

CAROLINA RIBEIRO DINIZ BOAVENTURA

**QUANTIFICAÇÃO DO CONTEÚDO DE DNA
NUCLEAR DE *Eucalyptus* spp. POR
CITOMETRIAS DE FLUXO E 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
2005**

CAROLINA RIBEIRO DINIZ BOAVENTURA

**QUANTIFICAÇÃO DO CONTEÚDO DE DNA
NUCLEAR DE *Eucalyptus* spp. POR
CITOMETRIAS DE FLUXO E 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: 16 de dezembro de 2005

Prof. Wagner Campos Otoni
(Conselheiro)

Prof. Luis Sérgio Saraiva

Dr^a. Eveline Teixeira Caixeta

Prof. Cosme Damião Cruz

Prof. Carlos Roberto de Carvalho
(Orientador)

Aos meus pais Willer e Simone,
à minha irmã Camila,
ao meu companheiro Evandro.

“Tenho apenas duas mãos e o sentimento do mundo...”

Carlos Drummond de Andrade.

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 orientação e ensinamentos.

Aos meus conselheiros, prof. Wagner Campos Otoni e prof. Sérgio Hermínio Brommonschenkel, pelo exemplo e pela colaboração no desenvolvimento do trabalho.

Ao prof. Lyderson Facio Viccini, pela amizade, incentivo, conselhos, paciência e pela contribuição à minha formação acadêmica.

Ao prof. Cláudio Horst Bruckner, pelo apoio, exemplo e conselhos.

Aos colegas do Laboratório de Citogenética e Citometria Vegetal, Milene, Isane, Maria Andréia, Wellington, Fernanda e Isabela pelo auxílio técnico, disposição e convivência no ambiente de trabalho.

À Tatiana, Leonardo, Ionara, Ângela e Leonarda, pela amizade e pelos momentos de descontração e companheirismo.

A todos os amigos do curso de Genética e Melhoramento, da turma de biologia UFJF, Rose Ballet, Real Ballet e do COTEOM, que contribuíram para minimizar os momentos difíceis desta caminhada.

A todos os meus familiares, principalmente minhas tias, primos e avós, pelo carinho, compreensão de tanto tempo ausente e pelas orações.

Meu especial agradecimento ao meu companheiro Evandro, pelo amor, pelos bons momentos de convívio, pelo incentivo, pela disponibilidade, pelos conselhos e pela força nos instantes difíceis.

Àqueles que constituem a base desta conquista. Meus pais, Willer Diniz Boaventura e Simone Ribeiro, e minha irmã Camila Ribeiro Diniz Boaventura, pelo carinho, apoio e amizade, pelo amor incondicional, incentivo, dedicação, por aceitarem minhas decisões e pelas lições de vida.

BIOGRAFIA

Carolina Ribeiro Diniz Boaventura, filha de Willer Diniz Boaventura e Simone Ribeiro, nasceu no dia 01 de maio de 1982, em Divinópolis - MG.

Em 2000 ingressou na Universidade Federal de Juiz de Fora, graduou-se licenciada em setembro de 2003 e bacharel em 2004 no curso Ciências Biológicas.

Durante a graduação, foi bolsista do programa de extensão “A Vida no Palco” do laboratório de Ecologia, bolsista em Treinamento Profissional “Caracterização genética e propagação de espécies vegetais” do laboratório de Genética, onde desenvolveu atividades de pesquisa em Citogenética Vegetal, e monitora bolsista da disciplina Genética Básica.

Em março de 2004, iniciou o Mestrado em Genética e Melhoramento na Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se à defesa de tese em dezembro de 2005.

CONTEÚDO

| | |
|---|------|
| RESUMO | viii |
| ABSTRACT | x |
| 1 - INTRODUÇÃO | 1 |
| 1.1 - Aspectos gerais do gênero <i>Eucalyptus</i> | 1 |
| 1.2 – Quantificação do conteúdo de DNA nuclear em plantas | 3 |
| 1.2.1 – Aspectos gerais da citometria de fluxo | 4 |
| 1.2.2 – Aspectos gerais da citometria de imagem | 8 |
| 1.2.3 – Aplicação no gênero <i>Eucalyptus</i> | 11 |
| 2- OBJETIVOS | 15 |
| 3- MATERIAL E MÉTODOS | 16 |
| 3.1 - Material | 16 |
| 3.2 - Métodos | 16 |
| 3.2.1 - Citometria de fluxo | 16 |
| 3.2.1.1 - Extração dos núcleos | 17 |
| 3.2.1.2 - Coloração com iodeto de propídeo | 18 |
| 3.2.1.3 - Processamento no citômetro de fluxo | 19 |
| 3.2.1.4 - Estimativa do conteúdo de DNA | 19 |
| 3.2.2 - Citometria de imagem | 20 |
| 3.2.2.1 - Hidrólise e coloração pela reação de Feulgen | 20 |
| 3.2.2.2 - Preparo das lâminas pela técnica de esmagamento | 20 |
| 3.2.2.3 - Análise dos dados | 21 |
| 4 - RESULTADOS | 23 |
| 4.1 - Citometria de fluxo | 23 |
| 4.2 - Citometria de imagem | 32 |
| 5 - DISCUSSÃO | 42 |
| 6 - CONCLUSÕES | 51 |
| 7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 52 |

RESUMO

BOAVENTURA, Carolina Ribeiro Diniz, M. S., Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2005. **Quantificação do conteúdo de DNA nuclear de *Eucalyptus* spp. por citometrias de fluxo e de imagem.** Orientador: Carlos Roberto de Carvalho. Conselheiros: Sérgio Hermínio Brommonschenkel e Wagner Campos Otoni.

O gênero *Eucalyptus*, da família Myrtaceae, apresenta cerca de 800 espécies e vários híbridos naturais. Além da importância biológica, é de múltiplo interesse comercial, destacando-se na indústria farmacêutica e na produção de biomassa lenhosa. A quantificação do conteúdo de DNA nuclear é útil em estudos de relações filogenéticas. Também é uma informação importante no mapeamento de genomas. Para a determinação do conteúdo de DNA nuclear em plantas, a citometria de fluxo é considerada a metodologia mais utilizada. No entanto, os estudos com *Eucalyptus* apresentam diferenças entre os valores encontrados. Outra técnica cujos resultados permitem a determinação da quantidade de DNA nuclear é a citometria de imagem. O objetivo deste trabalho é reavaliar as divergências nas quantificações de DNA nuclear em *Eucalyptus*, pela aplicação das citometrias de fluxo e de imagem. As quantificações foram realizadas com o uso do citômetro de fluxo, associado à coloração com iodeto de propídeo, dos núcleos isolados. Os padrões de referência foram folhas de *Raphanus sativus* Saxa (1,11 pg), *Lycopersicon esculentum* Stupicke (1,96 pg) e hemácias de *Gallus gallus* Leghorn fêmea (2,33 pg). Histogramas da intensidade de fluorescência relativa foram obtidos após a análise dos núcleos isolados dos padrões internos combinados com *E.*

globulus, *E. grandis* e *E. urophylla*. Os valores em pg de DNA nuclear encontrados para *E. globulus* e *E. grandis* foram de 1,39 e 1,41 (padrão *R. sativus*), 1,20 e 1,22 (padrão *L. esculentum*), e 1,05 e 1,09 (padrão *G. gallus*). A quantificação para *E. urophylla* foi de 1,01 pg (padrão *G. gallus*). As espécies de *Eucalyptus* analisadas não apresentaram diferenças entre si maiores que 5,4% no conteúdo de DNA do genoma em pg. Todavia, variações em uma única planta, resultantes dos diferentes padrões, apresentaram divergências de até 32%. A citometria de imagem, dos núcleos corados pela reação de Feulgen, foi realizada para analisar o conteúdo de DNA de *E. globulus*, cujos valores foram de 1,16 (padrão *R. sativus*) e 1,02 pg (padrão *L. esculentum*). O uso de fluorocromos (intercalantes ou base específicos) e a interferência de compostos secundários na coloração foram considerados pontos críticos na análise pela citometria de fluxo; além dos padrões de referência e dos coeficientes de variação para ambas as citometrias. Em todas as análises os maiores coeficientes de variação foram 3,80 (citometria de fluxo) e 4,83% (citometria de imagem). Pela comparação entre as metodologias aplicadas, demonstrou-se o valor mais elevado da estimativa do conteúdo de DNA nuclear em *E. globulus* via citometria de fluxo, cerca de 16% maior do que na citometria de imagem. As proporções entre os padrões vegetais continuaram as mesmas em ambas as citometrias. Embora a quantificação mais precisa de DNA nuclear em picogramas para *E. globulus* seja proveniente da citometria de fluxo das folhas, pelo valor do CV, a mais acurada foi considerada a média dos dados obtidos via citometria de imagem dos meristemas, cujo valor foi 1,09 pg DNA/2C.

ABSTRACT

BOAVENTURA, Carolina Ribeiro Diniz, M. S., Universidade Federal de Viçosa, December 2005. **Nuclear DNA content quantification of the *Eucalyptus* spp. by means of flow and image cytometries.** Adviser: Carlos Roberto de Carvalho. Committee members: Sérgio Hermínio Brommonschenkel and Wagner Campos Otoni.

The *Eucalyptus* genus of Myrtaceae family has about 800 species and some natural hybrids. Beyond the biological importance, it is of multiple commercial interests, being distinguished in the pharmaceutical industry and the production of pulp biomass. The quantification of the nuclear DNA content is useful in studies of phylogenetics. Also it is important information for genome mapping. For nuclear DNA content determination, flow cytometry is considered the most appropriate methodology. However, *Eucalyptus* studies present differences between values. Another technique whose results allow the determination of the nuclear DNA amount is the image cytometry. The objective of this work was to reevaluate the divergences in the measures of nuclear DNA in *Eucalyptus*, for the application of flow and image cytometries. The measures had been carried through with the use of flow cytometer and stain with propidium iodide, of the isolated nuclei. The reference standards were leaves of *Raphanus sativus* cv. Saxa (1.11 pg), *Lycopersicon esculentum* cv. Stupicke (1.96 pg) and *Gallus gallus* female Leghorn erythrocytes (2.33 pg). Histograms of relative fluorescence intensity have generated after analysis of the isolated nuclei of combined internal standards with *E. globulus*, *E. grandis* and *E. urophylla*. The values in pg of nuclear DNA found for *E. globulus* and *E. grandis*

had been of 1.39 and 1.41 (standard *R. sativus*), 1.20 and 1.22 (standard *L. esculentum*), and 1,05 and 1,09 (standard *G. gallus*). The quantification for *E. urophylla* pg was of 1.01 (standard *G. gallus*). The *Eucalyptus* species analyzed did not present differences among themselves greater than 5.4% in genomic DNA content in pg. However, intraspecific variations in only one plant, resultant of the different standards, presented divergences of up to 32%. The image cytometry analyses, with Feulgen reaction stain nuclei, were carried out to analyze the *E. globulus* DNA content, whose values were of 1.16 (standard *R. sativus*) and 1.02 pg (standard *L. esculentum*). The fluorochrome use (DNA-intercalating or base specific) and the secondary compounds interference in the staining were considered critical points in the analysis for the flow cytometry; besides the standards of reference and the coefficients of variation for both the cytometries. In all the analyses the bigger variation coefficients were 3.80 (flow cytometry) and 4.83 (image cytometry). For the comparison between the applied methodologies, the increase of the estimate of the nuclear DNA content was confirmed in *E. globulus* by flow cytometry, about 16% greater as compared to image cytometry. The ratios between plant standards remained the same ones in both techniques. Although the most precise nuclear DNA quantification in picogramas for *E. globulus* was proceeding from flow cytometry of leaves, by CV value, the most accurate was considered the average of meristem image cytometry data, whose value was 1.09 pg DNA/2C.

INTRODUÇÃO

1.1 - Aspectos gerais do gênero *Eucalyptus*

O gênero *Eucalyptus*, da família Myrtaceae, é nativo da Austrália e de algumas ilhas próximas, apresentando cerca de 800 espécies, além de híbridos naturais (COPPEN, 2002). O grupo, originalmente conhecido como eucalipto, foi reclassificado e dividido em dois: *Eucalyptus sensu stricto* e *Corymbia* (ROZEFELDS, 1996).

Em termos do alto número de táxons e do domínio em muitas comunidades de plantas, é considerado por Eldridge *et al.* (1994) um gênero próspero. Em seu ambiente natural, as árvores crescem numa ampla variação de condições climáticas e edáficas. Elas variam em arquitetura e forma, ocupando diversa gama de habitats: de pradarias de altas altitudes na costa e florestas tropicais, às margens de cursos d'água no deserto australiano (COPPEN, 2002).

O nome *Eucalyptus* foi estabelecido pelo Botânico francês, Charles Louis de L'Héritier Brutelle, em 1788, que recorre à natureza do opérculo da flor, na qual faltam pétalas e sépalas distintas (KANTIVILAS, 1996). As árvores possuem uma vasta mistura de metabólitos secundários, incluindo terpenos, glicosídeos cianogênicos, taninos hidrolisáveis e condensados, flavonóides, cetonas de longa cadeia e compostos floroglucinol formilados (COPPEN, 2002).

Segundo Matsumoto *et al.* (2000), para a grande parte das espécies estudadas é referido número cromossômico $2n=2x=22$, da mesma forma que a maioria dos gêneros da família Myrtaceae.

O gênero *Eucalyptus* é considerado de utilização difundida e um dos mais valorizados economicamente no mundo. A razão desta disseminação é seu rápido crescimento natural, que o faz idealmente adequado para se obter retorno econômico em um período relativamente curto de tempo. Uma grande variabilidade genética é outra razão da sua introdução em tantos países (COPPEN, 2002).

As vastas florestas de eucaliptos podem ser exploradas com objetivos comerciais, que vão desde a madeira para construção, combustível e pasta celulósica, à produção de óleos essenciais (ELDRIDGE *et al.*, 1994). Segundo Coppen (2002), as plantações para produção de pasta celulósica são constituídas principalmente das espécies *E. grandis*, *E. urophylla* (e híbridos de ambas), *E. saligna*, *E. dunnii*, *E. globulus*, *E. viminalis* e *E. tereticornis*.

No Brasil, o cultivo do eucalipto iniciou-se na primeira década do século 20 visando principalmente o uso da madeira como combustível. De 1909 a 1965 cerca de 470.000 ha de eucaliptos foram plantados em substituição às florestas nativas, 80% no interior do estado de São Paulo. A partir da década de 70, iniciou-se um aumento no uso das pastas de fibras curtas para produção de papel (FERREIRA e SANTOS, 1997). No final do século 20, as plantações de eucalipto ocupavam desde o norte dos estados do Pará e Maranhão até o leste e sul da Bahia, Minas Gerais, Espírito Santo, São Paulo, e estados do Sul (COPPEN, 2002).

As condições favoráveis de crescimento, o desenvolvimento das técnicas silviculturais e as vantagens advindas do uso de estoques de clones e híbridos para plantação conduziram às maciças plantações, que alimentam a indústria de pasta celulósica. A técnica de propagação vegetativa causou grande avanço no meio florestal, principalmente pela maior rapidez na promoção de ganhos genéticos por unidade de tempo. Isso ocorre porque a propagação vegetativa utiliza todo o potencial genético, incluindo a variância genética não aditiva nos plantios florestais (FERREIRA, 1992).

Além disso, projetos que desenvolvem ferramentas genômicas, assessorando o melhoramento, como o ForEst e o Genolyptus estão sendo desenvolvidos no Brasil desde 2001 e 2002, respectivamente (GRATTAPAGLIA, 2004).

1.2 – Quantificação do conteúdo de DNA nuclear em plantas

O conhecimento do tamanho do genoma tem recebido mais atenção desde a década de 90, sendo muito importante em diversas áreas da ciência, como a genética molecular, genômica, melhoramento, taxonomia e cladística (OHRI, 1998; YANPAISAN *et al.*, 1999; ZONNEVELD *et al.*, 2005; BENNETT e LEITCH 2005). Esse conhecimento tem sido útil em estudos de relações filogenéticas, na análise de possíveis correlações entre seu tamanho e características fisiológicas e agrônômicas, exemplo dos parâmetros de crescimento em milho (BIRADAR *et al.*, 1994) e cana (EDMÉ *et al.*, 2005), e na análise do efeito de fatores ambientais (LOUREIRO e SANTOS, 2004). 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 estimativa do tamanho de DNA nuclear é também uma informação importante aos interessados 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). Contudo, até o momento, o conteúdo do genoma nuclear continua desconhecido para aproximadamente 98,4% das espécies de angiospermas (banco de dados *on line* <http://www.rbgekew.org.uk/cval/homepage.html> BENNETT e LEITCH, 2004).

Segundo Price e Johnston (1996), as duas técnicas mais utilizadas na quantificação do genoma vegetal são as citometrias de fluxo e de imagem. Ambas são confiáveis na determinação do conteúdo de DNA nuclear em plantas, desde que sejam executadas conforme as precauções recomendadas, e que as análises sejam interpretadas.

1.2.1 – Aspectos gerais da citometria de fluxo

A estimação do conteúdo de DNA nuclear foi a primeira (HELLER 1973 citado por LOUREIRO e SANTOS, 2004) e continua a ser a principal utilização da citometria de fluxo em plantas, além da determinação do nível de ploidia. As determinações do conteúdo de DNA nuclear por citometria de fluxo são obtidas por comparação com um padrão de referência de valor conhecido (VINDELØV *et al.*, 1983). Segundo Dole el e Bartoš (2005), os dados obtidos usualmente são mostrados na forma de histogramas de densidade relativa, representando o conteúdo relativo de DNA.

A citometria de fluxo é uma técnica que envolve a análise das propriedades ópticas (dispersão da luz e fluorescência) de partículas microscópicas que fluem numa suspensão líquida. A medida em fluxo da fluorescência emitida permite análises a alta velocidade (10^2 - 10^3 partículas por segundo) e garante que sejam selecionadas aleatoriamente em toda a população, sem qualquer subjetividade associada (DOLE EL, 1997 e SILVA *et al.*, 2004). A análise do conteúdo de DNA baseia-se na intensidade de fluorescência relativa de núcleos ou células em suspensão, corados com um fluorocromo específico (DOLE EL e BARTOŠ, 2005).

A metodologia foi originalmente desenvolvida no fim dos anos 50, para uma contagem e análise rápidas de células sanguíneas. Com a natural evolução da técnica e com o aparecimento de novos marcadores fluorescentes, a utilização desta instrumentação generalizou-se a outras áreas e a estudos com outras células, como células vegetais e microbianas (DOLE EL, 1997 e DOLE EL e BARTOŠ, 2005).

Nos estudos com células vegetais, apesar da utilização da citometria de fluxo ter ocorrido apenas no início dos anos 80, o número de aplicações tem aumentado continuamente desde então, sendo uma técnica rotineiramente usada em vários laboratórios por todo o mundo (DOLE EL, 1991).

Segundo Dole el e Bartoš (2005), nos trabalhos envolvendo quantificação do genoma via citometria de fluxo, tradicionalmente os valores são convertidos em picogramas (pg) de DNA. Entretanto, a expressão dos valores em pares de base (pb) também tem sido utilizada. Os autores Dole el *et al.* (2003) citados por Dole el e Bartoš (2005), considerando a razão entre

pares de base AT:CG de 1:1 e ignorando a presença de nucleotídeos modificados, sugerem que 1 pg de DNA é igual a $0,978 \times 10^9$ pb.

Quando se quer determinar o tamanho do genoma nuclear para uma espécie, é indicado o uso de fluorocromos intercalantes, ou seja, sem preferência por pares de base (DOLE EL *et al.*, 1992 e DOLE EL e BARTOŠ, 2005). Segundo Michaelson *et al.* (1991) e Yanpaisan *et al.* (1999), o iodeto de propídeo 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. Johnston *et al.* (1999) também recomendam o uso de iodeto de propídeo como fluorocromo ao invés do DAPI na determinação da quantidade do DNA genômico em plantas.

Price e Johnston (1996) relataram que o iodeto de propídeo 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 corar preferencialmente seqüências de DNA ricas em bases AT, é menos rigoroso do que o iodeto de propídeo nas quantificações de DNA genômico (PRICE e JOHNSTON, 1996). Entretanto, muitos cientistas ainda usam este corante, segundo Dole el e Bartoš (2005), porque eles possuem citômetros com fonte de luz a lâmpada, os quais a fluorescência emitida pelo DAPI é fácil de excitar e mensurar.

A mitramicina, a cromomicina, o Hœchst e o DAPI são exemplos de fluorocromos base específicos. De acordo com Rayburn *et al.* (1989) citados por Michaelson *et al.* (1991), 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. O mesmo resultado é obtido com DAPI (DOLE EL, 1997).

A escolha e o uso dos padrões de referência é um dos pontos críticos de uma análise rigorosa na citometria de fluxo (DOLE EL *et al.*, 1998). Dole el e Bartoš (2005) sugeriram que, por questões técnicas como a maior similaridade possível na extração dos núcleos, os padrões vegetais são mais adequados para estimar o conteúdo de DNA em plantas do que os padrões de núcleos de células animais.

Segundo Johnston *et al.* (1999) e Gregory (2005), uma significativa fonte de erro que pode afetar a estimativa da quantidade de DNA em plantas é a

comparação entre os padrões com valor de DNA conhecidos. Este erro pode ser significativo, principalmente quando o padrão utilizado for proveniente de hemácias de galinha. O seu uso tem sido descartado, uma vez que as várias linhagens destas aves possuem diferenças no conteúdo de DNA (NAKAMURA *et al.*, 1990). A vantagem do uso de hemácias é que uma única galinha pode ser fonte de células para vários experimentos (JOHNSTON *et al.*, 1999).

Bennett e Smith (1991) e Johnston *et al.* (1999) testaram e sugeriram um grupo de padrões de referência para estimativas do conteúdo de DNA nuclear em plantas. Para esses autores, a estimação do DNA genômico possui maior linearidade de proporções quando os padrões possuem conteúdos de DNA próximos às amostras; mas entre a comunidade científica, ainda não se chegou a um consenso sobre que padrões de DNA usar quando se analisam núcleos de células vegetais.

A padronização externa abrange análises separadas dos núcleos padrões e dos núcleos amostrais. Esse tipo de procedimento pode causar pequenos erros, conseqüentes de variações na preparação e na coloração das duas amostras e de flutuações aleatórias na calibragem do próprio citômetro. Com a utilização de procedimentos que adotam a padronização interna, na qual o isolamento, coloração e análise das amostras são simultâneas, esses problemas são evitados (DOLE EL e BARTOŠ, 2005). Por conseguinte, as comparações entre as posições dos picos G₁ da fluorescência relativa do DNA são realizadas em um único histograma.

Segundo Marie e Brown (1993) e Greilhuber (2005), o co-processamento entre o padrão de referência e a amostra a qual se quer estimar o valor de DNA nuclear, padronização interna, minimiza o risco de se encontrar valores super ou subestimados na coloração. Já Hendrix e Stewart (2005) recomendam a não utilização do co-processamento até que a causa das diferenças de coloração provocadas por compostos secundários seja conhecida. A recomendação deve-se ao fato dos materiais vegetais frequentemente conterem inibidores de coloração endógenos, que podem afetar a mensuração dos resultados (Price *et al.*, 2000).

A presença de compostos extra-nucleares que interferem na fluorescência do iodeto de propídeo foi detectada em algumas espécies de

plantas, como *Helianthus annuus* (PRICE *et al.*, 1998 e PRICE *et al.*, 2000), *Gossypium* spp. (HENDRIX e STEWART, 2005) e em *Coffea liberica* var. *dewevrei* (NOIROT *et al.*, 2000, 2002, 2003 e 2005). Se essa interação entre compostos endógenos e intensidade de coloração existir, os dados da estimativa do conteúdo de DNA devem ser questionados, uma vez que o corante deve ter acesso igual aos sítios de ligação na cromatina (NOIROT *et al.*, 2000).

A análise em um citômetro de fluxo também depende da fonte de luz utilizada. Segundo Dole *et al.* (1991), há dois tipos de fonte de luz: *laser* ou lâmpada. Dole *et al.* (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. De acordo Price e Johnston (1996), nas análises para as quantificações absolutas de DNA genômico eles são mais comumente usados. Já as lâmpadas de mercúrio são consideravelmente menos dispendiosas e mais simples de usar, apesar de requererem um sistema com maior complexidade ótica. Na determinação de níveis de ploidia em plantas elas são as mais usadas, pois permitem melhor resolução nos histogramas.

Para a determinação da quantidade absoluta de DNA genômico, citômetros de fluxo a *laser* são os mais empregados, porque eles produzem luz monocromática visível, a mais utilizada em conjunto com o fluorocromo iodeto de propídeo (PRICE e JOHNSTON, 1996).

Peters (1979) comparou diferenças ópticas entre as duas fontes de luz, concluindo que são similares e que dependem das características de excitação dos fluorocromos usados. De acordo com Wilkerson (2004), é importante saber o comprimento de onda que a fonte de luz a *laser* irá excitar, porque o fluorocromo usado irá depender deste aspecto.

Outra característica da análise citométrica da quantidade de DNA em plantas diz respeito ao coeficiente de variação (CV). Segundo Dole *et al.* e Bartoš (2005), na citometria de fluxo a variação é normalmente expressada pelo coeficiente de variação. O CV permite que picos em diferentes posições possam ser diretamente comparados quanto à precisão. Marie e Brown (1993) consideram o coeficiente de variação um critério essencial nas avaliações dos métodos citológicos. 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.

Dole et al. (1997) relatou que a citometria de fluxo 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 estes valores não são reproduzíveis, provavelmente por variações dentro e entre os acessos analisados. Conforme Dole et al. e Bartoš (2005), tal precisão é difícil de ser conseguida em algumas plantas, por isso estes autores aceitaram como admissíveis valores de CV menores que 5%.

1.2.2 - Aspectos gerais da citometria de imagem

Segundo Hardie et al. (2002) e Greilhuber (2005) a citometria de imagem é uma das técnicas, cujos resultados permitem o cálculo da quantidade de DNA nuclear. Ela é uma ferramenta baseada na microscopia e na imagem digitalizada.

A técnica, originalmente conhecida como citometria ou citofotometria, foi desenvolvida a partir de metodologias baseadas no cálculo da densidade óptica (DO) (CHIECO et al., 2001). A primeira tentativa de quantificar o DNA nuclear *in situ* por meio do cálculo da absorvância da luz UV pela célula foi realizada por Caspersson em 1936 (CHIECO e DERENZINI, 1999).

Nos primeiros ensaios baseados na absorção de luz UV pelos ácidos nucléicos, foram observadas alta concentração de DNA nos núcleos celulares e alta concentração de RNA associada com a síntese protéica no citoplasma. Contudo, a técnica era dispendiosa e os dados gerados eram difíceis de ser interpretados, uma vez que as curvas de absorção de DNA e RNA ficavam sobrepostas (SWIFT, 1966).

A partir de 1947, o surgimento dos primeiros microfotômetros permitiu a quantificação de vários componentes celulares e atividade de enzimas por meio do cálculo da absorvância de células coradas ou não. Núcleos corados por meio da reação de Feulgen começaram a ser utilizados em estudos de quantificação do DNA nuclear (CHIECO e DERENZINI, 1999).

Segundo Bitensky (1979), a microdensitometria mede a concentração ou a massa de um cromóforo em regiões microscopicamente definidas. Inicialmente, comprovou-se do valor da citofotometria com a reação de Feulgen, pelas quantidades relativas de DNA em núcleos individuais de células isoladas. Entre 1940 e 1980, foram realizadas pesquisas visando um melhor entendimento da microfotometria e a um aperfeiçoamento dessa técnica, a fim estabelecer metodologias padronizadas que evitassem a obtenção de dados não muito precisos por causa dos efeitos da dispersão da luz no equipamento e da falta de uniformidade da superfície nuclear (CHIECO e DERENZINI, 1999).

Deeley (1955) sugeriu o cálculo da absorvância de toda a área corada como uma forma de contornar o problema da irregularidade da superfície nuclear. Dessa maneira, o objeto passou a ser representado pelo somatório das centenas de densidade ópticas obtidas, o que também permitiu o cálculo da área do mesmo (CHIECO *et al.*, 2001). De acordo com Bitensky (1979), as medidas foram confirmadas por ensaios bioquímicos e microdensitométricos comparativos. Assim, mesmo com os cromóforos heterogeneamente distribuídos, a microdensitometria pode ser precisa, contanto que seja operada com a necessária consideração às suas limitações dentro das leis da física.

Com o advento das vídeo-câmeras e com o aumento da disponibilidade de computadores, na segunda metade da década de 80, passou-se a ter uma instrumentação adequada para os estudos em citometria de imagem com custos mais acessíveis (CHIECO e DERENZINI, 1999). De acordo com Kiss *et al.* (1992), uma vídeo-câmera acoplada a um microscópio permite a mensuração de valores de densidade óptica integrada (DOI – medida de absorvância relacionada com a área). Além disso, segundo Hardie *et al.* (2002), o processo de análise requer uma cuidadosa calibração e um computador capaz de processar os comandos do *software* escolhido para análise de imagem.

Os antigos equipamentos deram lugar aos novos, conseqüentemente ocorreu a disseminação da citometria de imagem como técnica adequada para a quantificação de DNA na medicina. Essa técnica passou a ser utilizada no diagnóstico de tumores malignos, em estudos de ploidia e ciclo celular (PUECH e GIROUD, 1999 e VILHAR *et al.*, 2001).

O conteúdo de DNA celular pode ser calculado a partir da medida da absorvância dos núcleos intactos, em lâminas, coradas por meio da reação de Feulgen (FEULGEN e ROSSENBECK, 1924). A reação cora especificamente o DNA, no qual ocorre a hidrólise do ácido nucléico, criando radicais aldeídos nas desoxirriboses por meio de depurinação. Num ambiente ácido, as bases purínicas são retiradas da desoxirribose, expondo grupos de aldeídos e deixando intacto o arcabouço de DNA. Em seguida, a ligação desses grupos formados à moléculas de fucsina básica presentes no reativo de Schiff, reagente a base de parasosanilina tratada com ácido sulfúrico, cora o ácido desoxirribonucléico. Após uma coloração quantitativa do DNA, a DOI nuclear torna-se citometricamente equivalente ao conteúdo de DNA, o qual não poderia ser medido diretamente pela citometria (GREILHUBER e TEMSCH, 2001 e HARDIE *et al.*, 2002).

As estimativas do conteúdo de DNA podem variar entre experimentos pela conseqüência de vários fatores, incluindo a origem do tecido, diferentes preparações de fixadores e corantes, tempo e temperatura da hidrólise, ajuste e sensibilidade dos microscópios e câmeras utilizados (PRICE, 1988; PRICE e JOHNSTON, 1996; CHIECO e DERENZINI, 1999; GREILHUBER, 2005).

Segundo Price (1988) e Price e Johnston (1996), a hidrólise que precede a coloração com o Reativo de Schiff é uma potencial fonte de erros. Para Greilhuber e Temsch (2001) e Greilhuber (2005), este é o passo mais crítico da técnica. Se o tempo de exposição no HCl for pequeno, reduz a coloração; e se o tempo for prolongado, há a extração de fragmentos de DNA, também provocando uma redução na coloração. Além disso, de acordo com Chieco e Derenzini (1999), a solubilização do DNA e a quantidade de grupos aldeídos produzidos são variáveis de acordo com a fixação e a compactação da cromatina.

Conforme Chieco e Derenzini (1999), a quantificação do conteúdo de DNA pela reação de Feulgen é causada pelo fato da intensidade de coloração ser proporcional à concentração de DNA. De acordo com Chieco *et al.* (1994), para comparações numéricas, a utilização de uma referência padrão se torna necessária.

Esta técnica permite que as células sejam representadas como um arranjo de números, os quais são processados por programas computacionais

de acordo Puech e Giroud (1999). Além disso, procedimentos de controle de qualidade devem ser desenvolvidos e executados para que os resultados utilizando o sistema de análise de imagem sejam acurados.

Para a análise, Hardie *et al.* (2002) sugeriram obter valores na lâmina tanto de regiões contendo núcleos, como de regiões com ausência de material celular. A diferença da intensidade de luz entre as duas áreas representa a transmitância. No caso de imagens monocromáticas, estudos citométricos em plantas têm utilizado, principalmente, a escala de valor do pixel com 8 bits (256 tons de cinza) ou 12 bits (4096 tons de cinza) (VOGLMAYR e GREILHUBER, 1998)

De acordo com Hardie *et al.* (2002), a relação entre a densidade ótica e a transmitância é usualmente calculada automaticamente pelo equipamento que compõe o densitômetro. Pela heterogeneidade da coloração do DNA nuclear, é necessária a análise de vários pontos de densidade, cobrindo todo núcleo. A soma das densidades óticas individuais por pixel é a DOI. De posse destes dados, calcula-se a densidade ótica integrada por meio da seguinte equação:

$$DOI = \sum_{i=1}^n -\log \left[\frac{I f_i}{I b_i} \right]$$

em que:

n : número total de pixels no núcleo.

$I f_i$: intensidade dos pixels do núcleo.

$I b_i$: intensidade dos pixels da área limpa da lâmina.

(Fonte: HARDIE *et al.*, 2002).

1.2.3 – Aplicação no gênero *Eucalyptus*

Dados relativos ao tamanho do genoma são de fundamental significância em pesquisas na biologia (ZONNEVELD *et al.*, 2005). Segundo Myburg *et al.* (2003) há pouca informação disponível sobre evolução genômica e diferenciação genética no gênero *Eucalyptus*. Essa informação é necessária

no entendimento da natureza e da ocorrência de barreiras reprodutivas, e da base genética da superioridade dos híbridos neste gênero.

O primeiro trabalho de quantificação do DNA nuclear em *Eucalyptus*, de Marie e Brown (1993), divulgou o valor de 1,13 picogramas (pg) de DNA/2C e 40,1% de bases GC para *Eucalyptus globulus*. Os coeficientes de variação não foram especificados. Um fluorocromo intercalante e o padrão de referência hemácias de galinha foram usados.

Grattapaglia e Bradshaw (1994) analisaram 19 plantas diferentes de eucalipto, entre espécies comercialmente importantes e híbridos interespecíficos. Para o processamento, foram usadas folhas liofilizadas ou congeladas em nitrogênio líquido. Os resultados em pg de DNA/2C variaram de 0,77 para *E. citriodora* a 1,47 para *E. saligna*. *E. globulus* apresentou 1,09 pg de DNA/2C. Esses autores utilizaram hemácias de galinha como padrão interno. O fluorocromo usado foi o 4'-6-Diamidino-2-fenilindol (DAPI) e o coeficiente de variação do pico G1 dos eucaliptos analisados variou entre 6,3 e 12,8%.

Azmi *et al.* (1997^a) utilizaram a citometria de fluxo para avaliar o nível de ploidia de tumores provocados por *Agrobacterium tumefaciens* e seus subseqüentes materiais regenerados de *E. globulus*. Corados com o fluorocromo Hœchst e processados num citômetro com fonte de luz a *laser*, os autores utilizaram hemácias de galinha para calibração. As análises indicaram que as amostras eram diplóides.

Concordando com Marie e Brown (1993), outro trabalho analisando a ploidia de *E. globulus* e de materiais regenerados foi publicado por Azmi *et al.*, (1997^b). O conteúdo de DNA nuclear também foi avaliado. A coloração foi realizada com Hœchst para as análises de ploidia, e com brometo de etídeo para a determinação do tamanho do genoma. Fonte de luz a *laser* e hemácias de galinha como padrão interno foram utilizados. Não houve evidências de poliploidia em nenhuma das amostras, indicando a ausência de poliploidização durante a diferenciação celular *in vitro*. Os autores encontraram o valor de 1,13 pg DNA/2C e 40,1% de bases GC em *E. globulus*. Os coeficientes de variação não foram divulgados.

Pinto *et al.* (2004) analisaram embriões zigóticos e somáticos e folhas de *E. globulus*, com o objetivo de medir o conteúdo de DNA nuclear e determinar

se a embriogênese somática induz a poliploidia nessa planta. Usando como padrão interno *Lycopersicon esculentum* cultivar Stupicke, coloração com iodeto de propídeo e leitura com fonte de luz a *laser*, o valor encontrado para os embriões zigóticos foi de 1,32 pg DNA/2C. Para os embriões somáticos o valor foi de 1,39 e para as folhas foi de 1,40 pg DNA/2C. O coeficiente de variação ficou entre 3,5 e 6,8% nas análises das folhas.

Duas estimativas do conteúdo de DNA nuclear das espécies de *Eucalyptus* spp. foram obtidas pela técnica de citometria de imagem. As espécies são *E. tereticornis* e *E. camaldulensis*, com 1,20 e 1,40 pg de DNA/2C respectivamente, analisadas junto ao padrão *Allium cepa*, cujas diferenças na quantidade de DNA foram avaliadas sob estresse em cultura de tecidos (RANI e RAINA, 1998).

Nas técnicas de citometria de imagem e citometria de fluxo, foram encontrados somente cinco trabalhos relatando o conteúdo de DNA nuclear dos eucaliptos; e os valores encontrados para *E. globulus* via citometria de fluxo diferem entre si (Quadro 1). Além disso, Pinto *et al.* (2004) sugeriram a atuação de compostos secundários na coloração diferencial dos núcleos. Possíveis causas dessas incongruências não foram informadas na literatura. Provavelmente, estas diferenças são atribuídas à variabilidade das metodologias, dificultando a determinação de qual valor é mais acurado.

Alguns trabalhos utilizando ambas as técnicas citométricas de fluxo e imagem como ferramentas para mensuração da quantidade de DNA são encontradas na literatura. Greilhuber e Obermayer (1997; 1999) utilizaram-nas para estudar diferenças encontradas no tamanho do genoma em cultivares de soja. Eles concluíram que as divergências anteriormente descritas refletiam apenas variações metodológicas.

A mensuração da quantidade de DNA de *Capsicum* por citometria de fluxo utilizando a citometria de imagem como controle também foi realizada por Moscone *et al.* (2003). Os autores encontraram uma diferença entre metodologias em pg/1C de DNA; entre 2,4 e 4,8% menor nas análises processadas via citometria de imagem.

Pelos trabalhos citados acima, a utilização simultânea destas ferramentas pode contribuir para uma reavaliação das divergências nas quantificações de DNA nuclear em plantas da mesma espécie.

Quadro 1 – Quantidades de DNA nuclear em picogramas (pg) para *E. globulus* de acordo com a literatura.

| DNA/2C (pg) | Padrão | Fluorocromo | Luz | CV | Referência |
|-------------|---------------------------|-------------|--------------|------------|-------------------------------|
| 1,13 | <i>G. domesticus</i> | * | - | - | Marie e Brown, 1993 |
| 1,09 | Eritrócitos <i>Gallus</i> | DAPI | - | 6,3 a 12,8 | Grattapaglia e Bradshaw, 1994 |
| 1,13 | Eritrócitos <i>Gallus</i> | BE | <i>laser</i> | - | Azmi <i>et al.</i> , 1997 |
| 1,40 | <i>L. esculentum</i> | IP | <i>laser</i> | 4,6 a 6,8 | Pinto <i>et al.</i> , 2004 |

G. domesticus = *Gallus domesticus*

L. esculentum = *Lycopersicon esculentum*

* = BE (brometo de etídeo) ou IP (iodeto de propídeo)

DAPI = Diamidino-2-fenilindol

CV=Coeficiente de variação

2- OBJETIVOS

Considerando que a literatura apresenta valores diferentes do conteúdo de DNA nuclear nos eucaliptos analisados via citometria de fluxo, a utilização dessa técnica juntamente com a citometria de imagem poderá servir para a reavaliação dessas divergências.

O presente estudo propõe quantificar o conteúdo de DNA nuclear de *Eucalyptus* spp. pelas técnicas de citometria de fluxo e citometria de imagem.

Os objetivos específicos são:

- Estabelecer protocolos para a análise dos núcleos em suspensão de *E. grandis*, *E. urophylla* e *E. globulus* pela citometria de fluxo.
- Padronizar protocolos de quantificação do conteúdo de DNA nuclear de *E. globulus* pela citometria de imagem.
- Avaliar comparativamente os resultados da quantidade de DNA nuclear encontrados pela citometria de fluxo e de imagem.
- Estabelecer os padrões de referência que possam ser mais adequados à análise via citometria de fluxo dos eucaliptos.

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material

As sementes de *E. globulus*, *E. grandis*, *E. urophylla* foram cedidas pelo professor Sérgio Herminio Brommonschenkel, Laboratório de Genômica Vegetal, Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO) da Universidade Federal de Viçosa (UFV) e pelo professor Dario Grattapaglia, Embrapa - Recursos Genéticos e Biotecnologia. Sementes das plantas utilizadas como padrões nas análises citométricas foram cedidas pelo Dr. Jaroslav Dole el do Laboratório de Citogenética Molecular e Citometria do Instituto Experimental Botânico-Sokolovska-República Tcheca. As galinhas Legorhn IPEACS usadas como doadoras de hemácias foram cedidas pelo Departamento de Zootecnia da UFV. Todas as análises, citométricas de fluxo e de imagem, foram realizadas no Laboratório de Citogenética Vegetal, do Departamento de Biologia Geral da UFV.

3.2- MÉTODOS

3.2.1 - Citometria de fluxo

Esta técnica foi baseada na metodologia descrita por Otto (1990), com pequenas modificações.

3.2.1.1 - Extração dos núcleos

Folhas jovens e vigorosas foram coletadas de plantas cultivadas entre 1 e dois meses na casa de vegetação da UFV. *Raphanus sativus* var. Saxa e *Lycopersicon esculentum* cultivar Stupicke foram utilizadas como padrões internos para *Eucalyptus grandis* e *E. globulus*. Os valores dos padrões internos em picogramas de DNA foram escolhidos segundo o trabalho de Dole et al. (1992) (Quadro 2).

Quadro 2 - Valores em pg de DNA/2C dos padrões de referência que foram utilizados.

| Espécie | Pg de DNA/2c | Corante | Fonte de luz | Medidas de dispersão | Referência |
|---|--------------|--------------|--------------|----------------------|---------------------------|
| <i>Lycopersicon esculentum</i> | 1,90 | IP | - | S = 0,09 pg | Michaelson et al. (1991) |
| <i>Lycopersicon esculentum</i> var. stupicke | 1,96 | IP | lâmpada | CV <3% | Dole et al. (1992) |
| <i>Lycopersicon esculentum</i> cv. Gardener's light | 2,00 | IP | lâmpada | S = 0,07 pg | Obermayer et al. (2002) |
| <i>Raphanus sativus</i> var. Saxa | 1,11 | IP | lâmpada | CV <3% | Dole et al. (1992) |
| <i>Raphanus sativus</i> var. Saxa | 1,37 | IP | laser | - | Lab. 1 Dole et al. (1998) |
| <i>Raphanus sativus</i> var. Saxa | 0,98 | IP | lâmpada | - | Lab. 2 Dole et al. (1998) |
| <i>Raphanus sativus</i> var. Saxa | 1,06 | IP | lâmpada | - | Lab. 3 Dole et al. (1998) |
| <i>Raphanus sativus</i> var. Saxa | 1,45 | IP | laser | - | Lab. 4 Dole et al. (1998) |
| <i>Gallus domesticus</i> var. White Leghorn estocado por anos | 3,01 | IP | lâmpada | S = 0,05 | Johnston et al. (1999) |
| <i>Gallus domesticus</i> White leghorn Texas | 2,49 | IP | lâmpada | S = 0,03 | Johnston et al. (1999) |
| <i>Gallus domesticus</i> fêmea | 2,33 | Intercalante | - | - | Galbraith et al. (1983) |

IP = Iodeto de propídeo.

CV = Coeficiente de variação

S = Desvio padrão

Para a extração dos núcleos foi utilizado o protocolo adaptado de Otto (1990), cujos passos de extração e coloração são distintos. As folhas dos eucaliptos e *R. sativus* ou *L. esculentum* foram lavadas em água corrente e

mantidas em água destilada à 4 °C até o processamento. Subsequentemente, as folhas foram secas em papel toalha. O preparo da suspensão nuclear foi realizado com fragmentos de cerca de 2 cm² de cada amostra, processadas juntas, da planta usada como padrão interno (*R. sativus* ou *L. esculentum*) e do eucalipto. Os núcleos foram liberados das células por meio de cortes feitos com lâmina de barbear, em placa de Petri, à temperatura ambiente.

O preparo do padrão externo de núcleos de eritrócitos de aves foi realizado a partir da coleta do sangue e estocagem em tubos com heparina.

Aos 2 ml de sangue recém-coletado adicionaram-se 6 ml da solução EA I (140 mM NaCl, 10 mM Citrato de Sódio, 1 mM Tris pH=7,1) e centrifugados a 50 g durante 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e em seguida adicionado 6 ml de EA I. Mais uma centrifugação a 50 g durante 5 minutos e um descarte do sobrenadante, e o sedimentado foi ressuspensionado em 4 ml de EA II (140 mM NaCl, 10 % (v/v) Tween 20) e agitado em Vórtex. Foram adicionados 4 ml de EA III (320 mM sacarose, 15 mM MgSO₄.7H₂O, 15 mM β-Mercaptoetanol e 1 mM Tris pH=7,1). Após centrifugar a 250 g durante 5 minutos, e descartar o sobrenadante, foram adicionados 4 ml de EA III. Em seguida foram colocados na centrífuga a 120 g durante 5 minutos, e o sobrenadante descartado.

Subsequentemente, o sedimento foi transferido para um tubo limpo, e adicionado 4 ml de EA III. Outra centrifugação a 90 g por 5 minutos e descarte do sobrenadante foi feito. O sedimento foi ressuspensionado e depois adicionado 4 ml de fixador gelado. A suspensão foi armazenada a 4 °C *overnight*. A última centrifugação, a 50 g durante 5 minutos, foi feita, e em seguida o fixador foi descartado. Os núcleos sedimentados foram ressuspensionados e 12 ml de etanol 70% gelado foram adicionados. Em seguida uma filtragem da suspensão nuclear através de telas de 50 μm de diâmetro de poro foi feita. A estocagem foi realizada em alíquotas de 1,5 ml, a -20 °C até o momento de uso.

3.2.1.2 - Coloração com iodeto de propídeo

Os núcleos vegetais foram extraídos em placa de Petri contendo 0,5 ml de solução tampão OTTO-I. As folhas de *Eucalyptus* spp. foram picotadas simultaneamente com *R. sativus* ou *L. esculentum* como padrão interno. A

suspensão foi incubada de 2 a 3 minutos e filtrada em tela com diâmetro de poro de 30 μ m acrescentando-se mais 0,5 ml de OTTO-I, e depois centrifugada por 5 minutos a 110 rpm. Para o uso de hemácias de galinha (2,33 pg de DNA/2C segundo MARIE e BROWN, 1993) como padrão, 100 μ l dos núcleos em suspensão foram adicionados à solução de *E. globulus*, *E. grandis* ou *E. urophylla* antes da centrifugação. O sobrenadante foi descartado e ressuspendeu-se o restante em 100 μ l de OTTO-I. Após 10 min de incubação, 1,5 ml do tampão de coloração OTTO-II, contendo 75 μ l de iodeto de propídeo e 75 μ l de RNAase, foi adicionado.

A suspensão foi corada por 30 minutos no escuro e à temperatura ambiente e depois filtrada em telas com 20 μ m de diâmetro de poro.

3.2.1.3 - Processamento no citômetro de fluxo

A intensidade de fluorescência relativa dos núcleos corados com iodeto de propídeo foi mensurada por um citômetro de fluxo Partec PAS II/III (PARTEC GmbH, Munster, Germany), com fonte de luz a *laser* (RG 610 e filtro TK 420).

3.2.1.4 - Estimação do conteúdo de DNA

Todos os histogramas de intensidade de fluorescência relativa foram avaliados no programa FlowMax Partec®. A razão entre as médias dos picos G₀/G₁ dos padrões de referência e das amostras foi calculada e convertida em picogramas de DNA. Cada amostra foi analisada no mínimo duas vezes, não menos que 5000 núcleos e com coeficientes de variação menores que 5 %.

O tamanho do genoma nuclear foi calculado a partir das leituras dos núcleos em G₀/G₁, de acordo com a fórmula:

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

em que:

V: valor do conteúdo de DNA nuclear 2C (pg) de *Eucalyptus*.

L₁: leitura média do pico G₀/G₁ de *Eucalyptus* sp.

L₂: leitura média do pico G₀/G₁ do padrão.

pg: valor do conteúdo de DNA do padrão em picogramas

3.2.2 - Citometria de imagem

Utilizou-se a técnica descrita por Greilhuber e Temsch (2001), com pequenas modificações.

3.2.2.1 - Hidrólise e coloração pela reação de Feulgen

As raízes de *E. grandis*, *R. sativus* var. *Saxa* e *L. esculentum* cultivar Stupicke foram fixadas em três trocas de 10 minutos em metanol: ácido acético (3:1) e armazenadas a -20 °C. Nos passos seguintes as raízes do padrão e do eucalipto foram processadas juntas, para a padronização interna. Após o mínimo de 24 horas no fixador, foram lavadas durante 15 minutos em água destilada, à temperatura ambiente e colocadas em tubos de *Eppendorf* contendo 1 ml de HCl 5M, que foram imediatamente colocados em banho-maria, à 20 e 25 °C, durante 45, 50, 55 e 60 minutos. Após esse passo, lavaram-se as raízes em água destilada por 3 trocas de dois minutos.

Subsequentemente, o material foi colocado em tubos de *Eppendorf* contendo 1 ml de Reativo de Schiff (5 g de fucsina básica, 10 ml de HCl 1 N, 2,23 g de $K_2S_2O_5$, 1 g de carvão ativo e 85 ml de água destilada), e deixado por 24 h a 4 °C (modificado de GREILHUBER e TEMSCH, 2001). Os sítios do DNAapurínico com grupos aldeídos livres ligaram-se à molécula incolor de fucsina dissolvida no Reativo de Schiff, adquirindo a raiz uma cor magenta. Subsequentemente lavou-se as raízes durante 60, 50, 40, 30, 20, 15 e 10 minutos em água sulfurosa, em temperatura ambiente e prepararam-se, imediatamente, as lâminas pela técnica de esmagamento.

3.2.2.2 - Preparo das lâminas pela técnica de esmagamento

O preparo das lâminas foi feito de acordo com Carvalho (1995). As raízes de *E. globulus* e *R. sativus* ou *L. esculentum* submetidas juntas à reação de Feulgen foram lavadas em água sulfurosa com 40, 30, 20, 15 e 10 min (2,5 ml de $K_2S_2O_5$ 10% em 50 ml de água destilada) e depois durante 3 minutos em água destilada. Uma lâmina de vidro previamente limpa (imersa por 24 h em

solução sulfocrômica, lavada durante 10 min em água corrente e armazenada em recipiente com álcool 95% a 25 °C) contendo uma gota de ácido acético 45% foi usada para colocar as raízes já lavadas. Na mesma lâmina, a raiz do eucalipto e a raiz do padrão, hidrolisadas e coradas no mesmo *Eppendorf*, foram esmagadas. Com auxílio de um bisturi e de um microscópio estereoscópico (lupa) deixou-se apenas a região meristemática da raiz sobre a lâmina. Uma lamínula previamente limpa foi colocada sobre cada material, e esse conjunto foi imobilizado com auxílio de um papel de filtro. O esmagamento do meristema foi feito batendo-se levemente sobre o conjunto acima citado, com auxílio de um instrumento com extremidade plana, como um lápis. Após o esmagamento, a lâmina foi incubada em uma temperatura de -20 °C durante 60 minutos sobre uma placa metálica, e depois se efetuou a retirada da lamínula com auxílio de uma lâmina de barbear. Os locais da lâmina que estavam os meristemas foram cobertos com óleo de inclusão (Carl Zeiss = L 25, índice de refração = 1,525) e depois selados com uma lamínula previamente limpa e esmalte incolor.

3.2.2.3 - Análise dos dados

As lâminas foram observadas em fotomicroscópio OlympusTM; modelo BX 60, com objetiva de imersão de 40 X, equipado com acessórios de análise de imagem. Filtros de densidades neutras do sistema do microscópio que ajudaram a homogeneizar a incidência de luz e outro filtro de interferência verde (IF550) foram utilizados.

Condições de calibração e iluminação segundo Köhler, citado por Hardie *et al.* (2002) foram feitas, 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 e de 1392x1040 de resolução, do kit de análise de imagem Cool SNAPTM, acoplada ao microscópio e a um computador equipado com placa digitalizadora.

As análises foram realizadas usando o Programa Image Pro-Plus ® 4.5 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). A estimação do efeito *glare* foi feita automaticamente pelo programa.

Conforme descrito por Vilhar *et al.* (2001), para a determinação da densidade óptica integrada (DOI) foram utilizadas regiões da lâmina contendo núcleos e regiões com ausência de material celular. Para a análise, foram medidas as DOI de dez núcleos em prófase e dez núcleos em telófase. A partir das médias foram calculados os valores 2C e 4C para os núcleos de *E. globulus* e dos padrões *R. sativus* ou *L. esculentum*. Três lâminas de cada combinação padrão/eucalipto foram utilizadas na obtenção dos dados. O *software* 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 citometria de imagem, foram aqui utilizados para plantas: o coeficiente de variação e a razão 4C/2C. O primeiro requer coeficiente de variação dos núcleos 2C ou 4C, por lâmina, menor que 5% (BÖCKING *et al.*, 2001). O segundo determina que a razão entre os valores 2C e 4C não seja menor que 1,8 e maior que 2,2 (BÖCKING e NGUYEN; 2004).

4- RESULTADOS

4.1 - Citometria de fluxo

A determinação dos valores relativos da quantidade de DNA nuclear via citometria de fluxo, usando o fluorocromo iodeto de propídeo gerou histogramas com resolução que diferenciou as fases G_0/G_1 e algumas G_2 . Somente um histograma de cada combinação entre os padrões e os eucaliptos está apresentado (Figuras 1 a 3), uma vez que as repetições apresentaram o mesmo perfil.

Os histogramas gerados apresentaram um pico maior 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, 2, 3 e 5).

Todas as análises para *Eucalyptus* spp. apresentaram o maior coeficiente de variação (CV) de 3,8% (média de 2,90%). Nas amostras com o padrão *R. sativus* o maior CV foi de 3,53% (média de 3,21%). Nas análises utilizando *L. esculentum* como padrão os maiores coeficientes de variação foram de 3,8% (média 3,13%). Nos histogramas com *G. gallus* como padrão interno, os maiores CV foram de 3,32% (média 2,55%).

Os índices correspondem à razão da intensidade de fluorescência emitida dos núcleos da leitura dos eucaliptos pela do padrão. Os valores relativos (índice) e o CV referentes aos histogramas encontram-se nos Quadros 3, 4 e 5.

Pelos valores de leitura dos dois picos referentes à fase G_0/G_1 , um referente ao padrão e outro referente ao eucalipto, e pelo conteúdo de DNA

dos padrões calculou-se os valores absolutos em picogramas de DNA/2C de *E. globulus*, *E. grandis* e *E. urophylla* (Quadros 3 a 5) pela utilização da fórmula do item 3.2.1.4. A partir da relação $1 \text{ pg} = 0,978 \cdot 10^9$ pares de base (pb), estabelecida por Dole et al. (2003) citados por Dole et al. e Bartoš (2005), os valores 1C em pb foram calculados (Quadro 6).

As diferenças encontradas nas análises foram de até 32%, ao se comparar os valores obtidos de *E. globulus* com os padrões *R. sativus* e *G. gallus* (Figura 4).

Nas comparações interespecíficas dos gráficos com padrão interno hemácias de galinha, o menor valor corresponde à espécie *E. urophylla*, e o maior à *E. grandis*. Pelos coeficientes de variação não serem menores do que a metade das diferenças encontradas nas médias, não é possível afirmar o menor conteúdo de DNA em *E. urophylla*. Além disso, os histogramas da combinação dois a dois de *E. globulus*, *E. grandis* e *E. urophylla*, cujos CV foram menores que 2,70%, não distinguiram picos diferentes para cada espécie (Figura 5 e 6).

Embora não haja diferença, pelo coeficiente de variação, entre os valores de *E. globulus* e *E. grandis*, as amostras de *E. globulus* mostraram-se 0,8 a 3,8 % menores em todas as análises (Quadro 6).

Na Figura e no Quadro 7 estão apresentadas as quantificações de DNA nuclear feitas pelo presente trabalho e pela literatura. A diferença entre o menor e o maior valor (1,05 e 1,40 pg) é de 33%.

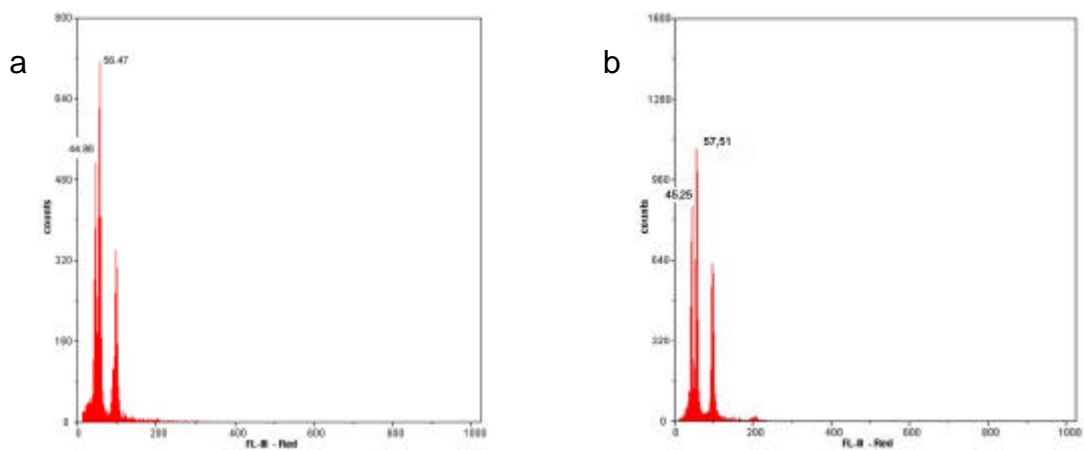


Figura 1 – Histogramas do conteúdo relativo de DNA nuclear de *E.globulus* e *R. sativus* (a) e *E. grandis* e *R. sativus* (b), obtidos após coloração com iodeto de propídeo. Leituras 002 e 003 do Quadro 3.

Quadro 3 - Valores das leituras referentes aos picos G1, coeficiente de variação (CV), índice e picogramas (pg) de DNA/2C obtidos nos histogramas gerados do processamento de *E. globulus* e *R. sativus*, e *E. grandis* e *R. sativus*.

| Nº | Leitura | CV | INDEX | Média INDEX | pg DNA/2C |
|--------------------|---------|------|-------|-------------|-----------|
| <i>R. sativus</i> | | | | | |
| 001 | 45,33 | 3,49 | 1,00 | 1,00 | 1,11 |
| 002 | 44,86 | 3,01 | 1,00 | | |
| 003 | 45,25 | 3,34 | 1,00 | | |
| 004 | 44,06 | 3,46 | 1,00 | | |
| <i>E. globulus</i> | | | | | |
| 001 | 56,44 | 2,90 | 1,25 | 1,25 | 1,39 |
| 002 | 56,47 | 3,22 | 1,26 | | |
| <i>E. grandis</i> | | | | | |
| 003 | 57,51 | 2,73 | 1,27 | 1,27 | 1,41 |
| 004 | 56,15 | 3,53 | 1,27 | | |

O índice é igual a razão da leitura do pico G₀/G₁ de cada pico dos eucaliptos correspondentes pela leitura de *R. sativus*.

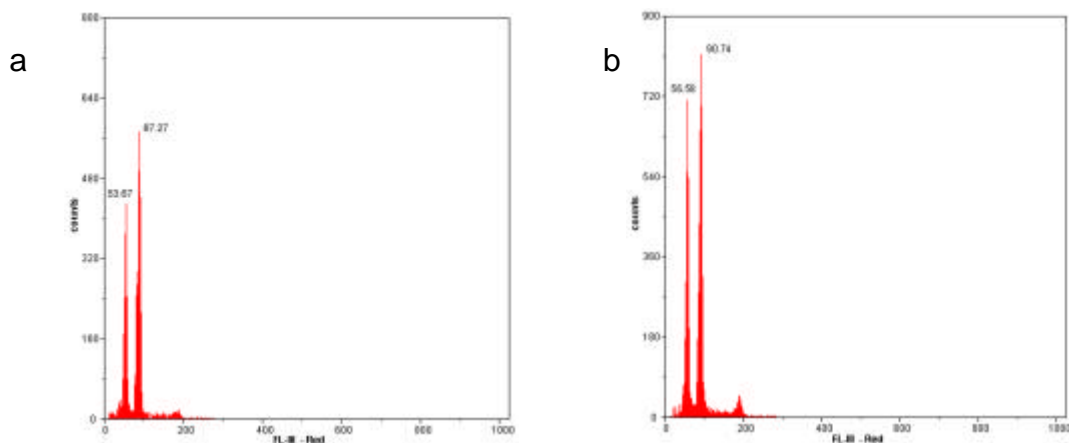


Figura 2 – Histogramas do conteúdo relativo de DNA nuclear de *E. globulus* e *L. esculentum* (a) e *E. grandis* e *L. esculentum* (b), obtidos após coloração com iodeto de propídeo. Leituras 002 e 003 do Quadro 4.

Quadro 4 – Valores das leituras referentes aos picos G1, coeficiente de variação (CV), índice e picogramas (pg) de DNA/2C obtidos nos histogramas gerados do processamento de *E. globulus* e *L. esculentum*, e *E. grandis* e *L. esculentum*.

| Nº | Leitura | CV | INDEX | Média INDEX | pg DNA/2C |
|----------------------|---------|------|-------|-------------|-----------|
| <i>L. esculentum</i> | | | | | |
| 001 | 89,19 | 3,04 | 1,00 | 1,00 | 1,96 |
| 002 | 87,27 | 2,41 | 1,00 | | |
| 003 | 90,74 | 2,57 | 1,00 | | |
| 004 | 88,74 | 3,29 | 1,00 | | |
| <i>E. globulus</i> | | | | | |
| 001 | 54,96 | 3,80 | 0,62 | 0,62 | 1,21 |
| 002 | 53,67 | 3,62 | 0,61 | | |
| <i>E. grandis</i> | | | | | |
| 003 | 56,58 | 3,58 | 0,62 | 0,63 | 1,22 |
| 004 | 55,65 | 2,73 | 0,63 | | |

O índice é igual a razão da leitura do pico G_0/G_1 de cada pico dos eucaliptos correspondentes pela leitura de *L. esculentum*.

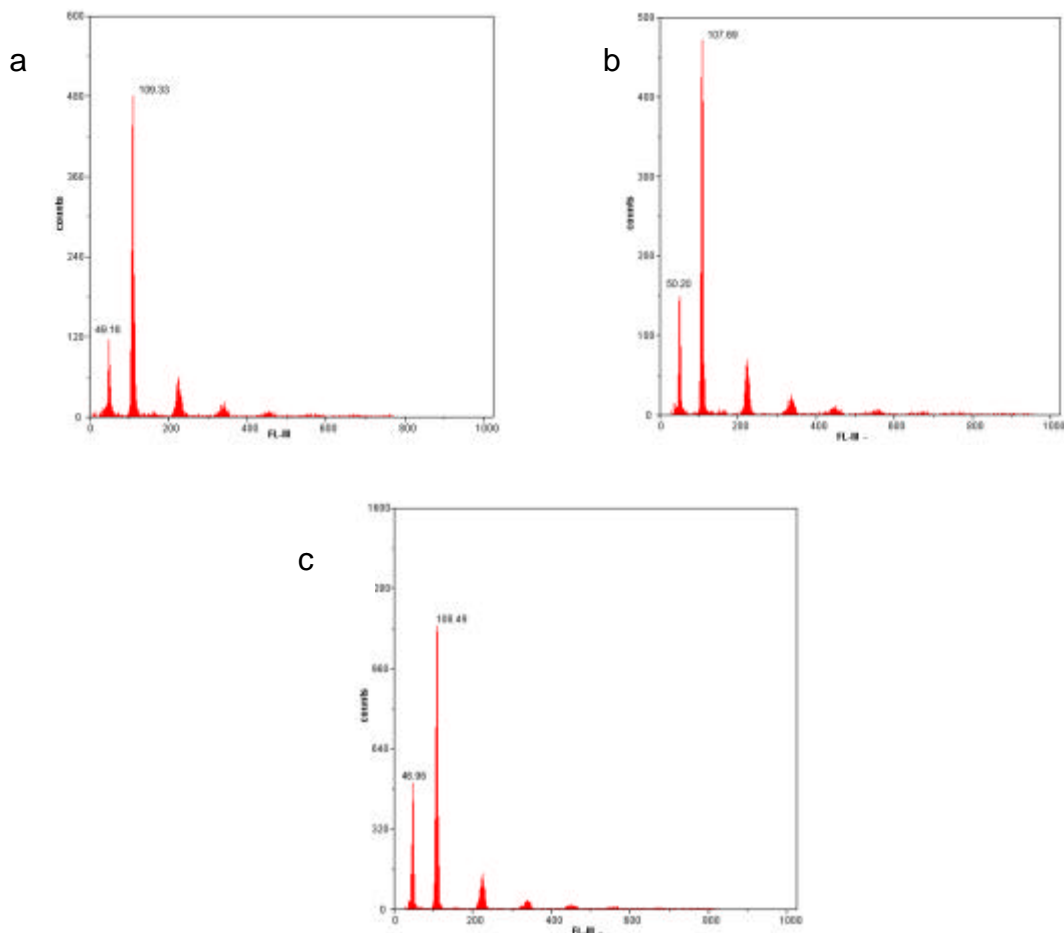


Figura 3 – Histogramas do conteúdo relativo de DNA nuclear de *E. globulus* e *G. gallus* (a), *E. grandis* e *G. gallus* (b) e *E. urophylla* e *G. gallus* (c), obtidos após coloração com iodeto de propídeo. Leituras 005, 006 e 003 do Quadro 5.

Quadro 5 - Valores das leituras referentes aos picos G1, coeficiente de variação (CV), índice e picogramas (pg) de DNA/2C obtidos nos histogramas gerados do processamento de *Eucalyptus globulus* e *Gallus gallus*, *E. grandis* e *G. gallus* e *E. urophylla* e *G. gallus*.

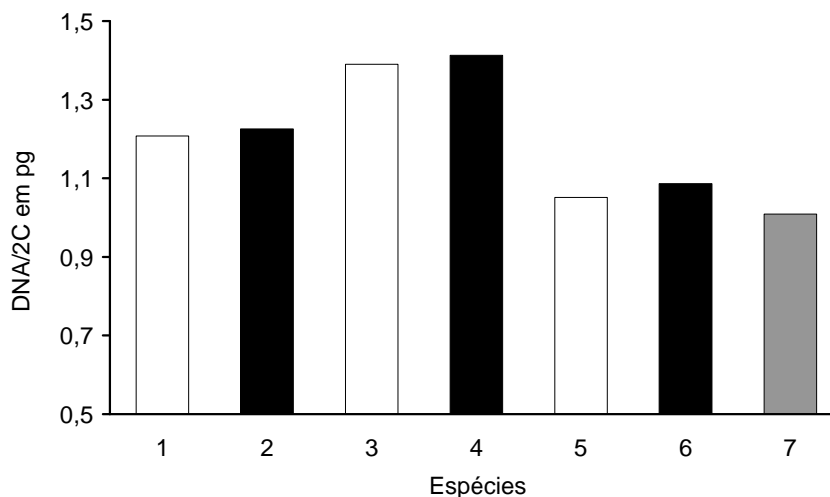
| Nº | Leitura | CV | INDEX | Média INDEX | pg DNA/2C |
|-----------------------|---------|------|-------|-------------|-----------|
| <i>G. gallus fêm.</i> | | | | | |
| 001 | 108,81 | 2,15 | 1,00 | 1,00 | 2,33 |
| 002 | 108,79 | 2,52 | 1,00 | | |
| 003 | 108,49 | 1,10 | 1,00 | | |
| 004 | 107,45 | 2,12 | 1,00 | | |
| 005 | 109,33 | 2,32 | 1,00 | | |
| 006 | 107,69 | 1,95 | 1,00 | | |
| <i>E. globulus</i> | | | | | |
| 004 | 50,06 | 3,16 | 0,47 | 0,47 | 1,05 |
| 006 | 50,20 | 3,15 | 0,47 | | |
| <i>E. grandis</i> | | | | | |
| 001 | 49,32 | 3,06 | 0,45 | 0,45 | 1,09 |
| 005 | 49,16 | 3,08 | 0,45 | | |
| <i>E. urophylla</i> | | | | | |
| 002 | 47,11 | 3,32 | 0,43 | 0,43 | 1,01 |
| 003 | 46,96 | 2,63 | 0,43 | | |

O índice é igual a razão da leitura do pico G_0/G_1 de cada pico dos eucaliptos correspondentes pela leitura de *G. gallus*.

Quadro 6 – Resumo geral da quantificação do conteúdo de DNA nuclear em picogramas (pg)/2C e mega pares de base (Mpb)/1C de *E. globulus*, *E. grandis* e *E. urophylla* combinados aos padrões.

| Gráficos | ÍNDEx | | | | | | | | | |
|----------------------|------------|------------|---------------|-------------------|-------------|-------------|---------|------|----------|-----|
| | Padrão | | | <i>Eucalyptus</i> | | | | | | |
| | <i>Lyc</i> | <i>Rap</i> | <i>Gallus</i> | <i>Glob</i> | <i>Gran</i> | <i>Urop</i> | | | | |
| <i>Lyc e Glob</i> | 1,00 | | | 0,62 | | | 2C (pg) | 1,21 | 1C (Mpb) | 590 |
| <i>Lyc e Gran</i> | 1,00 | | | | 0,63 | | | 1,23 | 599 | |
| <i>Rap e Glob</i> | | 1,00 | | 1,25 | | | | 1,39 | 680 | |
| <i>Rap e Gran</i> | | 1,00 | | | 1,27 | | | 1,41 | 691 | |
| <i>Gallus e Glob</i> | | | 1,00 | 0,45 | | | | 1,05 | 514 | |
| <i>Gallus e Gran</i> | | | 1,00 | | 0,47 | | | 1,09 | 531 | |
| <i>Gallus e Urop</i> | | | 1,00 | | | 0,43 | | 1,01 | 493 | |
| 2C (pg) | 1,96 | 1,11 | 2,33 | | | | | | | |

Lyc = *Lycopersicon esculentum*
Rap = *Raphanus sativus*
Ave = *Gallus gallus*
Glob = *Eucalyptus globulus*
Gran = *E. grandis*
Uro = *E. urophylla*



□ *Eucalyptus globulus*
■ *E. grandis*
■ *E. urophylla*
1 e 2 = *Lycopersicon esculentum*
3 e 4 = *Raphanus sativus*
5, 6 e 7 = *G. gallus*

Figura 4 – Comparação dos valores do conteúdo de DNA nuclear dos eucaliptos calculados em picogramas (pg), de acordo com os padrões utilizados.

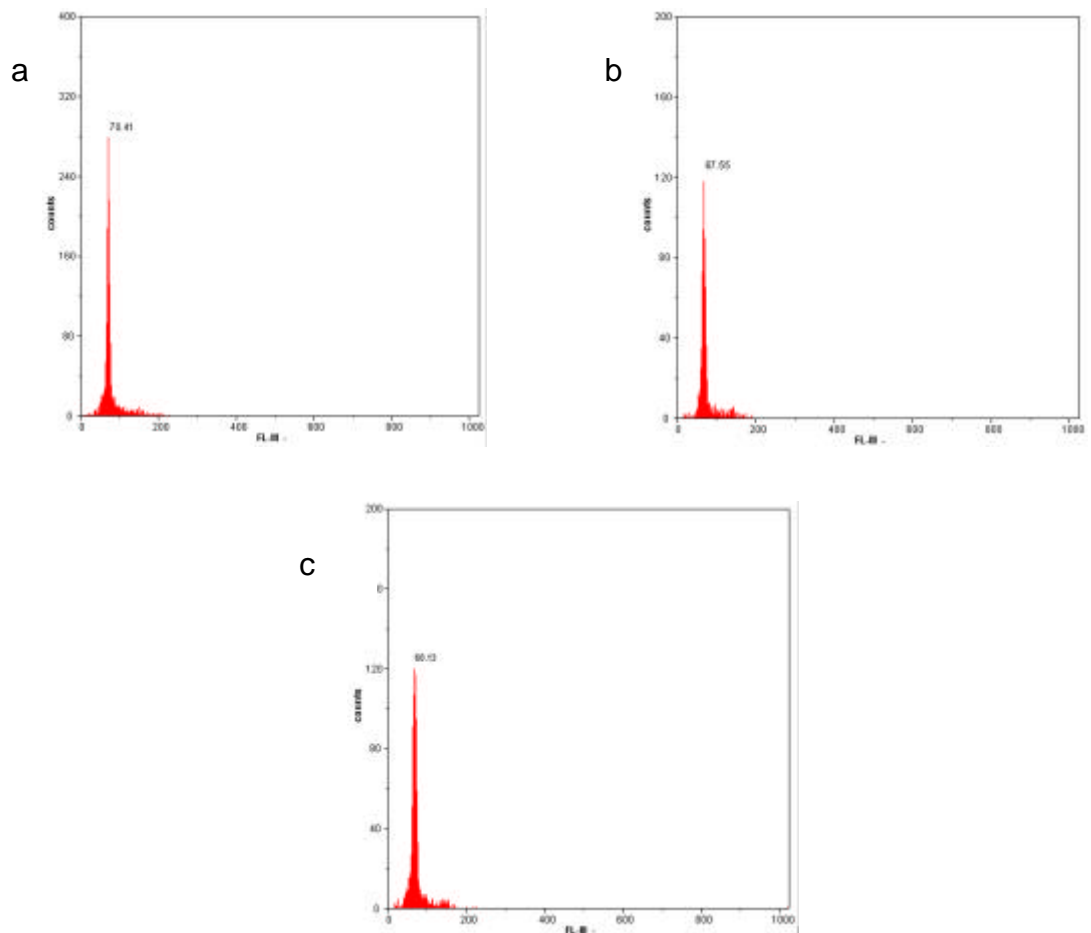
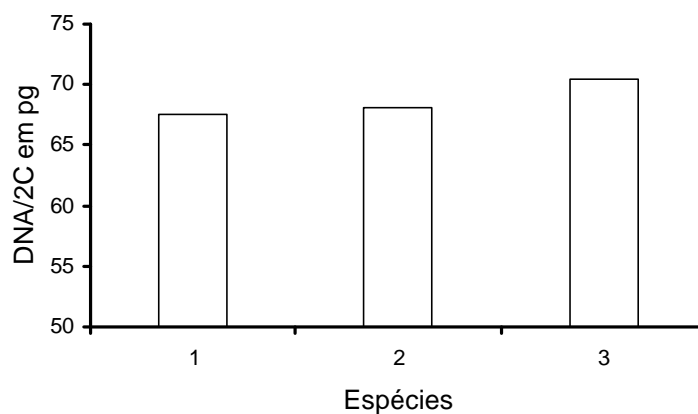


Figura 5 – Histogramas do conteúdo relativo de DNA nuclear de *E. globulus* e *E. grandis* (a), *E. globulus* e *E. urophylla* (b) e *E. urophylla* e *E. grandis* (c), obtidos após coloração com iodeto de propídeo.



1 = *Eucalyptus globulus* e *E. urophylla* (coeficiente de variação 1,83%).
 2 = *E. grandis* e *E. urophylla* (cv 2,70%)
 3 = *E. globulus* e *E. grandis* (cv 2,48%)

Figura 6 – Comparação entre as leituras dos picos dos núcleos combinados dos eucaliptos, corados com iodeto de propídeo.

Quadro 7 – Picogramas (pg) de DNA nuclear estimados via citometria de fluxo para *E. globulus* de acordo com a literatura.

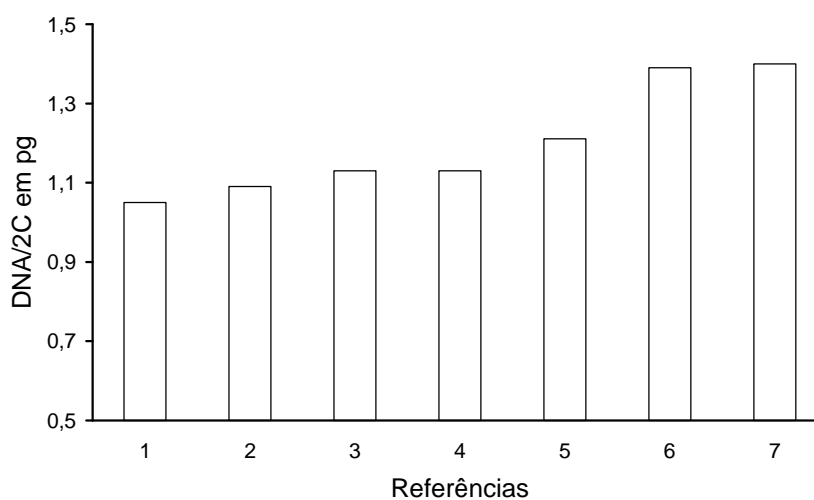
| Padrão | Fluorocromo | Luz | DNA/2C (pg) | CV | Referência |
|---------------------------|-------------|-------|-------------|------------|-------------------------------|
| <i>G. gallus</i> | IP | laser | 1,05 | 1,1 a 3,3 | Presente trabalho |
| Eritrócitos <i>Gallus</i> | DAPI | - | 1,09 | 6,3 a 12,8 | Grattapaglia e Bradshaw, 1994 |
| <i>G. domesticus</i> | * | - | 1,13 | - | Marie e Brown, 1993 |
| Eritrócitos <i>Gallus</i> | BE | laser | 1,13 | - | Azmi et al., 1997 |
| <i>L. esculentum</i> | IP | laser | 1,21 | 2,4 a 3,8 | Presente trabalho |
| <i>R. sativus</i> | IP | laser | 1,39 | 2,7 a 3,5 | Presente trabalho |
| <i>L. esculentum</i> | IP | laser | 1,40 | 4,6 a 6,8 | Pinto et al., 2004 |

* = Fluorocromo intercalante

BE = Brometo de etídeo

IP = Iodeto de propídeo

CV = Coeficiente de variação



3 = Marie e Brown, 1993

2 = Grattapaglia e Bradshaw, 1994

4 = Azmi *et al.*, 1997^b

7 = Pinto *et al.*, 1994

1, 5 e 6 = Presente trabalho

Figura 7 – Valores de DNA/2C em picogramas (pg) para *E. globulus* quantificados na literatura e pelo presente trabalho.

4.2 - Citometria de imagem

Utilizando os recursos da metodologia para coloração citoquímica pela reação de Feulgen observou-se que, para os diferentes tempos de exposição e temperaturas testadas para hidrólise, os resultados mais satisfatórios foram obtidos com a solução HCl 5 M por 60 min a 25 °C. O tempo de lavagem mais adequado na água sulfurosa, dos núcleos corados, foi de 10 min.

Dez núcleos em prófase inicial e dez em telófase tardia de cada planta, por lâmina, foram selecionados e mensurados (Figuras 8 a 13). Os núcleos corados pela reação de Feulgen capturados em objetiva 40 X foram segmentados; e cada densidade óptica integrada (DOI) nuclear foi calculada pelo programa Image Pro-Plus® 4.5. Os índices de DOI foram obtidos em todos os núcleos medidos (Quadros 8, 9, 10, 12, 13 e 14) e os coeficientes de variação (CV) ficaram abaixo de 4,86%. Tais dados demonstraram que os procedimentos que envolveram a preparação da lâmina, a coloração e a análise dos núcleos foram apropriados.

O conteúdo 4C de DNA para a *E. globulus* combinado ao padrão *L. esculentum* foi de 2,15 pg, e 2C de 1,02 pg. Quando combinado ao padrão *R. sativus*, o conteúdo 4C de DNA para *E. globulus* foi de 2,33, e o conteúdo 2C de 1,16 pg (Quadros 11 e 15).

O cálculo da razão entre os valores 4C e 2C em cada lâmina ficou entre 2,47 e 2,18 para *E. globulus*, e para *L. esculentum* entre 2,22 e 2,10. Para as lâminas com o outro padrão, *E. globulus* ficou entre 2,46 e 2,34 e *R. sativus* entre 2,30 e 2,53. A razão variou entre 9 e 23,5% para *E. globulus* e entre 4,5 e 11% para *L. esculentum* e nas outras lâminas entre 17 e 23% para *E. globulus* e 14,5 e 26,5% para *R. sativus*.

A partir do conteúdo 2C de DNA das plantas padrões, *R. sativus* 1,11 picogramas (pg) e *L. esculentum* 1,96, multiplicado por dois para corresponder ao conteúdo de DNA 4C das prófases iniciais, as unidades de DOI foram convertidas em picogramas de DNA (Quadros 11 e 15).

Comparando-se os resultados entre prófases e telófases, em pg de DNA, a telófase de *E. globulus* corresponde a 49,8 % (padrão *R. sativus*) e 47,4% (padrão *L. esculentum*) do valor da prófase. As razões prófase/telófase

de *E. globulus* ficaram entre 2:1 (padrão *R. sativus*) e 2,1:1 (padrão *L. esculentum*).

Nos resultados obtidos pela conversão da DOI em picogramas de DNA, (Quadros 11 e 15), observam-se diferenças entre as lâminas, do DNA total do genoma. Enquanto *E. globulus* apresenta 1,16 pg DNA/2C comparado à *R. sativus*, comparado à *L. esculentum* apresenta 1,02 pg DNA/2C; uma diferença de 14% (Figura 14).

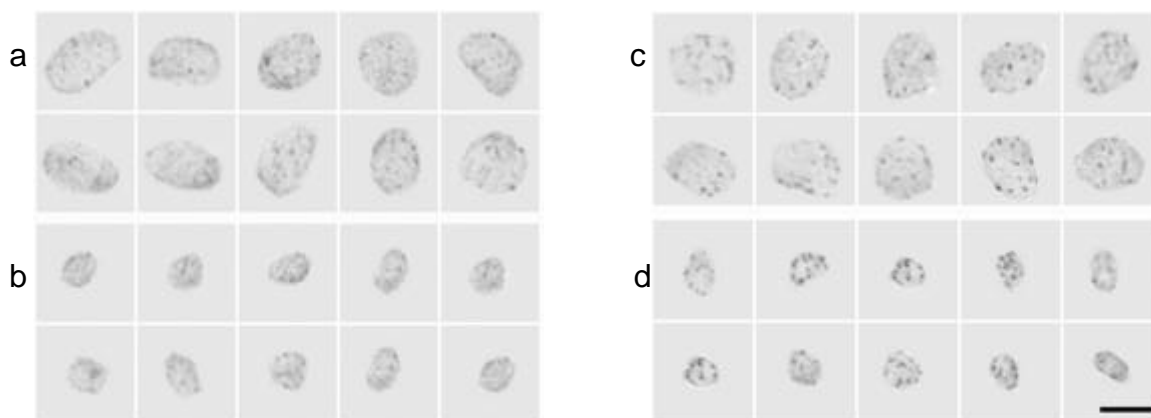


Figura 8 – Núcleos da lâmina I hidrolisados e corados por 24 h no reativo de Schiff. *Eucalyptus globulus* em prófase (a) e telófase (b). *Raphanus sativus* em prófase (c) e telófase (d). Barra = 10 μ m.

Quadro 8 – Valores de densidade óptica integrada (DOI), média (\bar{x}) e coeficientes de variação (CV) obtidos por citometria de imagem referente à figura 8.

| Lâmina I | Prófase | | | Telófase | | |
|--------------------|-----------|--------|------|-----------|-------|------|
| | Nº núcleo | DOI | CV | Nº núcleo | DOI | CV |
| <i>E. globulus</i> | 1 | 10,860 | | 1 | 4,363 | |
| | 2 | 10,730 | | 2 | 4,126 | |
| | 3 | 11,338 | | 3 | 4,510 | |
| | 4 | 10,866 | | 4 | 4,129 | |
| | 5 | 10,270 | | 5 | 4,088 | |
| | 6 | 10,112 | | 6 | 4,338 | |
| | 7 | 9,872 | | 7 | 4,486 | |
| | 8 | 10,525 | | 8 | 4,536 | |
| | 9 | 10,615 | | 9 | 4,304 | |
| | 10 | 10,605 | | 10 | 4,112 | |
| | \bar{x} | 10,579 | 3,76 | \bar{x} | 4,299 | 3,88 |
| <i>R. sativus</i> | 1 | 10,573 | | 1 | 3,850 | |
| | 2 | 9,857 | | 2 | 3,729 | |
| | 3 | 10,126 | | 3 | 4,066 | |
| | 4 | 10,231 | | 4 | 3,782 | |
| | 5 | 9,060 | | 5 | 3,649 | |
| | 6 | 9,732 | | 6 | 4,067 | |
| | 7 | 9,194 | | 7 | 4,113 | |
| | 8 | 9,564 | | 8 | 3,838 | |
| | 9 | 9,972 | | 9 | 3,831 | |
| | 10 | 9,185 | | 10 | 3,648 | |
| | \bar{x} | 9,749 | 4,86 | \bar{x} | 3,857 | 4,20 |

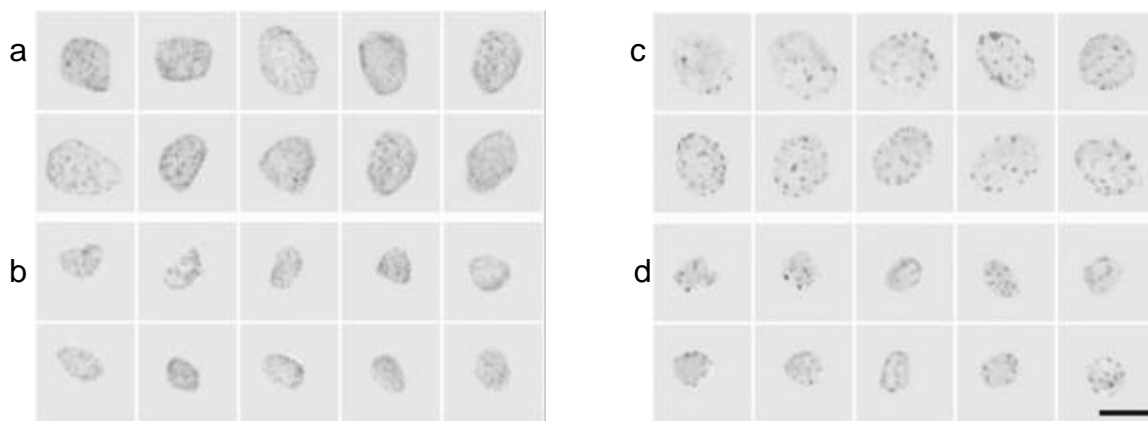


Figura 9 – Núcleos da lâmina II hidrolisados e corados por 24 h no reagente de Schiff. *Eucalyptus globulus* em prófase (a) e telófase (b). *Raphanus sativus* em prófase (c) e telófase (d). Barra = 10 μm .

Quadro 9 – Valores de densidade óptica integrada (DOI), média (\bar{x}) e coeficiente de variação (CV) obtidos por citometria de imagem referente à figura 9.

| Lâmina II | Prófase | | | Telófase | | |
|--------------------|-----------|--------|------|-----------|--------|------|
| | Nº núcleo | DOI | CV | Nº núcleo | DOI | CV |
| <i>E. globulus</i> | 1 | 9,781 | | 1 | 4,113 | |
| | 2 | 9,709 | | 2 | 3,740 | |
| | 3 | 10,195 | | 3 | 3,741 | |
| | 4 | 9,091 | | 4 | 4,173 | |
| | 5 | 9,630 | | 5 | 4,135 | |
| | 6 | 9,709 | | 6 | 3,863 | |
| | 7 | 9,439 | | 7 | 4,256 | |
| | 8 | 8,541 | | 8 | 4,213 | |
| | 9 | 9,207 | | 9 | 3,834 | |
| | 10 | 9,764 | | 10 | 3,8866 | |
| | \bar{x} | 9,507 | 4,60 | \bar{x} | 3,995 | 4,78 |
| <i>R. sativus</i> | 1 | 9,636 | | 1 | 3,924 | |
| | 2 | 9,549 | | 2 | 4,010 | |
| | 3 | 8,606 | | 3 | 3,793 | |
| | 4 | 9,046 | | 4 | 3,564 | |
| | 5 | 8,649 | | 5 | 3,691 | |
| | 6 | 8,566 | | 6 | 3,996 | |
| | 7 | 8,542 | | 7 | 3,516 | |
| | 8 | 8,536 | | 8 | 3,607 | |
| | 9 | 8,766 | | 9 | 3,793 | |
| | 10 | 8,847 | | 10 | 4,030 | |
| | \bar{x} | 8,875 | 4,39 | \bar{x} | 3,792 | 4,83 |

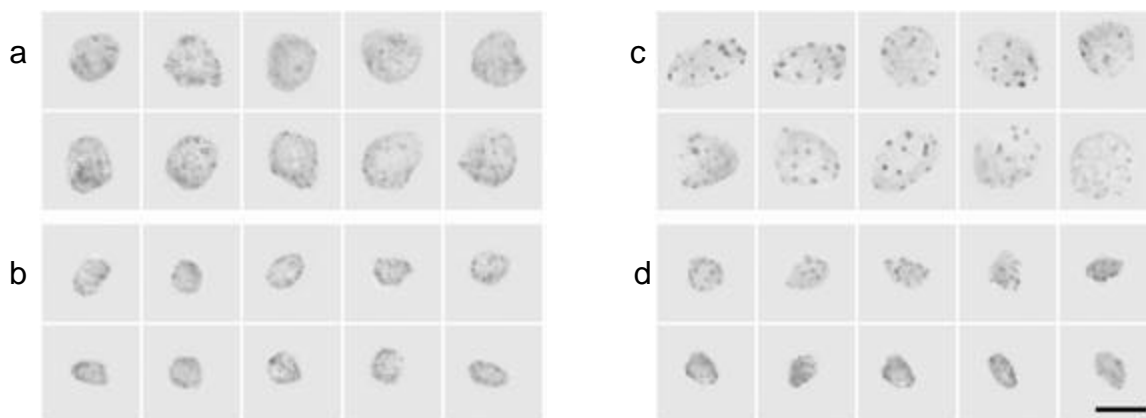


Figura 10 – Núcleos da lâmina III hidrolisados e corados por 24 h no reagente de Schiff. *Eucalyptus globulus* em prófase (a) e telófase (b). *Raphanus sativus* em prófase (c) e telófase (d). Barra = 10 μ m.

Quadro 10 – Valores de densidade óptica integrada (DOI), média (\bar{x}) e coeficiente de variação (CV) obtidos por citometria de imagem referente à figura 10.

| Lâmina III | Prófase | | | Telófase | | |
|--------------------|-----------|-------|------|-----------|-------|------|
| | Nº núcleo | DOI | CV | Nº núcleo | DOI | CV |
| <i>E. globulus</i> | 1 | 8,571 | | 1 | 3,837 | |
| | 2 | 9,132 | | 2 | 3,867 | |
| | 3 | 9,290 | | 3 | 3,893 | |
| | 4 | 9,409 | | 4 | 3,987 | |
| | 5 | 9,537 | | 5 | 4,012 | |
| | 6 | 9,574 | | 6 | 4,056 | |
| | 7 | 9,661 | | 7 | 4,114 | |
| | 8 | 9,744 | | 8 | 4,169 | |
| | 9 | 9,950 | | 9 | 4,302 | |
| | 10 | 9,977 | | 10 | 4,338 | |
| | \bar{x} | 9,484 | 4,17 | \bar{x} | 4,057 | 4,07 |
| <i>R. sativus</i> | 1 | 9,060 | | 1 | 4,009 | |
| | 2 | 9,073 | | 2 | 4,054 | |
| | 3 | 9,182 | | 3 | 4,067 | |
| | 4 | 9,565 | | 4 | 4,079 | |
| | 5 | 9,654 | | 5 | 4,086 | |
| | 6 | 9,680 | | 6 | 4,124 | |
| | 7 | 9,687 | | 7 | 4,181 | |
| | 8 | 9,717 | | 8 | 4,215 | |
| | 9 | 9,725 | | 9 | 4,280 | |
| | 10 | 9,863 | | 10 | 4,375 | |
| | \bar{x} | 9,521 | 2,96 | \bar{x} | 4,147 | 2,62 |

Quadro 11 – Quantificação do conteúdo de DNA de *Eucalyptus globulus* em picogramas (pg), padrão *Raphanus sativus*, via citometria de imagem.

| Lâmina | Planta | Prófase | | | Telófase | | | |
|--------|--------------------|---------|-------------|-----|----------|-------------|-----|-------|
| | | DOI | DNA 4C (pg) | CV | DOI | DNA 2C (pg) | CV | 4C/2C |
| I | <i>E. globulus</i> | 10,58 | 2,41 | 3,8 | 4,30 | 1,24 | 3,9 | 2,46 |
| I | <i>R. sativus</i> | 9,75 | 2,22 | 4,9 | 3,86 | 1,11 | 4,2 | 2,53 |
| II | <i>E. globulus</i> | 9,51 | 2,38 | 4,6 | 4,00 | 1,17 | 4,8 | 2,38 |
| II | <i>R. sativus</i> | 8,87 | 2,22 | 4,4 | 3,79 | 1,11 | 4,8 | 2,34 |
| III | <i>E. globulus</i> | 9,48 | 2,21 | 4,2 | 4,06 | 1,09 | 4,1 | 2,34 |
| III | <i>R. sativus</i> | 9,52 | 2,22 | 3,0 | 4,15 | 1,11 | 2,6 | 2,30 |
| Média | <i>E. globulus</i> | | 2,33 | | | 1,16 | | |

CV = coeficiente de variação.

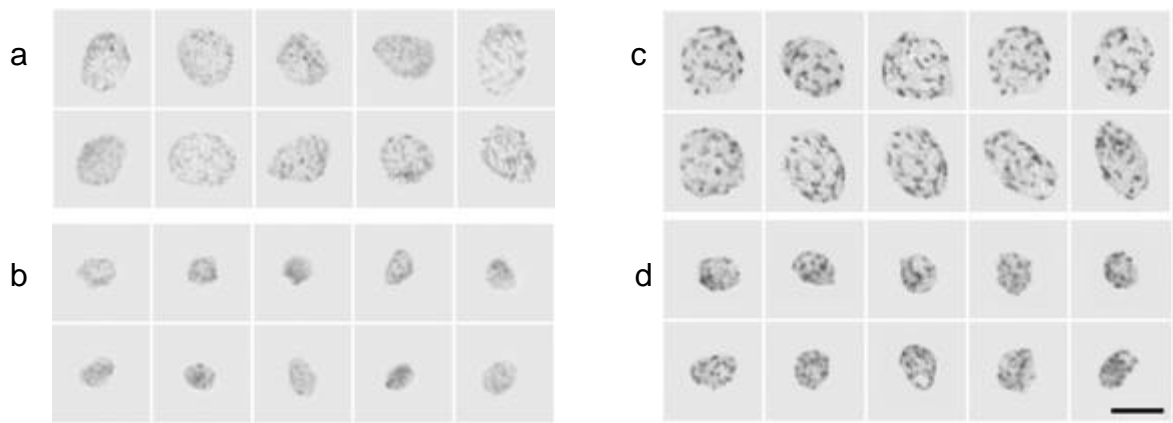


Figura 11 – Núcleos da lâmina IV hidrolisados e corados por 24 h no reagente de Schiff. *Eucalyptus globulus* em prófase (a) e telófase (b). *Lycopersicon esculentum* em prófase (c) e telófase (d). Barra = 10 μm .

Quadro 12 – Valores de densidade óptica integrada (DOI), média (\bar{x}) e coeficiente de variação (CV) obtidos por citometria de imagem referente à figura 11.

| Lâmina IV | Prófase | | | Telófase | | |
|----------------------|-----------|--------|------|-----------|-------|------|
| | Nº núcleo | DOI | CV | Nº núcleo | DOI | CV |
| <i>E. globulus</i> | 1 | 7,795 | | 1 | 3,243 | |
| | 2 | 7,816 | | 2 | 3,253 | |
| | 3 | 7,869 | | 3 | 3,284 | |
| | 4 | 8,042 | | 4 | 3,291 | |
| | 5 | 8,177 | | 5 | 3,346 | |
| | 6 | 8,482 | | 6 | 3,366 | |
| | 7 | 8,575 | | 7 | 3,366 | |
| | 8 | 8,658 | | 8 | 3,383 | |
| | 9 | 8,685 | | 9 | 3,424 | |
| | 10 | 8,744 | | 10 | 3,542 | |
| | \bar{x} | 8,284 | 4,41 | \bar{x} | 3,349 | 2,54 |
| <i>L. esculentum</i> | 1 | 13,949 | | 1 | 6,421 | |
| | 2 | 14,190 | | 2 | 6,488 | |
| | 3 | 14,720 | | 3 | 6,517 | |
| | 4 | 14,886 | | 4 | 6,554 | |
| | 5 | 14,895 | | 5 | 6,578 | |
| | 6 | 15,233 | | 6 | 6,848 | |
| | 7 | 15,359 | | 7 | 6,958 | |
| | 8 | 15,433 | | 8 | 7,091 | |
| | 9 | 15,713 | | 9 | 7,142 | |
| | 10 | 15,906 | | 10 | 7,184 | |
| | \bar{x} | 15,028 | 3,97 | \bar{x} | 6,778 | 4,18 |

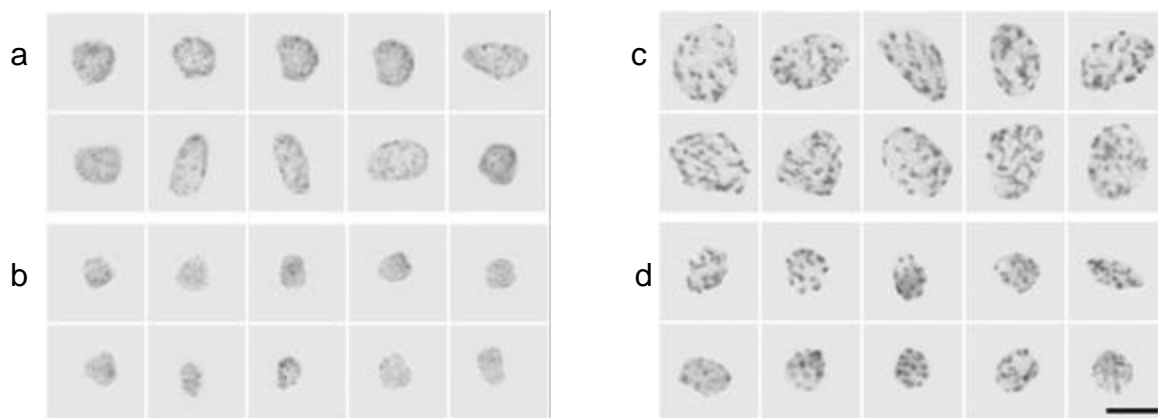


Figura 12 – Núcleos da lâmina V hidrolisados e corados por 24 h no reagente de Schiff. *Eucalyptus globulus* em prófase (a) e telófase (b). *Lycopersicon esculentum* em prófase (c) e telófase (d). Barra = 10 μm .

Quadro 13 – Valores de densidade óptica integrada (DOI), média (\bar{x}) e coeficiente de variação (CV) obtidos por citometria de imagem referente à figura 12.

| Lâmina V | Prófase | | | Telófase | | |
|----------------------|-----------|--------|------|-----------|-------|------|
| | Nº núcleo | DOI | CV | Nº núcleo | DOI | CV |
| <i>E. globulus</i> | 1 | 7,052 | | 1 | 3,204 | |
| | 2 | 7,081 | | 2 | 3,345 | |
| | 3 | 7,592 | | 3 | 3,366 | |
| | 4 | 7,594 | | 4 | 3,440 | |
| | 5 | 7,609 | | 5 | 3,517 | |
| | 6 | 7,834 | | 6 | 3,537 | |
| | 7 | 7,853 | | 7 | 3,557 | |
| | 8 | 7,948 | | 8 | 3,646 | |
| | 9 | 7,979 | | 9 | 3,668 | |
| | 10 | 7,983 | | 10 | 3,756 | |
| | \bar{x} | 7,652 | 4,28 | \bar{x} | 3,503 | 4,54 |
| <i>L. esculentum</i> | 1 | 13,821 | | 1 | 6,414 | |
| | 2 | 13,972 | | 2 | 6,569 | |
| | 3 | 14,034 | | 3 | 6,741 | |
| | 4 | 14,039 | | 4 | 6,843 | |
| | 5 | 14,414 | | 5 | 6,866 | |
| | 6 | 14,585 | | 6 | 6,898 | |
| | 7 | 14,604 | | 7 | 6,938 | |
| | 8 | 14,606 | | 8 | 7,075 | |
| | 9 | 15,172 | | 9 | 7,186 | |
| | 10 | 15,363 | | 10 | 7,389 | |
| | \bar{x} | 14,460 | 3,38 | \bar{x} | 6,891 | 3,91 |

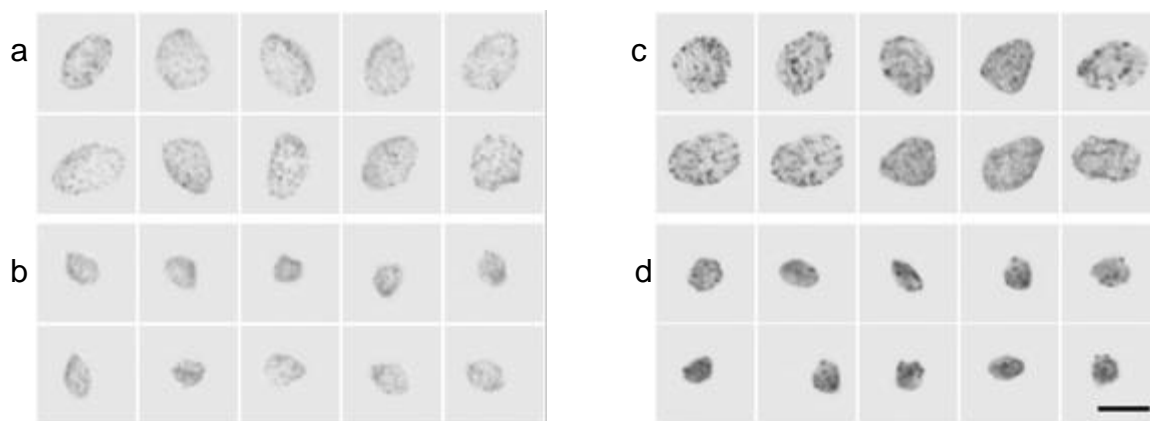


Figura 13 – Núcleos da lâmina VI hidrolisados e corados por 24 h no reagente de Schiff. *Eucalyptus globulus* em prófase (a) e telófase (b). *Lycopersicon esculentum* em prófase (c) e telófase (d). Barra = 10 μm .

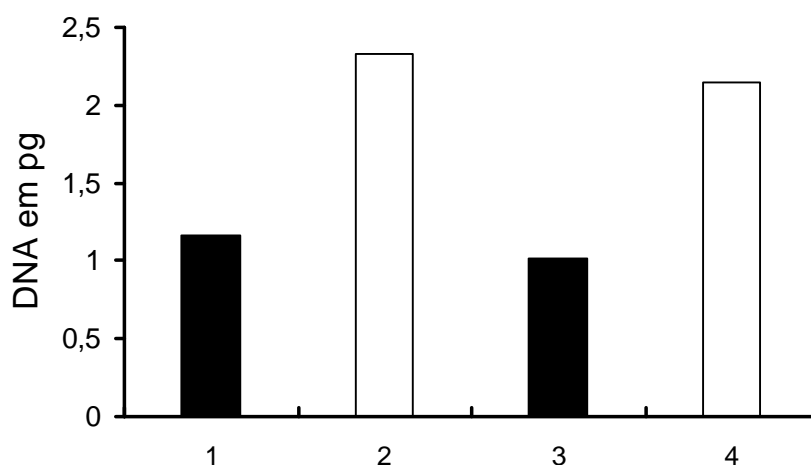
Quadro 14 – Valores de densidade óptica integrada (DOI), média (\bar{x}) e coeficiente de variação (CV) obtidos por citometria de imagem referente à figura 13.

| Lâmina VI | Prófase | | | Telófase | | |
|----------------------|-----------|--------|------|-----------|-------|------|
| | Nº núcleo | DOI | CV | Nº núcleo | DOI | CV |
| <i>E. globulus</i> | 1 | 7,672 | | 1 | 3,583 | |
| | 2 | 7,918 | | 2 | 3,586 | |
| | 3 | 8,275 | | 3 | 3,618 | |
| | 4 | 8,417 | | 4 | 3,817 | |
| | 5 | 8,520 | | 5 | 3,825 | |
| | 6 | 8,543 | | 6 | 3,883 | |
| | 7 | 8,657 | | 7 | 3,916 | |
| | 8 | 8,695 | | 8 | 3,932 | |
| | 9 | 8,792 | | 9 | 3,951 | |
| | 10 | 8,939 | | 10 | 4,045 | |
| | \bar{x} | 8,442 | 4,42 | \bar{x} | 3,815 | 4,10 |
| <i>L. esculentum</i> | 1 | 14,208 | | 1 | 6,641 | |
| | 2 | 14,432 | | 2 | 6,686 | |
| | 3 | 14,475 | | 3 | 6,788 | |
| | 4 | 14,667 | | 4 | 6,793 | |
| | 5 | 14,722 | | 5 | 6,858 | |
| | 6 | 14,774 | | 6 | 6,876 | |
| | 7 | 15,088 | | 7 | 6,878 | |
| | 8 | 15,255 | | 8 | 6,908 | |
| | 9 | 15,672 | | 9 | 6,928 | |
| | 10 | 15,719 | | 10 | 6,944 | |
| | \bar{x} | 14,901 | 3,29 | \bar{x} | 6,829 | 1,42 |

Quadro 15 – Quantificação do conteúdo de DNA de *Eucalyptus globulus* em picogramas (pg), padrão *Lycopersicon esculentum*, via citometria de imagem.

| Lâmina | Planta | Prófase | | | Telófase | | | CV 4C/2C |
|--------|---------------------|---------|-------------|-----|----------|-------------|-----|----------|
| | | DOI | DNA 4C (pg) | CV | DOI | DNA 2C (pg) | CV | |
| IV | <i>E. globulus</i> | 8,28 | 2,16 | 4,4 | 3,35 | 0,97 | 2,5 | 2,47 |
| IV | <i>L.esculentum</i> | 15,03 | 3,92 | 4,0 | 6,78 | 1,96 | 4,2 | 2,22 |
| V | <i>E. globulus</i> | 7,65 | 2,07 | 4,3 | 3,50 | 1,00 | 4,5 | 2,18 |
| V | <i>L.esculentum</i> | 14,46 | 3,92 | 3,4 | 6,89 | 1,96 | 3,9 | 2,10 |
| VI | <i>E. globulus</i> | 8,44 | 2,22 | 4,4 | 3,82 | 1,09 | 4,1 | 2,21 |
| VI | <i>L.esculentum</i> | 14,90 | 3,92 | 3,3 | 6,83 | 1,96 | 1,4 | 2,18 |
| Média | <i>E. globulus</i> | | 2,15 | | | 1,02 | | |

CV = coeficiente de variação.



■ = telófase
□ = prófase
1 e 2 = padrão *R. sativus*
3 e 4 = padrão *L. esculentum*

Figura 14 – Comparação da quantidade de DNA para *E. globulus* em prófase e telófase, obtida com os padrões *Raphanus sativus* e *Lycopersicon esculentum*.

5- DISCUSSÃO

Os histogramas obtidos via citometria de fluxo (Figuras 1, 2 e 3), associados aos baixos coeficientes de variação (CV) indicam que os núcleos foram isolados adequadamente, em quantidade suficiente e não sofreram danos significativos durante a extração, coloração e análise. Por conseguinte, o procedimento aplicado para estimar o conteúdo de DNA nuclear em amostras de eucalipto pode ser considerado apropriado.

Os valores em picogramas de DNA de *E. globulus* e *E. grandis* apresentaram-se 15% maiores nas análises cujo padrão foi *R. sativus* quando comparados com o padrão *L. esculentum* (Quadro 6) Além disso, quando comparados os valores de *E. globulus* do presente trabalho com os apresentados pela literatura, diferenças de até 33% são encontradas (Quadro 7). A citometria de fluxo possui precisão e sensibilidade para determinar a quantidade de DNA (MICHAELSON *et al.*, 1991), mas os Quadros 6 e 7 informaram diferenças nos resultados de *Eucalyptus*. As explicações podem ser, segundo Schifino (2001), uma real diferença intraespecífica do DNA nuclear ou de erros metodológicos.

Para os divergentes valores encontrados nesse trabalho, a hipótese de existir uma real diferença intraespecífica é descartada, uma vez que as folhas dos padrões e dos eucaliptos usadas nas análises foram provenientes da mesma planta. Diferenças nas estimativas do conteúdo de DNA nuclear de *R. sativus* e *L. esculentum* podem ser o motivo dos valores encontrados não serem iguais.

Da mesma forma como mostrado no Quadro 2, os conteúdos de DNA dos padrões utilizados neste trabalho apresentaram uma variedade de

diferentes valores estimados pela literatura. Visto que as plantas cultivadas usadas como padrões são de procedência do mesmo laboratório no qual também foram feitos trabalhos de quantificação de DNA das mesmas, a referência escolhida foi a publicada por Dole *et al.* (1992). Neste estudo considerou-se que o conteúdo de DNA dos padrões internos foram de 1,11 picogramas (pg) DNA/2C para *R. sativus* e 1,96 para *L. esculentum* (Quadro 2).

Em outro trabalho utilizando a mesma variedade de *R. sativus*, comparada com os padrões *Allium cepa* e *Pisum sativum* em diferentes laboratórios, Dole *et al.* (1998) estimaram valores que chegaram a 48,9 % de diferenças no conteúdo de DNA nuclear. Visto que esses dados são referências na literatura, ainda não se chegou a um consenso e um conjunto de padrões para referências e calibrações cuja metodologia não interfira no conteúdo de DNA nuclear previamente determinado. Assim, uma das causas dos desvios nos dados referentes aos padrões vegetais aqui usados seria uma real diferença em seus tamanhos genômicos. Para os demais trabalhos da literatura, essa mesma afirmação não pode ser feita. Resta então, comparar as metodologias aplicadas.

As variações dos aspectos metodológicos dificultam a comparação dos dados obtidos em diferentes laboratórios (DOLE EL, 1997; GREILHUBER, 1998, 2005). Segundo Dole *et al.* e Bartoš (2005), a estimativa do valor absoluto de DNA nuclear em plantas, via citometria de fluxo, não é uma questão somente de análise dos picos e comparação com o DNA padrão.

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. Para Dole *et al.* 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.

Dole *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, no caso da espécie *Allium cepa*. Estes autores questionaram a confiança dos fluorocromos base específicos, recomendam corantes intercalantes nas medias absolutas do genoma e ainda citam que o iodeto de

propídeo e o brometo de etídeo possuem propriedades similares de ligação ao DNA.

De acordo com o exposto, os trabalhos adequados à estimação do conteúdo de DNA em eucaliptos foram os que usaram fluorocromos intercalantes, incluindo o iodeto de propídeo aqui utilizado (Quadro 7).

Especialmente em plantas lenhosas, exemplo dos eucaliptos, devido aos compostos secundários, a cromatina é exposta tanto ao tampão de extração nuclear quanto aos componentes citosólicos e vacuolares durante o isolamento do núcleo. Segundo Noirot *et al.* (2003) e Dole el e Bartoš (2005), o corante fluorescente deve ter acesso a todos os sítios de ligação no DNA. Para estes autores, as interações núcleo-citosol são uma fonte de erro estequiométrico. Alguns compostos secundários, como os fenóis, são conhecidos por interagirem com proteínas e modificarem o acesso do corante à cromatina (GREILHUBER, 1988 citado por NOIROT *et al.*, 2005).

No presente trabalho e no de Grattapaglia e Bradshaw (1994) a etapa de centrifugação foi realizada; nos demais, os núcleos não passaram por esse passo ou não há informação suficiente para inferir. De acordo com Price *et al.* (2000), Noirot *et al.* (2000) e Dole el e Bartoš (2005), a diluição da suspensão nuclear ou a remoção do citosol pela centrifugação ajuda a reduzir os efeitos dos compostos citosólicos. Tal afirmação pode explicar as diferenças encontradas entre o presente trabalho e o de Pinto *et al.* (2004). Ambos utilizando o mesmo padrão interno *L. esculentum*, encontraram diferentes valores para os núcleos foliares de *E. globulus* (Quadro 7).

Dessa forma, os experimentos de quantificação do DNA necessitam que a estrutura da cromatina entre as plantas comparadas seja o mais similar, uma vez que elas devem reagir de modo semelhante aos compostos que interferem em sua coloração (DOLE EL e BARTOŠ, 2005).

Johnston *et al.* (1999) não recomendam o emprego de hemácias de galinha. Segundo eles, as divergências nos valores estimados e pela diferente estrutura entre células animais e células vegetais, fazem com que as hemácias não sejam um padrão apropriado. Estes autores encontraram dificuldades no uso dos eritrócitos de galinha como padrão de referência. Ao estimar o conteúdo de DNA de duas amostras de diferentes sangues de *Gallus domesticus*, eles 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 difere ainda da literatura mais citada (GALBRAITH *et al.*, 1983) que publicaram o valor de 2,33 pg DNA/2C.

Segundo Price e Johnston (1996) e Dole el e Bartoš (2005), o padrão 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 dos histogramas. No presente trabalho foram utilizados padrões vegetais com valores de DNA logo abaixo do DNA genômico dos eucaliptos (*R. sativus*) e acima (*L. esculentum*), além de *G. gallus* para efeito de comparação com os dados da literatura.

O tipo de luz empregado para produzir fluorescência no DNA corado foi mais uma das variantes encontradas nos trabalhos que determinaram a quantidade de DNA nuclear em *E. globulus*. Neste trabalho, no de Azmi *et al.* (1997^b) e Pinto *et al.* (2004), foram usados citômetros com fonte de luz a *laser*. Já os demais trabalhos de quantificação de *E. globulus* não citam a fonte de luz na metodologia.

No artigo de Dole el *et al.* (1998), comparações entre quatro laboratórios, dois usando fonte de luz a *laser* e dois usando lâmpada para excitação do iodeto de propídeo e DAPI, mostraram diferenças significativas entre ambas as fontes. As estimativas do conteúdo de DNA com citômetros a *laser* foram maiores dos que os obtidos com citômetros baseados em lâmpada ou com os dados obtidos pela citometria de imagem.

Portanto, a fonte de luz pode causar variações nas leituras dos picos, mas não houve dados suficientes na literatura para possíveis comparações dos valores. Os dados de variação dos pg de DNA encontrados na literatura também são insuficientes para uma comparação entre todos os trabalhos que quantificaram o DNA genômico de *E. globulus* (Quadro 7).

Para Marie e Brown (1993), gráficos com CVs entre 1 e 2% são considerados de boa qualidade, e gráficos de análises de rotina com CV abaixo de 3% são considerados aceitáveis. De acordo com Yanparisan *et al.* (1999), enquanto análises em humanos e animais um CV ente 1 e 2% é tido como de boa qualidade, em plantas essa boa qualidade geralmente fica entre 5 e 8%. Conforme Dole el e Bartoš (2005), tal precisão é difícil de ser conseguida em

algumas plantas, por isso estes autores aceitaram como admissíveis valores de CV menores que 5%.

Em ambos os trabalhos que citam o CV, Grattapaglia e Bradshaw (1994) e Pinto *et al.* (2004), apresentaram valores maiores dos que os aceitos por Marie e Brown (1993) e Dole el e Bartoš (2005) (Quadro 7). No presente trabalho, o CV maior foi de 3,8%.

O CV dos picos da intensidade de fluorescência relativa quantifica a precisão de uma medida individual, mas nada se pode afirmar quanto à reprodutividade da estimação do conteúdo de DNA (DOLE EL E BARTOŠ, 2005).

Nas comparações interespecíficas dos gráficos com padrão interno hemácias de galinha, o menor valor corresponde à espécie *E. urophylla*, e o maior à *E. grandis*. Pelo fato dos CVs não serem menores do que a metade das diferenças encontradas nas médias, não foi possível afirmar o menor conteúdo de DNA em *E. urophylla*. Além disso, análises das combinações dois a dois dos três eucaliptos não distinguiram mais que um pico G_0/G_1 de intensidade de fluorescência (Figura 5), com CV abaixo de 2,70% (Figura 6). Desse modo, entre as espécies avaliadas, *E. globulus*, *E. grandis* e *E. urophylla*, a citometria de fluxo não revelou a ocorrência de variação na quantidade de DNA nuclear. No artigo de Grattapaglia e Bradshaw (1994), as espécies *E. grandis* e *E. urophylla* também possuíram o mesmo conteúdo de DNA nuclear (1,33 e 1,34 pg DNA/2C, CV 6,3 a 12,8%).

Embora pela citometria de fluxo não haja diferença entre os valores de *E. globulus* e *E. grandis*, as amostras de *E. globulus* mostraram-se 0,8 a 3,8% menores em todas as análises (Figura 4). A diferença entre as espécies no trabalho de Grattapaglia e Bradshaw (1994) foi de 0,24 pg de DNA/2C, uma diferença significativa (CV 6,3 a 12,8%). A procedência das plantas usadas nesse e no presente trabalho não foram as mesmas, o que pode ser uma das causas da incongruência encontrada.

De acordo com os assuntos discutidos até então, e concordante com Greilhuber (2005), o problema da existência de variações no tamanho do genoma é multifacetado, envolvendo aspectos na preparação, no material escolhido e na instrumentação. Conforme Dole el e Bartoš (2005), quando as diferentes metodologias e os diferentes instrumentos da citometria de fluxo não

são divulgados em detalhes, a diferença entre laboratórios deve ser interpretada com precaução.

Segundo Puech e Giroud (1999), a complexidade da instrumentação da citometria de imagem também requer um rigoroso controle de qualidade em todos os passos do processamento. Um aspecto relevante na citometria de imagem é a utilização do padrão interno, o processamento das raízes e a preparação das lâminas em conjunto, o qual foi aqui adotado. Além disso, o Reativo de Schiff não ultrapassou mais do que 30 dias após o preparo, e foi usado somente uma vez, como recomendado por Hardie *et al.* (2002).

Os tecidos usados na preparação das lâminas foram os mesmos: 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).

Segundo os preceitos usados na medicina e aplicados em plantas conforme Böcking e Nguyen (2004), o valor ideal de 2, mais ou menos 10%, para a razão 4C/2C de cada planta não foi aqui alcançado nas análises com o padrão *R. sativus* e na lâmina IV com o padrão *L. esculentum* (Quadros 11 e 15). 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.

Dessa forma, os valores altos encontrados de 4C/2C para os padrões da pesquisa médica, e as diferenças em pg entre as medidas, não foram consequência da preparação das lâminas, do uso de padrões com estrutura celular diferente e da calibração do equipamento. No trabalho de Vilhar *et al.* (2001) as análises de um laboratório com *Arabidopsis thaliana* e *R. sativus* apresentaram as razões 4C/2C maiores do que 2,1. Eles justificaram o resultado como consequência da diferença nas propriedades ópticas das figuras (prófases e telófases) selecionadas, as mesmas utilizadas no presente trabalho. Além disso, propõem que os parâmetros utilizados na medicina são adaptados ao genoma humano, e que em plantas estes devem ser revistos.

Um fator que pode ter influenciado as medidas de telófases e prófases é as diferentes densidades que o núcleo pode apresentar, principalmente quando há maior quantidade de heterocromatina (PRICE, 1988). 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 dos padrões e de *E. globulus* podem ser visualizadas nas Figuras 8 a 13. De acordo com Price e Johnston (1996), o grau de compactação da cromatina interfere na formação de grupos aldeídos, consequência da proporção diferencial de depuração entre a cromatina condensada e descondensada durante a hidrólise. Hardie *et al.* (2002) afirmam que diferenças no nível de compactação do DNA são os principais obstáculos na comparação entre núcleos do padrão com a amostra.

Pelos aspectos citados acima, diferenças na espessura e na natureza química das raízes de *E. globulus* e dos padrões podem não ter assinalado iguais condições de hidrólise nas prófases e telófases. Neste sentido, as variações encontradas nos dados podem ser o resultado dos diferentes comportamentos nucleares das plantas, com curvas de hidrólise dissemelhantes.

Ao comparar os resultados entre prófases e telófases, em pg de DNA, a telófase de *E. globulus* corresponde a 49,8 % (padrão *R. sativus*) e 47,4 % (padrão *L. esculentum*) do valor da prófase. As razões prófase/telófase de *E. globulus* ficaram entre 2:1 (padrão *R. sativus*) e 2,1:1 (padrão *L. esculentum*). Tais proporções demonstram a linearidade dos dados dentro de cada padrão.

Os resultados da quantificação do DNA genômico no presente trabalho, via citometria de imagem, variou de 0,18 pg de DNA/4C e 0,14 pg de DNA/2C entre a utilização dos padrões *R. sativus* e *L. esculentum* respectivamente (Figura 14). Os desvios encontrados entre as lâminas provavelmente ocorreram em virtude das variações nas etapas de hidrólise, coloração e preparo da lâmina; ou mesmo pela já discutida variação entre os DNAs dos padrões *R. sativus* e *L. esculentum*.

Neste trabalho, comparações na citometria empregando hemácias de galinha como padrão não foram feitas. Segundo Price e Johnston (1996), ainda que alguns trabalhos recomendem o uso das hemácias como padrão, na citometria de imagem, a curva de hidrólise dos núcleos de planta e galinha são geralmente muito diferentes.

O coeficiente de variação (CV) abaixo de 6% é considerado aceitável na área médica por Böcking *et al.* (1995). A adequação das metodologias, a coloração homogênea nas fases analisadas e a calibração dos equipamentos de microscopia garantiram o processamento das imagens digitais no programa de análise de imagem Image Pro-Plus® 4.5 com o CV adequado (Quadros 11 e 15).

Na área médica, Bertino *et al.* (1994) e Borgiani *et al.* (1994) compararam as duas citometrias, de fluxo e imagem no prognóstico de câncer. Os autores chegaram à mesma conclusão, que ambos os métodos geraram resultados comparáveis.

Galbraith *et al.* (1983) encontraram a maioria dos valores da quantidade de DNA em plantas, feitos em seu laboratório por meio da citometria de fluxo, correlacionados com os valores da literatura determinados pela citometria de imagem. Os conteúdos de DNA obtidos pelas citometrias de fluxo e de imagem em milho foram equivalentes, e detectaram pequenas variações nos genomas portadores de cromossomos B. As metodologias foram realizadas no mesmo laboratório do presente trabalho por Rosado (2004).

Outros artigos foram publicados com as citometrias de fluxo e imagem para a análise do conteúdo de DNA em plantas (GREILHUBER e OBERMAYER, 1999; TEMSCH e GREILHUBER, 2000). As técnicas também foram confrontadas nos trabalhos de 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 aqui obtidos para *E. globulus* foram de 1,02 pg DNA/2C via citometria de imagem e 1,21 via citometria de fluxo, utilizando o padrão *L. esculentum* var Stupicke. Os valores encontrados utilizando o padrão *R. sativus* var. Saxa foram de 1,16 na citometria de imagem e 1,39 pg DNA/2C na citometria de fluxo (Quadros 6, 11 e 15). Ambas as mensurações entre a citometria de imagem e de fluxo realizadas com os padrões *R. sativus* e *L. esculentum* possuíram a mesma diferença: as medidas com Feulgen são 16% menores.

Os autores Greilhuber (1988), Johnston *et al.* (1999) para *Allium cepa*, e Noirot *et al.* (2000; 2002) não encontraram uma correlação entre os dados resultantes das duas citometrias. Noirot *et al.* (2000; 2002) apontam a

influência de compostos citosólicos como perturbadores no cálculo do tamanho do genoma via citometria de fluxo.

Noirot *et al* (2003), concluíram que a cafeína e o ácido clorogênico de *Coffea* modificaram a acessibilidade do iodeto de propídeo à *Petunia*, o padrão utilizado nas pesquisas. Um das hipóteses para diferentes conteúdos de DNA em *Helianthus annuus* que cresceram sob diversas intensidades de luz, segundo Price *et al.* (1998), é o acúmulo diferencial de compostos secundários nas plantas. Hendrix e Stewart (2005) não recomendam o uso de *Hordeum vulgare* como padrão interno para *Gossypium*, por ocorrer um aumento na estimativa do conteúdo de DNA.

A suposição que melhor explica essa mesma diferença para os dois padrões é a presença de compostos citosólicos em *E. globulus*, que influenciam a coloração da cromatina pelo fluorocromo iodeto de propídeo.

O conteúdo de DNA nuclear 2C em pg em embriões e folhas de *E. globulus* variou de 1,28 à 1,40 no trabalho de Pinto *et al.* (2004). Eles encontraram uma diferença significativa nesses valores entre os grupos analisados. Além disso, ao processar simultaneamente e independentemente os núcleos foliares de *E. globulus* e *L. esculentum*, os autores encontraram uma redução da fluorescência na padronização interna. Eles sugeriram que os eucaliptos contêm componentes extranucleares que inibem o acesso do iodeto de propídeo ao DNA, e que tais compostos podem estar em menores concentrações em outros órgãos.

Os compostos presentes em *E. globulus* podem estar ligados à menor coloração da cromatina tanto por inibir diretamente o acesso do fluorocromo ao DNA, quanto por incitar a ação de inibidores de coloração.

Pelas incongruências encontradas nas análises em diferentes laboratórios, foi necessário estudo com padrões comuns em ambas as técnicas, para que as possíveis causas das divergências pudessem ser examinadas.

Comparada com a citometria de fluxo, a citometria de imagem é considerada um método melhor estabelecido, pela não influência de metabólitos secundários na coloração da cromatina (DOLE EL *et al.*, 1998). Nesse sentido, de todos os valores obtidos, os mais confiáveis em acurácia são aqueles cuja técnica empregada foi a citometria de imagem.

6 – CONCLUSÕES

As espécies *E. globulus*, *E. grandis* e *E. urophylla* aqui analisadas não apresentaram diferenças entre si maiores que 5,4% do conteúdo de DNA nuclear, pela citometria de fluxo.

As comparações de *E. globulus* combinado a *R. sativus* ou *L. esculentum* não forneceram valores iguais de conteúdo de DNA. Entretanto, os padrões de referência utilizados responderam igualmente na diferença de 14% entre si dos valores encontrados entre a citometria de fluxo, em torno de 16 % maior, e a citometria de imagem. Provavelmente por consequência de compostos secundários facilitadores de coloração da cromatina.

Por conseguinte às interferências de coloração via citometria de fluxo, e às prováveis modificações dos valores genômicos dos padrões vegetais, a quantidade de DNA nuclear em picogramas para *E. globulus* foi considerada a média dos dados obtidos via citometria de imagem. Embora, a técnica mais precisa, pelos menores coeficientes de variação seja a citometria de fluxo. Combinado à *R. sativus* *E. globulus* apresenta 1,16 e à *L. esculentum* 1,02 pg DNA/2C via citometria de imagem. Logo, a quantificação do conteúdo de DNA nuclear de *E. globulus* é de 1,09 pg DNA/2C.

6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AZMI, A., DEWITTE, W., DREVET, C., ONCKELEN, H.V., LANDRÉ, P., BOUDET, A.M., JOUANIN, L. e CHRQUI, D. Bud regeneration from *Eucalyptus globulus* clones and seedlings through hormonal imbalances induced by *Agrobacterium tumefaciens* strain 82.139. **Plant Science**, 127: 81-90, 1997^a.

AZMI, A., NOIN, M., LANDRÉ, P., PROUTEAU, M., BOUDET, A.M., e CHRQUI, D. High frequency plant regeneration from *Eucalyptus globulus* Labill. hypocotyls: Ontogenesis and ploidy level of the regenerants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 51: 9-16, 1997^b.

BARANY, M. e GREILHUBER, J. Flow cytometric analysis of genome size variation in cultivated and wild *Pisum sativum* (*Fabaceae*). **Plant Systematics and Evolution**, 194: 231-239, 1995.

BENNETT, M.D. e SMITH, J.B. Nuclear DNA amounts in angiosperms. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series B**, 334: 309-345, 1991.

BENNETT M.D., LEITCH, I.J. 2004. Angiosperm DNA C-values database (release 5.0, Dec. 2004). Acesso em 25 de agosto de 2005. Disponível em: <http://www.rbgekew.org.uk/cval/homepage.html>.

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

BERTINO, B., KNAPE, W.A., PYTLINSKA, M., STRAUSS, K. e HAMMOU, J.C. A comparative study of DNA content as measured by flow cytometry and image analysis in 1864 specimens. **Analytical cellular pathology: the journal of the European Society for Analytical Cellular Pathology**, 6 (4): 377-394, 1994.

BIRADAR D.P., BULLOCK D., e RAYBURN, A. Nuclear DNA amount, growth, and yield parameters in maize. **Theoretical and Applied Genetics**, 88: 557-560, 1994.

BITENSKY, L. Microdensitometry. **CIBA Foundation Symposium**, 73: 181-202, 1979.

BÖCKING, A., GIROUD, F., REITH, A. Consensus report of the esacp task force on standardization of diagnostic DNA image cytometry. **Analytical Cellular Pathology**, 8: 67-74, 1995.

BÖCKING, A. Fourth updated ESACP consensus report on diagnostic DNA image cytometry. **Analytical Cellular Pathology**, 23:89-95, 2001.

BÖCKING, A. e NGUYEN, V. Q. H. Diagnostic and prognostic use of DNA image Cytometry in cervical squamous intraepithelial lesions and invasive carcinoma. **Cancer Cytopathology**, 102 (1): 41-54, 2004.

BORGIANI, L., COGORNO, P., TOSO, F., GALLO, L., BUCCARAN, G., ROVIDA, S. e CANEPA, M. Comparative DNA analysis of breast cancer by flow cytometry and image analysis. **Pathologica**, 86 (4): 356-359, 1994.

CARVALHO, C.R. **Desenvolvimento de tecnologia citogenética em milho (Zea mays L.)** 1995 127 f., UFV. Dissertação – (Doutorado em Genética e Melhoramento) - Viçosa, MG, 1995.

CHIECO, P., JONKER, A., MELCHIORRI, C., VANNI, G. e NOORDEN, C.J.F.V. A user`s guide for avoiding errors in absorbance image Cytometry: a

review with original experimental observations. **Histochemical Journal**, 26: 1-19, 1994.

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

CHIECO, P., JONKER, A. e NOORDER, C.J.F. **Image Cytometry**. 1^a ed. Estados Unidos: BIOS e Springer, 2001. 116p.

COPPEN, J.J.W. **Eucalyptus: The genus *Eucalyptus***. 1^a ed. London : Taylor & Francis, 2002. 450p.

DEELEY, E. M. An integrating microdensitometer for biological cells. **Journal of Scientific Instruments**, 32: 263-267, 1955.

DOLE EL, J. Flow cytometric analysis of nuclear DNA content in higher plants. **Phytochemical Analysis**, 2: 143-154, 1991.

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

DOLE EL, J. Applications of flow cytometry for the study of plant genomes. **Journal of Applied Genetics**, 38 (3): 285-302. 1997.

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

DOLE EL, J., BARTOŠ, J., VOLGLMAYR, H. e GREILHUBER, J. Nuclear DNA content and genome size of trout and human. **Cytometry**, 51: 127-128, 2003.

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

DUIJNDAN, W.A.L. e DUIJN, P.V. The influence of chromatin compactness on the stoichiometry of the Feulgen-Shiff procedure studied in model films. II. Investigations on films containing condensed or swollen chicken erythrocyte nuclei. **The Journal of Histochemistry and Cytochemistry**. 23 (12): 891-900, 1975.

EDMÉ, S.J.; COMSTOCK, J.C.; MILLER, J.D. e TAI, P.Y.P. Determination of DNA content and genome size in sugarcane. **Journal American Society Sugar Cane Technologists**. 25:1-16, 2005.

ELDRIDGE, K. G., DAVIDSON, J., HARWOOD, C. AND VAN WYK, G. **Eucalypt domestication and breeding**. 1^a ed. Oxford: Clarendon Press, 1994. 288 p.

FERREIRA, M. Melhoramento e a silvicultura intensiva clonal. **Piracicaba: IPEF**, 45: 22-30, 1992.

FERREIRA, M.; SANTOS, P.E.T. Melhoramento genético florestal dos Eucalyptus no Brasil - Breve histórico e perspectivas. Conferência IUFRO sobre silvicultura e melhoramento de eucaliptos, 1^o. 1997, Salvador. Proceedings. Colombo: Embrapa. Centro Nacional de Pesquisa de Florestas, 1997. v.1; 14-34.

FEULGEN, R. e ROSSENBECK, H. Mikroskopisch-chemischer Nachweis einer Nucleisäure vom Typus der Thymonucleinsäure und die darauf beruhende elektive Färbung von Zellkernen in mikroskopischen Präparaten. **Hoppe-Seyler's Zeitschrift fur Physiologische Chemie** 135:203-248,1924.

GALBRAITH, D.J., HARKINS, K.R., MADDOX, J.M., AYRES, N.M., SHARMA, D.P. e FIROOZABADY, D.P. Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissues. **Science**, 220: 1049-1051, 1983.

GRATTAPAGLIA, D. e BRADSHAW, H.H.Jr. Nuclear content of commercially important *Eucalyptus* species and hybrids. **Canadian Journal of Forest Research**, 24: 1074-1078, 1994.

GRATTAPAGLIA, D. Integrating genomics into *Eucalyptus* breeding. **Genetics and Molecular Research**, 3 (3): 369-379, 2004.

GREGORY, T.R. The C-value enigma in Plants and Animals: a review of parallels and an appeal for partnership. **Annals of Botany**, 95: 133-146, 2005.

GREILHUBER, J. "Self-tanning" – a new and important source of stoichiometric error in cytophotometric determination of nuclear DNA content in plants. **Plant Systematics and Evolution**, 158: 87-96, 1988.

GREILHUBER, J. e OBERMAYER, R. Genome size in maturity group in *Glycine max* (soybean). **Heredity**, 78: 547-551, 1997.

GREILHUBER, J. Intraespecific variation in genome size: a critical reassessment. **Annals of Botany**, 82 (A): 27-35, 1998.

GREILHUBER, J. e OBERMAYER, R. Genome size in chinese soybean accessions—stable or variable?. **Annals of Botany**, 84: 259-262, 1999.

GREILHUBER, J. e TEMSCH, E.M. Feulgen densitometry: some observations relevant to best practice in quantitative nuclear DNA content determination. **Acta Botanica Croatica**, 60 (2): 285-298, 2001.

GREILHUBER, J. Intraespecific variation in genome size in angiosperms: identifying its existence. **Annals of Botany**, 95: 91-98, 2005.

HARDIE, D.C. GREGORY, T.R., HERBET, P.D.N. From pixels to picograms: a beginner's guide to genome quantification by Feulgen image analysis densitometry. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, 50: 735-749, 2002.

HELLER, F.O. DNA-measurement of *Vicia faba* L. with pulse cytophotometry. **Berichte Der Deutschen Botanischen Gesellschaft**, 86(5-9): 437-441, 1973.

HENDRIX, B. e STEWART, J. M. Estimation of the nuclear DNA content of *Gossypium* species. **Annals of Botany**, 95: 789-797, 2005.

JOHNSTON, J., BENNET, M., RAYBURN, A., GALBRAITH, D. e Price, H. Reference standards for determination of DNA content of plant nuclei. **American Journal of Botany**, 86(5): 609-613, 1999.

KANTIVILAS, G. The discovery of Tasmanian eucalyptus: an historical sketch. **Tasforests**, 8: 1-13, 1996.

KISS, R., GASPERIN, P., VERHEST, A. e PASTEELS, J.L. Modification of tumor ploidy level via the choice of tissue taken as diloid reference in digital cell image analysis of Feulgen-stained nuclei. **Modern Pathology**, 5: 655-660, 1992.

LOUREIRO, J. e SANTOS, C. Aplicação da citometria de fluxo ao estudo do genoma vegetal. **Boletim da Sociedade Portuguesa de Biotecnologia**, 77: 18-29, 2004.

MARIE, D. e BROWN, S.C. A cytometric exercise in plant DNA histograms, with 2C values for 70 species. **Biology of the Cell**, 79: 41-51, 1993.

MATSUMOTO, S.T., MORALES, M.A.M., RUAS, C.F. e RUAS, P.M. Cytogenetic analysis of seven species of *Eucalyptus* L' Hér. (Myrtaceae). **Caryologia**, 53(3-4): 205-212, 2000.

MICHAELSON, M.J., PRICE, H.J., ELLISON, J.R. e JOHNSTON, J.S. Comparison of plant DNA contents determined by feulgen microspectrophotometry and laser flow Cytometry. **American Journal of Botany**, 78 (2): 183-188, 1991.

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

MYBURG, A.A., GRIFFIN, A.R., SEDEROFF, R.R. e WHETTEN, R.W. Comparative genetic linkage maps of *Eucalyptus grandis*, *Eucalyptus globulus* and their F1 hybrid based on a double pseudo-backcross mapping approach. **Theoretical and Applied Genetics**, 107: 1028-1042, 2003.

NAKAMURA, D., TIERSCH, T.R., DOUGLASS, M. e CHANDLER, R.W. Rapid identification of sex in birds by flow cytometry. **Cytogenetics and Cell Genetics**, 53(4): 201-205, 1990.

NOIROT, M., BARRE, P., LOUARN, J., DUPERRAY, C. e HAMON, S. Nucleus-cytosol interactions – a source of stoichiometric error in flow cytometric estimation of nuclear DNA content in plants. **Annals of Botany**, 86 (2): 309-316, 2000.

NOIROT, M., BARRE, P., LOUARN, J., DUPERRAY, C. e HAMON, S. Consequences of stoichiometric error on nuclear DNA content evaluation in *Coffea liberica* var. *dewevrei* using DAPI and propidium iodide. **Annals of Botany**, 89 (4): 385-389, 2002.

NOIROT, M., BARRE, P., LOUARN, J., DUPERRAY, C. e 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**, 92 (2): 259-264, 2003.

NOIROT, M., BARRE, P., LOUARN, J., DUPERRAY, C., HAMON, S. e KOCHKO, A. Investigation on the causes of stoichiometric error in genome size estimation using heat experiments: consequences on data interpretation. **Annals of Botany**, 95: 111-118, 2005.

NUNEZ, R. Flow Cytometry: Principles and Instrumentation. **Current Issues in Molecular Biology**, 3 (2): 39-45, 2001.

OBERMAYER, R., LEITCH, I.J., HANSON, L. e BENNETT, M. Nuclear DNA C-values in 30 Species Double the Familial Representation in Pteridophytes. **Annals of Botany**, 90: 209-217, 2002.

OHRI, D. Genome Size Variation and Plant Systematics. **Annals of Botany**, 82 (A): 75-83, 1998.

OTTO, F. Dapi staining of fixed cells for high-resolution flow cytometry. In: Z. Darzynkiewicz e H.A. Crissman **Flow Cytometry** 1^a ed. London: Academic Press, 1990. 33, 11, 105-10.

PETERS, D.C. A comparison of mercury arc lamp and laser illumination for flow cytometers. **Journal of Histochemistry and Citochemistry**, 27 (1): 241-245, 1979.

PINTO, G., LOUREIRO, J. LOPES, T. e SANTOS, C. Analysis of the genetic stability of *Eucalyptus globulus* Labill. Somatic embryos by flow cytometry. **Theoretical and Applied Genetics**, 109 (4):580-587, 2004.

PRICE, H.J. DNA content variation among higher plants. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, 75: 1248-1257, 1988.

PRICE. H.J., e JOHNSTON, J.S. Analysis of plant dna content by Feulgen microspectrophotometry and flow cytometry. **Methods of genome analysis in plants**. 1^a ed. Boca Raton, Flórida: CRC Press, 1996. 7, 115 – 32.

PRICE. H.J. MORGAN, P.W. E JOHNSTON, J.S. Environmentally correlated variation in 2C nuclear DNA content measurements in *Helianthus annuus* L.. **Annals of Botany**, 82 (A): 95-98, 1998.

PRICE, H.J. HODNETT, G. e JOHNSTON, J.S. Sunflower (*Helianthus annuus*) leaves contain compounds that reduce nuclear propidium iodide fluorescence. **Annals of Botany**, 86 (5): 929-934, 2000.

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

RANI, V. e RAINA, S.N. Genetic analysis of enhanced-axillary-branching-derived *Eucalyptus tereticornis* Smith and *E. camaldulensis* Dehn. Plants. **Plant Cell Reports**, 17:236-242, 1998.

RAYBURN, A.L., AUGER, A., BENZINGER, E.A. E HEPBURN, A.G. Detection of intraespecific DNA content variation in *Zea mays* by flow cytometry. **Experimental Botany**, 40: 1179-1183, 1989.

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

ROZEFELDS A.C.. *Eucalyptus* phylogeny and history: a brief summary. **Tasforests**, (8) 15-26, 1996.

SCHIFINO-WITTMANN, M.T. Determinação da quantidade de DNA nuclear em plantas. **Ciência Rural, Santa Maria**, 31 (5): 897-902, 2001.

SILVA, T.L., REIS, A., HEWITH, C. E ROSEIRO, J.C. Citometria de fluxo – funcionalidade celular on-line em bioprocessos. **Boletim da Sociedade Portuguesa de Biotecnologia**, 77: 32-40, 2004.

SWIFT, H. Microphotometry in biological research. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, 14: 842-852, 1966.

TEMESH, E.M. e GREILHUBER, J. Genome size variation in *Arachis hypogaea* and *A. monticola* re-evaluated. **Genome**, 43: 449-451, 2000.

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

VINDELØV, L.L., CHRISTENSEN, I.J. E NISSEN, N.I. Standardization on high-resolution flow cytometric DNA analysis by the simultaneous use of chicken and trout red blood cells as internal reference standards. **Cytometry**, 3 (5): 328-331, 1983.

VOGLMAYR, H. e GREILHUBER, J. Genome size determination in peronosporales (Oomycota) by Feulgen image analysis. **Fungal Genetics and Biology**. 25 (3): 181-195, 1998.

WILKERSON, M.J. 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°. 2004, Orlando. **Internet Publisher**: International Veterinary Information Service, Ithaca NY (www.ivis.org).

YANPAISAN, W., KING, N.J.C. E DORAN, P.M. Flow cytometry of plant cells with applications in large-scale bioprocessing. **Biotechnology Advances**, 17: 3-27, 1999.

ZONNEVELD, B.J.M., LEITCH, I.J. E BENNETT, M.D. First nuclear DNA amounts in more than 300 angiosperms. **Annals of Botany**, 96: 229-244, 2005.