) referentes aos histogramas encontram-se nas Tabelas 3 a 12.

Pelos valores de leitura dos dois picos referentes à fase G_0/G_1 e tomando-se como referência o conteúdo de DNA de um dos dois padrões, calculou-se os valores absolutos em pg de DNA/2C para todas as espécies estudadas (Tabelas 3 a 12).

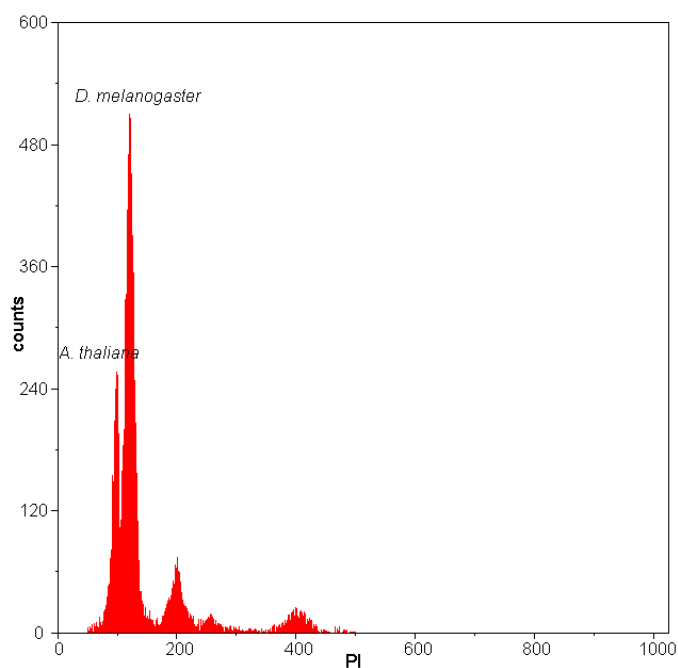


Figura 1 – Histograma apresentando os picos correspondentes aos núcleos G₀/G₁ e G₂, corados com IP, de *A. thaliana* e *D. melanogaster*.

Tabela 3 – Valores das leituras (canal), coeficiente de variação (CV), índice, índice médio e DNA/2C em picogramas (pg), obtidos a partir dos 6 histogramas gerados do processamento de *A. thaliana* e *D. melanogaster* por CF

<i>A. thaliana</i>			<i>D. melanogaster</i>		
Leitura	CV(%)	Índice	Leitura	CV(%)	Índice
100	2,13	1,00	119,98	2,66	1,20
100	2,87	1,00	125,54	2,66	1,26
100	2,16	1,00	121,68	3,01	1,22
100	2,56	1,00	121,98	2,17	1,22
100	2,89	1,00	123,38	2,83	1,23
100	2,78	1,00	122,59	3,12	1,22
Índice médio		1,00	Índice médio		1,22
DNA/2C		0,32*	DNA/2C		0,39

*valor de referência para *A. thaliana* (0,32 pg, Bennett et al. 2003)

Tabela 4 – Valores das leituras (canal), coeficiente de variação (CV), índice, índice médio e DNA/2C em picogramas (pg), obtidos a partir dos 6 histogramas gerados do processamento de *A. thaliana* e *D. melanogaster* por CF, porém tomando-se *D. melanogaster* como padrão

<i>D. melanogaster</i>			<i>A. thaliana</i>		
Leitura	CV(%)	Índice	Leitura	CV(%)	Índice
100	2,66	1,00	83,34	2,13	0,83
100	2,66	1,00	79,65	2,87	0,80
100	3,01	1,00	82,18	2,16	0,82
100	2,17	1,00	81,97	2,56	0,82
100	2,83	1,00	81,05	2,89	0,82
100	3,12	1,00	81,56	2,78	0,82
Índice médio		1,00	Índice médio		0,82
DNA/2C		0,36*	DNA/2C		0,29

* valor de referência para *D. melanogaster* (0,36 pg, Bennett et al. 2003).

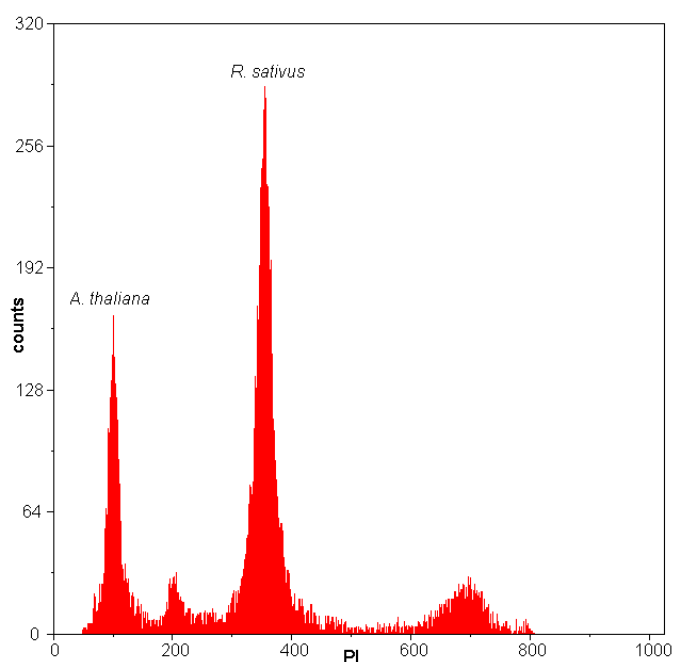


Figura 2 – Histograma apresentando os picos correspondentes aos núcleos G_0/G_1 e G_2 , corados com IP, de *A. thaliana* e *R. sativus*.

Tabela 5- Valores das leituras (canal), coeficiente de variação (CV), índice, índice médio e DNA/2C em picogramas (pg), obtidos a partir dos 6 histogramas gerados do processamento de *A. thaliana* e *R. sativus* por CF

<i>A. thaliana</i>			<i>R. sativus</i>		
Leitura	CV(%)	Índice	Leitura	CV(%)	Índice
100	4,46	1,00	354,29	2,11	3,54
100	3,53	1,00	328,36	1,56	3,28
100	4,30	1,00	329,47	3,62	3,29
100	4,23	1,00	332,07	3,95	3,32
100	3,11	1,00	273,07	2,16	2,73
100	2,99	1,00	318,39	1,44	3,18
Índice médio		1,00	Índice médio		3,22
DNA/2C		0,32*	DNA/2C		1,03

* valor de referência de *A. thaliana* (0,32 pg, Bennett et al. 2003)

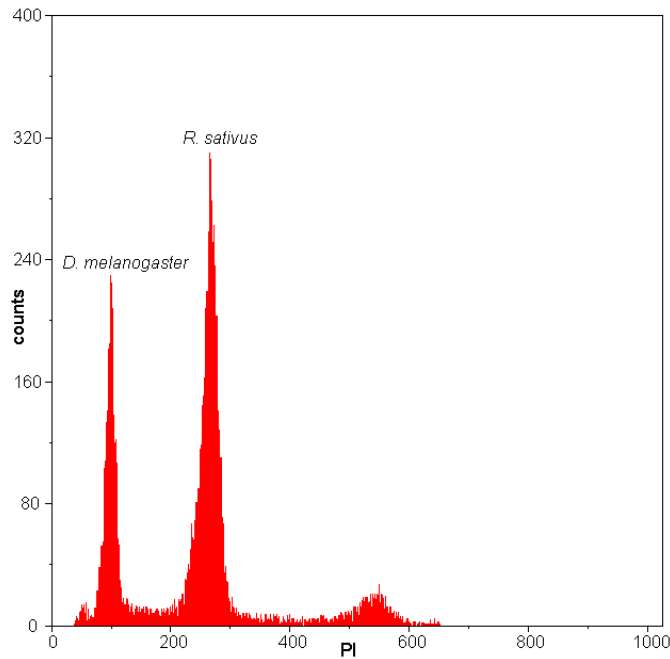


Figura 3 – Histograma apresentando os picos correspondentes aos núcleos G₀/G₁ e G₂, corados com IP, de *D. melanogaster* e *R. sativus*.

Tabela 6 – Valores das leituras (canal), coeficiente de variação (CV), índice, índice médio e DNA/2C em picogramas (pg), obtidos a partir dos 6 histogramas gerados do processamento de *D. melanogaster* e *R. sativus* por CF

<i>D. melanogaster</i>			<i>R. sativus</i>		
Leitura	CV(%)	Índice	Leitura	CV(%)	Índice
100	3,99	1,00	260,22	2,53	2,60
100	3,07	1,00	262,88	1,93	2,63
100	4,10	1,00	268,86	2,30	2,69
100	3,65	1,00	260,57	2,32	2,60
100	3,86	1,00	262,58	2,84	2,62
100	2,23	1,00	263,45	1,99	2,63
Índice médio		1,00	Índice médio		2,63
DNA/2C		0,36*	DNA/2C		0,95

* valores de referência de *D. melanogaster* (0,36 pg, Bennett et al. 2003).

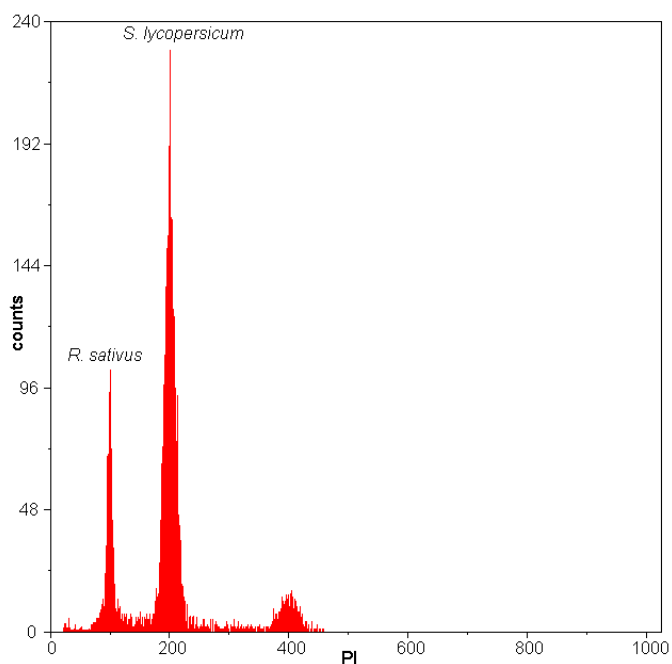


Figura 4 – Histograma apresentando os picos correspondentes aos núcleos G_0/G_1 e G_2 , corados com IP, de *R. sativus* e *S. lycopersicum*.

Tabela 7 – Valores das leituras (canal), coeficiente de variação (CV), índice, índice médio e DNA/2C em picogramas (pg), obtidos a partir dos 6 histogramas gerados do processamento de *R. sativus* e *S. lycopersicum* por CF

<i>R. sativus</i>			<i>S. lycopersicum</i>		
Leitura	CV(%)	Índice	Leitura	CV(%)	Índice
100	3,69	1,00	200,91	2,89	2,01
100	3,58	1,00	201,07	3,28	2,01
100	2,44	1,00	201,70	2,09	2,01
100	3,77	1,00	187,93	1,86	1,88
100	3,24	1,00	188,20	1,59	1,88
100	2,51	1,00	194,16	1,16	1,94
Índice médio		1,00	Índice médio		1,96
DNA/2C		1,26*	DNA/2C		2,47

*valor de referência de *R. sativus* (1,26 pg, Doležel et al. 1998).

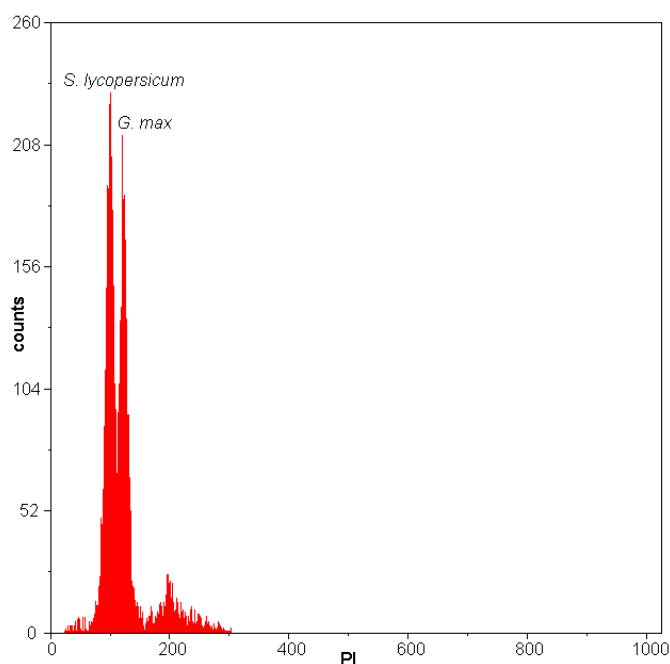


Figura 5 – Histograma apresentando os picos correspondentes aos núcleos G_0/G_1 e G_2 , corados com IP, de *S. lycopersicum* e *G. Max*.

Tabela 8 – Valores das leituras (canal), coeficiente de variação (CV), índice, índice médio e DNA/2C em picogramas (pg), obtidos a partir dos 6 histogramas gerados do processamento de *S. lycopersicum* e *G. max* por CF

<i>S. lycopersicum</i>			<i>G. max</i>		
Leitura	CV(%)	Índice	Leitura	CV(%)	Índice
100	2,78	1,00	118,73	2,78	1,19
100	2,95	1,00	117,51	2,65	1,18
100	3,15	1,00	117,83	2,61	1,18
100	3,39	1,00	117,71	2,83	1,18
100	2,92	1,00	121,15	1,99	1,21
100	3,58	1,00	123,05	1,83	1,23
Índice médio		1,00	Índice médio		1,20
DNA/2C		1,96*	DNA/2C		2,34

*valor de referência de *S. lycopersicum* (1,96 pg, Doležel et al. 1992).

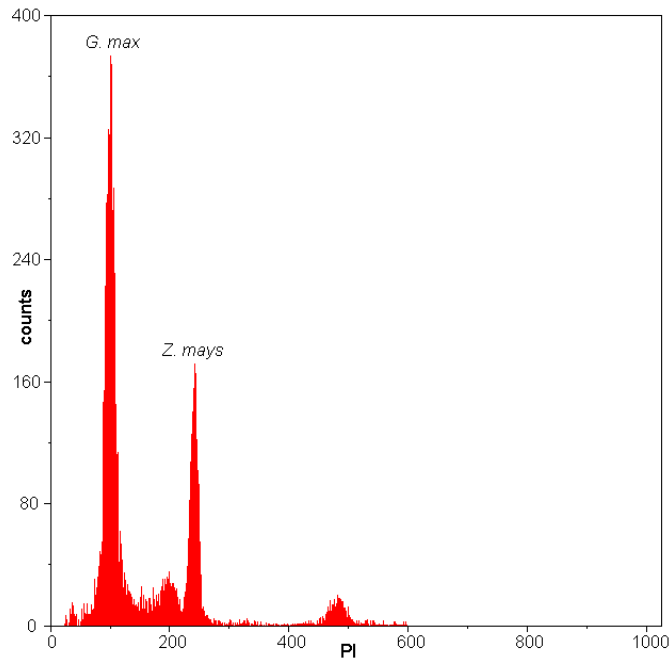


Figura 6 – Histograma apresentando os picos correspondentes aos núcleos G_0/G_1 e G_2 , corados com IP, de *G. max* e *Z. mays*.

Tabela 9 – Valores das leituras (canal), coeficiente de variação (CV), índice, índice médio e DNA/2C em picogramas (pg), obtidos a partir dos 6 histogramas gerados do processamento de *G. max* e *Z. mays* por CF

<i>G. max</i>			<i>Z. mays</i>		
Leitura	CV(%)	Índice	Leitura	CV(%)	Índice
100	3,19	1,00	240,40	3,16	2,40
100	3,51	1,00	241,11	2,34	2,41
100	2,47	1,00	229,66	1,07	2,30
100	2,93	1,00	238,84	2,54	2,39
100	3,08	1,00	235,83	1,55	2,36
100	2,50	1,00	237,34	2,03	2,37
Índice médio		1,00	Índice médio		2,37
DNA/2C		2,65*	DNA/2C		6,28

*valor de referência de *G. max* (2,65 pg, Doležel et al. 1998).

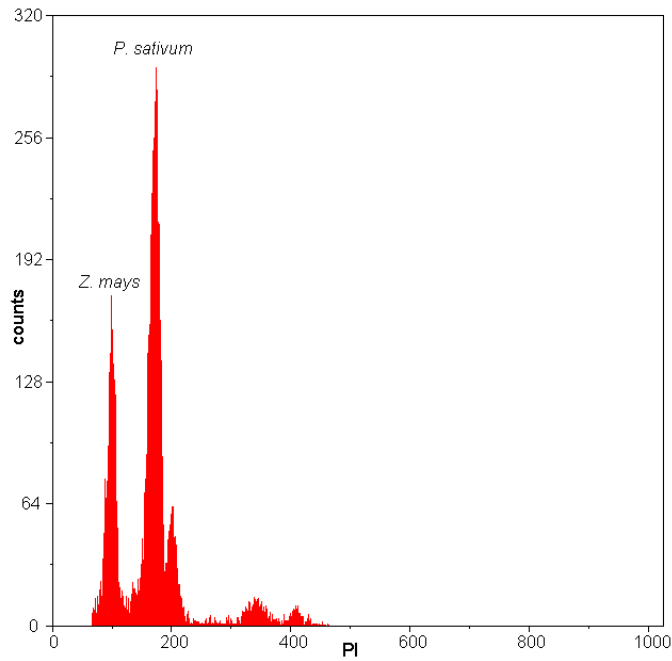


Figura 7 – Histograma apresentando os picos correspondentes aos núcleos G_0/G_1 e G_2 , corados com IP, de *Z. mays* e *P. sativum*.

Tabela 10 – Valores das leituras (canal), coeficiente de variação (CV), índice, índice médio e DNA/2C em picogramas (pg), obtidos a partir dos 6 histogramas gerados do processamento de *Z. mays* e *P. sativum* por CF

<i>Z. mays</i>			<i>P. sativum</i>		
Leitura	CV(%)	Índice	Leitura	CV(%)	Índice
100	3,38	1,00	167,80	2,19	1,68
100	4,20	1,00	172,49	2,47	1,72
100	3,53	1,00	171,49	2,58	1,71
100	4,01	1,00	169,11	2,24	1,69
100	3,35	1,00	171,19	2,54	1,71
100	2,86	1,00	172,48	1,54	1,72
Índice médio		1,00	Índice médio		1,71
DNA/2C		5,67*	DNA/2C		9,69

*valor de referência de *Z. mays* (5,67 pg, Doležel et al. 1998).

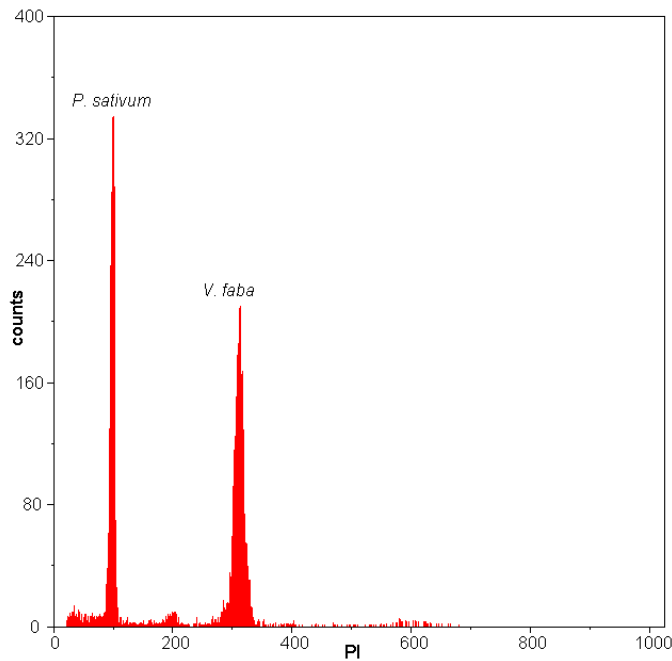


Figura 8 – Histograma apresentando os picos correspondentes aos núcleos G_0/G_1 e G_2 , corados com IP, de *P. sativum* e *V. faba*.

Tabela 11 – Valores das leituras (canal), coeficiente de variação (CV), índice, índice médio e DNA/2C em picogramas (pg), obtidos a partir dos 6 histogramas gerados do processamento de *P. sativum* e *V. faba* por CF

<i>P. sativum</i>			<i>V. faba</i>		
Leitura	CV(%)	Índice	Leitura	CV(%)	Índice
100	2,35	1,00	313,09	1,86	3,13
100	2,88	1,00	309,99	2,04	3,10
100	2,90	1,00	309,32	2,11	3,09
100	1,79	1,00	311,51	1,63	3,12
100	2,69	1,00	311,42	2,54	3,11
100	2,29	1,00	311,44	1,13	3,11
Índice médio		1,00	Índice médio		3,11
DNA/2C		9,09*	DNA/2C		28,27

*valor de referência de *P. sativum* (9,09 pg, Doležel et al. 1998).

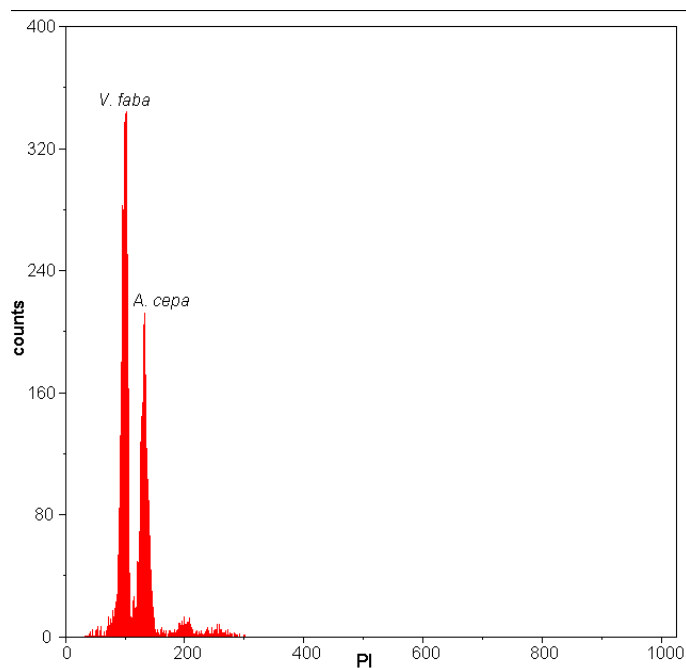


Figura 9 – Histograma apresentando os picos correspondentes aos núcleos G_0/G_1 e G_2 , corados com IP, de *V. faba* e *A. cepa*.

Tabela 12 – Valores das leituras (canal), coeficiente de variação (CV), índice, índice médio e DNA/2C em picogramas (pg), obtidos a partir dos 6 histogramas gerados do processamento de *V. faba* e *A. cepa* por CF

<i>V. faba</i>			<i>A. cepa</i>		
Leitura	CV(%)	Índice	Leitura	CV(%)	Índice
100	2,78	1,00	131,77	3,55	1,32
100	2,95	1,00	131,87	3,44	1,32
100	1,70	1,00	129,07	2,86	1,29
100	3,06	1,00	131,75	3,15	1,32
100	2,20	1,00	130,01	2,64	1,30
100	2,29	1,00	129,18	1,13	1,29
Índice médio		1,00	Índice médio		1,31
DNA/2C		27,00*	DNA/2C		35,37

*valor de referência de *V. faba* (27,00 pg, Doležel et al. 1998).

Tabela 13 – Resumo da quantificação do conteúdo 2C de DNA nuclear em picogramas para *D. melanogaster*, *A. thaliana*, *R. sativus*, *S. lycopersicum*, *G. max*, *Z. mays*, *P. sativum*, *V. faba* e *A. cepa*

Padrão	DNA/2C/padrão	Amostra	DNA/2C/amostra
<i>A. thaliana</i>	0,32	<i>D. melanogaster</i>	0,39
<i>D. melanogaster</i>	0,36	<i>A. thaliana</i>	0,29
<i>A. thaliana</i>	0,32	<i>R. sativus</i>	1,03
<i>D. melanogaster</i>	0,36	<i>R. sativus</i>	0,95
<i>R. sativus</i>	1,26	<i>S. lycopersicum</i>	2,47
<i>S. lycopersicum</i>	1,96	<i>G. max</i>	2,34
<i>G. max</i>	2,65	<i>Z. mays</i>	6,28
<i>Z. mays</i>	5,67	<i>P. sativum</i>	9,69
<i>P. sativum</i>	9,09	<i>V. faba</i>	28,27
<i>V. faba</i>	27,00	<i>A. cepa</i>	35,37
<i>A. cepa</i>	34,89		

Além dos valores do conteúdo de DNA obtidos da comparação de uma espécie padrão com outra (Tabelas 3 a 13), calculou-se o índice para todas as espécies tomando-se cada uma dessas como um padrão primário de referência (Tabela 14). A partir desses índices calculou-se os valores absolutos de DNA (Tabela 15). Para esse cálculo utilizou-se como DNA de referência os valores descritos por Bennett et al. (2003) para *A. thaliana* e *D. melanogaster*, e por Doležel et al. (1992), Doležel et al. (1994) e Doležel et al. (1998) para *R. sativus*, *S. lycopersicum*, *G. max*, *Z. mays*, *P. sativum*, *V. faba* e *A. cepa*.

Os valores de DNA obtidos foram comparados com os valores descritos previamente pelos autores citados acima. Para essa finalidade, utilizou-se três métodos fundamentados em técnicas estatísticas multivariadas: (1) Componentes Principais; (2) Agrupamento de Otimização pelo método Tocher + distância Euclidiana média padronizada e (3) Agrupamento UPGMA + distância Euclidiana média padronizada. Os Componentes Principais foram apresentados juntamente com o método de agrupamento Tocher (Figuras 10,12,14 e 16). A Tabela 16 descreve abreviaturas para a lista dos laboratórios utilizados nas análises multivariadas, conforme mencionado no item 3.2.4, acrescido dos resultados encontrados no presente estudo.

A primeira comparação foi realizada com os valores de DNA obtidos e os valores descritos por Doležel et al. (1998). Esses autores obtiveram resultados em quatro laboratórios diferentes, utilizando *P. sativum* e *A. cepa* como padrões primários. Os dados do presente estudo foram apresentados como 5º laboratório (Tabela 17). Por essa razão, calculou-se os valores de DNA para todas as espécies com os mesmos valores de DNA dos padrões de referência primária (*P. sativum* e *A. cepa*) utilizados pelos referidos autores. Esses valores são 9,09 pg de DNA/ 2C (valor determinado previamente no laboratório 2 com padrão leucócitos humanos) para *P. sativum* e 33,5 pg de DNA/2C (Bennett e Leitch 1997) para *A. cepa*. Nessas análises excluiu-se *S. lycopersicum*, uma vez que Doležel et al. (1998) não apresentaram valores para tal espécie. Os valores de DNA descritos por Doležel et al. (1992) também foram utilizados como referência.

Sendo assim, pela associação dos métodos estatísticos 1 e 2, os resultados da primeira comparação demonstraram que os valores de DNA obtidos por cada laboratório foi dividido em cinco grupos: 1 (L1, L1', L4, e L4'); 2

(L3' e L5'); 3 (L3, L5 e L2); 4 (R1) e 5 (L2') (Figura 10). Quando a distância entre os valores de DNA foi apresentada pelo método 3 observou-se que os menos distantes foram aqueles obtidos por L1 e L1'. Os valores que mais distanciaram em relação aos demais foram aqueles obtidos por L2', L5' e L3'. Nota-se que os valores obtidos por L5 apresentou maior proximidade com os valores obtido por L3, e L5' maior proximidade com L3' (Figura 11).

A segunda comparação foi realizada com os valores de DNA obtidos com o padrão primário *A. thaliana* (0,32 pg de DNA/2C, Bennett et al. 2003) e os valores calculados por Doležel et al. (1998) (Tabela 18). Neste caso, analisou-se apenas os valores obtidos pelos quatro laboratórios quando *P. sativum* foi utilizado como padrão de referência primária. Segundo os referidos autores houve menos discrepâncias nos dados calculados com base nesse padrão primário. Observou-se, então, pela associação dos métodos 1 e 2, a formação de três grupos: 1 (L1, L2, L3 e R1); 2 (L4) e 3 (L5-1) (Figura 12). Pelo método 3 observou-se que os valores de DNA obtidos por L5-1 apresentaram-se mais próximos de L3 e mais distante de L4 (Figura 13).

Na terceira comparação utilizou-se os valores de DNA obtidos por Doležel et al. (1998) e os valores obtidos por L5-2 (Tabela 19). Assim como na segunda comparação, observou-se a formação de três grupos pela associação dos métodos 1 e 2: 1 (L2, L3 e R1), 2 (L1 e L4) e 3 (L5-2) (Figura 14). Com o método 3 foi possível observar que os valores de DNA obtidos por L5-2 estão mais próximos daqueles obtidos por L3 e mais distantes de L4. Nota-se ainda que os valores de DNA obtidos por L2 e L3 foram os que apresentaram maior proximidade (Figura 15).

Uma quarta comparação foi realizada com os valores de DNA obtidos quando *A. thaliana*, *R. sativus*, *G. max*, *Z. mays*, *P. sativum* e *A. cepa* foram utilizados como padrão primário. Os valores obtidos por Doležel et al. (1998), com os padrões primários *P. sativum* e *A. cepa* foram novamente comparados (Tabela 20). Evidenciou-se a formação de três grupos pelo método 1 e 2: 1 (L2, L3, L2', L3', L5-1, L5-5, L5-6, L5-7, L5-8 e R1); 2 (L1, L4, L1' e L4') e 3 (L5-3 e L5-4) (Figura 16). Pelo método 3 observou-se que os valores de DNA mais próximos foram aqueles obtidos por L5-1 e L5-5. L5-7, L5-8 e L5-6 formaram uma ligação próxima, porém intermediária aos outros valores. L5-3 e L5-4 foram os que mais distanciaram em relação aos demais (Figura 17).

Tabela 14 – Índice médio da quantidade relativa de DNA estimado para as espécies padrão utilizando-se como referência primária cada uma dessas espécies

Espécies	Padrões primários								
	<i>A. thaliana</i>	<i>D. melanogaster</i>	<i>R. sativus</i>	<i>S. lycopersicum</i>	<i>G. max</i>	<i>Z. mays</i>	<i>P. sativum</i>	<i>V. faba</i>	<i>A. cepa</i>
<i>A. thaliana</i>	1,00	0,82	0,31	0,16	0,13	0,05	0,03	0,01	0,008
<i>D. melanogaster</i>	1,22	1,00	0,38	0,19	0,16	0,07	0,04	0,012	0,009
<i>R. sativus</i>	3,20	2,64	1,00	0,50	0,42	0,18	0,10	0,033	0,025
<i>S. lycopersicum</i>	6,23	5,16	1,96	1,00	0,83	0,35	0,20	0,065	0,05
<i>G. max</i>	7,49	6,20	2,34	1,20	1,00	0,42	0,25	0,08	0,06
<i>Z. mays</i>	17,73	14,68	5,56	2,84	2,37	1,00	0,59	0,19	0,14
<i>P. sativum</i>	30,31	25,07	9,51	4,86	4,05	1,71	1,00	0,32	0,24
<i>V. faba</i>	94,17	77,78	29,59	15,10	12,60	5,31	3,11	1,00	0,76
<i>A. cepa</i>	123,35	101,89	38,67	19,78	16,50	6,96	4,07	1,31	1,00

Tabela 15 – Valores médios da quantidade de DNA 2C em picograma obtidos em seis repetições para as espécies padrão utilizando valores de DNA descritos por diferentes autores para cada padrão primário

Espécies	Padrões primários														
	Bennett et al. (2003)		Doležel et al. (1992)						Doležel et al. (1994)	Doležel et al. (1998)					
	1*	2	3	4	6	7	8	9	5	3	5	6	7	8	9
1- <i>A. thaliana</i>	0,32	0,29	0,34	0,31	0,29	0,27	0,27	0,27	0,32	0,39	0,35	0,31	0,29	0,28	0,27
2- <i>D. melanogaster</i>	0,39	0,36	0,42	0,38	0,40	0,36	0,32	0,33	0,39	0,48	0,42	0,38	0,36	0,34	0,34
3- <i>R. sativus</i>	1,02	0,95	1,11	0,99	1,03	0,91	0,89	0,88	1,05	1,26	1,12	1,00	0,96	0,91	0,89
4- <i>S. lycopersicum</i>	1,99	1,86	2,17	1,96	2,00	1,81	1,75	1,73	2,07	2,47	2,19	1,97	1,88	1,78	1,74
5- <i>G. max</i>	2,39	2,23	2,60	2,35	2,40	2,27	2,15	2,09	2,50	2,96	2,65	2,38	2,25	2,14	2,10
6- <i>Z. mays</i>	5,67	5,28	6,17	5,57	5,72	5,35	5,11	4,98	5,92	7,01	6,28	5,67	5,36	5,09	5,01
7- <i>P. sativum</i>	9,69	9,02	10,55	9,52	9,78	9,07	8,61	8,45	10,12	11,99	10,74	9,69	9,09	8,64	8,49
8- <i>V. faba</i>	30,13	28,0	32,84	29,60	30,37	28,20	26,90	26,42	31,50	37,29	33,40	30,13	28,27	27,00	26,52
9- <i>A. cepa</i>	39,5	36,7	42,92	38,78	39,81	36,91	35,24	34,76	41,25	48,73	43,75	39,47	37,03	35,37	34,89

* Os números referentes aos padrões primários estão de acordo com cada espécie da coluna 1.

Tabela 16 – Abreviatura dos laboratórios, acrescido dos resultados encontrados no presente estudo, de acordo com os padrões primários, utilizados nas análises multivariadas

	Laboratórios	Padrão primário (DNA/2C)
Doležel et al. (1998)	L1	1- <i>P. sativum</i> (9,09)
	L1'	2- <i>A. cepa</i> (33,5)
	L2	1
	L2'	2
	L3	1
	L3'	2
	L4	1
	L4'	2
Doležel et al. (1992)	R1	-
Presente estudo	L5	1- <i>P. sativum</i> (9,09)
	L5'	2- <i>A. cepa</i> (33,5)
	L5-1	<i>A. thaliana</i> (0,32)
	L5-2	<i>D. melanogaster</i> (0,36)
	L5-3	<i>R. sativus</i> (1,26)
	L5-4	<i>G. max</i> (2,65)
	L5-5	<i>Z. mays</i> (5,67)
	L5-6	<i>P. sativum</i> (9,09)
	L5-7	<i>V. faba</i> (27,00)
	L5-8	<i>A. cepa</i> (34,89)

Tabela 17 – Valores de DNA/2C, calculados com base nos padrões primários descritos na tabela 16, obtidos por diferentes laboratórios para sete espécies padrão. Esses valores foram submetidos à primeira análise multivariada.

Laboratórios	Espécies						
	<i>A. thaliana</i>	<i>R. sativus</i>	<i>G. max</i>	<i>Z. mays</i>	<i>P. sativum</i>	<i>V. faba</i>	<i>A. cepa</i>
1	0,43	1,38	2,72	5,81	9,09	26,22	33,71
L2	0,34	1,13	2,44	5,54	9,09	27,75	35,76
L3	0,34	1,08	2,33	5,33	9,09	27,92	37,13
L4	0,43	1,44	3,10	5,98	9,09	26,11	32,97
L1'	0,42	1,37	2,71	5,77	9,03	26,06	33,50
L2'	0,32	1,06	2,29	5,19	8,52	26,00	33,50
L3'	0,31	0,98	2,10	4,81	8,20	25,19	33,50
L4'	0,44	1,46	3,15	6,08	9,24	26,53	33,50
L5	0,29	0,96	2,25	5,36	9,09	28,27	37,03
L5'	0,27	0,86	2,02	4,81	8,16	25,50	33,50
R1	0,32	1,11	2,50	5,72	9,07	26,90	34,76

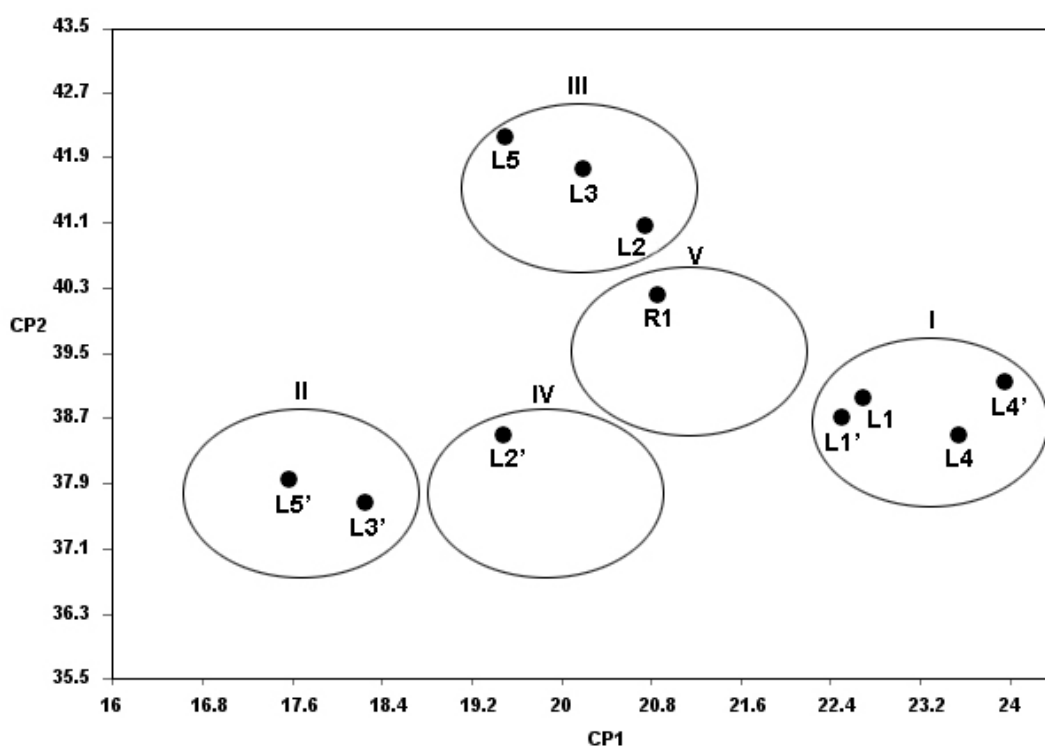


Figura 10 – Dispersão gráfica dos dois primeiros Componentes Principais dos 11 laboratórios avaliados, conforme descrição da tabela 17. Os valores foram agrupados pelo método de Tocher utilizando distância Euclidiana média padronizada.

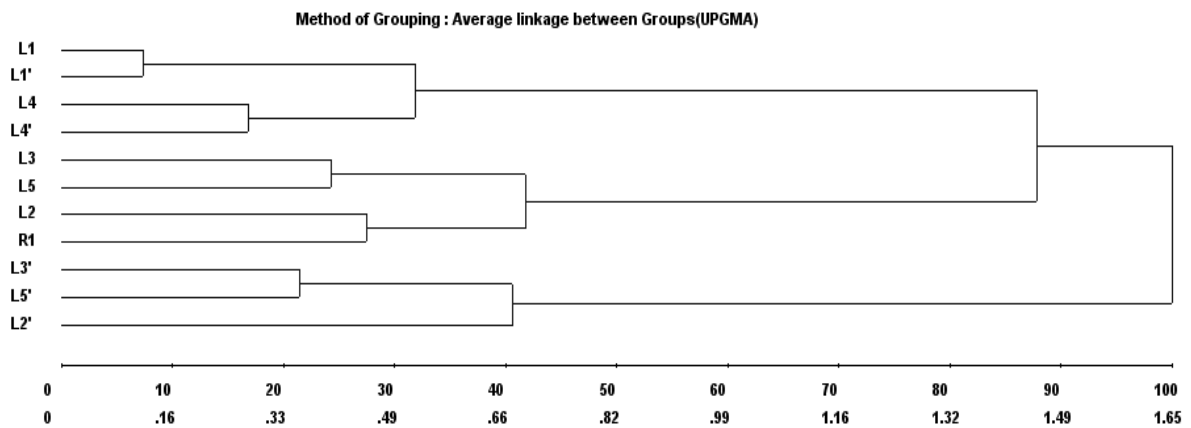


Figura 11 – Dendrograma resultante da análise de 11 laboratórios, conforme descrição da tabela 17, obtido pelo método de agrupamento UPGMA e utilizando a distância Euclidiana média padronizada.

Tabela 18 – Valores de DNA/2C calculados com base nos padrões primários descritos na tabela 16, obtidos por diferentes laboratórios para sete espécies padrão. Esses valores foram submetidos à segunda análise multivariada.

Laboratórios	Espécies						
	<i>A. thaliana</i>	<i>R. sativus</i>	<i>G. max</i>	<i>Z. mays</i>	<i>P. sativum</i>	<i>V. faba</i>	<i>A. cepa</i>
L1	0,43	1,38	2,72	5,81	9,09	26,22	33,71
L2	0,34	1,13	2,44	5,54	9,09	27,75	35,76
L3	0,34	1,08	2,33	5,33	9,09	27,92	37,13
L4	0,43	1,44	3,10	5,98	9,09	26,11	32,97
L5-1	0,32	1,02	2,39	5,67	9,69	30,13	39,5
R1	0,32	1,11	2,50	5,72	9,07	26,90	34,76

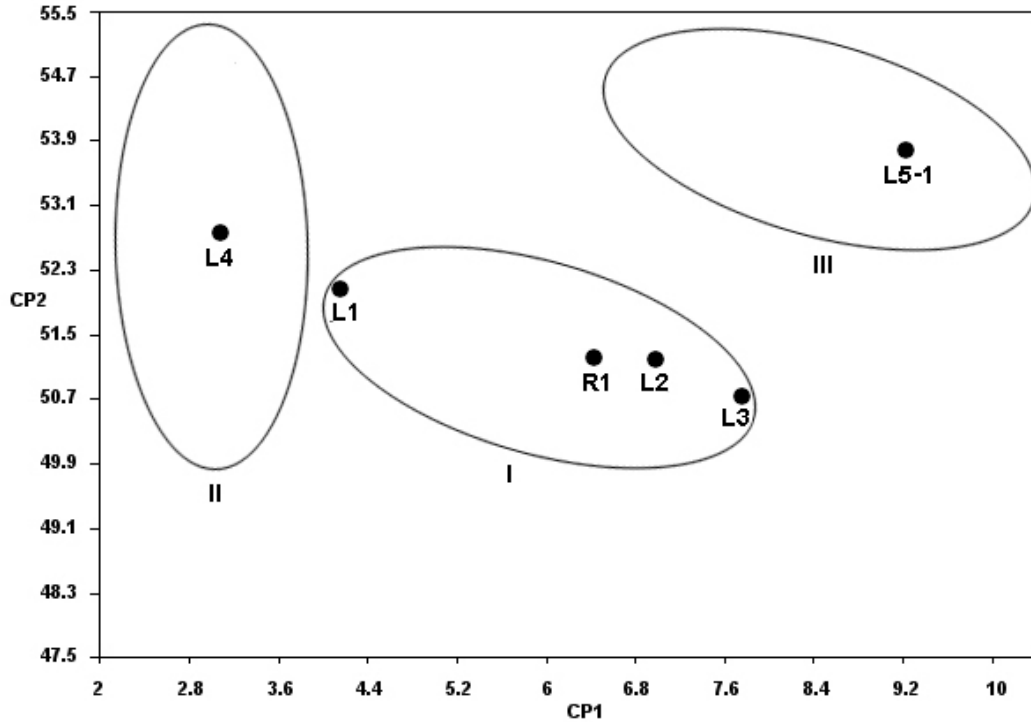


Figura 12 – Dispersão gráfica dos dois primeiros Componentes Principais dos seis laboratórios avaliados, conforme descrição da tabela 18. Os valores foram agrupados pelo método de Tocher utilizando distância Euclidiana média padronizada.

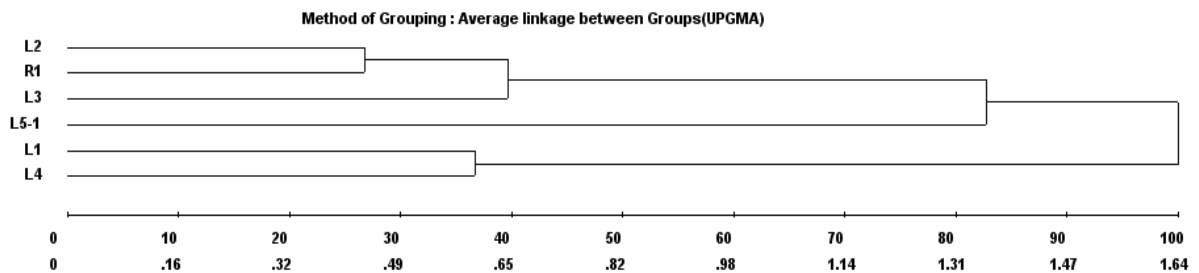


Figura 13 – Dendrograma resultante da análise de seis laboratórios, conforme descrição da tabela 18, obtido pelo método de agrupamento UPGMA e utilizando a distância Euclidiana média padronizada.

Tabela 19 – Valores de DNA/2C calculados com base nos padrões primários descritos na tabela 16, obtidos por diferentes laboratórios para sete espécies padrão. Esses valores foram submetidos à terceira análise multivariada.

Laboratórios	Espécies						
	<i>A. thaliana</i>	<i>R. sativus</i>	<i>G. max</i>	<i>Z. mays</i>	<i>P. sativum</i>	<i>V. faba</i>	<i>A. cepa</i>
L1	0,43	1,38	2,72	5,81	9,09	26,22	33,71
L2	0,34	1,13	2,44	5,54	9,09	27,75	35,76
L3	0,34	1,08	2,33	5,33	9,09	27,92	37,13
L4	0,43	1,44	3,10	5,98	9,09	26,11	32,97
L5-2	0,29	0,95	2,23	5,28	9,02	28,00	36,7
R1	0,32	1,11	2,50	5,72	9,07	26,90	34,76

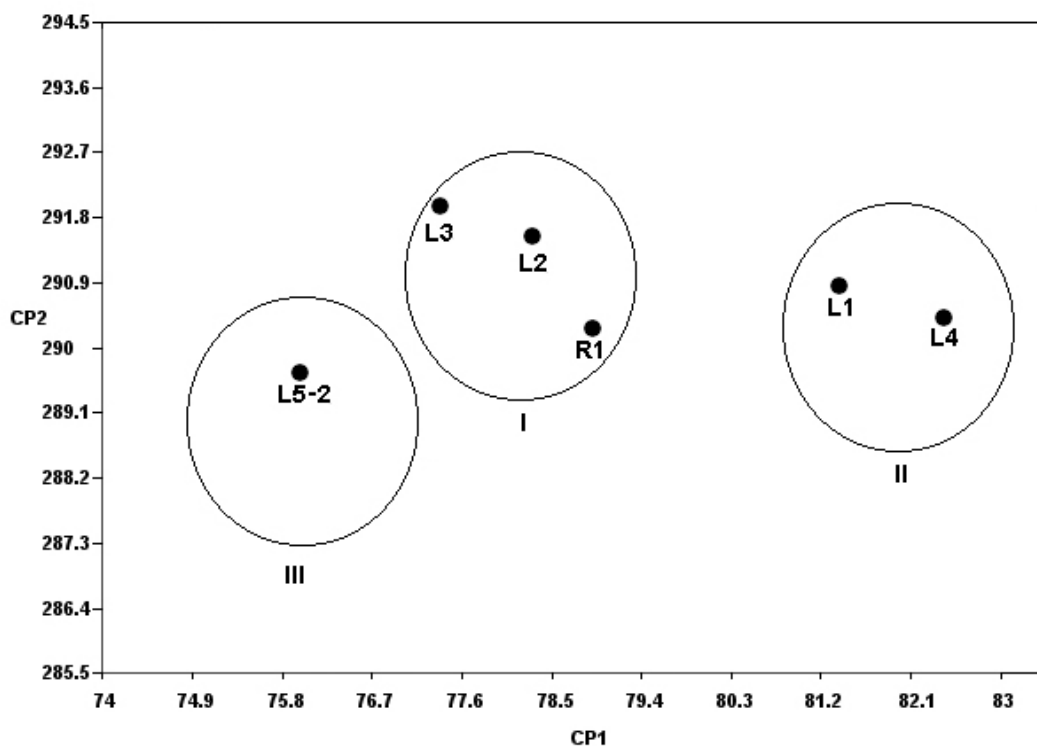


Figura 14 – Dispersão gráfica dos dois primeiros Componentes Principais dos seis laboratórios avaliados, conforme descrição da tabela 19. Os valores foram agrupados pelo método de Tocher utilizando distância Euclidiana média padronizada.

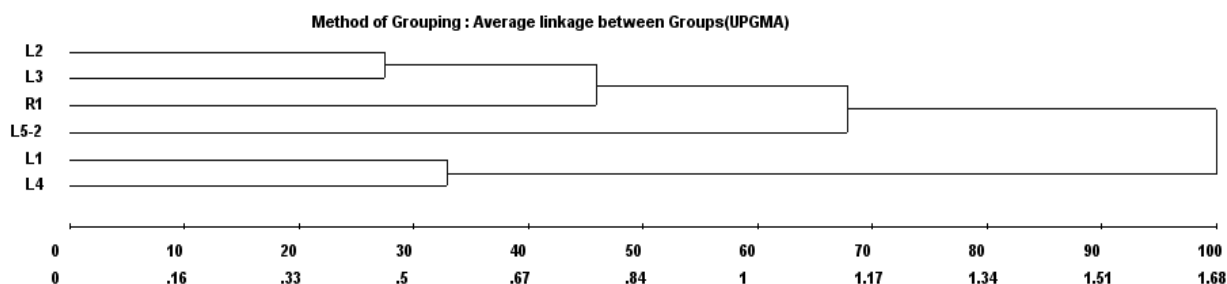


Figura 15 – Dendrograma resultante da análise de seis laboratórios, conforme descrição da tabela 19, obtido pelo método de agrupamento UPGMA e utilizando a distância Euclidiana média padronizada.

Tabela 20 – Valores de DNA/2C calculados com base nos padrões primários descritos na tabela 16, obtidos por diferentes laboratórios para sete espécies padrão. Esses valores foram submetidos à quarta análise multivariada

Laboratórios	Espécies						
	<i>A. thaliana</i>	<i>R. sativus</i>	<i>G. max</i>	<i>Z. mays</i>	<i>P. sativum</i>	<i>V. faba</i>	<i>A. cepa</i>
L1	0,43	1,38	2,72	5,81	9,09	26,22	33,71
L2	0,34	1,13	2,44	5,54	9,09	27,75	35,76
L3	0,34	1,08	2,33	5,33	9,09	27,92	37,13
L4	0,43	1,44	3,10	5,98	9,09	26,11	32,97
L1'	0,42	1,37	2,71	5,77	9,03	26,06	33,50
L2'	0,32	1,06	2,29	5,19	8,52	26,00	33,50
L3'	0,31	0,98	2,10	4,81	8,20	25,19	33,50
L4'	0,44	1,46	3,15	6,08	9,24	26,53	33,50
L5-1	0,32	1,02	2,39	5,67	9,69	30,13	39,5
L5-3	0,39	1,26	2,96	7,01	11,99	37,29	48,73
L5-4	0,35	1,12	2,65	6,28	10,74	33,40	43,75
L5-5	0,31	1,00	2,38	5,67	9,69	30,13	39,47
L5-6	0,29	0,96	2,25	5,36	9,09	28,27	37,03
L5-7	0,28	0,91	2,14	5,09	8,64	27,00	35,37
L5-8	0,27	0,89	2,10	5,01	8,49	26,52	34,89
R1	0,32	1,11	2,50	5,72	9,07	26,90	34,76

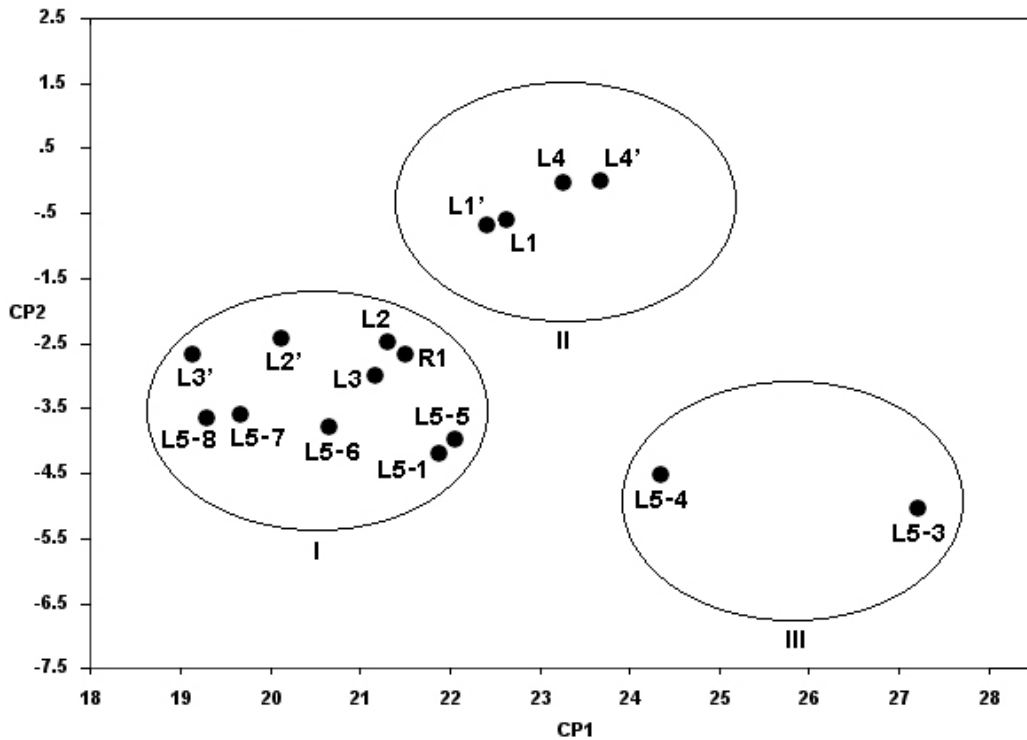


Figura 16 – Dispersão gráfica dos dois primeiros Componentes Principais dos 16 laboratórios avaliados, conforme descrição da tabela 20. Os valores foram agrupados pelo método de Tocher utilizando distância Euclidiana média padronizada.

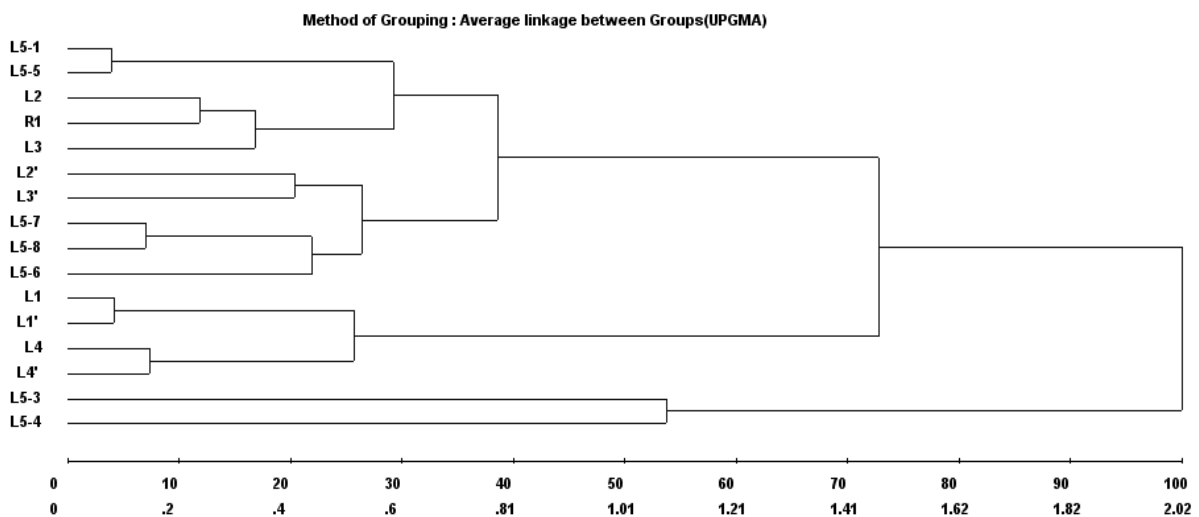


Figura 17 – Dendrograma resultante da análise de 16 laboratórios, conforme descrição da tabela 20, obtido pelo método de agrupamento UPGMA e utilizando a distância Euclidiana média padronizada.

Os valores médios de DNA nuclear obtidos para cada espécie utilizando diferentes padrões primários foram estatisticamente comparados pelo teste de *Dunnett*. O resultado do teste encontra-se na tabela 21. Os valores de DNA mensurados com os padrões primários *D. melanogaster* e *R. sativus* proporcionaram o maior número de diferenças comparando-se com os valores de DNA de referência. Quando se utilizou *D. melanogaster*, apenas *V. faba* e *A. cepa* apresentaram valores estatisticamente iguais aos valores de DNA de referência. Quando *R. sativus* foi utilizado, apenas os valores de *A. thaliana* e *G. max* foram iguais a referência.

Os padrões primários *A. thaliana*, *S. lycopersicum* e *P. sativum* proporcionaram valores de DNA estatisticamente iguais aos valores de referência para a maioria das espécies. Utilizando esses padrões primários apenas os valores de *R. sativus* diferiram estatisticamente. Os resultados evidenciaram também, que as espécies que possuem o conteúdo de DNA mais elevado, como *V. faba* e *A. cepa*, proporcionaram valores de DNA estatisticamente diferentes apenas para *R. sativus* e *G. max*.

Tabela 21 – Resultado do teste de *Dunnett* aplicado às diferentes médias de conteúdo de DNA para as espécies padrão quando cada uma dessas foi utilizada como padrão primário.

Espécies (DNA referência/pg)	Padrões primários								
	1*	2	3	4	5	6	7	8	9
1- <i>A. thaliana</i> (0,32)	-	X							
2- <i>D. melanogaster</i> (0,36)		-	X						
3- <i>R. sativus</i> (1,26)	X [#]	X	-	X		X	X	X	X
4- <i>S. lycopersicum</i> (1,96)		X	X	-		X			
5- <i>G. max</i> (2,65)		X			-			X	X
6- <i>Z. mays</i> (5,67)		X	X			-			
7- <i>P. sativum</i> (9,09)		X	X				-		
8- <i>V. faba</i> (27)			X		X			-	
9- <i>A. cepa</i> (34,89)			X		X				-

* Os números referentes aos padrões primários estão de acordo com cada espécie da coluna 1.

O x representa valores de DNA que diferiram estatisticamente do valor de referência pelo teste de *Dunnett* ($P < 0,05$).

4.2 – Citometria de imagem

As lâminas preparadas com as raízes obtidas das plantas padrão apresentaram núcleos intactos e adequados para análises. A maceração enzimática e a fragmentação dessas raízes pela técnica de dissociação celular com secagem ao ar foram fundamentais para obtenção desses resultados.

A fixação das lâminas em formaldeído 4%, a hidrólise em HCl 5 M por 45 min, a 25 °C, e a coloração citoquímica pela reação de Feulgen por 14 h, a 4 °C, possibilitaram a obtenção dos núcleos estequiometricamente corados (Figuras 18 a 24).

Os núcleos corados e capturados em objetiva de 40 X foram segmentados digitalmente. Dez núcleos em prófase e dez em telófase de cada planta, por lâmina, foram selecionados visualmente e mensurados (Figuras 18 a 24). A densidade óptica integrada (DOI) nuclear foi calculada pelo programa Image Pro-Plus® 6.1. As médias para as duas classes de núcleos foram calculadas como 2C (telófase) e 4C (prófase). As DOIs dos dez núcleos em prófase e telófase foram, então, obtidas e a média foi apresentada nas tabelas 22 a 28.

A partir do conteúdo 2C de DNA das plantas padrões, utilizando valores de referência descritos por Bennett et al. (2003) para *A. thaliana*, Doležel et al. (1992) para *S. lycopersicum* e Doležel et al. (1998) para *R. sativus*, *G. max*, *Z. mays*, *P. sativum*, *V. faba* e *A. cepa*, as unidades de DOI foram convertidas em picogramas de DNA (Tabelas 22 a 28). Nessas análises, *D. melanogaster* não foi utilizada como padrão de referência, uma vez que apresentou resultados discrepantes com relação às plantas analisadas por CF.

Em todas as análises os CVs ficaram abaixo de 4,97% (Tabelas 22 a 28). Nas lâminas com núcleos de *A. thaliana* e *R. sativus* o menor CV obtido foi de 2,2% e o maior 4,7%; nas lâminas com núcleos de *R. sativus* e *S. lycopersicum* o menor CV foi 2,42% e o maior 4,45%; com *S. lycopersicum* e *G. max*, o menor foi 2,31% e o maior 4,97%; *G. max* e *Z. mays*, o menor 2,35% e o maior 4,63%; *Z. mays* e *P. sativum*, o menor 2,83% e o maior 4,86%; *P. sativum* e *V. faba*, o menor 2,11% e o maior 4,53% e *V. faba* e *A. cepa*, o menor 1,67% e o maior 4,85%.

As médias obtidas da razão entre os valores da DOI para os núcleos 4C e 2C em cada lâmina ficou entre 1,99 e 2,36 (Tabelas 22 a 28). As razões entre os valores do conteúdo de DNA das prófases e telófases, obtidas para as plantas que tiveram seu genoma mensurado, apresentaram proporção próxima de 2:1 (Tabelas 22 a 28). Para *R. sativus* a razão prófase/telófase foi de 2,05:1, representando 2,5% a mais no valor de DNA obtido nos núcleos em prófase. Para *S. lycopersicum* a razão foi de 2,04:1 (2% de DNA a mais no valor obtido em prófase). Para *G. max* 2,02:1 (1%); para *Z. mays* 2,01:1 (0,5%); para *P. sativum* 2,04:1 (2%); para *V. faba* 2,07:1 (3,5%) e para *A. cepa* 2,02:1 (1%).

Os conteúdos médios de DNA/2C, em picograma, para todas as espécies mensuradas, foram obtidos dividindo os valores de DNA 4C por dois e em seguida somando o resultado ao valor de DNA 2C, e novamente dividindo por dois (Tabela 29).

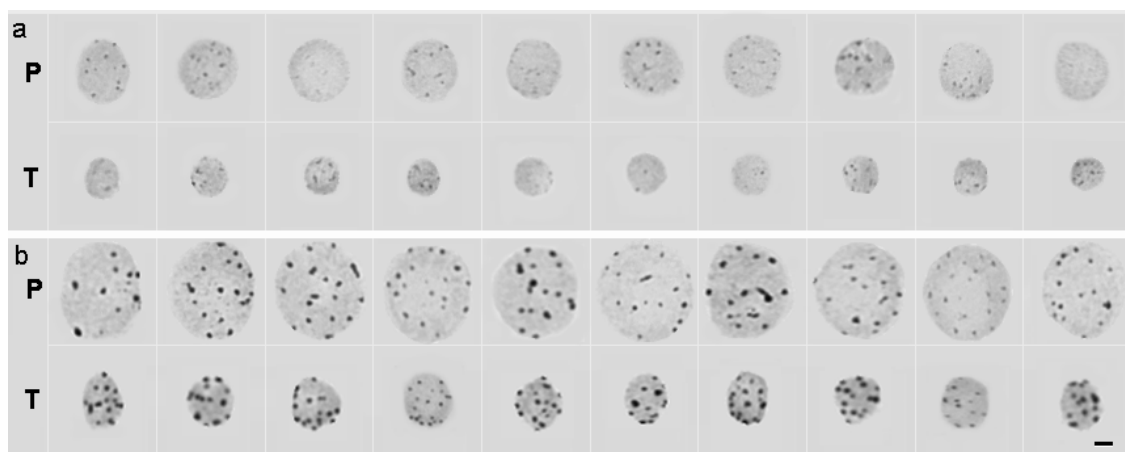


Figura 18 – Núcleos de *A. thaliana* e *R. sativus* obtidos paralelamente em uma mesma lâmina, hidrolisados com HCl 5 M por 45 min e corados por 14 h no reativo de Schiff. (a) *A. thaliana* em prófase (P) e telófase (T) e (b) *R. sativus* em prófase (P) e telófase (T). Barra = 10 μ m.

Tabela 22 – Valores médios de densidade óptica integrada (DOI), coeficiente de variação (CV) e DNA 2C e 4C obtidos por CI referente à figura 18.

Lâmina	<i>A. thaliana</i>				<i>R. sativus</i>			
	Prófase		Telófase		Prófase		Telófase	
	DOI médio	CV(%)	DOI médio	CV(%)	DOI médio	CV(%)	DOI médio	CV(%)
I	41,9	4,7	19,2	3,0	147,4	2,2	66,7	2,8
II	54,6	2,8	26,3	4,5	202,5	2,6	94,3	4,1
III	87,8	2,7	42,8	4,3	307,4	2,2	146,2	3,7
	Médias 4C/2C				Médias 4C/2C			
I		2,18				2,21		
II		2,08				2,15		
III		2,05				2,10		
	DNA/4C	DNA/2C	Razão 4C/2C		DNA/4C	DNA/2C	Razão 4C/2C	
I	0,64	0,32	2,00		2,25	1,11	2,03	
II	0,64	0,32	2,00		2,38	1,15	2,07	
III	0,64	0,32	2,00		2,24	1,09	2,05	
Média	0,64	0,32	2,00		2,29	1,12	2,05	

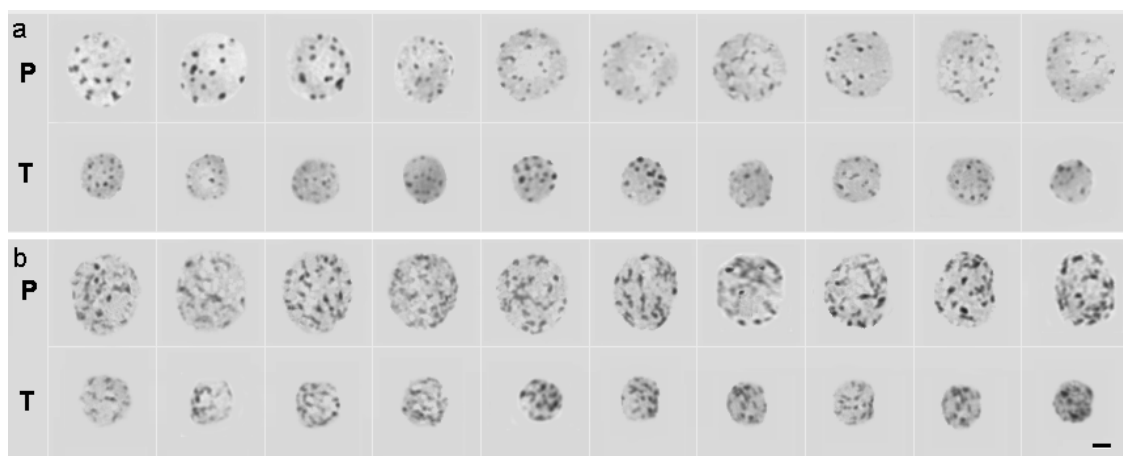


Figura 19 – Núcleos de *R. sativus* e *S. lycopersicum* obtidos paralelamente em uma mesma lâmina, hidrolisados com HCl 5 M por 45 min e corados por 14 h no reativo de Schiff. (a) *R. sativus* em prófase (P) e telófase (T) e (b) *S. lycopersicum* em prófase (P) e telófase (T). Barra = 10 μ m.

Tabela 23 – Valores médios de densidade óptica integrada (DOI), coeficiente de variação (CV) e DNA 2C e 4C obtidos por CI referente à figura 19.

Lâmina	<i>R. sativus</i>				<i>S. lycopersicum</i>			
	Prófase		Telófase		Prófase		Telófase	
	DOI médio	CV(%)	DOI médio	CV(%)	DOI médio	CV(%)	DOI médio	CV(%)
I	77,83	4,45	36,42	3,83	138,75	4,07	63,74	4,29
II	70,74	3,59	31,57	4,42	128,87	2,67	57,98	3,92
III	85,34	3,17	37,90	2,70	148,26	2,42	62,85	3,81
	Médias 4C/2C				Médias 4C/2C			
I		2,14				2,18		
II		2,24				2,22		
III		2,25				2,36		
	DNA/4C	DNA/2C	Razão 4C/2C		DNA/4C	DNA/2C	Razão 4C/2C	
I	2,52	1,26	2,00		4,49	2,21	2,04	
II	2,52	1,26	2,00		4,59	2,31	1,98	
III	2,52	1,26	2,00		4,38	2,09	2,10	
Média	2,52	1,26	2,00		4,49	2,20	2,04	

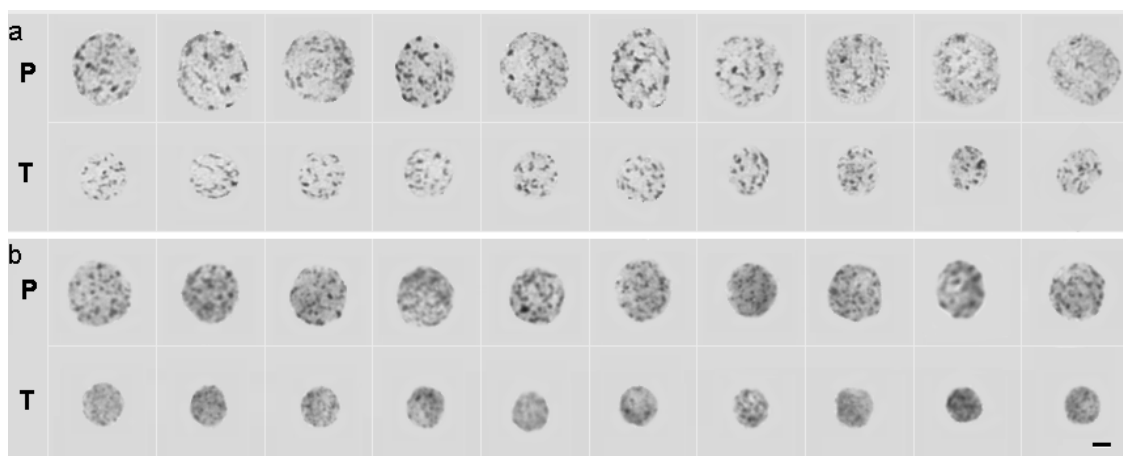


Figura 20 – Núcleos de *S. lycopersicum* e *G. max* obtidos paralelamente em uma mesma lâmina, hidrolisados com HCl 5 M por 45 min e corados por 14 h no reativo de Schiff. (a) *S. lycopersicum* em prófase (P) e telófase (T) e (b) *G. max* em prófase (P) e telófase (T). Barra = 10 μ m.

Tabela 24 – Valores médios de densidade óptica integrada (DOI), coeficiente de variação (CV) e DNA 2C e 4C obtidos por CI referente à figura 20.

Lâmina	<i>S. lycopersicum</i>				<i>G. max</i>			
	Prófase		Telófase		Prófase		Telófase	
	DOI médio	CV(%)	DOI médio	CV(%)	DOI médio	CV(%)	DOI médio	CV(%)
I	76,30	2,53	36,81	4,42	96,85	2,95	46,48	4,39
II	65,13	4,02	29,96	4,75	87,68	2,31	40,10	3,35
III	74,24	2,66	36,52	4,14	91,47	4,52	44,27	4,97
	Médias 4C/2C				Médias 4C/2C			
I		2,07				2,08		
II		2,17				2,19		
III		2,03				2,07		
	DNA/4C	DNA/2C	Razão 4C/2C		DNA/4C	DNA/2C	Razão 4C/2C	
I	3,92	1,96	2,00		4,98	2,47	2,01	
II	3,92	1,96	2,00		5,28	2,62	2,01	
III	3,92	1,96	2,00		4,83	2,38	2,03	
Média	3,92	1,96	2,00		5,03	2,49	2,02	

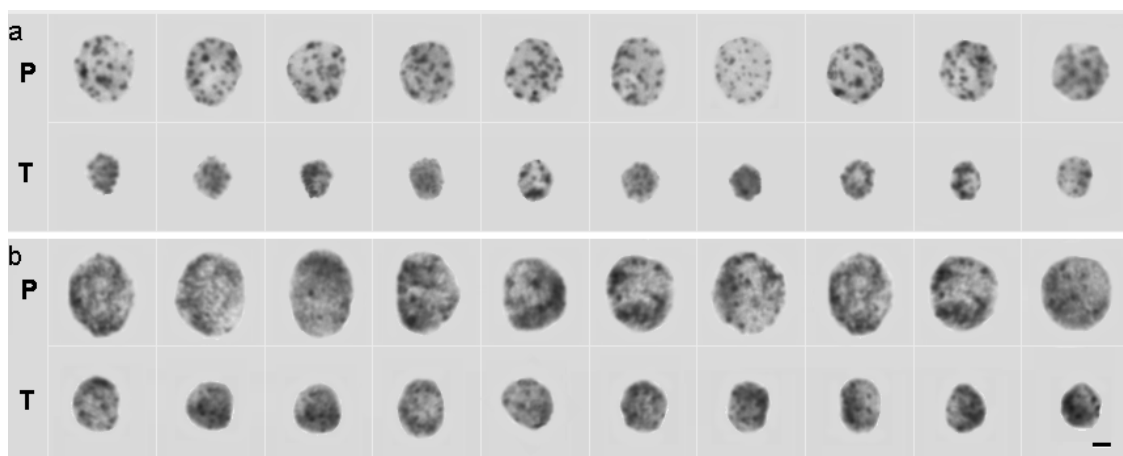


Figura 21 – Núcleos de *G. max* e *Z. mays* obtidos paralelamente em uma mesma lâmina, hidrolisados com HCl 5 M por 45 min e corados por 14 h no reativo de Schiff. (a) *G. max* em prófase (P) e telófase (T) e (b) *Z. mays* em prófase (P) e telófase (T). Barra = 10 μ m.

Tabela 25 – Valores médios de densidade óptica integrada (DOI), coeficiente de variação (CV) e DNA 2C e 4C obtidos por CI referente à figura 21.

Lâmina	<i>G. max</i>				<i>Z. mays</i>			
	Prófase		Telófase		Prófase		Telófase	
	DOI médio	CV(%)	DOI médio	CV(%)	DOI médio	CV(%)	DOI médio	CV(%)
I	88,80	4,63	41,17	3,19	188,28	2,53	86,56	4,14
II	89,86	4,36	41,94	3,17	192,27	2,88	90,10	4,41
III	102,59	3,80	49,10	3,98	219,19	4,46	103,83	2,35
	Médias 4C/2C				Médias 4C/2C			
I		2,16				2,18		
II		2,14				2,13		
III		2,09				2,11		
	DNA/4C	DNA/2C	Razão 4C/2C		DNA/4C	DNA/2C	Razão 4C/2C	
I	5,30	2,65	2,00		11,24	5,57	2,02	
II	5,30	2,65	2,00		11,34	5,69	1,99	
III	5,30	2,65	2,00		11,32	5,60	2,02	
Média	5,30	2,65	2,00		11,30	5,62	2,01	

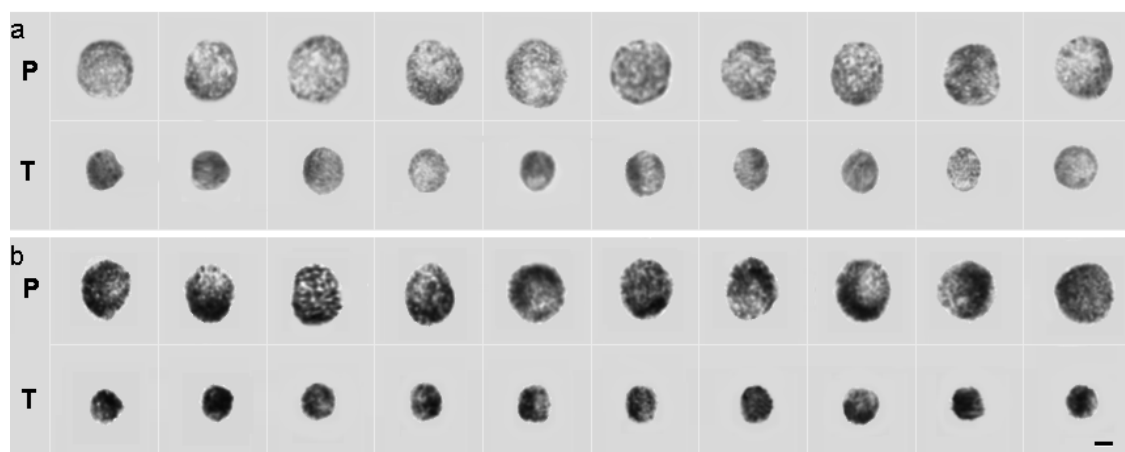


Figura 22 – Núcleos de *Z. mays* e *P. sativum* obtidos paralelamente em uma mesma lâmina, hidrolisados com HCl 5 M por 45 min e corados por 14 h no reativo de Schiff. (a) *Z. mays* em prófase (P) e telófase (T) e (b) *P. sativum* em prófase (P) e telófase (T). Barra = 10 μ m.

Tabela 26 – Valores médios de densidade óptica integrada (DOI), coeficiente de variação (CV) e DNA 2C e 4C obtidos por CI referente à figura 22.

Lâmina	<i>Z. mays</i>				<i>P. sativum</i>			
	Prófase		Telófase		Prófase		Telófase	
	DOI médio	CV(%)	DOI médio	CV(%)	DOI médio	CV(%)	DOI médio	CV(%)
I	108,61	4,34	52,45	4,18	187,48	4,54	86,38	2,93
II	282,95	2,83	133,34	3,19	454,13	3,11	221,11	3,24
III	350,25	3,50	167,55	3,25	591,73	3,04	272,54	4,86
	Médias 4C/2C				Médias 4C/2C			
I	2,07				2,17			
II	2,12				2,05			
III	2,09				2,17			
	DNA/4C	DNA/2C	Razão 4C/2C		DNA/4C	DNA/2C	Razão 4C/2C	
I	11,34	5,67	2,00		19,57	9,34	2,10	
II	11,34	5,67	2,00		18,20	9,40	1,94	
III	11,34	5,67	2,00		19,16	9,22	2,08	
Média	11,34	5,67	2,00		18,98	9,32	2,04	

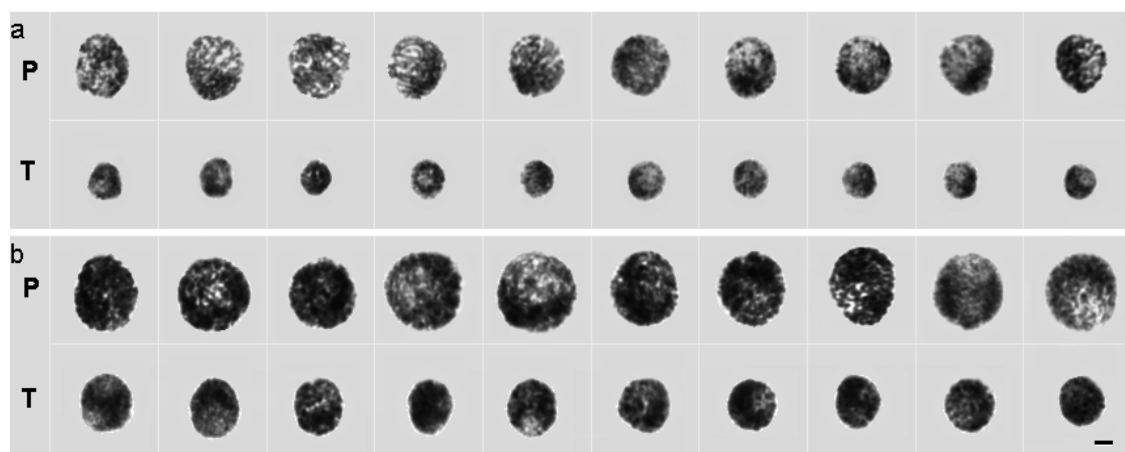


Figura 23 – Núcleos de *P. sativum* e *V. faba* obtidos paralelamente em uma mesma lâmina, hidrolisados com HCl 5 M por 45 min e corados por 14 h no reativo de Schiff. (a) *P. sativum* em prófase (P) e telófase (T) e (b) *V. faba* em prófase (P) e telófase (T). Barra = 10 μ m.

Tabela 27 – Valores médios de densidade óptica integrada (DOI), coeficiente de variação (CV) e DNA 2C e 4C obtidos por CI referente à figura 23.

Lâmina	<i>P. sativum</i>				<i>V. faba</i>			
	Prófase		Telófase		Prófase		Telófase	
	DOI médio	CV(%)	DOI médio	CV(%)	DOI médio	CV(%)	DOI médio	CV(%)
I	164,58	2,11	82,84	3,82	496,46	3,57	233,56	3,30
II	173,54	4,05	83,70	3,63	505,94	2,87	247,24	4,53
III	215,81	4,46	104,94	3,68	671,59	3,26	310,65	3,03
	Médias 4C/2C				Médias 4C/2C			
I		1,99				2,13		
II		2,07				2,05		
III		2,06				2,16		
	DNA/4C	DNA/2C	Razão 4C/2C		DNA/4C	DNA/2C	Razão 4C/2C	
I	18,18	9,09	2,00		54,84	25,63	2,14	
II	18,18	9,09	2,00		53,00	26,85	1,97	
III	18,18	9,09	2,00		56,57	26,91	2,10	
Média	18,18	9,09	2,00		54,80	26,46	2,07	

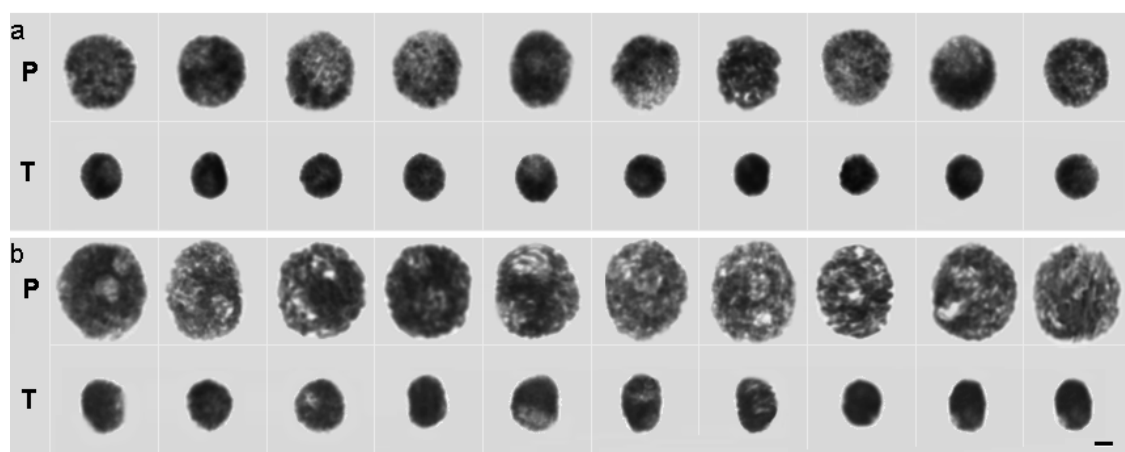


Figura 24 – Núcleos de *V. faba* e *A. cepa* obtidos paralelamente em uma mesma lâmina, hidrolisados com HCl 5 M por 45 min e corados por 14 h no reativo de Schiff. (a) *V. faba* em prófase (P) e telófase (T) e (b) *A. cepa* em prófase (P) e telófase (T). Barra = 10 μ m.

Tabela 28 – Valores médios de densidade óptica integrada (DOI), coeficiente de variação (CV) e DNA 2C e 4C obtidos por CI referente à figura 24.

Lâmina	<i>V. faba</i>				<i>A. cepa</i>			
	Prófase		Telófase		Prófase		Telófase	
	DOI médio	CV(%)	DOI médio	CV(%)	DOI médio	CV(%)	DOI médio	CV(%)
I	493,05	4,31	245,04	4,46	664,38	2,75	324,30	3,49
II	513,85	4,40	250,51	1,67	712,63	4,12	335,40	2,80
III	480,79	2,15	227,69	4,85	634,91	3,53	306,29	2,84
	Médias 4C/2C				Médias 4C/2C			
I	2,01				2,05			
II	2,05				2,12			
III	2,11				2,07			
	DNA/4C	DNA/2C	Razão 4C/2C		DNA/4C	DNA/2C	Razão 4C/2C	
I	54,00	27,00	2,00		72,76	35,73	2,04	
II	54,00	27,00	2,00		74,89	36,15	2,07	
III	54,00	27,00	2,00		71,31	36,32	1,96	
Média	54,00	27,00	2,00		72,97	36,06	2,02	

Tabela 29 – Conteúdo de DNA nuclear obtido de prófases (4C) e telófases (2C) e valor médio de DNA 2C, em picogramas, obtido por citometria de imagem para as espécies padrão.

Padrão (DNA referência)	Amostra	DNA da amostra			
		2C	4C	4C/2	Média 2C + 4C/2
<i>A. thaliana</i> (0,32) [†]	<i>R. sativus</i>	1,12	2,29	1,15	1,13
<i>R. sativus</i> (1,26) [*]	<i>A. thaliana</i>	0,36	0,70	0,35	0,36
<i>R. sativus</i> (1,26) [*]	<i>S. lycopersicum</i>	2,20	4,49	2,25	2,22
<i>S. lycopersicum</i> (1,96) [#]	<i>G. max</i>	2,49	5,03	2,52	2,51
<i>G. max</i> (2,65) [*]	<i>Z. mays</i>	5,62	11,30	5,65	5,64
<i>Z. mays</i> (5,67) [*]	<i>P. sativum</i>	9,32	18,98	9,49	9,41
<i>P. sativum</i> (9,09) [*]	<i>V. faba</i>	26,46	54,80	27,40	26,93
<i>V. faba</i> (27,00) [*]	<i>A. cepa</i>	36,06	72,97	36,49	36,28
<i>A. cepa</i> (34,89) [*]					

Valores de DNA 2C descritos por: [#]Doležel et al. (1992), ^{*}Doležel et al. (1998) e [†]Bennett et al. (2003).

Os valores médios de DNA 2C obtidos por CI para *R. sativus*, *S. lycopersicum*, *G. max*, *Z. mays*, *P. sativum*, *V. faba* e *A. cepa* (Tabela 29) foram estatisticamente comparados com os valores determinados pela CF (Tabela 13). *A. thaliana* foi utilizada como padrão para determinar o valor de DNA da espécie *R. sativus* e não teve seu conteúdo de DNA comparado nesta análise. Sendo assim, utilizou-se a análise de regressão polinomial e observou-se uma estreita relação linear entre os resultados obtidos pelas duas metodologias. Um coeficiente de determinação $R^2 = 99,74\%$ e de correlação $r = 99,8\%$ pôde ser observado (Figura 25).

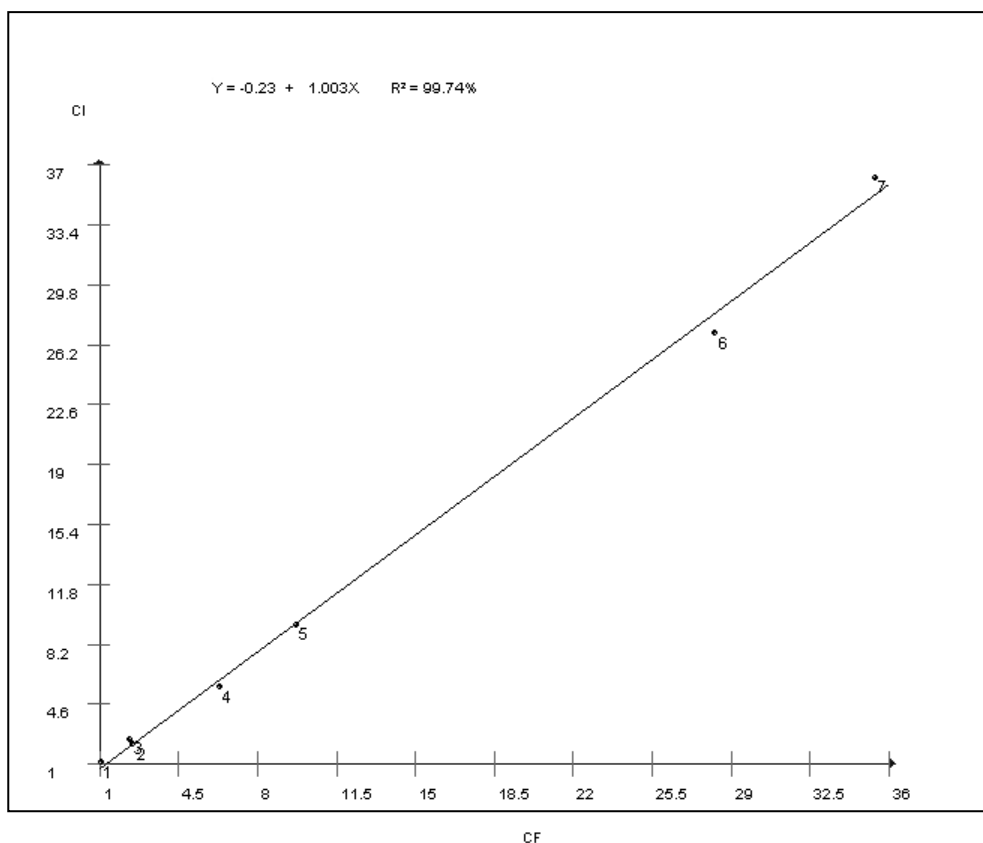


Figura 25 – Relação entre a quantidade de DNA de (1) *R. sativus*, (2) *S. lycopersicum*, (3) *G. max*, (4) *Z. mays*, (5) *P. sativum*, (6) *V. faba* e (7) *A. cepa*, determinada por CF e CI. Os valores foram obtidos das tabelas 13 e 29.

Os valores de conteúdo de DNA nuclear obtidos da comparação entre os pares de espécies padrão, por CI, apresentou forte correlação com os valores obtidos pela CF. Porém, nas análises seguintes, realizadas com os dados da CF, observou-se que os conteúdos de DNA diferiram dos conteúdos descritos previamente na literatura quando diferentes plantas foram empregadas como padrão primário. Realizou-se, então, o teste de *Dunnnett* para determinar qual seria a espécie padrão mais adequada para ser aplicada como padrão primário. Em seguida, testou-se mais uma metodologia, a CI, a fim de confirmar esses dados. Realizou-se, então, o teste de *Dunnnett* com os valores de conteúdo de DNA obtidos pela CI, quando cada planta padrão foi utilizada como padrão primário. Os valores de DNA obtidos de três lâminas para cada espécie foram utilizados e contabilizou-se tanto os valores de DNA dos núcleos profásicos (divididos por dois) quanto os telofásicos, totalizando seis repetições. Os valores médios de DNA nuclear encontram-se na tabela 30 e o resultado do teste encontra-se na tabela 31.

Os valores de DNA mensurados com o padrão primário *R. sativus* proporcionou o maior número de diferenças comparando-se com os valores de DNA de referência. Quando esta espécie foi utilizada, apenas os valores de *A. thaliana* foram iguais.

O padrão primário *G. max* proporcionou valores de DNA estatisticamente iguais aos valores de referência para a maioria das espécies, apresentando diferenças apenas para *R. sativus* e *A. cepa*. As outras espécies utilizadas como padrão primário proporcionaram resultados diferentes para três espécies e iguais para quatro. Analisando as linhas da Tabela 31, nota-se que os valores obtidos com todos os padrões primários foram estatisticamente diferentes dos valores da literatura descrito para *R. sativus*, seguido por *Z. mays*.

A tabela 32 apresenta os valores de DNA obtidos com *A. thaliana* pela CF e CI.

Tabela 30 – Valores médios de DNA 2C, em picograma, obtidos de seis repetições para as espécies padrão quando cada uma dessas foi utilizada como padrão primário.

Espécies (DNA referência/pg)	Padrões primários							
	1*	2	3	4	5	6	7	8
1- <i>A. thaliana</i> (0,32)	0,32	0,31	0,30	0,33	0,33	0,31	0,31	0,31
2- <i>R. sativus</i> (1,26)	1,13	1,26	1,10	1,19	1,19	1,13	1,13	1,13
3- <i>S. lycopersicum</i> (1,96)	1,99	2,22	1,96	2,10	2,10	2,00	2,00	2,00
4- <i>G. max</i> (2,65)	2,54	2,83	2,50	2,65	2,70	2,60	2,60	2,50
5- <i>Z. mays</i> (5,67)	5,40	6,02	5,32	5,64	5,67	5,50	5,50	5,30
6- <i>P. sativum</i> (9,09)	8,96	9,98	8,82	9,35	9,40	9,09	9,10	8,80
7- <i>V. faba</i> (27,00)	26,55	29,57	26,13	27,70	27,85	26,93	27,00	26,00
8- <i>A. cepa</i> (34,89)	35,68	39,73	35,11	37,22	37,42	36,19	36,28	34,89

* Os números referentes aos padrões primários estão de acordo com cada espécie da coluna 1.

Tabela 31 – Resultado do teste de *Dunnnett* aplicado às diferentes médias de conteúdo de DNA obtidas por CI para as espécies padrão quando cada uma dessas foi utilizada como padrão primário.

Espécies (DNA referência/pg)	Padrões primários							
	1*	2	3	4	5	6	7	8
1- <i>A. thaliana</i> (0,32)	-							
2- <i>R. sativus</i> (1,26)	x [#]	-	x	x	x	x	x	x
3- <i>S. lycopersicum</i> (1,96)		x	-		x			
4- <i>G. max</i> (2,65)	x	x	x	-				x
5- <i>Z. mays</i> (5,67)	x	x	x		-	x	x	x
6- <i>P. sativum</i> (9,09)		x				-		
7- <i>V. faba</i> (27,00)		x					-	
8- <i>A. cepa</i> (34,89)		x		x	x	x	x	-

* Os números referentes aos padrões primários estão de acordo com cada espécie da coluna 1.

O x representa valores de DNA que diferiram estatisticamente do valor de referência pelo teste de *Dunnnett* ($P < 0,05$).

Tabela 32 – Conteúdo médio de DNA nuclear obtido por citometria de fluxo (CF) e imagem (CI) para sete espécies padrão, utilizando *A. thaliana* como padrão primário.

Espécies	Conteúdo de DNA				DNA médio (desvio padrão)
	CF	CI			
		Prófase	Telófase	Média	
<i>R. sativus</i>	1,02	1,14	1,12	1,13	1,07 (± 0,077)
<i>S. lycopersicum</i>	1,99	1,97	2,01	1,99	1,99 (± 0,000)
<i>G. max</i>	2,39	2,53	2,55	2,54	2,46 (± 0,106)
<i>Z. mays</i>	5,67	5,39	5,41	5,40	5,53 (± 0,190)
<i>P. sativum</i>	9,69	8,87	9,04	8,96	9,32 (± 0,516)
<i>V. faba</i>	30,13	26,09	27,01	26,55	28,34 (± 2,531)
<i>A. cepa</i>	39,5	35,47	35,88	35,68	37,59 (± 2,701)

5 – DISCUSSÃO

5.1 – Citometria de fluxo

Núcleos em G_0/G_1 de seis repetições, corados com IP, apresentaram picos nos histogramas com CVs variando de 1,07 a 4,46% (Tabelas 3 a 12). Esses resultados demonstram que a metodologia para realização da CF foi adequada e gerou populações nucleares íntegras e em quantidades suficientes para análise. Doležel e Bartoš (2005) relataram que CVs abaixo de 5% são aceitáveis para quantificações de DNA por CF.

Os CVs foram obtidos de suspensões nucleares mantidas em tampão de extração OTTO-I por 10 min e em tampão de coloração OTTO-II por 30 min. O OTTO I é constituído por compostos que facilitam a obtenção de CVs baixos como Tween 20, um detergente não iônico que facilita a liberação e fragmentação da membrana plasmática e o ácido cítrico, utilizado como estabilizador da cromatina (Doležel e Bartoš 2005, Loureiro et al. 2006a). Esses compostos associados ao procedimento de fragmentação das folhas (Galbraith et al. 1983), promoveram suspensões contendo núcleos sem citoplasma, sem fragmentos celulares (Loureiro et al. 2007) e estequiometricamente corados (Doležel e Bartoš 2005). Além disso, o antioxidante ditiotreitol foi incorporado aos tampões de extração e coloração, com objetivo de minimizar a interferência de metabólitos secundários armazenados no vacúolo na acessibilidade do IP ao DNA, e assim contribuir para a obtenção de histogramas com CVs baixos.

Em plantas, os tampões mais usados para CF são Galbraith's (Galbraith et al. 1983), LB01 (Doležel et al. 1992), OTTO (Otto 1990, Doležel e Gohde 1995) e Tris.MgCl₂ (Pfosser et al. 1995). No presente estudo utilizou-se apenas os tampões OTTO em virtude da presença dos componentes mencionados acima. Com a presença do ácido cítrico, a estrutura da cromatina da amostra e do

padrão apresenta-se mais uniforme, minimizando diferenças na intensidade de coloração, resultando em histogramas com baixo CV (Doležel e Bartoš 2005; Loureiro et al. 2006a). Este fato tem sido observado em nossa rotina de laboratório (Carvalho et al. 2008, Rosado et al. 2009) e foi confirmado por essas análises.

Além da constituição dos tampões, o procedimento descrito por Otto (1990) ocorre em duas etapas, com a centrifugação da suspensão nuclear e o descarte do sobrenadante entre elas. Este procedimento diminui a quantidade de fragmentos não nucleares e metabólitos secundários presente na amostra (Noirot et al. 2000).

No presente estudo utilizou-se o fluorocromo intercalante IP. Diferentes corantes não intercalantes, GC ou AT específicos, podem resultar em diferentes valores de medidas do tamanho genômico, dependendo da proporção AT/CG de cada planta. Doležel et al. (1992) demonstraram que o uso de fluorocromos que se ligam preferencialmente às bases AT ou GC podem causar erros de até 100% nas medidas. Estes autores questionaram a confiança desses fluorocromos e recomendaram o uso de corantes intercalantes em quantificações absolutas do conteúdo de DNA. Para Doležel e Bartoš (2005), como a maioria das espécies de plantas não possui a composição de bases conhecida e como o padrão provavelmente não terá a mesma proporção da amostra analisada, não é recomendável o uso dos fluorocromos base-específicos.

O tipo de luz empregada para analisar a fluorescência do DNA corado pode ser outra variante encontrada nos trabalhos que determinam a quantidade de DNA nuclear. No presente trabalho utilizou-se citômetro com fonte à *laser*. Segundo Doležel et al. (1998), comparações entre quatro laboratórios, dois usando fonte à *laser* e dois usando fonte de luz HBO para excitação do IP e DAPI, mostraram diferenças significativas entre ambas as fontes. As estimativas do conteúdo de DNA com citômetros à *laser* foram maiores dos que os obtidos com citômetros com luz HBO ou com os dados obtidos pela CI. Portanto, o uso inadequado da fonte de luz pode causar variações nas leituras dos picos nos histogramas.

Como mostrado na Tabela 1, os conteúdos de DNA dos padrões utilizados neste trabalho tem sido apresentados na literatura com valores distintos. Visto

que as plantas utilizadas são de procedência do mesmo laboratório, no qual também foram feitos trabalhos de quantificação de DNA das mesmas, as referências escolhidas para os cálculos realizados no presente estudo foram as publicadas por Doležel et al. (1992), Doležel et al. (1994) e Doležel et al. (1998).

Nas primeiras análises realizadas observou-se que a quantidade de DNA obtida para os padrões, com exceção de *A. thaliana*, *R. sativus* e *G. max*, foi maior que a quantidade previamente descrita (Tabela 13). Esse fato demonstra que o conteúdo de DNA desses padrões não está calibrado, como mencionado por Bennett e Leitch (2005). Os valores de DNA obtidos deveriam ser iguais aos valores descritos por Doležel et al. (1992) para *S. lycopersicum*, e por Doležel et al. (1998) para *R. sativus*, *G. max*, *Z. mays*, *P. sativum*, *V. faba* e *A. cepa*, uma vez que a variedade é a mesma para todas as espécies utilizadas.

Apesar de serem padrões que possuem o DNA seqüenciado, as comparações realizadas entre *A. thaliana* e *D. melanogaster* também apresentaram valores diferentes dos previamente descritos. De acordo com Johnston et al. (1999), as diferenças estruturais entre células vegetais e animais fazem dessas uma comparação inapropriada, pois podem demonstrar diferenças na permeabilidade ao corante. Doležel e Bartoš (2005) também mencionaram que os valores estimados por CF são mais acurados quando a estrutura da cromatina da amostra e do padrão é similar, pois reagem uniformemente aos fatores que interferem na acessibilidade do corante ao DNA.

Ao comparar o conteúdo de DNA calculado quando cada espécie foi aplicada como um padrão primário, observou-se que não existiu concordância entre os resultados e os valores descritos previamente (Tabela 15). De acordo com Doležel e Bartoš (2005), os diferentes padrões primários utilizados podem levar a essa fonte de variação. Os valores de referência foram obtidos por Doležel et al. (1992) e Doležel et al. (1998), que utilizaram leucócitos humanos como padrão primário. Ao determinar o conteúdo de DNA das plantas padrões o genoma humano ainda não havia sido completamente seqüenciado e, dessa forma, os autores podem ter utilizado valores subestimados para a quantificação. Na pesquisa realizada por Doležel et al. (1998), os leucócitos humanos foram utilizados para calibrar *P. sativum*, que foi diretamente utilizada para calibrar todas

as outras espécies padrão. Além disso, os autores utilizaram também *A. cepa* como padrão primário, para comparação.

Os valores de conteúdo de DNA observados no presente estudo não foram os mesmos daqueles obtidos por Doležel et al. (1992) e Doležel et al. (1998). Sendo assim, para saber a proximidade dos valores encontrados e os obtidos pelos referidos autores, realizou-se uma análise multivariada. Essas comparações foram obtidas por meio do método de Componentes Principais, agrupamento de otimização pelo método Tocher com distância Euclidiana média padronizada e agrupamento UPGMA também com distância Euclidiana média padronizada. Segundo Godinho et al. (2006), o objetivo principal da análise de componentes principais é a obtenção de um pequeno número de combinações lineares (componentes principais) de um conjunto de variáveis, que retenham o máximo possível da informação contida nas variáveis originais. Já os métodos de agrupamento têm por finalidade separar um grupo original de observações em vários subgrupos, de forma a obter homogeneidade dentro e heterogeneidade entre os subgrupos (Bertan et al. 2006).

Na primeira comparação, realizada conforme a tabela 17, observou-se que os valores de conteúdo de DNA que formaram o grupo 1 (Figura 10), foram obtidos pelos laboratórios de Doležel et al. (1998) que fizeram análises em citômetros de fluxo com fonte à *laser*. Além disso, L1 e L1' utilizaram padrões primários diferentes (*P. sativum* ou *A. cepa*), porém o mesmo tampão, Mg²⁺ descrito por Galbraith et al. (1983), para o isolamento de núcleos. O mesmo foi observado para L4 e L4', porém utilizaram o tampão LB01 descrito por Doležel et al. (1989). Dentre esses quatro laboratórios, observou-se que os dados mais próximos foram obtidos por L1 e L1' (Figura 11), demonstrando que o tampão utilizado pode ser um fator determinante para semelhanças entre diferentes análises.

O grupo 2 foi formado com os dados obtidos por L3' de Doležel et al. (1998) e os dados obtidos por L5', do presente estudo. Além de aplicar o mesmo padrão primário, os dois laboratórios realizaram o procedimento de extração e coloração dos núcleos em dois passos. Porém, L3' utilizou o procedimento descrito por Baranyi e Greilhuber (1996), que não envolve a centrifugação entre as duas etapas. O grupo 3 foi formado pelos dados obtidos por L2, L3 e L5, que

foram agrupados, possivelmente, em virtude do mesmo padrão primário, *P. sativum*. No entanto, a fonte de luz do citômetro de fluxo foi diferente para o L5, assim como os tampões utilizados pelos três laboratórios. Pelo método UPGMA, nota-se uma aproximação maior entre L3 e L5, provavelmente pelo emprego da metodologia em dois passos para obtenção da suspensão nuclear. O grupo 4 foi formado pelos valores de DNA obtidos por Doležel et al. (1992), que utilizaram leucócitos humanos como padrão de referência primária. O grupo 5 foi formado por valores obtidos por L2', de Doležel et al. (1998). Pelo agrupamento UPGMA (Figura 11), observou-se que esses dados foram os que mais distanciaram em relação aos demais. Alguns fatores podem ter causado esse distanciamento, como utilização de *A. cepa* como padrão primário e leitura realizada em citômetro de fluxo com lâmpada de mercúrio. Doležel et al. (1998) relataram que os valores obtidos com o padrão *A. cepa* causaram diferenças de até 50% entre os dados obtidos por todos os laboratórios. Além disso, como mencionado anteriormente, observou-se diferenças de até 16% nos dados obtidos com citômetros de fluxo com fonte à *laser* e com luz HBO.

Na segunda comparação, os valores obtidos por L5-1 foi agrupado separadamente dos demais, assim como L4 (Figura 12). Notou-se, pelos agrupamentos Tocher e UPGMA (Figuras 12 e 13) que esses dois laboratórios ficaram distantes um do outro. De acordo com Bennett e Leitch (2005), *A. thaliana* seria um bom padrão primário para calibrar as espécies vegetais utilizadas como padrão em análises citométricas. Essa espécie possui o DNA seqüenciado e calibrado com outra espécie que também possui o DNA totalmente seqüenciado, *Caenorhabditis elegans* (Bennett et al. 2003). Por esse motivo, os valores obtidos por L5-1 podem ter sido separados dos demais. Já o L4, pode ter sido separado por ter realizado as análises utilizando tampão de isolamento nuclear LB01.

O método UPGMA indicou que os valores de DNA obtidos por L5-1 se aproximaram mais dos valores obtidos por L3 e distanciaram dos valores obtidos por L4. A metodologia de extração e coloração nuclear realizada em dois passos pode ter determinado uma semelhança entre diferentes análises e os diferentes tampões podem ter causado diferenças.

A terceira comparação foi semelhante à segunda, porém o L5 utilizou *D. melanogaster* como padrão primário, sendo caracterizado como L5-2. Os

laboratórios de Doležel et al. (1998) que realizaram análises em citômetro com fonte de luz HBO apresentaram valores de DNA mais próximos, formando um grupo com os valores obtidos por Doležel et al. (1992) (Figura 14). Os valores obtidos pela análise em citômetro com fonte à *laser* formaram outro agrupamento (Figura 14). Separadamente dos outros laboratórios, o L5-2 formou um grupo, que se apresentou mais próximo de L3 e mais distante de L4 (Figura 15). Esse resultado foi semelhante ao obtido na análise anterior. No entanto, de acordo com Doležel et al. (2007), núcleos de células animais não são adequados para análises de células vegetais e por isso os resultados obtidos podem não ser compatíveis.

A quarta comparação envolveu os resultados obtidos com todas as espécies de plantas que foram utilizadas como padrão primário e os laboratórios de Doležel et al. (1998), além do valor de referência de Doležel et al. (1992) (Tabela 20). No grupo 1 de Tocher (Figura 16), observou-se que L2, L3, L2', L3', que utilizaram citômetro com fonte de luz HBO nas análises, formaram um agrupamento com L5-1, L5-5, L5-6, L5-7, L5-8, que utilizaram citômetro com fonte à *laser*, e com R1. Neste caso, além da fonte de luz do citômetro ter sido diferente, os tampões e os padrões primários utilizados também diferiram. No entanto, pelo método UPGMA, observou-se que os laboratórios 5 apresentaram maior aproximação entre si do que com os referidos laboratórios de Doležel et al. (1998). Dessa forma, evidenciou-se uma maior uniformidade entre os valores de DNA obtidos quando o mesmo tampão e a mesma fonte para o citômetro de fluxo foram utilizados.

No grupo 2, da quarta análise, observou-se uma formação semelhante ao grupo 1 da primeira análise e apresentando o mesmo perfil pelo método UPGMA (Figuras 16 e 17). O grupo 3 foi formado pelos dados obtidos com os padrões primários *R. sativus* e *G. max*. Esses valores foram os que mais distanciaram dos demais (Figura 17), no entanto, foram obtidos de análises semelhantes aos outros padrões. De acordo com Doležel et al. (2007), existe uma necessidade de reduzir o número de padrões utilizados em análises citométricas, para minimizar diferenças nas quantificações de DNA. Sendo assim, *R. sativus* e *G. max* poderiam ser candidatos a exclusão, uma vez que os valores de DNA obtidos com esses dois padrões apresentaram-se mais distantes dos demais. Uma das causas

desse distanciamento poderia ser uma real diferença entre a estrutura genômica das espécies comparadas com esses padrões.

Nestas quatro comparações realizadas, observou-se que as variações nos conteúdos de DNA obtidos pelos laboratórios foram decorrentes das diferentes metodologias utilizadas por cada um. Este fato também foi observado por Greilhuber (2005). Este autor relatou que aspectos metodológicos dificultam a comparação de dados obtidos em diferentes estudos. Por esse motivo, na presente pesquisa, reuniu-se alguns dados observados em trabalhos de quantificação de DNA que ajudaram a minimizar diferenças e erros estequiométricos. Dentre esses, centrifugar a suspensão nuclear e descartar o sobrenadante (Cros et al. 1994; Doležel e Bartoš 2005); adicionar compostos antioxidante aos tampões (Prince et al. 2000, Doležel e Bartoš 2005), manter todas as plantas em um mesmo ambiente e condições de crescimento (Noirot et al. 2005), realizar repetições (Doležel e Bartoš 2005) e em períodos diferentes (Bennett et al. 2007). Além disso, todas as etapas foram realizadas por um mesmo pesquisador.

Levando em consideração apenas os dados obtidos pelo laboratório 5, em virtude dos aspectos metodológicos citados acima, realizou-se comparações entre as médias de conteúdo de DNA pelo teste de *Dunnnett*. Mais uma vez observou-se que *R. sativus* e também *D. melanogaster* proporcionaram o maior número de diferenças comparando-se com os valores de referência (Tabela 21). Segundo Doležel et al. (2007), *R. sativus* é utilizado em apenas 1,6% das análises que envolvem quantificações genômicas. O conteúdo de DNA baixo, 1,26 pg (Doležel et al. 1998), pode ser uma das causas dessa planta ser pouco utilizada como padrão. As espécies que possuem DNA intermediário, como *P. sativum* e *Hordeum vulgare* têm preferência nas análises, com 15% e 12,7% de utilização, respectivamente (Doležel e Bartoš 2005, Loureiro et al. 2006a). Os valores obtidos com *D. melanogaster* podem não ser confiáveis, uma vez que núcleos animais não são bons padrões para plantas (Johnston et al. 1999).

As espécies que tiveram seu conteúdo de DNA calibrado com *A. thaliana*, *S. lycopersicum* e *P. sativum*, mostraram valores estatisticamente iguais aos valores de referência, com exceção de *R. sativus* (Tabela 21). Sendo assim, esses novos valores obtidos, principalmente com *A. thaliana*, espécie que teve

seu DNA seqüenciado, poderiam formar um grupo de “*Gold standard*” para plantas, como idealizado por Bennett e Leitch (2005).

5.2 – Citometria de imagem

A complexidade da CI requer um rigoroso controle de qualidade em todos os passos do processamento da amostra a ser analisada (Puech e Giroud 1999). Um aspecto relevante nesta metodologia foi a utilização do padrão interno, com o processamento das raízes em conjunto em uma mesma lâmina. Além disso, o Reativo de Schiff não foi utilizado após 30 dias do preparo, sendo usado somente uma vez em cada análise, como recomendado por Hardie et al. (2002). Os tecidos empregados na preparação das lâminas foram os meristemas radiculares. Núcleos de tecidos similares e do mesmo estágio de desenvolvimento são necessários na análise, para que pequenas diferenças no conteúdo de DNA possam ser detectadas com acurácia (Price e Johnston 1996).

A adequação das metodologias, assim como a coloração homogênea dos núcleos e a calibração dos equipamentos de microscopia possibilitaram o processamento das imagens digitais no programa de análise de imagem com CVs abaixo de 4,97% (Tabelas 22 a 28). Haroske et al. (2001) considera o CV abaixo de 5% aceitável para esse tipo de análise.

Além do CV, a razão 4C/2C obtida pelo conteúdo de DNA de prófases e telófases também foi utilizada como controle de qualidade das preparações nucleares. Observou-se que em todas as análises essa razão ficou entre o valor recomendado por Böcking e Nguyen (2004) (Tabelas 22 a 28). Segundo esses autores o valor ideal seria 2, mais ou menos 10%, para a razão 4C/2C de cada espécie. Tais proporções demonstram a linearidade dos dados dentro de cada padrão. Hardie et al. (2002) afirmaram que algumas variações entre os núcleos são esperadas. Estas inconstâncias são baseadas em diferenças de coloração, orientação e condições do *background* local. De acordo com Price (1988), um fator que pode influenciar as medidas de telófases e prófases são as diferentes densidades que o núcleo pode apresentar, principalmente quando há maior quantidade de heterocromatina. Duijndam e Duijn (1975), analisando a influência da compactação da cromatina na coloração pela reação de Feulgen, concluíram

que quanto maior a compactação, menor a intensidade da coloração com o mesmo tempo de hidrólise.

Diferenças entre a heterocromatina das plantas padrões podem ser visualizadas nas Figuras 18 a 24. De acordo com Price e Johnston (1996), o grau de compactação da cromatina interfere na formação de grupos aldeídos, conseqüência da proporção diferencial de depurinação entre a cromatina condensada e descondensada durante a hidrólise. Hardie et al. (2002) afirmaram que diferenças no nível de compactação do DNA podem ser um obstáculos na comparação entre núcleos do padrão com a amostra.

Os valores de DNA obtidos pela CI e CF apresentaram uma forte associação linear. O coeficiente de determinação $R^2 = 99,74\%$ evidenciou que as duas metodologias são complementares. Diferentes estudos têm demonstrado que os resultados obtidos por ambas as metodologias são comparáveis (Greilhuber 2005). Galbraith et al. (1983) relataram que os valores da quantidade de DNA em plantas, obtidos em seu laboratório por meio da CF, correlacionaram com os valores da literatura determinados pela CI. Doležel et al. (1998) e Vilhar et al. (2001) também relataram que existe uma alta correlação entre os valores obtidos pela CF e CI. Outro estudo, realizado no mesmo laboratório do presente trabalho por Rosado et al. (2009), demonstraram que os conteúdos de DNA obtidos pelas CF e CI em milho foram equivalentes, e detectaram pequenas variações nos genomas portadores de cromossomos B.

Outros trabalhos foram publicados com as CF e CI para análise do conteúdo de DNA em plantas (Greilhuber e Obermayer 1999, Temsch e Greilhuber 2000). As técnicas também foram confrontadas por Michaelson et al. (1991), Barany e Greilhuber (1995) e Johnston et al. (1999), cujos resultados confirmaram o tamanho equivalente do genoma por ambas as técnicas.

Os dados obtidos pela CI foram utilizados com o propósito de apoiar os resultados das análises realizadas com os dados da CF. Doležel et al. (1998) obtiveram valores de DNA por CI das mesmas plantas analisadas no presente estudo, porém utilizaram essa metodologia apenas para obter o grau de correlação com os dados da CF. Os valores descritos e publicados por esses autores foram obtidos apenas pela CF.

O teste de *Dunnett*, aplicado aos dados da CI, confirmaram que a espécie *R. sativus* não é um bom padrão primário, uma vez que proporcionou o maior número de diferenças comparando-se com os valores de DNA de referência (Tabela 31). Nas análises por CF, tanto *R. sativus* quanto *D. melanogaster* apresentaram resultados semelhantes, sendo considerados os padrões primários inferiores. Nas análises por CI, *D. melanogaster* não foi utilizada, pois, como discutido na CF, padrões animais não são confiáveis para mensuramento de DNA de plantas (Johnston et al.1999).

Ao contrário do observado na CF, a espécie *G. max* proporcionou o maior número de valores de DNA iguais aos valores de referência quando utilizado como padrão primário. Com esta espécie apenas *R. sativus* e *A. cepa* apresentaram valores estatisticamente diferentes. As outras espécies utilizadas como padrões primários, com exceção de *R. sativus*, proporcionaram valores de DNA iguais para quatro espécies e diferentes para três (Tabela 31). Na CF, *A. thaliana*, *S. lycopersicum* e *P. sativum* foram as espécies que apresentaram menos diferenças, apenas uma, quando foram utilizadas como padrão primário (Tabela 21). Na CI, os referidos padrões primários proporcionaram três valores de DNA diferentes. Essas espécies apresentaram os valores de DNA semelhantes aos valores obtidos com a espécie mais utilizada em análises citométricas, *P. sativum*, segundo Doležel et al. (2007).

Para determinar quais padrões primários seriam mais apropriados, novamente utilizou-se o critério de ter uma espécie que possui o genoma seqüenciado. Dessa forma, considerou-se os valores de DNA calibrados com *A. thaliana* como sendo os valores revisados por CI para as espécies padrão. Esses valores são 1,13 pg de DNA 2C para *R. sativus*; 1,99 para *S. lycopersicum*; 2,54 para *G. max*; 5,40 para *Z. mays*; 8,96 para *P. sativum*; 26,55 para *V. faba* e 35,68 para *A. cepa*.

Como a CI foi utilizada para complementar os resultados da CF, os valores de DNA revisados para as espécies padrão podem ser descritos como a média dos valores obtidos pela CF e CI, com *A. thaliana* como padrão primário. Esses valores podem ser visualizados na tabela 32.

6 – CONCLUSÕES

A metodologia aplicada nas técnicas de CF e CI gerou núcleos adequados para análise. A qualidade das suspensões nucleares e das lâminas foi demonstrada pelos CVs abaixo de 4,46% e 4,97%, respectivamente. Além disso, na CI, observou-se que em todas as análises a razão entre os valores de DNA de prófases e telófases ficou entre o valor ideal, que seria $2 \pm 10\%$. Essas proporções demonstraram a linearidade dos dados dentro de cada padrão utilizado.

Em virtude das diferentes metodologias utilizadas por diferentes autores, os valores de conteúdo de DNA obtidos pela CF foram discrepantes dos valores descritos previamente. No presente estudo, porém, utilizou-se recursos para minimizar essas diferenças e possíveis erros estequiométricos como: centrifugar a suspensão nuclear e descartar o sobrenadante, adicionar compostos antioxidante aos tampões, manter todas as plantas em um mesmo ambiente e condições de crescimento, realizar repetições em períodos diferentes.

As espécies padrão aqui analisadas proporcionaram diferentes valores de DNA quando foram utilizadas como referência primária de calibração. Observou-se que *R. sativus* e também *D. melanogaster* proporcionaram o maior número de diferenças comparando-se com os valores de referência. Esses dados foram confirmados pelos dados obtidos na CI. Neste caso, apenas *R. sativus* foi comparado, uma vez que os padrões de células animais foram considerados, em consenso por diferentes autores, inadequados para comparações com células vegetais.

As espécies que tiveram seu conteúdo de DNA calibrado com *A. thaliana*, *S. lycopersicum* e *P. sativum*, mostraram a maioria dos valores obtidos na CF estatisticamente iguais aos valores de referência. Na CI, a espécie que apresentou menor diferença foi *G. max*. As outras espécies apresentaram o mesmo número de diferenças. Esses dados confirmaram o perfil das três

referidas espécies analisadas na CF. Sendo assim, os valores de DNA obtidos com *A. thaliana* foram considerados como valor revisado para as espécies padrão, uma vez que é a única espécie dentre os melhores padrões que possui o DNA seqüenciado. Esses novos valores foram definidos como a média entre os resultados obtidos pela CF e CI.

Portanto, os resultados do presente estudo sugerem que os valores de DNA, em picograma, para *R. sativus*, *S. lycopersicum*, *G. max*, *Z. mays*, *P. sativum*, *V. faba* e *A. cepa* podem ser 1,07 (\pm 0,077); 1,99 (\pm 0,000); 2,46 (\pm 0,106); 5,53 (\pm 0,190); 9,32 (\pm 0,516); 28,34 (\pm 2,531) e 37,59 (\pm 2,701), respectivamente.

7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abreu IS, Carvalho CR, Clarindo WR. Chromosomal DNA content of sweet pepper determined by association of cytogenetic and cytometric tools. *Plant Cell Rep.* 27: 1227–1233, 2008.
- Adams MD, Celniker SE, Holt RA, Evans CA, Gocayne JD, Amanatides PG, Scherer SE, et al. The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* 287:2185-95, 2000.
- Arabidopsis Genome Initiative. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408:796-815, 2000.
- Arumuganathan K; Earle ED. Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant Mol. Biol. Rep.* 9: 208-218, 1991.
- Azmi A, Noin M, Landré P, Prouteau M, Boudet AM, Chriqui D. High frequency plant regeneration from *Eucalyptus globulus* Labill. hypocotyls: Ontogenesis and ploidy level of the regenerants. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 51: 9-16, 1997.
- Baranyi M, Grailhuber J. Flow cytometric and Feulgen densitometric analysis of genome size in *Pisum*. *Theor. Appl. Genet.* 92:297-307, 1996.
- Baranyi M, Greilhuber J. Flow cytometric analysis of genome size variation in cultivated and wild *Pisum sativum* (Fabaceae). *Plant Syst. Evol.* 194: 231-239, 1995.

- Bennett MD, Smith JB. Nuclear DNA amounts in angiosperms. *Phil. Trans. Royal Soc. Lond. B* 274:228-274, 1976.
- Bennett MD, Leitch IJ. Nuclear DNA amounts in angiosperms. *Ann. Bot.* 76: 113-176, 1995.
- Bennett MD, Leitch IJ, Price HJ, Johnston JS. Comparison with *Caenorhabditis* (~100 Mb) and *Drosophila* (~175 Mb) using flow cytometry show genome size in *Arabidopsis* to be ~157 Mb and thus ~25% larger than the *Arabidopsis* Genome Initiative estimate of ~125 Mb. *Ann. Bot.* 91: 547-557, 2003.
- Bennett MD, Leitch IJ. Plant genome size research: A field in focus. *Ann. Bot.* 95: 1-6, 2005.
- Bennett MD, Price HJ, Johnston S. Anthocyanin inhibits propidium iodide DNA fluorescence in *Euphorbia pulcherrima*: implications for genome size variation and flow cytometry. *Ann. Bot.* 101:1-14, 2007.
- Bertan I, Carvalho FIF, Oliveira AC, Vieira EA, Hartwig I, Silva JAG, Shimidt DAM, Valério IP, Busato CC, Ribeiro G. Comparação de métodos de agrupamentos na representação da distância morfológica entre genótipos de trigo. *R. Bras. Agrociência* 12: 279-286, 2006.
- Bocking A, Giroud F, Reith A. Consensus report of ESACP task force on standardization of diagnostic DNA image cytometry. *Analyt. Cell Path.* 8: 67-74, 1995.
- Bocking A, Nguyen VQH. Diagnostic and prognostic use of DNA image Cytometry in cervical squamous intraepithelial lesions and invasive carcinoma. *Cancer Cytopathol.* 102: 41-54, 2004.

- Carvalho CR, Clarindo WR, Praça MM, Araújo FS, Carels N. Genome size, base composition and karyotype of *Jatropha curcas* L., an important biofuel plant. *Plant Sci.* 174, 613–617, 2008.
- Carvalho CR. Desenvolvimento de tecnologia citogenética em milho (*Zea mays* L.). Viçosa: UFV, 1995, 127p. (Tese Doutorado/Genética e Melhoramento).
- Clarindo WR, Carvalho CR. A high quality chromosome preparation from cell suspension aggregates culture of *Coffea canephora*. *Cytologia* 71: 243-249, 2006.
- Clarindo WR, Carvalho CR, Araújo FS, Abreu IS, Otoni WC. Recovering polyploid papaya *in vitro* regenerants as screened by flow cytometry. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 92, 207–214, 2008.
- Chieco P, Derenzini M. The Feulgen reaction 75 years on. *Hist. Cell Biol.* 111: 345-358, 1999.
- Chieco P, Junker A, Van Noorden CJF. Image Cytometry. *Microscopy Handbooks.* Springer. 116 p., 2001.
- Cohen C. Image cytometric analysis in pathology. *Human Path* 27: 482-493, 1996.
- Cros J, Gavalda MC, Chabrilange N, Recalt C, Duperray C, Hamon S. Variations in the total nuclear DNA content in African *Coffea* species (Rubiaceae). *Café Cacao The.* 38:3-10, 1994.
- Cruz CD.. Programa GENES- Aplicativo Computacional em Genética e Estatística. 1st ed. Editora UFV, Minas Gerais, Br. 442 p., 1997.
- Doležel J, Binarová P, Lucretti S. Analysis of nuclear DNA content in plant cells by flow cytometry. *Biol. Plant.* 31:113-120, 1989.

- Doležel J. Flow cytometric analysis of nuclear DNA content in higher plants. *Phytochem. analysis* 2:143-154, 1991.
- Doležel J, Sgorbati S, Lucretti S. Comparison of three DNA fluorochromes for flow cytometric estimation of nuclear DNA content in plants. *Physiol. Plant.* 85: 625-631, 1992.
- Doležel J, Dolezelova M, Novak FJ. Flow cytometric estimation of nuclear DNA amount in diploid bananas (*Musa acuminata* and *M. balbisiana*). *Biol. Plant.* 36:351-357, 1994.
- Doležel J, Gohde W. Sex determination in dioecious plants *Melandrium album* and *M. rubrum* using high-resolution flow cytometry. *Cytometry* 19: 103 – 106, 1995.
- Doležel J. Application of flow cytometry for the study of plant genomics. *J. Appl. Genet.* 38: 285-302, 1997.
- Doležel J, Greilhuber J, Lucretti S, Meister A, Lysak MA, Nardi L, Obermayer R. Plant genome size estimation by flow cytometry: inter-laboratory comparison. *Ann. Bot.* 82: 17-26, 1998.
- Doležel J, Bartoš J, Volgmayr H, Greilhuber J. Nuclear DNA content and genome size of trouts and human. *Cytometry* 51A: 127-128, 2003.
- Doležel J, Bartoš J. Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. *Ann. Bot.* 95: 99-110, 2005.
- Doležel J, Greilhuber J, Suda J. Flow cytometry with plant cells: Analysis of genes chromosomes and genomes. Editora Wiley- VCH, 454p, 2007.
- Duijndam WAL, Van Duijn P. The influence of chromatin compactness on the stoichiometry of the Feulgen-Schiff procedure studied in model films. II

- Investigations on films containing condensed or swollen chicken erythrocyte nuclei. *J. Histochem. Cytochem.* 23: 891-900, 1975.
- Feulgen R; Rossenbeck H. Mikroskopisch-chemischer Nachweis einer Nucleisäure vom Typus der Thymonucleinsäure und die darauf beruhende elektive Färbung von Zellkernen in mikroskopischen Präparaten. *Hoppe Seyler Z. Physiol. Chem.* 135:203-248, 1924.
- Gaillard JLJ; Duijn PV, Schaberg A. Photometric determination of DNA in human chromosomes. *Exp. Cell. Res.* 53: 417-431, 1968.
- Galbraith DW, Harkins KR, Maddox JM, Ayres JM, Sharma DP, Firoozabady E. Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissue. *Science* 220: 1049-1051, 1983.
- Grattapaglia D, Bradshaw HHJr. Nuclear content of commercially important *Eucalyptus* species and hybrids. *Can. J. For. Res.* 24:1074-1078, 1994.
- Greilhuber J., Ebert I. Genome size variation in *Pisum*. *Genome* 37: 646-655, 1994.
- Greilhuber J, Obermayer R. Genome size in chinese soybean accessions—stable or variable? *Ann. Bot.* 84: 259-262, 1999.
- Greilhuber J. Intraspecific variation in genome size in angiosperms: identifying its existence. *Ann. Bot.* 95:91-98, 2005.
- Greilhuber J. Cytochemistry and C-values: The less-well-know world of nuclear DNA amounts. *Ann. Bot.* 101:791-804, 2008.
- Godinho MS, Oliveira AE, Soares MHFB. Análise de componentes principais no estudo de dados estatísticos em ensino de química. 29º Reunião anual da Sociedade Brasileira de química. 2006, Águas de Lindóia, SP.

- Hardie DC, Gregory TR, Hebert PDN. From pixels to picograms: a beginners' guide to genome quantification by Feulgen image analysis densitometry. *J. Hist. Cyt.* 50: 735-749, 2002.
- Haroske G, Baak JPA, Danielsen H, Giroud F, Gschwendtner A, Oberholzer M, Reith A, Spieler P, Bocking A. Fourth updated ESACP consensus report on diagnostic DNA image cytometry. *Anal. Cell. Pathol.* 23: 89-95, 2001.
- Johnston JS, Bennett MD, Rayburn AL, Galbraith DW, Price HJ. Reference standards for determination of DNA content of plant nuclei. *Am. J. Bot.* 86: 609-613, 1999.
- Kiss R, Gasperin P, Verhest A, Pasteels J L. Modification of tumor ploidy level via the choice of tissue taken as diploid reference in digital cell image analysis of Feulgen-stained nuclei. *Modern Path.* 5: 655-660, 1992.
- Kjellstrand PPT. Temperature and acid concentration in the search for optimum Feulgen hydrolysis conditions. *J. Hist. Cyt.* 25: 129-134, 1977.
- Knight CA, Beaulieu JM. Genome size scaling through phenotype space. *Ann. Bot.* 1–8, 2008.
- Kolář F, Stech M, Travnicek P, Rauchova J, Urfus T, Vit P, Kubesova M, Suda J. Towards resolving the *Knautia arvensis* agg. (Dipsacaceae) puzzle: primary and secondary contact zones and ploidy segregation at landscape and microgeographic scales. *Ann. Bot.* 103: 963–974, 2009.
- Lopes DM; Carvalho CR; Clarindo WR; Praça MM; Tavares MG. Genome size estimation of three stingless bee species (Hymenoptera, Meliponinae) by flow cytometry. *Apidologie* 2009. DOI: 10.1051/apido/2009030.
- Loureiro J, Rodriguez E, Doležel J, Santos C. Comparison of four nuclear isolation buffers for plant DNA flow cytometry. *Ann. Bot.* 98: 679–689, 2006a.

- Loureiro J, Rodriguez E, Doležal J, Santos C. Flow cytometric and microscopic analysis of the effect of tannic acid on plant nuclei and estimation of DNA content. *Ann. Bot.* 98: 515–527, 2006b.
- Loureiro J, Rodriguez E, Doležal J, Santos C. Two new nuclear isolation buffers for plant DNA flow cytometry: a test with 37 species. *Ann Bot.* 2007.
- Marie D, Brown SC. A cytometric exercise in plant DNA histograms, with 2C values for 70 species. *Biology of the Cell.* 79: 41-51, 1993.
- Mellin W. Cytophotometry in tumor pathology. A critical review of methods and applications, and some results of DNA analysis. *Pathol. Res. Pract.* 186: 213-229, 1990.
- Michaelson MJ; Prince HJ; Ellison JR; Johnston JS. Comparison of plant DNA contents determined by Feulgen microspectrophotometry and *laser* flow cytometry. *Am. J. Bot.* 78: 183-188, 1991.
- Moscone EA, Baranyi M, Ebert I, Greilhuber J, Ehrendorfer F, Hunziker AT. Analysis of nuclear DNA content in *Capsicum* (Solanaceae) by flow cytometry and feulgen densitometria. *Ann. Bot.* 92:21-29, 2003.
- Motley J, Yokoya K, Roberts AV. “ D- Flowering” – The Flow Cytometry of Plant DNA. In: Diamond RA, DeMaggio S (Eds) *In Living Color- Protocols in Flow Cytometry and Cell Sorting*, pp. 391-420. Springer. Lab Manual. 2000.
- Nitsh B, Murken J, Bruck HJ. Determining Feulgen-DNA of individual chromosomes by fluorescence cytophotometry with incident light. *Histochemie* 23:254-265, 1970.
- Noirot M, Barre P, Louarn J, Duperray C, Hamon S Nucleus- cytosol interactions - a source of stoichiometric error in flow cytometric estimation of nuclear DNA content in plants. *Ann. Bot.* 86: 309-316, 2000.

- Noirot M, Poncet V, Barre P, Hamon P, Hamon S, Kochko A. Genome size variations in diploid african *Coffea* species. *Ann. Bot.* 92: 709-714, 2003b.
- Noirot M, Barre P, Duperray C, Hamon S, Kochko A. Investigation on the causes of stoichiometric error in genome size estimation using heat experiments: consequences on data interpretation. *Ann. Bot.* 95: 111-118, 2005.
- Nunez R. Flow Cytometry: Principles and Instrumentation. *Curr. Issues Mol. Biol.* 3: 39-45, 2001.
- Obermayer R, Leitch IJ, Hanson L, Bennett M. Nuclear DNA C-values in 30 species double the familial representation in Pteridophytes. *Ann. Bot.* 90: 209-217, 2002.
- Otto FJ. DAPI staining of fixed cells for high-resolution flow cytometry of nuclear DNA. In: Darzynkiewicks Z, Crissman HA, eds. *Methods in Cell Biology*, 33. San Diego: Academic Press, 105-110. 1990.
- Peters DC. A comparison of mercury arc lamp and *laser* illumination for flow cytometers. *J. Histochem. Citochem.* 27: 241-245, 1979.
- Pfossier M, Amon A, Lelley T, Heberle-Bors E. Evaluation of sensitivity of flow cytometry in detecting aneuploidy in wheat using disomic and dielosomic wheat-rye addition lines. *Cytometry* 21:158-168, 1995.
- Pinto G, Loureiro J, Lopes T, Santos C. Analysis of the genetic stability of *Eucalyptus globulus* Labill. Somatic embryos by flow cytometry. *Theor. Appl. Genet.* 109: 580-587, 2004.
- Praça MM, Carvalho CR, Clarindo WR. A practical and reliable procedure for *in vitro* induction of tetraploid tomato. *Sci. Hortic.* 122: 501-505, 2009.

- Price HJ, Bachmann K, Chambers KL, Riggs J. Detection of intraspecific variation in nuclear DNA content in *Microseris douglasii*. Botanical Gazette 141: 195–198, 1980.
- Price HJ. DNA content variation among higher plants. Ann. Miss. Bot. Garden 75: 1248-1257, 1988.
- Price, H.J., Johnston, J.S. Methods of genome analysis in plants. In Analysis of plant DNA content by Feulgen microspectrophotometry and flow cytometry. 1st ed. CRC Press LLC . Florida, USA. pp. 115 – 32, 1996.
- Price HJ, Hodnett G, Johnston S. Sunflower (*Helianthus annuus*) leaves contain compounds that reduce nuclear propidium iodide fluorescence. Ann. Bot. 86: 929-934, 2000.
- Puech M, Giroud F. Standardisation of DNA quantitation by image analysis: quality control of instrumentation. Cytometry 36: 11-17, 1999.
- Rasch EM, Barr HJ, Rash RW. The DNA content of sperm of *Drosophila melanogaster*. Chromosoma 33: 1-18, 1971.
- Rosado TB, Clarindo WR, Carvalho CR. An integrated cytogenetic, flow and image cytometry procedure used to measured the DNA content of *Zea mays* A and B chromosome. Plant Sci. 176:154-158, 2009.
- Rossi AAB, Clarindo WR, Carvalho CR, Oliveira LO. Karyotype and nuclear DNA content of *Psychotria ipecacuanha*: a medicinal species. Cytologia 73: 53–60, 2008.
- Sandoval A, Hoher V, Verdeil JL. Flow cytometric analysis of the cell cycle in different coconut palm (*Cocos nucifera* L.) tissues cultured in vitro. Plant Cell Rep. 22: 25-31, 2003.

- Swift H. Microphotometry in biological research. *J. Hist. Cyt.* 14: 842-852, 1966.
- Temsh EM, Greilhuber J. Genome size variation in *Arachis hypogaea* and *A. monticola* re-evaluated. *Genome* 43: 449-451, 2000.
- Vilhar B, Greilhuber J, Koce JD, Temsch EM, Dermastia M. Plant genome size measurement with DNA image cytometry. *Ann. Bot.* 87: 719-728, 2001.
- Vilhar B, Dermastia M. Standardization of instrumentation in plant DNA image cytometry. *Acta Bot. Croat.* 61: 11-26, 2002.
- Volgmayr H, Greilhuber J. Genome size determination in Peronosporales (Oomycota) by Feulgen Image Analysis. *Fungal Genet. Biol.* 25: 181-195, 1998.
- Wied GL, Bartels PH, Dytch HE, Bibbo M. Rapid DNA evaluation in clinical diagnosis. *Acta Cytol.* 27: 33-37, 1983.
- Wilkerson MJ. Principles of flow cytometry and cell sorting. Annual Meeting of the American College of Veterinary Pathologists and Annual Meeting of the American Society of Clinical Pathology, 55^o. 2004, Orlando. Internet Publisher: International Veterinary Information Service, Ithaca NY (www.ivis.org).
- Yanpaisan W, King NJC, Doran PM. Flow cytometry of plant cells with applications in large-scale bioprocessing. *Biotechnol. Adv.*, 17: 3-27, 1999.