

MARIA ANDRÉIA CORRÊA MENDONÇA

**DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE DNA EM PIMENTÃO
(*Capsicum annuum* L.) POR CITOMETRIA DE IMAGEM**

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 *Magister Scientiae*.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2006**

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

M539d
2006

Mendonça, Maria Andréia Corrêa, 1982-
Determinação do conteúdo de DNA em pimentão
(*Capsicum annuum* L.) por citometria de imagem /
Maria Andréia Corrêa Mendonça. – Viçosa : UFV, 2006.
xi, 52f. : il. ; 29cm.

Orientador: Carlos Roberto de Carvalho.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 43-52.

1. Genética vegetal. 2. Ácido desoxirribonucléico.
3. Citometria de imagem. 4. Microscopia. 5. Pimentão.
6. *Capsicum annuum*. I. Universidade Federal de Viçosa.
II. Título.

CDD 22.ed. 581.35

MARIA ANDRÉIA CORRÊA MENDONÇA

**DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE DNA EM PIMENTÃO
(*Capsicum annuum* L.) POR CITOMETRIA DE IMAGEM**

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 *Magister Scientiae*.

APROVADA: 03 de fevereiro de 2006.

Prof. Wagner Campos Otoni
(Conselheiro)

Prof. Cosme Damião Cruz

Prof^a. Sílvia das Graças Pompolo

Dr^a Eveline Teixeira Caixeta

Prof. Carlos Roberto de Carvalho
(Orientador)

**Aos meus pais, Antônio Marcos e Rosânia.
Aos meus irmãos, Adriana e Marcos.**

DEDICO

AGRADECIMENTOS

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

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro.

Ao Professor Carlos Roberto de Carvalho, pela dedicada orientação, pelos ensinamentos transmitidos, pelo enorme incentivo, pela amizade, pela confiança, pela paciência e pelo exemplo de amor à pesquisa.

Aos meus conselheiros Professores Wagner Campos Otoni e Everaldo Gonçalves de Barros, pela amizade e pelas contribuições para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Professor Cosme Damião Cruz, pelo auxílio nas análises estatísticas, pelas contribuições na interpretação dos resultados e pelas sugestões.

À Professora Sílvia das Graças Pompolo, pelas sugestões e pela atenção durante o curso.

À Dr^a Eveline Teixeira Caixeta, pelas sugestões.

Ao Professor Luiz Sérgio Saraiva, pela amizade e atenção durante o curso.

Ao Professor Paulo César Gomes, pelo fornecimento das aves para a elaboração do presente estudo.

A todos os meus professores, pela contribuição ao meu crescimento profissional.

Aos funcionários do Laboratório de Citogenética e Citometria Vegetal “Americano” e “Zé Chico”, pelo auxílio profissional, pela amizade e pela atenção.

Aos funcionários do Aviário DZO/UFV, pelo auxílio nas coletas de sangue e captura das aves.

Aos meus amigos do Laboratório de Citogenética e Citometria Vegetal Isane, Milene, Carolina, Fernanda e Isabella, pelo auxílio técnico, pela amizade e pelo agradável convívio no ambiente de trabalho.

Ao meu amigo Wellington, pela amizade e pelo companheirismo.

Aos meus amigos Janaina, Jaqueline, Juliana, Tatiana, Gustavo e Leonardo, pelos momentos de agradável convívio e descontração.

Ao Pedro, à Francielle e ao Lucas, pela amizade, pelo carinho e pelo alegre convívio.

Aos meus familiares, pelo carinho, pelo incentivo e pelas orações.

Ao Mário Henrique, pelo amor, pela dedicação, pela compreensão e pelo apoio; e à sua família, pelo carinho e incentivo.

Àqueles que são a base desta conquista: meus pais Rosânia e Antônio Marcos, pelo amor incondicional, pelo incentivo, pela dedicação, pelo exemplo e pelos sábios conselhos, e meus irmãos Adriana e Marcos, pelo carinho, pelo apoio e pela presença.

A Deus, pelo dom da vida, por conceder-me força e possibilitar-me alcançar mais este objetivo.

BIOGRAFIA

MARIA ANDRÉIA CORRÊA MENDONÇA, filha de Antônio Marcos de Mendonça e Rosânia Corrêa Mendonça, nasceu em Manhumirim, Minas Gerais, no dia 19 de abril de 1982.

Em 2000, iniciou o curso de Ciências Biológicas na Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa, MG, bacharelando-se em janeiro de 2004.

Durante o período de graduação, foi monitora do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular e bolsista do PIBIC/CNPq no Departamento de Biologia Geral, onde desenvolveu atividades de pesquisa em Citogenética Vegetal.

Em março de 2004, ingressou no Programa de Pós-Graduação, em nível de Mestrado, em Genética e Melhoramento da UFV, submetendo-se à defesa de tese em fevereiro de 2006.

CONTEÚDO

	Página
RESUMO	viii
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Aspectos gerais do gênero <i>Capsicum</i>	1
1.2. Determinação do conteúdo de DNA	2
1.2.1. Aspectos gerais da citometria de imagem.....	3
1.2.2. Padrões interno e externo	5
1.2.3. Quantificação de DNA no gênero <i>Capsicum</i>	9
2. OBJETIVOS	12
3. MATERIAL E MÉTODOS	13
3.1. Material	13
3.2. Métodos	14
3.2.1. Procedimentos para calibração do sistema óptico e digital.....	14
3.2.2. Preparo das lâminas de eritrócitos de <i>Gallus domesticus</i>	15
3.2.3. Preparo das lâminas de <i>Capsicum annum</i>	16
3.2.4. Análise de dados.....	17

4. RESULTADOS	19
4.1. Controle de qualidade do sistema óptico e digital.....	19
4.2. Aplicação das metodologias de citometria de imagem em eritrócitos de <i>Gallus domesticus</i>	23
4.3. Determinação do conteúdo de DNA em <i>Capsicum annuum</i> por citometria de imagem.....	25
5. DISCUSSÃO	31
5.1. Controle de qualidade do sistema óptico e digital.....	31
5.2. Aplicação das metodologias de citometria de imagem em eritrócitos de <i>Gallus domesticus</i>	34
5.3. Determinação do conteúdo de DNA de <i>Capsicum annuum</i> por citometria de imagem.....	38
6. CONCLUSÕES	41
REFERÊNCIAS.....	43

RESUMO

MENDONÇA, Maria Andréia Corrêa, M. S., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2006. **Determinação do conteúdo de DNA em pimentão (*Capsicum annuum* L.) por citometria de imagem.** Orientador: Carlos Roberto de Carvalho. Conselheiros: Everaldo Gonçalves de Barros e Wagner Campos Otoni.

Capsicum é um dos gêneros mais importantes economicamente da família Solanaceae. Das 25 espécies descritas, cinco são extensivamente cultivadas. *Capsicum annuum* é a mais importante comercialmente, pelo seu valor agrônomo como especiaria. Apesar da sua importância, valores de conteúdo de DNA conflitantes, que variam de 5,52 a 10,80 pg, têm sido descritos para essa espécie. Diante dos avanços dos equipamentos digitais nas análises de citometria de imagem, o presente trabalho propôs o estabelecimento desses recursos para reavaliar o tamanho do genoma em *C. annuum*. Os objetivos específicos foram: (i) o estabelecimento de parâmetros de confiabilidade para análises em citometria de imagem, por meio da realização de testes de estabilidade do equipamento, linearidade e uniformidade da densidade óptica integrada dos núcleos; (ii) aplicação dessa calibração em núcleos de eritrócitos de *Gallus domesticus* 'Leghorn' (macho e fêmea); e (iii) desenvolvimento de metodologias de citometria de imagem para determinação do conteúdo de DNA em pimentão (*C. annuum* L. 'Fortuna Super'). Lâminas de esfregaço de sangue de galinha e galo submetidas à

reação de Feulgen foram utilizadas nos testes de calibração e para a determinação da densidade óptica integrada. As preparações citogenéticas de pimentão foram feitas pela técnica de esmagamento de meristemas radiculares submetidos à reação de Feulgen. Uma vez estabelecidos os parâmetros de confiabilidade para a realização da citometria de imagem, a aplicação dessas padronizações em análises de núcleos de eritrócitos de ave permitiu identificar diferenças de 4,32% no conteúdo de DNA nuclear entre machos e fêmeas de *G. domesticus*. Análise de variância demonstrou que a diferença encontrada era significativa, e essa foi atribuída ao heteromorfismo dos cromossomos sexuais. As análises de citometria de imagem em *C. annuum* permitiram o cálculo da densidade óptica integrada, atendendo aos parâmetros internacionalmente adotados para esse tipo de estudo. O conteúdo de DNA estimado para *C. annuum* 'Fortuna Super', utilizando *Pisum sativum* 'Ctirad' com o padrão interno, foi de 8,10 pg. Esse valor difere em 2% do obtido previamente por citometria de fluxo, utilizando-se material nuclear foliar da mesma população de plantas. Além disso, o valor obtido difere em 16% e 28% dos valores 2C obtidos por citometria de imagem descritos na literatura e em 7% e 32% dos relatados por citometria de fluxo. Esses resultados abrangem informações acerca do genoma dessa espécie, que podem ser úteis em programas de melhoramento e seqüenciamento e em estudos evolutivos.

ABSTRACT

MENDONÇA, Maria Andréia Corrêa, M. S., Universidade Federal de Viçosa, February 2006. **Image cytometric measurement of nuclear DNA content in pepper (*Capsicum annuum* L.)**. Adviser: Carlos Roberto de Carvalho. Committee members: Everaldo Gonçalves de Barros and Wagner Campos Otoni

Capsicum genus is one of the most important members of the Solanaceae family with high economic value. Out of 25 known species, five are extensively cultivated. *Capsicum annuum* is the most important commercially by its agronomic value as spice. In despite of this importance, the nuclear DNA content of *C. annuum* is still uncertain with values from the literature ranging from 5.52 to 10.80 pg. In face of the fast development of digital image technologies in cytometry, this study proposes the utilization of these resources to reevaluate the genomic size in *C. annuum*. The specific objectives were: (i) to determine the reliability parameters for image cytometry analysis by performing tests of equipment stability, linearity and uniformity of nuclei integrated optical density; (ii) to apply that parameters in analysis of erythrocytes' nuclei from *Gallus domesticus* 'Leghorn' (male and female); and (iii) to develop image cytometry methodologies for determination of the nuclear DNA content of pepper (*C. annuum* L. 'Fortuna Super'). Hen and rooster blood samples were prepared by using the method of smear preparation. The slides were stained with Feulgen reaction and they were used to perform the quality control procedures and

integrated optical density measurements. Root tips of *C. annuum* were fixed, stained with Feulgen reaction and squashed on a microscope slide. Once the parameters of the reliability for performing image cytometry were established, the application of those standardizations in the chicken red blood cells suggested that this technique allows identification of differences in the nuclear DNA content between rooster and hen. Analysis of variance demonstrated that the 4.32% difference obtained was significant and it was attributed to sexual chromosomes heteromorfism. *C. annuum* analyses allowed the calculation of integrated optical density values, and they were in accordance with the international standards for DNA image cytometry. The 2C DNA value for *C. annuum* 'Fortuna Super', using *Pisum sativum* as the internal standard, was 8.10 pg. This data differs in 2% from the previously obtained by flow cytometry for the same plant population. Besides, the value obtained in this study differs in 16% and 28% from those 2C values previously published by image cytometry and in 7% and 32% for flow cytometry. These results include information about *C. annuum* genome that can be useful in breeding programs, genome sequencing projects and for comparative studies of genome evolution.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Aspectos gerais do gênero *Capsicum*

O pimentão é um membro da família Solanaceae pertencente ao gênero *Capsicum* (PRINCE et al., 1993), que abrange espécies cultivadas e silvestres originadas das Américas Central e do Sul. Dentre as espécies cultivadas, cinco destacam-se em termos de importância agrônômica: *C. annuum*, *C. baccatum*, *C. chinense*, *C. frutescens* e *C. pubescens* (PICKERSGILL, 1991; BELLETTI et al., 1998; PARAN et al., 1998).

Além das cultivadas, cerca de 20 espécies silvestres de *Capsicum* foram relatadas, sendo algumas utilizadas pelo homem, a exemplo de *C. cardenasii*, *C. chacoense*, *C. eximium*, *C. galapagoense*, *C. praetermissum* e *C. tovarii* (BELLETTI et al., 1998).

Entre essas espécies, *C. annuum* destaca-se como uma das hortaliças mais cultivadas em todo o mundo (REIFSCHNEIDER, 2000), apresentando uma produção mundial de 650.763.397 toneladas/ano e ocupando uma área de 40.824.347 ha, juntamente com outras hortaliças (FAO, 2003). No Brasil, o pimentão apresenta-se como uma das 10 mais importantes hortaliças cultivadas (SANTANA et al., 2004). Considerando as pimentas do gênero *Capsicum*, Reifschneider (2000) estimou a área plantada no país em 15.000 ha, com uma

receita anual de 79 milhões de reais. Entretanto, o referido autor enfatizou a carência de dados estatísticos mais confiáveis sobre essa cultura no Brasil.

Em termos botânicos, as espécies de *Capsicum* apresentam grande variabilidade quanto aos seus principais caracteres morfológicos, como formato, tamanho, cor e posição de flores e frutos, número de pedicelos por nó e folhas, entre outros, o que condiciona uma ampla diversidade de tipos (BERTÃO, 1993). Dessa forma, a distinção entre as diferentes espécies tem sido realizada considerando-se características agrônômicas, morfológicas, bioquímicas e citológicas em conjunto (McLEOD et al., 1983).

Estudos citogenéticos em *Capsicum* têm demonstrado que todas as espécies do gênero são diplóides, com $2n=2x=24$ ou $2n=2x=26$ (MOSCONE et al., 2003). Dentre as espécies com $2n = 24$ estão *C. annuum*, *C. frutescens*, *C. chinense*, *C. chacoense*, *C. galapagoense*, *C. baccatum*, *C. praetermissum*, *C. tovarii*, *C. pubescens*, *C. cardenasii* e *C. eximium* (PICKERSGILL, 1991; MOSCONE et al., 1995). Segundo Pickersgill (1991), os táxons com $x=13$ são *C. campylopodium*, *C. ciliatum* e *C. mirabile*.

Almeida e Carvalho (2004) caracterizaram a morfologia dos cromossomos de *C. annuum* 'Fortuna Super', confirmando o número cromossômico $2n = 24$ cromossomos, sendo 10 pares metacêntricos (1-10), um submetacêntrico, apresentando uma constrição secundária (11), e outro acrocêntrico (12).

1.2. Determinação do conteúdo de DNA

O mensuramento do tamanho do genoma de plantas fornece informações úteis para o melhoramento, sistemática e taxonomia vegetal (VOLGMAYR e GREILHUBER, 1998). Além disso, o conhecimento do tamanho do genoma se faz necessário para o planejamento de projetos de seqüenciamento (HARDIE et al., 2002), em trabalhos envolvendo marcadores moleculares (NOIROT et al., 2002) e em estudos evolutivos (NOIROT et al., 2003a).

Ao longo dos anos, vários métodos têm sido empregados para quantificação de DNA. Os primeiros estudos envolveram extração de DNA de grande número de células para calcular o conteúdo de DNA total da preparação. Para determinar a quantidade de DNA por núcleo, esse valor era dividido por uma estimativa do número de núcleos utilizados no processo de extração (HARDIE et al., 2002). Embora essa metodologia não permitisse a identificação de células com diferentes níveis de ploidia, ela possibilitou a determinação da constância do conteúdo de DNA numa mesma espécie (HARDIE et al., 2002; DOLE EL e BARTOŠ, 2005). Análises de cinética de reassociação também foram utilizadas para determinação do conteúdo de DNA, embora os dados obtidos fossem de difícil interpretação em termos de valor C, em virtude da presença de seqüências repetitivas de DNA (DOLE EL e BARTOŠ, 2005).

Com o advento das metodologias que se baseavam na análise de núcleos individuais, estimativas mais precisas do conteúdo de DNA foram alcançadas (DOLE EL e BARTOŠ, 2005). Dentre essas metodologias, a citometria de fluxo (CF) e a citometria de imagem (CI) têm sido amplamente empregadas para determinar o tamanho de genomas (MOSCONE et al., 2003).

1.2.1. Aspectos gerais da citometria de imagem

A citometria de imagem é uma metodologia que permite estimar a quantidade de DNA de núcleos (CHIECO e DERENZINI, 1999) e de cromossomos (CLARINDO, 2004; ROSADO, 2004) em lâminas, por meio da medida de absorbância, após esses terem sido corados pela reação de Feulgen (CHIECO e DERENZINI, 1999).

A reação de Feulgen é uma técnica citoquímica específica para DNA (HARDIE et al., 2002). Essa técnica se baseia na exposição de grupos aldeído na molécula de DNA como resultado de uma hidrólise ácida, bem como na posterior ligação da pararosanilina, rosanilina ou mangenta rosa, presentes no reativo de Schiff, aos grupos aldeído formados pelo tratamento com ácido clorídrico (CHIECO e DERENZINI, 1999).

Segundo Chieco e Derenzini (1999), a distribuição não-homogênea do cromóforo é uma das principais causas da falta de relação entre a medida de absorvância obtida em determinado ponto e o conteúdo de DNA nuclear. Nesse sentido, metodologias que evitem os erros de coloração do DNA devem ser desenvolvidas para possibilitar maior rigor na mensuração do conteúdo de DNA.

Estudos têm sido realizados no sentido de estabelecer condições ótimas de hidrólise do DNA, uma vez que é um passo determinante para a coloração deste e, posteriormente, para a sua quantificação. No procedimento originalmente descrito por Feulgen e Rossenbeck (1924), citados por Hardie et al. (2002), recomendou-se a hidrólise a 60 °C, por 4 min, em ácido clorídrico 1 M. Porém, estudos posteriores indicaram que a hidrólise com ácido clorídrico 5 M, em temperatura ambiente (20 °C – 25 °C), por um período de tempo entre 45 e 60 min, era mais adequada, 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 ser perdidos (KJELLSTRAND, 1977; BÖCKING et al., 1995).

Após a coloração do DNA a ser analisado por CI, é necessária a captura das imagens observadas ao microscópio, por uma videocâmera (KISS et al., 1992). A imagem capturada é convertida em pixels, que estão relacionados a uma cor e uma intensidade em específico. Dessa forma, a imagem é processada automaticamente pelo programa de análise de imagens, gerando valores de absorvância relacionados com a área, denominados valores de densidade óptica integrada (DOI) (HARDIE et al., 2002).

A maioria das análises realizadas via citometria de imagem utiliza a luz processada de câmeras analógicas/digitais monocromáticas ou de câmeras policromáticas (RGB), mas com apenas o canal de comprimento de onda na faixa verde. No caso de imagens monocromáticas, estudos citométricos em humanos e plantas têm utilizado, principalmente, a escala de valor do pixel com 8 bits (256 tons de cinza) (VOLGMAYR e GREILHUBER, 1998) ou 12 bits (4.096 tons de cinza) (FONTES, 2003; CLARINDO, 2004; ROSADO, 2004). São coletados, então, valores na lâmina tanto de regiões contendo núcleos quanto

de regiões com ausência de material celular (*background*) (HARDIE et al., 2002). A equação abaixo é utilizada para a realização dos cálculos da DOI:

$$DOI = \sum_{i=1}^n -\log_{10} \frac{I_{fi}}{I_{bi}}$$

n = número total de pixels do objeto;
 I_{fi} = intensidade dos pixels do objeto; e
 I_{bi} = intensidade dos pixels fora do objeto.

Ainda não existe metodologia padronizada que seja internacionalmente reconhecida para CI em plantas. Vilhar et al. (2001) recomendaram que os estudos de CI em plantas fossem realizados seguindo e adaptando o consenso metodológico adotado para humanos, que, segundo esses autores, constituem referências gerais para a quantificação do DNA.

Essa metodologia consiste na: (i) utilização de células de referência, isto é, de padrões com valor 2C previamente estabelecido, para comparação das medidas de densidade; e (ii) preparação e análise dos padrões, juntamente com as amostras do espécime, de forma que as células de referência passem pelos mesmos processos que a amostra, em iguais condições. O coeficiente de variação (CV) entre as medidas obtidas tanto para as amostras quanto para os padrões deve ser inferior a 5% (COEN et al., 1992; BÖCKING et al., 1995; HAROSKE et al., 1998; HAROSKE et al., 2001).

1.2.2. Padrões interno e externo

Os valores de DOI obtidos em estudos de CI são adimensionais, constituindo valores apenas equivalentes ao conteúdo de DNA. Dessa forma, a conversão dos valores de DOI para unidades de picogramas (pg), por meio da comparação com os conteúdos de DNA conhecidos para os padrões, é essencial para a realização da quantificação de DNA (HAROSKE et al., 1998; HAROSKE et al., 2001).

Os padrões têm sido classificados como externo e interno. O primeiro caracteriza-se por ser processado e analisado separadamente da amostra-

teste. No segundo tipo, a amostra-teste e o padrão são processados e analisados em conjunto (MOTLEY et al., 2000).

As desvantagens de se utilizar o padrão externo podem ser atribuídas a flutuações na calibragem do equipamento entre as análises (MOTLEY et al., 2000). Esse tipo de problema tem sido evitado com o uso do padrão interno. Quando o processamento desse e da amostra é realizado em conjunto, ambos são afetados pelos erros experimentais, que podem surgir durante a preparação e coloração (DOLE EL, 1997; MOTLEY et al., 2000; NOIROT et al., 2000; NOIROT et al., 2003b).

A importância dos padrões de referência e seu uso metodológico têm sido enfatizados em alguns trabalhos (DOLE EL, 1997; JOHNSTON et al., 1999). No entanto, uma das principais fontes de erro na quantificação de DNA em plantas ainda continua sendo a falta de padrões adequados, com conteúdo de DNA bem estabelecido (JOHNSTON et al., 1999).

Segundo Dole el (1997), a seleção do padrão apropriado é crucial para a obtenção da estimativa do tamanho do genoma nuclear. Esse padrão deve apresentar estabilidade genética, tamanho de genoma constante, ser facilmente manipulado, estar disponível em quantidades suficientes para análise (VILHAR et al., 2001; DOLE EL e BARTOŠ, 2005; GREILHUBER, 2005) e apresentar conteúdo de DNA próximo ao da espécie investigada (VINDELØV et al., 1983; DOLE EL, 1997).

O uso de núcleos de células vegetais como padrão interno em análises de plantas tem sido considerado o mais apropriado (MOTLEY et al., 2000). No entanto, a maioria das quantificações de DNA em plantas foi realizada utilizando, direta ou indiretamente, como padrões os núcleos de eritrócitos de ave (*Gallus domesticus*) ou outros padrões de células animais, como eritrócitos de truta, leucócitos e fibroblastos humanos (JOHNSTON et al., 1999; MOTLEY, 2000), que foram quantificados, em sua maioria, empregando-se o valor de referência para o núcleo do eritrócito de *Gallus domesticus* igual a 2,50 pg, determinado quimicamente por Rasch et al. (1971) (JOHNSTON et al., 1999; BENNETT et al., 2003).

Embora os núcleos de eritrócitos de *G. domesticus* sejam amplamente usados como padrões de referência (JOHNSTON et al., 1999), estimativas conflitantes para o conteúdo de DNA dessas células têm sido descritas, podendo-se verificar que existem na literatura várias determinações do conteúdo de DNA para núcleos de eritrócitos de *Gallus*, estando algumas delas destacadas no Quadro 1.

Quadro 1 – Valores 2C relatados para núcleos de eritrócitos de *Gallus domesticus*

Padrão	Valor 2C (pg)	Sexo	Tipo de determinação	Referência
<i>G. domesticus</i>	2,50	NI	Q	Rasch et al., 1971
<i>G. domesticus</i>	2,33	NI	Q	Galbraith et al., 1983
<i>G. domesticus</i>	2,50	NI	CF	Tiersch et al., 1989
<i>G. domesticus</i>	2,49	macho	CF	Nakamura et al., 1990
<i>G. domesticus</i>	2,43	fêmea	CF	Nakamura et al., 1990
<i>G. domesticus</i>	2,47	NI	CF	Tiersch e Wachtel, 1991
<i>G. domesticus</i>	2,50	macho	CF	De Vita et al., 1994
<i>G. domesticus</i> 'Leghorn' TAMU ¹	2,54	macho	CF	Johnston et al., 1999
<i>G. domesticus</i> 'Leghorn' TAMU ²	2,98	macho	CF	Johnston et al., 1999
<i>G. domesticus</i> 'Leghorn' Arizona	3,01	macho	CF	Johnston et al., 1999
<i>G. domesticus</i> 'Rod Island'	2,48	fêmea	CF	Johnston et al., 1999

¹ Sangue coletado uma semana antes da análise.

² Sangue coletado e armazenado a -80 °C durante vários anos.

NI = não identificado; Q = química; CF = citometria de fluxo; e pg = picogramas.

Tem sido relatado que diferenças observadas em quantificações de DNA estão diretamente ligadas ao tipo de metodologia utilizada para a preparação do material nuclear, coloração e análise (VINDELØV et al., 1983; DOLE EL e BARTOŠ, 2005).

Outro fator que tem sido descrito como causa de divergências em quantificações de DNA, especialmente em mamíferos e aves, é a presença de cromossomos sexuais heteromórficos (TIERSCH et al., 1989). Diferenças de

tamanho de genoma entre machos e fêmeas foram relatadas em camundongos, aves e humanos (VINDELØV et al., 1983; De VITA et al., 1994).

O genoma de *Gallus gallus* apresenta 1,05 Gpb (INTERNATIONAL CHICKEN GENOME CONSORTIUM, 2004), que estão distribuídos em microcromossomos (MICs), que não podem ser distinguidos entre si por meio de técnicas de bandeamento, em virtude do tamanho relativamente pequeno, e macrocromossomos (MACs), que se assemelham aos dos mamíferos em comprimento e estrutura (SCHIMID et al., 1989; BLOOM et al., 1993; GRÜTZNER et al., 2001).

Em *G. domesticus* foram descritos 39 pares de cromossomos, sendo que os pares 1 – 6 são considerados MACs, visto que são os únicos cromossomos que se apresentam maiores que os menores de humanos (McQUEEN et al., 1998). Os pares de 7 – 10 possuem tamanho intermediário e têm sido classificados como MICs grandes ou MACs pequenos, enquanto os pares de 11 – 39, denominados MICs (BLOOM et al., 1993).

Segundo Stubblefield e Orro (1982), os cinco primeiros autossomos, juntamente com o cromossomo Z, representam 65% do genoma de uma fêmea de *G. domesticus*. Os cromossomos de tamanho intermediário (7 – 14 mais o W) correspondem a mais 20%. Os demais constituem cerca de 15% do genoma. E, no que diz respeito aos cromossomos sexuais, o Z é aproximadamente duas vezes maior que o W (BLOOM et al., 1993). Portanto, espera-se que eritrócitos de machos apresentem um conteúdo de DNA maior que o de fêmeas (VINDELØV et al., 1983).

Poucos estudos foram realizados no sentido de esclarecer essa diferença no conteúdo de DNA. Pesquisas em zoologia têm adotado para núcleos de eritrócitos de *G. domesticus*, independentemente do sexo do animal doador, o valor $2C = 2,50$ pg (BENNETT et al., 2003). Segundo Marie e Brown (1993), nos trabalhos com plantas tem sido utilizado, para os núcleos de eritrócitos, o valor $2C = 2,33$ pg, descrito por Galbraith et al. (1983).

1.2.3. Quantificação de DNA no gênero *Capsicum*

A determinação do conteúdo de DNA do gênero *Capsicum* tem sido realizada por vários autores, a partir de diferentes metodologias de coloração e análise dos núcleos. No entanto, os valores 2C obtidos têm sido conflitantes (Quadros 2 e 3).

Quadro 2 – Valores 2C relatados para *Capsicum annuum*

Espécies	2C DNA (pg)	Métodos de análise	Referências
<i>C. annuum</i> Silvestre	8,00	F/CI	Bennett e Smith, 1976
<i>C. annuum</i> Cultivado	10,80	F/CI	
<i>C. annuum</i>	5,52	MI/CF	Galbraith et al., 1983
<i>C. annuum</i> ¹	5,60 – 7,51	IP/CF	Arumuganathan e Earle, 1991
<i>C. annuum</i> 'Doux Long des Landes'	7,65	IP/CF	Belletti et al., 1998
<i>Capsicum annuum</i> var. <i>annuum</i>	6,32	F/CI	Moscone et al., 2003
<i>C. annuum</i> var. <i>annuum</i>	6,76	IP/CF	Moscone et al., 2003
<i>C. annuum</i> 'Fortuna Super'	8,23	DAPI/CF	Martins e Carvalho, 2004

¹ Foram analisados sete cultivares.

pg = picogramas; F = Feulgen; MI = mitramicina; IP = iodeto de propídio; CF = citometria de fluxo; e CI = citometria de imagem.

Bennett e Smith (1976), estudando amostras de *Capsicum*, determinaram o conteúdo de DNA usando a técnica de coloração de Feulgen e *Allium cepa* 'Stuttgarter Riense', cujo valor 2C = 33,5 pg, como padrão interno. Valores 2C iguais a 8,0 pg e 10,8 pg foram descritos nas espécies selvagens e cultivadas, respectivamente.

Moscone et al. (2003), utilizando a metodologia de citometria de imagem, determinaram o conteúdo de DNA das espécies *C. annuum* (2C = 6,32 pg) e *C. pubescens* (2C = 9,12 pg), também utilizando *Allium cepa* 'Stuttgarter Riense' (2C = 33,5 pg) como padrão.

Além desses estudos envolvendo a determinação do conteúdo de DNA por CI, metodologias de CF também têm sido utilizadas para quantificação de DNA em *Capsicum*. Galbraith et al. (1983) determinaram o valor 2C = 5,52 pg de DNA para núcleos de *C. annuum* corados com mitramicina, usando núcleos de eritrócitos de *G. domesticus* (2C = 2,33 pg) como padrão interno. Arumuganathan e Earle (1991) relataram valores entre 5,60 e 7,51 pg para sete cultivares de *C. annuum*. A metodologia empregada por esses autores também envolveu eritrócitos de ave como padrão interno e coloração com iodeto de propídio (Quadro 2).

Belletti et al. (1998) analisaram nove espécies de *Capsicum* e duas subespécies. A espécie utilizada como padrão interno para a obtenção da estimativa da quantidade de DNA nuclear de *Capsicum annuum* 'Doux Long des Landes' foi *Pisum sativum* 'Lincoln' (2C = 9,07 pg). Os valores de DNA do genoma das demais espécies foram calculados a partir do valor de DNA atribuído a *C. annuum* (Quadro 3).

Quadro 3 – Valores 2C relatados em espécies do gênero *Capsicum* por citometria de fluxo

Espécies	2C DNA (pg) Belletti et al. (1998)	2C DNA (pg) Moscone et al. (2003)
<i>C. annuum</i>	7,65	6,76
<i>C. chacoense</i>	7,66	6,70
<i>C. tovarii</i>	7,93	-
<i>C. frutescens</i>	7,94	6,80
<i>C. chinense</i>	8,04	6,84
<i>C. baccatum pendulum</i>	8,39	7,36
<i>C. baccatum baccatum</i>	8,43	7,42
<i>C. baccatum umbilicatum</i>	-	7,42
<i>C. eximium</i>	8,70	8,12
<i>C. cardenasii</i>	8,97	-
<i>C. praetermissum</i>	9,13	-
<i>C. pubescens</i>	9,72	8,94
<i>C. parvifolium</i>	-	11,54
<i>C. campylopodium</i>	-	10,27

O tamanho do genoma de outras 25 amostras pertencentes a nove espécies diplóides e quatro variedades de *Capsicum* foi quantificado por Moscone et al. (2003), utilizando metodologias de citometria de fluxo. As preparações analisadas por esses autores foram coradas com brometo de etídio e os valores de DNA, determinados com base no padrão interno *Hordeum vulgare* 'Ditta' (1C = 5,063 pg) (Quadro 3).

2. OBJETIVOS

Considerando os avanços dos equipamentos digitais nas análises de citometria de imagem e a presença de valores conflitantes para o conteúdo de DNA em *Capsicum annuum*, no presente trabalho propôs-se o estabelecimento desses recursos para reavaliar tamanho do genoma em *C. annuum* cultivar Fortuna Super.

Os objetivos específicos foram:

- Padronizar procedimentos para calibração do sistema de análise de imagem utilizado no presente estudo, quanto a estabilidade, a linearidade das medidas de densidade óptica e a uniformidade da iluminação na imagem de captura, a fim de obter parâmetros que demonstrem a confiabilidade das medidas de densidade óptica integradas obtidas.
- Aplicar metodologias de preparação de lâminas, fixação, hidrólise e coloração por meio da reação de Feulgen, para estudos de citometria de imagem em núcleos de eritrócitos de *Gallus domesticus*, visando à verificação da existência de diferenças no conteúdo de DNA entre machos e fêmeas dessa espécie.
- Adaptar metodologias de preparação de lâminas, fixação, hidrólise e coloração por meio da reação de Feulgen, para estudos em citometria de imagem em *C. annuum* 'Fortuna Super'.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material

Sementes de pimentão *Capsicum annuum* cultivar Fortuna Super foram cedidas pelo Dr. Luiz Arthur da Costa, pesquisador da Universidade Federal de Lavras (UFLA). Sementes de *Pisum sativum* cultivar Ctirad, utilizadas como padrão para determinação do conteúdo de DNA em pimentão, foram cedidas pelo Dr. Jaroslav Doležel, do Laboratório de Citogenética Molecular e Citometria do Instituto de Botânica Experimental da República Tcheca. Aves da espécie *Gallus domesticus* 'Legorhn' IPEACS (machos e fêmeas) foram cedidas pelo Prof. Paulo César Gomes, do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa. As análises citogenéticas e de citometria de imagem foram realizadas no Laboratório de Citogenética e Citometria Vegetal do Departamento de Biologia Geral da Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, MG.

3.2. Métodos

3.2.1. Procedimentos para calibração dos sistemas óptico e digital

A avaliação do sistema de análise de imagem foi realizada conforme descrito por Puech e Giroud (1999), Hardie et al. (2002) e Vilhar e Dermastia (2002) e consistiu da realização de testes de estabilidade, linearidade e uniformidade da DOI do núcleo.

O teste de estabilidade consiste na determinação do tempo que o sistema de análise de imagens necessita, a partir do instante em que foi ligado, para se tornar estável. Para a realização do teste de estabilidade foram calculados os valores de densidade óptica (DO) de um pixel e de um núcleo de eritrócito de fêmea de *G. domesticus* posicionados no centro da imagem de captura. As imagens foram capturadas em intervalos de 4 min, durante 88 min.

O teste de linearidade é um procedimento de verificação da relação entre a DO real dos objetos e a gerada pelo sistema de análise de imagens. Tal relação deve ser linear. A avaliação da linearidade do sistema foi realizada seguindo a metodologia descrita por Hardie et al. (2002), na qual se recomenda a utilização de filtros de densidade *Stepped Density Filter* (Edmund Industrial Optics). Uma regressão linear entre os valores de DO certificados pela Edmund Industrial Optics e os valores medidos pelo equipamento foi calculada. Os parâmetros utilizados para análise da regressão foram: inclinação da reta; erro-padrão (SE), expresso em porcentagem; e o coeficiente de determinação da regressão (R^2).

Em alguns sistemas ocorre variação nas medidas de densidade óptica integrada (DOI) de objetos uniformemente iluminados, quando estes estão posicionados em diferentes locais da imagem de captura. Para verificar se o sistema utilizado no presente estudo apresentava essas variações, foi realizado um teste de uniformidade da DOI dos núcleos. O teste consistiu do cálculo da DOI de cada um dos núcleos, de um conjunto de quatro núcleos de eritrócitos de fêmea de *G. domesticus*, posicionados em 16 diferentes locais da imagem de captura (Figura 1). Calculou-se o CV dos 64 valores de DOI.

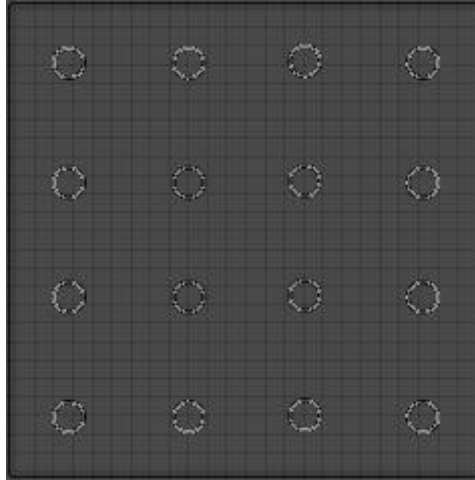


Figura 1 – Círculos representando as coordenadas de referência para posicionamento dos núcleos a serem capturados para realização do teste de uniformidade da densidade óptica integrada (DOI) dos núcleos.

3.2.2. Preparo das lâminas de eritrócitos de *Gallus domesticus*

As lâminas de eritrócitos de ave foram preparadas por meio da técnica de esfregaço, seguindo os procedimentos descritos por Hardie et al. (2002). Para tanto, foram colocados, com o auxílio de uma pipeta, 5 μ L do sangue de *G. domesticus* macho, no centro de uma lâmina bem limpa e seca. Uma segunda lâmina foi posicionada transversalmente em cima da gota, formando um ângulo de 45° com a primeira, fazendo que o sangue preenchesse o espaço entre as duas lâminas. A segunda lâmina foi levemente arrastada até uma das extremidades da primeira, criando uma fina camada de células sangüíneas. O mesmo procedimento foi realizado com o sangue da fêmea, em direção à outra extremidade da lâmina. As lâminas foram secadas ao ar e em chapa quente por 1 h, colocadas em cubetas contendo etanol 70% e armazenadas a -20 °C.

A metodologia para realização da reação de Feulgen em lâminas de eritrócitos foi adaptada de Haroske et al. (2001). As lâminas preparadas por meio da técnica de esfregaço foram deixadas, por 60 min, em solução fixadora de formaldeído 4%. Decorrido esse tempo, as lâminas foram lavadas em água corrente, durante 10 min, secadas ao ar e colocadas em solução de ácido

clorídrico (HCl) 5 M, a 25 °C, por tempos variando de 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 ou 60 min, para padronização do tempo de hidrólise adequado.

Após a hidrólise, as lâminas foram lavadas em água destilada por três trocas de 2 min, secadas ao ar e colocadas em câmara úmida, cobertas com Reativo de Schiff (5 g de Fucsina Básica (Merck), 15 mL de HCl 1 M, 2,23 g de $K_2S_2O_5$, 1 g de carvão ativo e 85 mL de água destilada). Após 12 horas, esse material foi lavado em água sulfurosa ($K_2S_2O_5$ 1%) por três trocas de 2 min e em água destilada por 1 min. As lâminas foram secadas ao ar e montadas com óleo de imersão (Carl Zeiss L25, com índice de refração = 1,525) e lamínula.

3.2.3. Preparo das lâminas de *Capsicum annuum* e *Pisum sativum*

As sementes de *C. annuum* cultivar Fortuna Super e de *P. sativum* cultivar Ctirad, utilizadas nos estudos de citometria de imagem, foram colocadas para germinar em placas de Petri contendo papel-filtro umedecido em água destilada. As sementes foram submetidas à germinação em temperatura de 28 – 30 °C, em BOD, no escuro. As raízes com comprimento entre 0,5 e 1,0 cm foram cortadas e colocadas em frascos contendo solução fixadora gelada de metanol-ácido acético 3:1. Após 10 min no *freezer*, foram efetuadas duas trocas da solução para assegurar a integridade do material. Uma vez fixadas, as raízes permaneceram armazenadas a -20 °C, durante 24 h, como recomendado por Vilhar et al. (2001). Após as 24 h, a solução fixadora foi substituída por solução de etanol 95% e armazenadas a -20 °C, conforme descrito por Greilhuber e Ebert (1994).

A reação de Feulgen em meristemas radiculares foi realizada segundo Greilhuber e Ebert (1994), com modificações. As raízes fixadas foram lavadas por 15 min em água destilada, à temperatura ambiente e colocadas em tubos de microcentrífuga Eppendorf contendo 1 mL de HCl 5 M. Os tubos foram mantidos em banho-maria, a 25 °C, por tempos variando entre 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75 e 80 min, para que fosse padronizado o tempo de hidrólise adequado. As raízes foram lavadas em água destilada por três trocas de 2 min, a fim de interromper a reação, as quais foram colocadas em tubos de

microcentrífuga Eppendorf contendo 1 mL de Reativo de Schiff (5 g de Fucsina Básica (Merck), 15 mL de HCl 1 M, 2, 23 g de $K_2S_2O_5$, 1 g de carvão ativo e 85 mL de água destilada), onde permaneceram por 24 h a 4 °C. Decorrido esse tempo, o material foi lavado durante 45 min em água sulfurosa ($K_2S_2O_5$ 1%), em temperatura ambiente.

As raízes de *Capsicum* e *Pisum* submetidas à reação de Feulgen foram colocadas sobre uma lâmina de vidro previamente limpa contendo uma gota de ácido acético 45%. Com o auxílio de um bisturi e de um microscópio estereoscópico, retirou-se a coifa da raiz e isolou-se o meristema radicular, sendo uma lamínula colocada sobre o material. Com o auxílio de papel-filtro e de um instrumento de ponta rombuda, realizou-se o esmagamento do meristema, após o que as lâminas foram incubadas a -20 °C, durante 30 min, sobre uma placa metálica. Procedeu-se, então, à retirada das lamínulas, com o auxílio de uma lâmina de barbear. As lâminas foram secadas ao ar, montadas com óleo de imersão (Carl Zeiss L25, com índice de refração = 1,525) e lamínula.

3.2.4. Análise de dados

O sistema de análise de imagem usado no presente estudo consistiu de um fotomicroscópio Olympus™, modelo BX60 com fonte de luz estabilizada, acoplado com uma câmera monocromática CCD de 12 bits, pertencente ao *kit* de análise de imagem Cool SNAP™. Utilizaram-se um filtro de interferência de cor verde (IF 550) e um filtro de densidade neutra (ND 6). Antes de cada captura foram realizados ajustes de microscopia, pelo método de *Köhler*, para a objetiva de 40 x, com abertura numérica 0,75. As imagens dos núcleos foram capturadas e processadas com o auxílio das ferramentas do programa Image Pro® Plus 4.5, do *kit* de análise de imagem Cool SNAP™. Uma curva de calibração foi obtida a partir de filtros certificados pela Edmund Industrial Optics, com DO = 0,15; 0,30; 0,40; 0,60; 0,90; e 2,50. O processamento da imagem foi segmentado para correção do *background* e os valores de DOI, calculados automaticamente pelo *software*.

Para a de CI em eritrócitos de *G. domesticus*, foram analisadas 24 imagens de captura (12 de macho e 12 de fêmea), que continham entre 50 e 100 núcleos de eritrócitos, em três lâminas-teste. As diferenças de DOI encontradas com relação a machos e fêmeas de *G. domesticus*, nos diferentes testes, foram submetidas à análise de variância. Os programas GENES (CRUZ, 2001) e SPSS 11.4 para Macintosh™ foram utilizados nas análises estatísticas.

No procedimento de citometria de imagem nos meristemas radiculares, o método prófase/telófase foi empregado, conforme Vilhar et al. (2001). Dez núcleos em prófases iniciais e 10 em telófases tardias foram selecionados em cada raiz e a DOI das classes telófases (2C) e prófases (4C), calculada.

A quantidade de DNA em picogramas (pg) foi calculada a partir dos valores de DOI das amostras e usando a seguinte equação:

$$2C_A = \frac{DOI_A \times 2C_P}{DOI_P}$$

$2C_A$ = Valor 2C da amostra;

$2C_P$ = Valor 2C do padrão;

DOI_A = DOI da amostra; e

DOI_P = DOI do padrão.

A conversão dos valores de conteúdo de DNA em megapares de bases (Mpb) para picogramas (pg) foi calculada de acordo com a equação descrita por Dole et al. (2003):

$$2C(pb) = (0,978 \times 10^9) \times 2C(pg)$$

4. RESULTADOS

4.1. Controle de qualidade do sistema óptico e digital

O teste de estabilidade do sistema de análise de imagens compreendeu a avaliação do tempo de aquecimento eletrônico do sistema. Utilizou-se nas análises um pixel cujas coordenadas eram 80.255 x 80.255. Um gráfico apresentando as medidas de DO vs tempo foi plotado (Figura 2). Por meio da análise visual dos dados exibidos foi possível concluir que o sistema utilizado no presente estudo estabilizou-se após os 12 min. A partir desse tempo, os valores de DO observados foram $0,414 \pm 0,001$ no núcleo e $0,018 \pm 0,001$ no pixel.

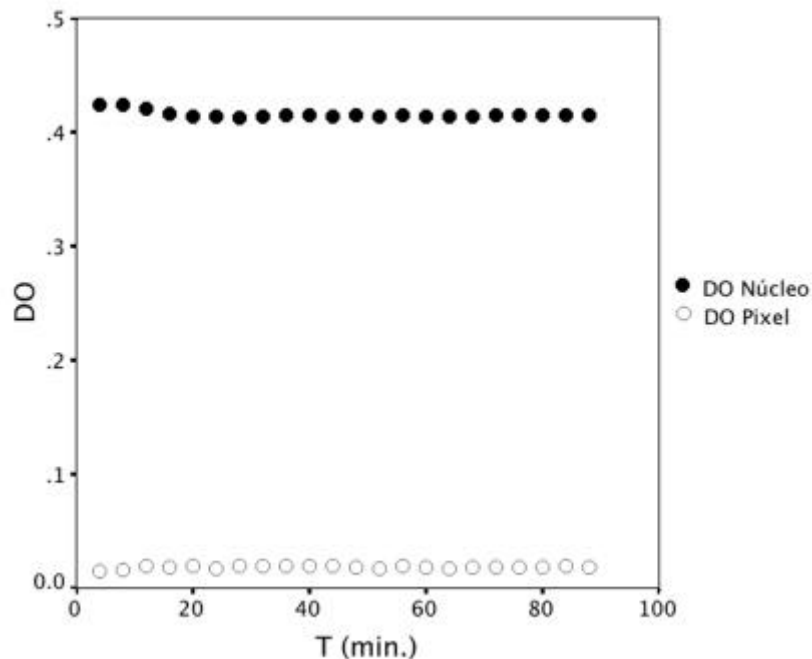


Figura 2 – Gráfico obtido da análise de estabilidade do sistema de análise de imagem. Os valores médios da densidade óptica (DO) do pixel e do núcleo foram considerados estáveis a partir do tempo de 12 min.

A linearidade do sistema foi avaliada por meio da comparação das medidas densitométricas dos filtros calculadas pelo *software* de análise de imagem, com base nos valores teóricos de DO dos filtros, certificados pela Edmund Industrial Optics.

As diferentes densidades neutras do *Stepped Density Filter* (Edmund Industrial Optics) observadas ao microscópio estão apresentadas na Figura 3.

O resultado da avaliação da linearidade do sistema utilizado neste estudo encontra-se na Figura 4 e as estimativas dos parâmetros que descrevem essa linearidade, no Quadro 4, juntamente com os valores recomendados para esse critério, propostos por Puech e Giroud (1999).

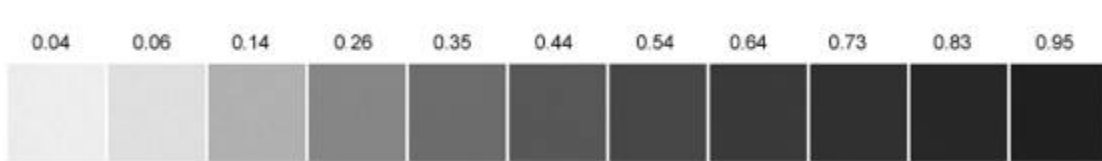


Figura 3 – Tons de cinza presentes no *Stepped Density Filter* (Edmund Industrial Optics) e respectivos valores de densidades neutras calibradas.

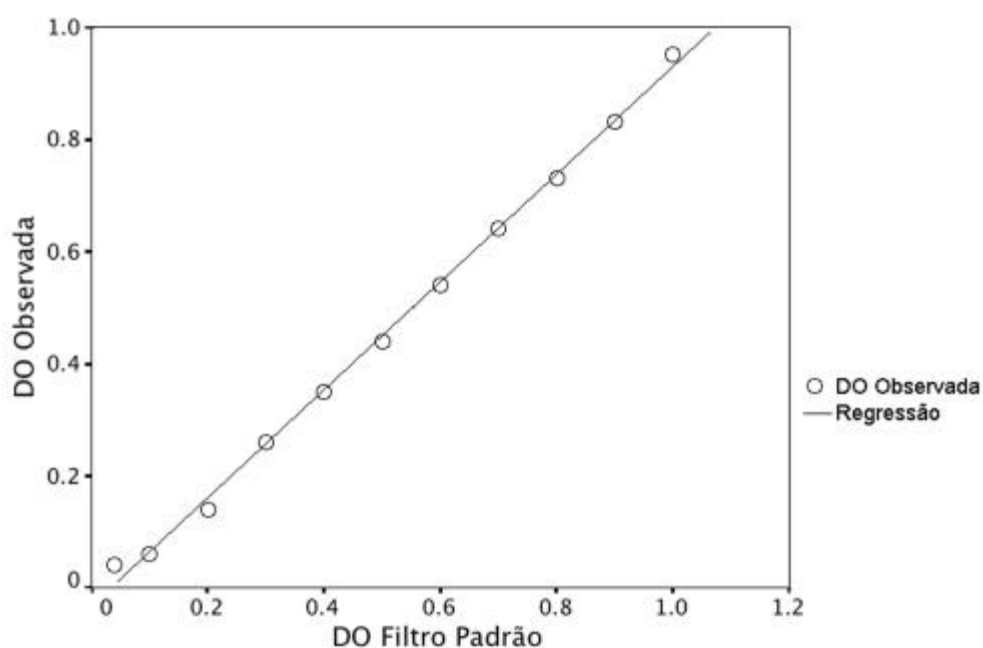


Figura 4 – Retra obtida da análise de regressão para avaliação da linearidade, verificando-se alta correlação entre os valores de densidade óptica (DO) observados e os valores certificados do filtro-padrão.

Quadro 4 – Parâmetros para avaliação da linearidade do sistema de análise de imagem

	Inclinação (a)	R²	SE
Valores recomendados	0,9 - 1,1	> 0,990	< 5%
Teste	0,96	0,9978	1,54%

Modelo $y = ax+b$; R^2 = coeficiente de determinação; e SE = erro-padrão.

A uniformidade das medidas de DOI foi estimada por meio do cálculo das DOI de uma amostra uniforme de núcleos, em diferentes partes do campo, como ilustrado na Figura 5. Obteve-se uma DOI média dos núcleos igual a 6,11 e CV igual a 0,68%.

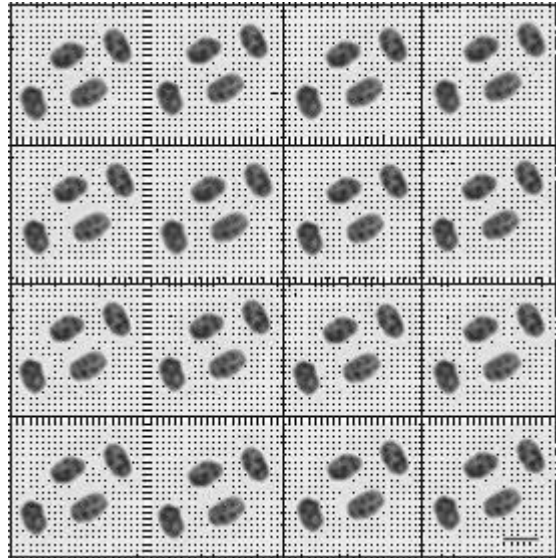


Figura 5 – Amostra de núcleos de *Gallus domesticus* 'Leghorn' utilizados para o teste de uniformidade da densidade óptica integrada (DOI) dos núcleos. Barra = 5 μm .

4.2. Aplicação das metodologias de citometria de imagem em eritrócitos de *Gallus domesticus*

As metodologias de preparo das lâminas, hidrólise e coloração adotadas foram consideradas adequadas para estudos de citometria de imagem, permitindo a determinação da DOI em cada núcleo (Quadro 5).

A coloração com Feulgen considerada adequada foi obtida em lâminas hidrolisadas por 45 min e expostas ao corante por 12 h. Períodos inferiores ou superiores de hidrólise resultaram em lâminas nas quais os núcleos estavam fracamente corados ou não puderam ser visualizados.

Obteve-se, nos núcleos de eritrócitos, as médias dos valores de DOI iguais a 7,52; 7,78; e 7,00 para machos e 7,30; 7,50; e 6,59 para fêmeas, nos ensaios 1, 2 e 3, respectivamente (Quadro 5). Os CVs entre os valores de DOI variaram de 2,1% a 2,6%.

Para verificar se as diferenças de DOI observadas entre machos e fêmeas de *G. domesticus* eram significativas, as médias dos valores obtidos nos três ensaios foram submetidas à análise de variância (Quadros 6). O teste F foi significativo a 5% de probabilidade para as características avaliadas, podendo-se concluir que as médias de DOI de machos e fêmeas diferiram entre si.

Transformando esses dados em valores relativos de conteúdo de DNA (Quadro 7), observou-se que a diferença identificada entre o valor 2C de galos e de galinhas foi de 4,32%.

Quadro 5 – Medidas da densidade óptica integrada (DOI) dos núcleos interfásicos de eritrócitos de *Gallus domesticus* 'Leghorn' obtidos nos ensaios 1, 2 e 3, acompanhados da média da DOI dos núcleos

<i>Gallus domesticus</i> 'Leghorn'						
Repetições	Ensaio 1		Ensaio 2		Ensaio 3	
	Macho	Fêmea	Macho	Fêmea	Macho	Fêmea
1	7,5836	7,2715	7,7258	7,4467	7,0057	6,6226
2	7,4822	7,1786	7,6905	7,4246	7,0153	6,5599
3	7,5064	7,3026	7,8800	7,4016	6,9885	6,6228
4	7,5009	7,2862	7,7887	7,4646	6,9339	6,6109
5	7,5060	7,2119	7,7658	7,4929	7,0203	6,4938
6	7,5042	7,3092	7,8674	7,4487	6,9957	6,6232
7	7,4702	7,2967	7,7278	7,5195	6,9148	6,6002
8	7,4154	7,2459	7,7230	7,5005	7,0083	6,4935
9	7,5180	7,3354	7,7759	7,4925	7,0211	6,6214
10	7,5511	7,3554	7,8195	7,5984	6,9702	6,6633
11	7,5888	7,3534	7,8216	7,6275	7,0455	6,5466
12	7,6394	7,4667	7,8206	7,5672	7,0447	6,6515
\bar{X}	7,5222	7,3011	7,7839	7,4987	6,9970	6,5925

\bar{X} = média.

Quadro 6 – Análise de variância da densidade óptica integrada (DOI) dos núcleos interfásicos de eritrócitos de *Gallus domesticus* ‘Leghorn’ obtidos nos ensaios 1, 2 e 3

FV	GL	SQ	QM	F
Sexo	1	1,6590	1,6590	443,3940*
Ensaio	2	9,2001	4,6000	1229,4316*
Sexo x Ensaio	2	0,1040	0,0520	13,9038*
Resíduo	66	0,2470	0,0037	
Total	71	11,2101		

* Significativo a 5% de probabilidade.

Quadro 7 – Valores relativos do conteúdo de DNA em *Gallus domesticus* ‘Leghorn’

Sexo	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Média
Fêmea	100,00	100,00	100,00	100,00
Macho	103,03	103,80	106,14	104,32

4.3. Determinação do conteúdo de DNA em *Capsicum annuum* por citometria de imagem

Uma vez estabelecidos os parâmetros para CI, o próximo passo foi aplicá-los em amostras *C. annuum* ‘Fortuna Super’, com o propósito de determinar o seu valor 2C.

As metodologias desenvolvidas para a fixação, hidrólise e coloração de pontas de raízes proporcionaram a obtenção de núcleos de células meristemáticas bem preservadas, com coloração considerada adequada para realização das medidas e determinação dos valores de DOI (Figura 6).

A coloração com Feulgen considerada adequada foi obtida em lâminas hidrolisadas por 60 min e coradas durante 12 h. Períodos inferiores e superiores de hidrólise resultaram lâminas em que os núcleos estavam fracamente corados ou não puderam ser visualizados.

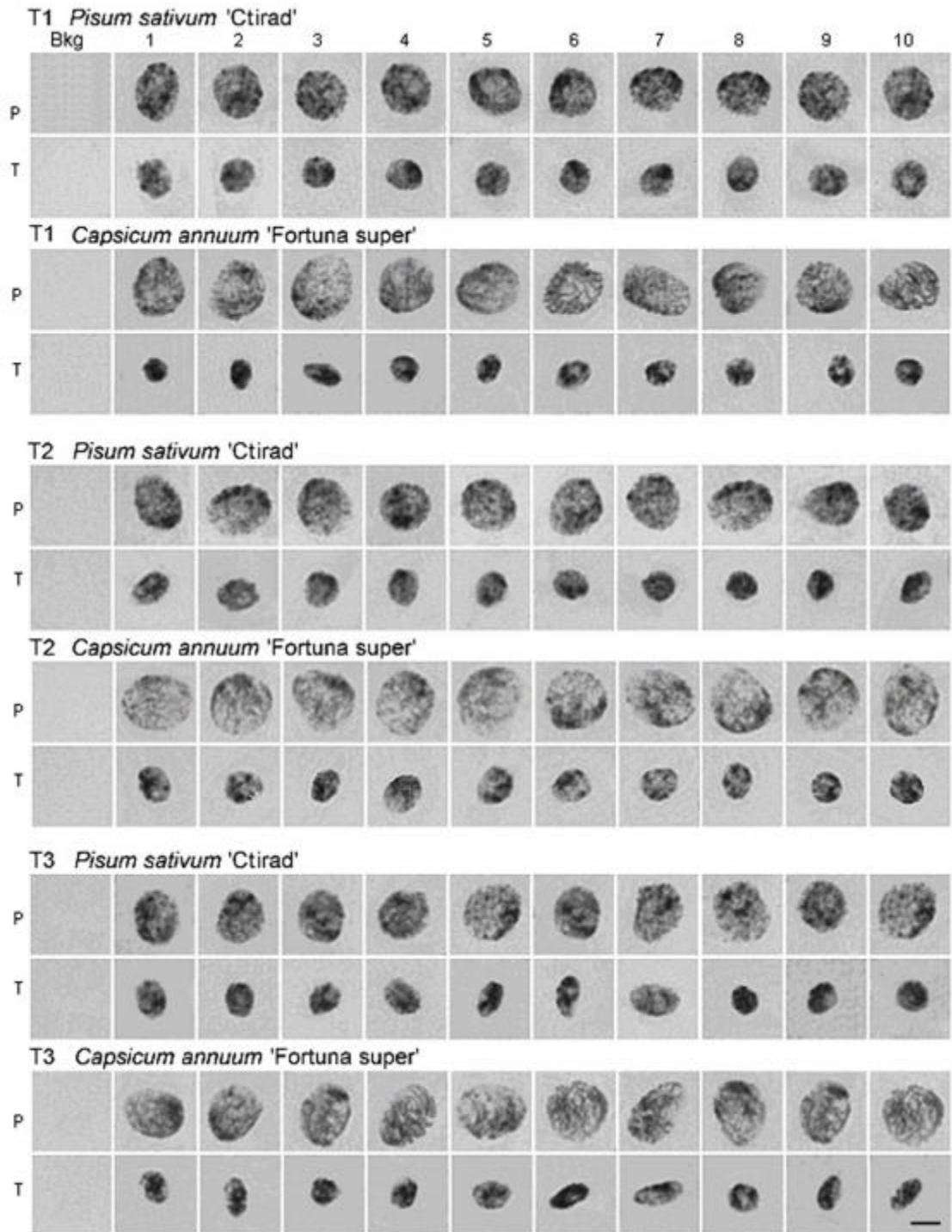


Figura 6 – Amostra do conjunto de imagens capturadas de núcleos de *Capsicum annuum* 'Fortuna Super' e do padrão *Pisum sativum* 'Ctirad', utilizada para fazer a medida da densidade óptica integrada (T1 = teste 1; T2 = teste 2; T3 = teste 3; Bkg = background; P = prófases; e T= telófases). Barra = 5 μ m.

As DOI calculadas dos núcleos de *C. annuum* 'Fortuna Super' e do padrão *P. sativum* 'Citrad', em três ensaios, estão apresentados nos Quadros 8 e 9.

Os valores de DOI médios obtidos dos núcleos em prófase de *C. annuum* foram 3,78; 3,67; e 3,68, nos ensaios 1, 2 e 3, respectivamente. Nas prófases de *P. sativum* analisadas, encontraram-se os valores 4,10, 3,95 e 3,93. As médias de DOI calculadas do material em telófase de *C. annuum* foram 1,78; 1,82; e 1,73 e das amostras de *P. sativum* foram 1,96; 1,92; e 1,90. Nos três ensaios realizados, obteve-se um CV inferior a 5%.

Com base nos valores descritos, foi calculada a razão entre o valor 4C, obtido a partir dos núcleos em prófase, e o valor 2C, fornecido pelas amostras em telófase (Quadro 10). A razão 4C/2C dos materiais de *C. annuum* e *P. sativum* foi igual a 2,1 nos ensaios 1 e 3. O ensaio 2 apresentou razão 4C/2C igual a 2,0 em *C. annuum* e 2,1 em *P. sativum*.

Calculou-se, também, a razão entre as DOI de *C. annuum* e *P. sativum* em cada ensaio, tanto nas prófases quanto nas telófases (Quadro 11), sendo o índice médio igual a 1,08. Por meio da aplicação da equação descrita anteriormente, obteve-se o valor 2C = 8,10 pg em *C. annuum* 'Fortuna Super'.

Quadro 8 – Valores de densidade óptica integrada (DOI) das amostras de núcleos de *Capsicum annuum* ‘Fortuna Super’ apresentados na Figura 6, acompanhados das respectivas médias e coeficientes de variação

<i>Capsicum annuum</i> ‘Fortuna Super’						
	Ensaio 1		Ensaio 2		Ensaio 3	
	Prófases	Telófases	Prófases	Telófases	Prófases	Telófases
1	3,6201	1,8797	3,4546	1,9683	3,5552	1,7139
2	3,8526	1,7523	3,5916	1,7470	3,5062	1,7600
3	3,8963	1,7505	3,5344	1,7810	3,6675	1,6703
4	3,7623	1,8217	3,4435	1,9797	3,7621	1,6644
5	3,8441	1,7971	3,5261	1,9444	3,6166	1,7428
6	3,7222	1,7371	3,8227	1,7562	3,7744	1,8947
7	3,8567	1,7308	3,9346	1,8287	3,5848	1,8014
8	3,7437	1,7118	3,7618	1,7958	3,8950	1,6997
9	3,7888	1,8467	3,9098	1,7633	3,6675	1,6833
10	3,6935	1,7544	3,7924	1,9539	3,7745	1,6673
\bar{X}	3,7780	1,7782	3,6772	1,8518	3,6804	1,7298
CV (%)	2,1640	2,9530	4,8400	4,9950	3,0980	4,0240

\bar{X} = média e CV = coeficiente de variação.

Quadro 9 – Valores de densidade óptica integrada (DOI) das amostras de núcleos de *Pisum sativum* 'Ctirad' apresentados na Figura 6, acompanhados das respectivas médias e coeficientes de variação

<i>Pisum sativum</i> 'Ctirad'						
	Ensaio 1		Ensaio 2		Ensaio 3	
	Prófases	Telófases	Prófases	Telófases	Prófases	Telófases
1	4,1510	1,8814	4,2008	1,8996	4,0267	1,9992
2	4,1006	1,8811	4,1128	2,0981	3,8545	1,9251
3	4,0567	1,8885	3,9495	1,9456	3,8078	1,8105
4	4,1756	2,0139	4,1661	1,8889	3,8741	1,9589
5	4,0925	2,0222	3,8160	1,9004	3,9478	1,7969
6	4,0304	1,8941	3,9000	1,8688	3,8456	1,7840
7	4,1327	2,0038	3,8158	1,8838	3,8846	2,0060
8	4,1415	1,9693	3,9911	1,8766	4,0326	1,8252
9	4,0184	2,0383	3,8601	1,9213	3,8495	1,8910
10	4,0845	2,0364	3,7033	1,9111	4,1946	2,0424
\bar{X}	4,0984	1,9629	3,9516	1,9194	3,9318	1,9039
CV (%)	1,2140	3,3210	3,9603	3,2960	2,8950	4,7870

\bar{X} = média e CV = coeficiente de variação.

Quadro 10 – Razão entre os valores de densidade óptica integrada (DOI) de prófases (4C) e telófases (2C) das amostras de *Capsicum annuum* 'Fortuna Super' e do padrão *Pisum sativum* 'Ctirad'

	Prófases (P)	Telófases (T)	P/T(4C/2C)
Ensaio 1 <i>C. annuum</i>	3,778	1,778	2,1
<i>P. sativum</i>	4,098	1,963	2,1
Ensaio 2 <i>C. annuum</i>	3,677	1,852	2,0
<i>P. sativum</i>	3,952	1,919	2,1
Ensaio 3 <i>C. annuum</i>	3,680	1,730	2,1
<i>P. sativum</i>	3,932	1,904	2,1

Quadro 11 – Índice ou razão entre as médias de densidade óptica integrada (DOI) da amostra de *Capsicum annuum* 'Fortuna Super' e o padrão *Pisum sativum* 'Ctirad'

	Índice	Prófases	Telófases
Ensaio 1 <i>P. sativum</i> / <i>C. annuum</i>		1,08	1,10
Ensaio 2 <i>P. sativum</i> / <i>C. annuum</i>		1,07	1,04
Ensaio 3 <i>P. sativum</i> / <i>C. annuum</i>		1,07	1,10
\bar{X}		1,08	1,08

\bar{X} = média.

5. DISCUSSÃO

5.1. Controle de qualidade do sistema óptico e digital

Segundo Hardie et al. (2002), o primeiro passo para a determinação do conteúdo de DNA por citometria de imagem envolve a preparação do microscópio, desde a limpeza das lentes ao *Köhler*. O microscópio deve estar em local que diminua as vibrações e conectado a um regulador de voltagem (HARDIE et al., 2002). No presente estudo, antes da obtenção de qualquer medida a limpeza completa das lentes e ajustes de microscopia pelo método de *Köhler* foram realizados, visando à minimização dos erros experimentais.

Além disso, utilizou-se, em todas as capturas, um filtro de interferência verde (IF 550) para que a luz incidente apresentasse comprimento de onda próximo ao da absorção máxima do reativo de Schiff (~560 nm). Segundo Hardie et al. (2002), a luz monocromática pode reduzir problemas associados a aberrações cromáticas em lentes de baixa qualidade e, ainda, aumentar o contraste entre o *background* e os objetos corados fracamente, embora a medida da densidade não seja afetada pelo uso de luz não filtrada. No entanto, os autores Fand e Spencer (1964), citados por Hardie et al. (2002), relataram que esse cuidado não é essencial, uma vez que medidas realizadas com comprimentos de onda fora do pico de absorção do Feulgen resultam nas mesmas proporções obtidas quando se utiliza comprimento de onda específico.

Da mesma forma, foi utilizado um filtro de densidade neutra (ND 6), uma vez que tem sido relatado que o uso de filtro promove a homogeneização da luz incidente, embora não sejam essenciais para a realização das medidas de DOI (HARDIE et al., 2002).

Os procedimentos de controle da qualidade do equipamento incluíram testes de estabilidade, linearidade e uniformidade das medidas de DOI ao longo da imagem de captura.

Para o início de cada sessão de obtenção de imagens, o sistema deve estar estável. Desse modo, a determinação do tempo necessário para a estabilização dos valores de DO fornecidas pelo sistema de análise de imagens é essencial. Na Figura 2, demonstrou-se que o sistema utilizado apresentou-se estável a partir de 12 min após ter sido ligado. A partir desse tempo, as medidas de DO observadas foram $0,414 \pm 0,001$ para o núcleo e $0,018 \pm 0,001$ para o pixel.

Vilhar e Dermastia (2002) realizaram teste semelhante, no qual apenas o tempo necessário para a estabilização de um pixel foi testado. Esses autores consideraram que as medidas de DO permaneciam estáveis a partir de 90 min, embora não tenham relatado a variação da DO a partir desse tempo. Essa diferença nos tempos gastos pelo sistema de análise de imagem para alcançar a estabilidade pode ser explicada, em parte, pela presença de um dispositivo de refrigeração no sistema utilizado para a realização do presente estudo. Segundo Pirard et al. (1999), a câmera apresenta aquecimento lento na ausência de dispositivo de refrigeração, e o aumento da temperatura provoca excitação eletrônica indesejável, que tem como consequência a oscilação dos valores de cinza gravados sob iluminação constante. O período de aquecimento de 12 min foi regularmente utilizado em todos os experimentos subsequentes.

A linearidade de um sistema de análise de imagem é uma importante característica que deve ser testada antes da quantificação de DNA ou de qualquer outro tipo de medida densitométrica (PUECH e GIROUD, 1999). Segundo Hardie et al. (2002), uma câmera com resposta linear é um dos componentes-chave do sistema de análise de imagem. Para o procedimento de medida da linearidade foram utilizadas lâminas de referência com valores de

densidade neutra certificados (PUECH e GIROUD, 1999; HARDIE et al., 2002). Segundo Puech e Giroud (1999), um sistema de análise de imagens ideal deve proporcionar uma relação linear representada por uma reta com inclinação igual a 1, o menor erro-padrão possível e um coeficiente de determinação (R^2) mais próximo possível de 1.

De acordo com os padrões utilizados na área médica, se a inclinação da reta é menor que 0,9 e maior que 1,1 e se o erro-padrão é maior que 5% e o coeficiente de determinação inferior a 0,99, o sistema avaliado não está qualificado para realização de medidas precisas do conteúdo de DNA (VILHAR e DERMASTIA, 2002). Observaram-se, no sistema utilizado neste estudo, R^2 igual a 0,9978 e erro-padrão igual a 1,54%, sendo a inclinação da reta igual a 0,96 (Quadro 4). Esses valores indicam que o sistema utilizado atendeu às condições de linearidade requeridas para a realização de medidas densitométricas.

Os valores descritos neste estudo são inferiores aos apresentados por Vilhar e Dermastia (2002), que obtiveram valores de erro-padrão entre 6,0% e 6,3%, superiores aos recomendados para estudos em CI. Essa divergência pode ser explicada, em parte, pelo fato de os autores terem utilizado imagens processadas em câmera colorida. Segundo Puech e Giroud (1999), sistemas compostos por câmeras coloridas apresentam desempenho inferior àqueles com câmeras monocromáticas.

Em alguns sistemas de análise de imagem, os valores digitalizados de uma amostra homogênea e uniformemente iluminada não são constantes (PUECH e GIROUD, 1999). Com isso, a DO dos objetos varia de acordo com o posicionamento destes na imagem de captura. McEachron et al. (1990), citados por Puech e Giroud (1999), relataram que esse fenômeno pode ocorrer em virtude de variações de sensibilidade da câmera, de oscilações na intensidade luminosa ou, ainda, de sinais breves nas partes eletrônicas.

No presente estudo, utilizou-se uma amostra de núcleos de eritrócitos de *G. domesticus* submetidos à reação de Feulgen para estimação das diferenças de DOI causadas pelo fenômeno anteriormente descrito, sendo obtido CV de 0,68%. Esse valor de CV observado é inferior ao limite de 3% recomendado por

Böcking et al. (1995) para análises de citometria de imagem para diagnóstico de câncer. Além disso, os valores apresentados são inferiores aos descritos por Hardie et al. (2002) e por Vilhar e Dermastia (2002), que relataram CV de aproximadamente 1% quando realizaram testes semelhantes.

Considerando esses valores, verificou-se que as diferenças na DOI decorrentes do posicionamento do núcleo dentro da imagem de captura eram relativamente pequenas. No entanto, uma área localizada na região central da imagem de captura foi demarcada e utilizada para posicionar os núcleos capturados para as análises posteriores. Com isso, os efeitos decorrentes da falta de uniformidade da iluminação foram minimizados, possibilitando a obtenção de dados mais acurados.

5.2. Aplicação das metodologias de citometria de imagem em eritrócitos de *Gallus domesticus*

A técnica de esfregaço empregada no presente trabalho proporcionou lâminas com qualidade adequada para citometria de imagem, em que os núcleos se apresentaram espalhados, com densidade de núcleos por campo constante, poucas sobreposições e no mesmo plano de foco. Esses fatores possibilitaram a distribuição homogênea do cromóforo no núcleo. Caso o cromóforo apresentasse distribuição não-homogênea, a medida de absorvância obtida em determinado ponto poderia não estar correlacionada com o conteúdo de DNA nuclear (CHIECO e DERENZINI, 1999).

A hidrólise é o passo crítico da reação de Feulgen mais conhecido (CHIECO e DERENZINI, 1999; GREILHUBER, 2005). O tempo de hidrólise deve ser determinado para cada material, a fim de evitar que haja interferência na coloração do DNA pela reação de Feulgen (CHIECO e DERENZINI, 1999). Durante a hidrólise ocorre formação de radicais aldeídos nas desoxirriboses, por meio da depurinação, essenciais por se associarem aos cromóforos presentes no reativo de Schiff (HARDIE et al., 2002).

No presente estudo, a coloração considerada adequada foi obtida em lâminas de eritrócitos expostas ao reativo de Schiff por 12 h e hidrolisadas por 45 min. Períodos inferiores e superiores de hidrólise resultaram lâminas em que os núcleos estavam fracamente corados ou não puderam ser visualizados. A eliminação de fragmentos de DNA em períodos de hidrólise superiores aos descritos e a ausência de grupos aldeídos em períodos inferiores dificultaram a coloração dos núcleos.

A aplicação das metodologias de coloração e a análise anteriormente descritas possibilitaram o cálculo da DOI para machos e fêmeas de *G. domesticus* (Quadro 5). As variações entre as médias de DOI observadas nos testes podem ser atribuídas a diferenças sutis de coloração, orientação e condições locais de *background*. Segundo Hardie et al. (2002), essas variações na DOI entre diferentes núcleos são esperadas.

Os CVs para os valores de DOI em aves variaram de 2,1% a 2,6%, indicando a adequação das metodologias de calibração do sistema óptico e digital, coloração e análise adotadas no presente estudo. Em diagnósticos de câncer feitos por CI, aceita-se um CV de até 5% (BÖCKING et al., 1995; HAROSKE et al., 1998; HAROSKE et al., 2001).

Os resultados da análise de variância (Quadro 7), referentes aos valores de DOI de *G. domesticus*, confirmaram a existência de diferenças significativas entre machos e fêmeas, a 5% de probabilidade. No entanto, observou-se também que a interação Sexo x Ensaio foi significativa. Fazendo-se a decomposição dessa interação (dados não mostrados), foi possível concluir que a interação observada era do tipo simples (CRUZ et al., 2004). Dessa forma, as diferenças entre as médias dos machos e fêmeas foram causadas pelas divergências no conteúdo de DNA em cada um dos testes realizados, embora diferenças de coloração pela reação de Feulgen e condições locais de *background* possam ter influenciado os valores de DOI.

Considerando os valores relativos de conteúdo de DNA apresentados no Quadro 6, observa-se uma diferença de aproximadamente 4,32% no conteúdo de DNA entre machos e fêmeas.

Embora não tenha sido relatado por alguns autores (RASCH et al., 1971; GALBRAITH et al., 1983; TIERSCH et al., 1989; TIERSCH e WACHTEL, 1991), diferenças no tamanho do genoma de machos e fêmeas são esperadas em espécies que apresentam heteromorfismo sexual (VINDELØV et al., 1983; De VITA et al., 1994).

Cariogramas de *G. domesticus* descritos na literatura (AUER et al., 1987; BLOOM et al., 1993; McQUEEN et al., 1998; LADJALI-MOHAMMEDI et al., 1999; MASABANDA et al., 2004) demonstraram que o cromossomo W, presente nas fêmeas, é menor que o Z. Desse modo, espera-se que núcleos de células de fêmea contenham menos DNA que os de machos de uma mesma espécie, considerando que o processo de compactação do DNA seja semelhante em ambos os sexos.

A diferença observada em valores de machos e fêmeas (4,32%) foi maior que a relatada por Vindeløv et al. (1983) (3,7%), Nakamura et al. (1990) (2%) e De Vita et al. (1994) (2,4%), que utilizaram metodologia de citometria de fluxo para avaliar o conteúdo de DNA de galos e galinhas. Essas divergências nas estimativas podem ser explicadas, em parte, pela utilização de diferentes metodologias para a quantificação de DNA.

Segundo Dole el (1997), a probabilidade de identificar diferenças pequenas no conteúdo de DNA de uma amostra depende da precisão da medida, que é caracterizada pelos valores de CVs dos picos observados nos histogramas, e do valor dessa diferença a ser identificada. Considerando-se a diferença de 2% no conteúdo de DNA relatada por Nakamura et al. (1990) e De Vita et al. (1994), o CV que permitiria detectar essa diferença, quando núcleos de machos e fêmeas fossem processados simultaneamente, é, no máximo, 1%. Brown et al. (1991), Dole el (1997) e Roux et al. (2003) concordam que CV entre 1% e 3% são considerados de alto nível de resolução, e, desse modo, difíceis de serem alcançados.

Outra forma de identificar a diferença entre machos e fêmeas é a realização do processamento de cada uma das amostras com um padrão interno cujo conteúdo de DNA seja semelhante, mas não igual (ROUX et al., 2003). No entanto, Vindeløv et al. (1983) relataram que esse tipo de

metodologia pode ser influenciado por oscilações do aparelho entre diferentes processamentos ou por mudanças no nível de ajustamento dos canais do citômetro de fluxo em que correm as amostras.

Um importante problema já identificado em estudos de tamanho de genoma é a presença de diferentes valores de conteúdo de DNA atribuídos a um mesmo padrão (Quadro 1). Segundo Dole et al. (1998), há necessidade de uma padronização dos valores de referência para quantificação, uma vez que o uso de diferentes padrões pode conduzir a estimativas do conteúdo de DNA divergentes, numa mesma espécie.

Esse problema tornou-se evidente quando o conteúdo de DNA absoluto foi simulado para galos e galinhas, utilizando-se os valores relativos descritos neste trabalho (Quadro 6) e os dados apresentados no Quadro 1.

Utilizando o valor $2C = 2,49$ pg para machos (NAKAMURA et al., 1990) como referência, calculou-se $2C = 2,39$ pg para fêmeas. Se, no entanto, for utilizado $2C = 3,01$ pg para galo (JOHNSTON et al., 1999), o valor obtido para galinha seria $2C = 2,88$ pg.

Bennett e Leitch (2005) relataram que todos os métodos utilizados para determinação do valor C estão sujeitos a erros técnicos ou de outra natureza. No entanto, esses autores sugerem que dados obtidos por meio do seqüenciamento completo do genoma estariam livres de tais erros e propõe a sua utilização para estimar o tamanho absoluto do genoma.

Segundo o *International Chicken Genome Consortium* (2004), o genoma de *Gallus gallus* apresenta 1,05 Gpb. Embora esta seja uma estimativa aproximada do valor real do número de bases de um genoma haplóide de fêmea, essa estimativa também foi utilizada para cálculo do conteúdo de DNA em picogramas. Os valores resultantes dos cálculos foram 2,15 pg para galinhas e 2,24 pg para galos. Tais valores são inferiores aos relatados por metodologias de CI, CF e químicas (Quadro 1). Tal diferença, em parte, pode ser atribuída a valores subestimados do conteúdo de DNA em Mpb, como relatado para o genoma de *Arabidopsis thaliana* por Bennett et al. (2003).

5.3. Determinação do conteúdo de DNA de *Capsicum annuum* por citometria de imagem

A técnica de esmagamento do meristema radicular empregada proporcionou a obtenção de lâminas com qualidade adequada para citometria de imagem, em que os núcleos se apresentaram dispersos e no mesmo plano de foco.

No presente estudo, a coloração dos núcleos de meristemas radiculares considerada adequada foram as obtidas com hidrólises de 60 min e tempo de coloração com reativo de Schiff igual a 12 h.

A razão 4C/2C não desviou em mais que 5% da taxa ideal 2,0 em nenhuma das amostras (Quadro 10), conforme recomendado (BÖCKING, 1995; KINDERMANN e HILGERS, 1994). Além disso, os CVs das medidas de DOI foram inferiores a 5%, seguindo os padrões recomendados para esse tipo de estudo (VILHAR et al., 2001).

Considerando os valores relativos apresentados no Quadro 11 e que o valor 2C para *Pisum sativum* 'Ctirad' é igual a 8,75 pg (DOLE EL et al., 1998), o valor absoluto do conteúdo de DNA em *C. annuum* 'Fortuna Super' é igual a 8,10 pg.

Os valores do conteúdo de DNA para *C. annuum* L. 'Fortuna Super', utilizando *Pisum sativum* 'Ctirad' como padrão, foram comparáveis ao anteriormente obtido por meio de análises por citometria de fluxo (índice = 1,10) do material nuclear foliar da mesma população de plantas, obtido por Martins e Carvalho (2004). O índice relatado por esses autores foi 2% maior que o calculado por citometria de imagem. Essa diferença é inferior à relatada por Moscone et al. (2003), que também realizaram quantificação de DNA por CI e CF em duas amostras provenientes da mesma população. Eles obtiveram diferenças de 4,8% para *C. annuum* e 2,4% para *C. pubescens*. Além disso, o valor 2C = 8,10 pg estimado por CI difere em 16% dos observados por Bennett e Smith (1976), cujo valor 2C médio obtido para *C. annuum* foi de 9,40 pg, utilizando-se metodologias de coloração com Feulgen. Esse valor superior pode ser explicado, em parte, pela utilização do padrão *Allium cepa*, cujo valor 2C =

33,5 pg. A utilização de padrões com conteúdo de DNA muito superiores ou inferiores ao da amostra pode conduzir a problemas de linearidade durante o processamento, influenciando os valores 2C encontrados (DOLE EL et al., 1992).

Moscone et al. (2003), também utilizando metodologias de CI e o mesmo padrão usado por Bennett e Smith (1976), relataram valores 2C, em picogramas, 28% menores (6,32 pg) que os encontrados no presente trabalho em amostras de *C. annuum*.

As diferenças entre os resultados obtidos por Bennett e Smith (1976) e por Moscone et al. (2003), utilizando os mesmos padrões, são de aproximadamente 49%. Valores tão divergentes podem ser atribuídos a variações metodológicas, como diferenças nas preparações citológicas e nas metodologias de coloração, ou por variações intra-específicas no conteúdo de DNA.

O baixo valor (2C = 5,52) obtido por Galbraith et al. (1983), comparado com o valor encontrado no presente trabalho (8,10 pg), pode ser atribuído à utilização de mitramicina como fluorocromo para CF. Esse corante liga-se especificamente em regiões ricas em guanina e citosina e, desse modo, pode conduzir a diferentes estimativas do valor 2C (Schweizer, 1976, citado por MOSCONE et al., 2003), não sendo recomendado para análises citométricas por não permitir a identificação de pequenas diferenças no conteúdo de DNA (MICHAELSON et al., 1991).

A utilização de núcleos de eritrócitos de ave (2C = 2,33 pg) como padrão também pode justificar parte das divergências encontradas quando os valores descritos por Galbraith et al. (1983) e por Arumuganathan e Earle (1991) são comparados com as estimativas obtidas no presente estudo. Essa divergência pode ser justificada, em parte, pela utilização de padrões de células animais. Embora os núcleos de eritrócitos de ave tenham sido utilizados em muitas investigações (GALBRAITH et al., 2003; ARUMUGANATHAN e EARLE, 1991; MARIE e BROWN, 1993; BENNETT e LEITCH, 1995; ROUX et al., 2003) para quantificação de DNA em plantas, eles não são considerados adequados, pois apresentam conteúdo de DNA inferior à de muitas espécies vegetais

(MICHAELSON et al., 1991). Além disso, eles não constituem um padrão interno verdadeiro e podem apresentar valores de fluorescência divergentes em diferentes amostras, embora o conteúdo de DNA seja aparentemente o mesmo (JOHNSTON et al., 1999). Dessa forma, o uso de células vegetais como padrões internos para quantificação de DNA em plantas é recomendado (PRICE et al., 1988; JOHNSTON et al., 1999).

6. CONCLUSÕES

Nos procedimentos utilizados para a quantificação de DNA nuclear por citometria de imagem (CI) foi essencial o controle de todos os passos dos experimentos, da fixação aos procedimentos de determinação da DOI. Dada a não-existência de critérios bem estabelecidos para estudos de CI em plantas, os padrões de qualidade adotados foram os descritos para humanos, uma vez que constituem critérios gerais para a quantificação de DNA.

As metodologias descritas para a avaliação do sistema de análise de imagens, que incluíram os testes de estabilidade, linearidade e uniformidade das medidas de DOI dos núcleos, asseguraram a adequação do sistema de análise de imagens utilizado na realização de medidas densitométricas.

Os procedimentos metodológicos adotados na citometria de imagem, envolvendo o preparo do material citogenético, a fixação, a reação de hidrólise e a etapa de coloração do DNA pela reação de Feulgen, foram apropriados para obtenção dos valores de densidade óptica integrada (DOI), que foram convertidos em unidades de picogramas.

A calibração adequada dos equipamentos de microscopia e de análise de imagem, bem como o controle de todas as etapas da citometria de imagem, permitiu verificar diferenças de conteúdo de DNA entre machos e fêmeas de *Gallus domesticus*. A análise de variância das médias de densidade óptica integrada apresentou evidências de que essa diferença era significativa a 5% de

probabilidade. Concluiu-se, portanto, que o conteúdo de DNA de machos de *G. domesticus* é 4,32% maior que o das fêmeas. Tal diferença foi atribuída ao heteromorfismo dos cromossomos sexuais presentes nessa espécie.

As metodologias adotadas para estudos de quantificação de DNA em *Capsicum annuum* L. 'Fortuna Super' possibilitaram a determinação do valor $2C = 8,10$ pg. Esse valor foi 2% inferior ao relatado para núcleos da mesma população de plantas, por citometria de fluxo. Essa pequena diferença entre os valores mencionados demonstra a adequação da metodologia de CI para determinação do valor C de plantas, com a vantagem de que as análises podem ser feitas utilizando-se uma pequena quantidade de núcleos da amostra.

A citometria de imagem, conforme realizada, apresenta, dessa forma, potencial aplicação em estudos de plantas utilizando-se apenas uma única ponta de raiz, o que permite determinar o seu valor $2C$, em picogramas, e identificar eventuais variações nesse valor. Tal metodologia também pode ser aplicada em amostras provenientes de cultura de tecidos vegetais ou no monitoramento de materiais submetidos a substâncias que podem alterar o ciclo celular, com o propósito de identificar precocemente possíveis variações no conteúdo de DNA desses materiais.

A determinação do conteúdo de DNA também pode ser aplicada na identificação de híbridos interespecíficos e de plantas poliplóides, além de auxiliar a caracterização genealógica de um indivíduo, podendo, portanto, ser utilizada em programas de melhoramento. Além disso, informações referentes ao tamanho do genoma são particularmente úteis em "projetos-genoma", uma vez que esse dado permite definir as estratégias a serem seguidas para o seqüenciamento.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, P. M.; CARVALHO, C. R. NOR-associated heterochromatin of pepper chromosomes stained with acridine orange. **Caryologia**, v. 57, n. 2, p. 172-176, 2004.

ARUMUGANATHAN, K.; EARLE, E. D. Nuclear DNA content of some important plant species. **Plant Molecular Biology Reports**, v. 9, p. 208-218, 1991.

AUER, H.; MAYR, B.; LAMBROU, M.; SCHLEGER, W. An extended chicken karyotype, including the NOR chromosome. **Cytogenetics and Cell Genetics**, v. 45, p. 218-221, 1987.

BELLETTI, P.; MARZACHÌ, C.; LANTERI, S. Flow cytometric measurement of nuclear DNA content in *Capsicum* (Solanaceae). **Plant Systematics and Evolution**, v. 209, p. 85-91, 1998.

BENNETT, M. D.; LEITCH, I. J. Nuclear DNA amounts in angiosperms. **Annals of Botany**, v. 76, p. 113-176, 1995.

BENNETT, M. D.; LEITCH, I. J. Plant genome size research: a field in focus. **Annals of Botany**, v. 95, p. 1-6, 2005.

BENNETT, M. D.; LEITCH, I. J.; PRICE, H. J.; JOHNSTON, J. S. 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. **Annals of Botany**, v. 91, p. 547-557, 2003.

BENNETT, M. D.; SMITH, J. D. Nuclear DNA amounts in angiosperms. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B – Biological Sciences**, v. 274, p. 227-274, 1976.

BERTÃO, M. R. **Evolução cariotípica no gênero *Capsicum* (Solanaceae)**. Piracicaba, SP: ESALQ, 1993. 148 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura Luíz de Queiroz, Piracicaba.

BLOOM, S. E.; DELANY, M. E.; MUSCARELLA, D. E. Constant and variable features of avian chromosomes. In ETCHES, R. J.; GIBBONS, A. M. V. (Eds.). **Manipulation of the avian genome**. Boca Raton: CRC Press, 1993. p. 39-59.

BÖCKING, A.; GIROUD, F.; REITH, A. Consensus report of ESACP task force on standardization of diagnostic DNA image cytometry. **Analytical Cellular Pathology**, v. 8, p. 67-74, 1995.

BROWN, S. C.; DEVAUX, P.; MARIE, D.; BERGOUNIOUX, C.; PETIT, P. X. Analyse de la ploïdie par cytométrie en flux. **Cahier**, v. 105, n. 47, p. 1-16, 1991.

CHIECO, P.; DERENZINI, M. The Feulgen reaction 75 years on. **Histochemistry and Cellular Biology**, v. 111, p. 345-358, 1999.

CLARINDO, W. R. **Avaliação de agregados celulares de café (*Coffea* spp.) por técnicas citométricas e citogenéticas**. Viçosa, MG: UFV, 2004. 83 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

COEN, H.; PAUWELS, M.; ROELS, F. The rat liver cell nuclear imprinting as a standard for DNA measurements. **Analytical Cellular Pathology**, v. 4, p. 273-285, 1992.

CRUZ, C. D. **Programa genes** – Versão Windows: Aplicativo computacional em genética e estatística, Viçosa, MG: Editora UFV, 2001. 648 p.

CRUZ, C. D.; REGAZZI, A. J.; CARNEIRO, P. C. S. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. 3. ed. Viçosa, MG: Editora UFV, 2004. v. 1, 480 p.

De VITA, R.; CABALLO, D.; ELEUTERI, P.; DELLOMO, G. Evaluation of interspecific DNA content variation and sex identification in Falconiformes and Strigiformes by flow cytometric analysis. **Cytometry**, v. 16, p. 346-350, 1994.

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

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

DOLE EL, J.; BARTOŠ, J.; VOGLMAYR, H.; GREILHUBER, J. Nuclear DNA content and genome size of trouts and human. **Cytometry**, v. 51, n. A, p. 127-128, 2003.

DOLE EL, J.; GREILHUBER, J.; LUCRETTI, S.; MEISTER, A.; LYSÁK, M. A.; NARDI, L.; OBERMAYER, R. Plant genome size estimation by flow cytometry: inter-laboratory comparison. **Annals of Botany**, v. 82, p. 17-26, 1998.

DOLE EL, J.; SGORBATI, S.; LUCRETTI, S. Comparison of three DNA fluorochromes for flow cytometric estimation of nuclear DNA content in plants, **Physiologia Plantarum**, v. 85, p. 625-631, 1992.

FAO. **Agricultural production data collection**. 2003. Disponível em: <<http://apps.fao.org>>. Acesso em: 20 dez 2005.

FONTES, B. P. D. **Citogenética, citometria de fluxo e citometria de imagem em *Coffea spp.*** Viçosa, MG: UFV, 2003. 130 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

GALBRAITH, D. W.; HARKINS, K. R.; MADDOX, J. M.; AYRES, J. M.; SHARMA, D. P.; FIROOZABADY, E. Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissue. **Science**, v. 220, p. 1049-1051, 1983.

GREILHUBER, J. Intraspecific variation in genome size in angiosperms – identifying its existence. **Annals of Botany**, v. 95, p. 91-98, 2005.

GREILHUBER, J.; EBERT, I. Genome size variation in *Pisum*. **Genome**, v. 37, p. 646-655, 1994.

GRÜTZNER, F.; ZEND-AJUSH, E.; STOUT, K.; MUNSHE, S.; NIVELEAU, A.; NANDA, I.; SCHIMID, M.; HAAF, T. Chicken microchromosomes are hypermethylated and can be identified by specific painting probes. **Cytogenetics and Cell Genetics**, v. 93, p. 265-269, 2001.

HARDIE, D. C.; GREGORY, T. R.; HEBERT, P. D. N. From pixels to picograms: a beginners' guide to genome quantification by Feulgen image analysis densitometry. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 50, n. 6, p. 735-749, 2002.

HAROSKE, G.; BAAK, J. P. A.; DANIELSEN, H.; GIROUD, F. GSCHWENDTNER, A.; OBERHOLZER, M.; REITH, A.; SPIELER, P.; BÖCKING, A. Fourth updated ESACP consensus report on diagnostic DNA image cytometry. **Analytical Cellular Pathology**, v. 23, p. 89-95, 2001.

HAROSKE, G.; GIROUD, F.; REITH, A.; SPIELER, P.; BÖCKING, A. 1997 ESACP consensus report on diagnostic image cytometry. Part I: Basic considerations and recommendations for preparation, measurement and interpretation. **Analytical Cellular Pathology**, v. 17, p. 189-200, 1998.

INTERNATIONAL CHICKEN GENOME CONSORTIUM. Sequence and comparative analysis of the chicken genome provide unique perspectives on vertebrate evolution. **Nature**, v. 432, p. 695-716, 2004.

JOHNSTON, J. S.; BENNETT, M. D.; RAYBURN, A. L.; GALBRAITH, D. W.; PRICE, H. J. Reference standards for determination of DNA content of plant nuclei. **American Journal of Botany**, v. 86, p. 609-613, 1999.

KINDERMAN D.; HILGERS, C. H. Glare correction in DNA image cytometry. **Analytical Cellular Pathology**, v. 6, p. 165-180, 1994.

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 Pathology**, v. 5, n. 6, p. 655-660, 1992.

KJELLSTRAND, P. P. T. Temperature and acid concentration in the search for optimum Feulgen hydrolysis conditions. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 25, p. 129-134, 1977.

LADJALI-MOHAMMEDI, K.; BITGOOD, J. J.; TIXIER-BOICHARD, M.; PONCE DE LEON, F. A. International system for standardized avian karyotypes (ISSAK): standardized banded karyotypes of the domestic fowl (*Gallus domesticus*). **Cytogenetics and Cell Genetics**, v. 86, p. 271-276, 1999.

MARIE, D.; BROWN, S. C. A cytometric exercise in plant DNA histograms, with 2C values for 70 species. **Biology of the Cell**, v. 78, p. 41-51, 1993.

MARTINS, F. A.; CARVALHO, C. R.; ALMEIDA, P. M. Determinação da quantidade de DNA e variação interespecífica em *Capsicum annuum* L. In: CONGRESSO NACIONAL DE GENÉTICA, 50., 2004, Florianópolis, SC. **Resumos...** Florianópolis, 2004. (CD-ROM).

MASABANDA, J. S.; BURT, D. W.; O'BRIEN, P. C. M.; VIGNAL, A.; FILLON, V.; WALSH, P. S.; COX, H.; TEMPEST, H. G.; SMITH, J.; HABERMANN, F.; SCHMIDT, M.; MATSUDA, Y.; FERGUSON-SMITH, M. A.; CROOIJMANS, R. P. M. A.; GROENEN, M. A. M.; GRIFFIN, D. K. Molecular cytogenetic definition of the chicken genome: the first complete avian karyotype. **Genetics**, v. 166, p. 1367-1373, 2004.

McLEOD, M. J.; ESHBAUGH, W. H.; GUTTMAN, S. I.; RAYLE, R. E. An electrophoretic study of evolution in *Capsicum* (Solanaceae). **Evolution**, v. 37, p. 562-574, 1983.

McQUEEN, H. A.; SIRIACO, G.; BIRD, A. P. Chicken microchromosomes are hyperacetylated, early replicating and gene rich. **Genome Research**, v. 8, p. 621-630, 1998.

MICHAELSON, M. J.; PRICE, H. J.; ELLISON, J. R.; JOHNSTON, J. S. Comparison of plant DNA contents determined by Feulgen microspectrophotometry and laser flow cytometry. **American Journal of Botany**, v. 78, n. 2, p. 183-188, 1991.

MOSCONE, E. A.; LOIDL, J.; EHRENDORFER, F.; HUNZIKER, A.T. Analysis of active nucleolus organizing regions in *Capsicum* (Solanaceae) by silver staining. **American Journal of Botany**, v. 82, p. 276-287, 1995.

MOSCONE, E.; BARANYI, M.; EBERT, I.; GREILHUBER, J.; EHRENDORFER, F.; HUNZIKER, A. Analysis of nuclear DNA content in *Capsicum* (Solanaceae) by flow cytometry and Feulgen densitometry. **Annals of Botany**, v. 92, p. 21-29, 2003.

MOTLEY, J.; YOKOYA, K.; ROBERTS, A. V. "D- flowering" – The flow cytometry of plant DNA. In: DIAMOND, R. A.; DeMAGGIO, S. (Eds.). **In living color** – Protocols in flow cytometry and cell sorting. [S. l.]: Springer Lab Manual, 2000. p. 391-420.

NAKAMURA, D.; TIERSCH, T. R.; DOUGLASS, M.; CHANDLER, R. W. Rapid identification of sex in birds by flow cytometry. **Cytogenetics and Cell Genetics**, v. 53, p. 201-205, 1990.

NOIROT, M.; BARRE, P.; DUPERRAY, C.; LOUARN, J.; HAMON, S. Effects of caffeine and chlorogenic acid on propidium iodide accessibility to DNA: consequences on genome size evaluation in coffee tree. **Annals of Botany**, v. 92, p. 259-264, 2003a.

NOIROT, M.; BARRE, P.; LOUARN, J.; DUPERRAY, C.; HAMON, S. Consequences of stoichiometric error on nuclear DNA content evaluation in *Coffea liberica* var. *dewevrei* using DAPI and propidium iodide. **Annals of Botany**, v. 89, p. 385-389, 2002.

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. **Annals of Botany**, v. 86, p. 309-316, 2000.

NOIROT, M.; PONCET, V.; BARRE, P.; HAMON, P.; HAMON, S.; KOCHKO, A. Genome size variations in diploid african *Coffea* species. **Annals of Botany**, v. 92, p. 709-714, 2003b.

PARAN, I.; AFTERGOOT, E.; SHIFRISS, C. Variation in *Capsicum annuum* revealed by RAPD and AFLP markers. **Euphytica**, v. 99, p. 167-173, 1998.

PICKERSGILL, B. Cytogenetics and evolution of *Capsicum* L. In: TSUCHIYA, T.; GUPTA, P. K. (Eds.). **Chromosome engineering in plants: genetics, breeding, evolution**, part B. Amsterdam: Elsevier, 1991. p. 139-160.

PIRARD, E.; LEBRUN, V.; NIVART, J. F. Optimal acquisition of video images in reflected light microscopy. **European Microscopy and Analysis**, v. 60, p. 9-11, 1999.

PRICE, H. J. DNA content variation among higher plants. **Annals of Missouri Botany Garden**, v. 75, p. 1248-1257, 1988.

PRINCE, J. P.; POCHARD, E.; TANKSLEY, S. D. Construction of a molecular linkage map of pepper and a comparison of synteny with tomato. **Genome**, v. 36, p. 404-417, 1993.

PUECH, M.; GIROUD, F. Standardisation of DNA quantitation by image analysis: quality control of instrumentation. **Citometry**, v. 36, p. 11-17, 1999.

RASCH, E. M.; BARR, H. J.; RASH, R. W. The DNA content of sperm of *Drosophila melanogaster*. **Chromosoma**, v. 33, p. 1-18, 1971.

REIFSCHNEIDER, F. J. B. **Capsicum**. Pimentas e pimentões no Brasil. Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia/Embrapa Hortaliças, 2000. 113 p.

ROSADO, T. B. **Análise citogenética de cromossomos B de milho (*Zea mays* L.) associada às citometrias de fluxo e de imagem**. Viçosa, MG: UFV, 2004. 71 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

ROUX, N.; TOLOZA, A.; RADECKI, Z.; ZAPATA-ARIAS, F. J.; DOLE EL, J. Rapid detection of aneuploidy in *Musa* using flow cytometry. **Plant Cell Reports**, v. 21, p. 483-490, 2003.

SANTANA, M. J.; CARVALHO, J. A.; FAQUIN, V.; QUEIROZ, T. M. Produção do pimentão (*Capsicum annuum* L.) irrigado sobre diferentes tensões de água no solo e doses de cálcio. **Ciências Agrotécnicas**, v. 28, n. 6, p. 1385-1391, 2004.

SCHIMID, M.; ENDERLE, E.; SCHINDLER, D.; SCHEMPP, W. Chromosome banding and DNA replication patterns in bird karyotypes. **Cytogenetics and Cell Genetics**, v. 52, p. 139-146, 1989.

STUBBLEFIELD, E.; ORRO, J. The isolation of specific chicken macrochromosomes by zonal centrifugation and flow sorting. **Cytometry**, v. 2, p. 273-281, 1982.

TIERSCH, T. R.; CHANDLER, R. W.; WACHTEL, S. S.; ELIAS, S. Reference standards for flow cytometry and application in comparative studies of nuclear DNA content. **Cytometry**, v. 10, p. 706-710, 1989.

TIERSCH, T. R.; WACHTEL, S. S. On the evolution of genome size in birds. **The Journal of Heredity**, v. 82, p. 363-368, 1991.

VILHAR, B.; DERMASTIA, M. Standardization of instrumentation in plant DNA image cytometry. **Acta Botanica Croatica**, v. 61, n. 1, p. 11-26, 2002.

VILHAR, B.; GREILHUBER, J.; KOCE, J. D.; TEMSCH, E. M.; DERMASTIA, M. Plant genome size measurement with DNA image cytometry. **Annals of Botany**, v. 87, p. 719-728, 2001.

VINDELØV, L. L.; CHRISTENSEN, I. J.; NISSON, N. I. Standardization of high-resolution flow cytometric DNA analysis by the simultaneous use of chicken and trout red blood cells as internal reference standards. **Cytometry**, v. 3, p. 328-331, 1983.

VOLGMAYR, H.; GREILHUBER, J. Genome size determination in Peronosporales (Oomycota) by Feulgen Image Analysis. **Fungal Genetics and Biology**, v. 25, p. 181-195, 1998.