

## CONTEÚDO DE DNA NUCLEAR, REAVALIADO POR CITOMETRIA DE IMAGEM, DE ESPÉCIES PADRÃO UTILIZADAS EM ANÁLISES CITOMÉTRICAS DE PLANTAS

**Milene Miranda Praça-Fontes<sup>1</sup>, Carlos Roberto de Carvalho<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Universidade Federal do Espírito Santo/Departamento de Produção Vegetal, Alto Universitário S/N – CX Postal 16, CEP:29.500.000 – Alegre - ES, milenemiranda@yahoo.com.br

<sup>2</sup>Universidade Federal de Viçosa/Departamento de Biologia Geral, Av. PH Hols S/N, CEP: 36570-000, ccarvalh@ufv.br

**Resumo-** A aplicação de técnicas citométricas tem possibilitado a caracterização de genomas de várias espécies de plantas. Esses trabalhos vêm promovendo relevantes informações a estudos evolutivos, moleculares e para o melhoramento de culturas. Para que uma espécie tenha seu DNA mensurado, necessita-se de padrões de referência que tenham seu conteúdo de DNA bem estabelecido. No entanto, observa-se na literatura que as espécies utilizadas como padrão apresentam diferentes valores de DNA descritos. Isto tem gerado mensuramentos errôneos do genoma de várias espécies vegetais. Considerando a necessidade de estabelecer padrões de confiança para análises citométricas em plantas, em virtude das discrepâncias de valores citados na literatura, o presente estudo teve como objetivo reavaliar os valores de conteúdo de DNA de *Raphanus sativus*, *Solanum lycopersicum*, *Glycine max*, e *Zea mays*, utilizando *A. thaliana* como padrão de referência primária. Os resultados encontrados para o conteúdo de DNA das espécies estudadas foram 1,13; 1,19; 2,54; 5,40, respectivamente.

**Palavras-chave:** Citometria de imagem, DNA, valor C, padrões, picograma

**Área do Conhecimento:** Genética

### Introdução

A quantificação do conteúdo de DNA em plantas tem sido reconhecida como um relevante parâmetro para caracterização genômica, com aplicabilidade em estudos evolutivos, biodiversidade (KNIGHT e BEAULIEU, 2008), planejamento de projetos de seqüenciamento e em trabalhos envolvendo marcadores moleculares (BENNETT e LEITCH, 2005). O mensuramento do tamanho do genoma de plantas fornece informações úteis para várias áreas da ciência, como biologia celular, ecologia, fitogeografia, melhoramento, sistemática e taxonomia vegetal (DOLEZEL et al., 2007; KOLAR et al., 2009).

Um dos critérios mais importantes que tem sido observado nas análises citométricas, tanto por citometria de fluxo (CF) quanto por citometria de imagem (CI), consiste na utilização de células de referência (padrão), com valor 2C de DNA previamente conhecido, para efeito de comparação. A seleção de um padrão apropriado é crucial para a estimativa do tamanho do genoma nuclear (DOLEZEL et al., 2007).

Plantas utilizadas como padrão tais como *Raphanus sativus*, *Solanum lycopersicum*, *Glycine max* e *Zea mays* possuem diferentes valores para o conteúdo 2C de DNA nuclear descritos na literatura (DOLEZEL et al., 2007). Essas diferenças podem ser atribuídas a erros estequiométricos na coloração do DNA, a análises realizadas em diferentes laboratórios, a utilização

de diferentes variedades e padrões (BENNETT e LEITCH, 2005; GREILHUBER, 2005).

O objetivo do presente trabalho foi reavaliar o conteúdo de DNA dessas quatro espécies por meio da CI. *Arabidopsis thaliana* foi utilizada como padrão primário interno, pois essa espécie possui tanto a quantidade de DNA conhecida quanto o genoma seqüenciado.

### Metodologia

O procedimento da CI e reação de Feulgen foram realizados de acordo com Greilhuber e Ebert (1994) e Vilhar et al. (2001), com pequenas modificações.

Sementes de *A. thaliana*, *R. sativus*, *S. lycopersicum*, *G. Max* e *Zea mays*, foram germinadas e as raízes foram fixadas. Para o preparo da lâmina, raízes de duas espécies (em ordem crescente de DNA nuclear) foram fragmentadas estritamente em paralelo, sem sobreposição na mesma lâmina (GREILHUBER e EBERT, 1994). Estas foram preparadas por dissociação celular conforme descrito por Carvalho (1995). Com auxílio de um bisturí, as raízes foram dissociadas sob microscópio estereoscópico e, simultaneamente, foram gotejadas três gotas de solução fixadora. Subsequentemente, as lâminas foram secadas ao ar e em placa aquecedora, a 50 °C, por 10 min. Após, foram imediatamente colocadas em solução fixadora de formaldeído 4% por 12 h, a 25 °C.

Após a fixação, as lâminas foram lavadas em água destilada, secadas ao ar e hidrolisadas em HCl 5 M por 45 min a 25 °C. A coloração foi realizada com o reativo de Schiff por 14 h a 4 °C. Após isso, as lâminas foram lavadas em água sulfurosa e água destilada e novamente secadas ao ar. Os locais da lâmina que continham os meristemas foram cobertos com óleo de imersão e depois selados com uma lamínula previamente limpa e esmalte incolor.

As lâminas foram observadas em fotomicroscópio e as análises foram realizadas usando o Programa Image Pro-Plus. Os valores de densidade óptica integrada (DOI) foram obtidos de dez núcleos em prófases e dez núcleos em telófases. Três lâminas de cada combinação (amostra/padrão) foram utilizadas na obtenção dos dados.

A partir do conteúdo 2C de DNA das plantas padrões, utilizando valores de referência descritos por Bennett et al. (2003) para *A. thaliana*, Doležel et al. (1992) para *S. lycopersicum* e Doležel et al. (1998) para *R. sativus*, *G. max*, *Z. mays*, as unidades de DOI foram convertidas em picogramas de DNA.

## Resultados

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

A fixação das lâminas em formaldeído 4%, a hidrólise em HCl 5 M por 45 min, a 25 °C, e a coloração citoquímica pela reação de Feulgen por 14 h, a 4 °C, possibilitaram a obtenção dos núcleos estequiometricamente corados (Figuras 1 a 4).

Dez núcleos em prófase e dez em telófase de cada planta, por lâmina, foram selecionados visualmente e mensurados (Figuras 1 a 4). A densidade óptica integrada (DOI) nuclear foi calculada pelo programa Image Pro-Plus® 6.1. As médias para as duas classes de núcleos foram calculadas como 2C (telófase) e 4C (prófase). As DOIs dos dez núcleos em prófase e telófase foram, então, obtidas e a média foi apresentada nas tabelas 1 a 4.

Nas análises os CVs ficaram abaixo de 4,97% (Tabelas 1 a 4). Nas lâminas com núcleos de *A. thaliana* e *R. sativus* o menor CV obtido foi de 2,2% e o maior 4,7%; nas lâminas com núcleos de *R. sativus* e *S. lycopersicum* o menor CV foi 2,42% e o maior 4,45%; com *S. lycopersicum* e *G. max*, o menor foi 2,31% e o maior 4,97%; *G. max* e *Z. mays*, o menor 2,35% e o maior 4,63%.

As médias obtidas da razão entre os valores da DOI para os núcleos 4C e 2C em cada lâmina ficou entre 2,03 e 2,36 (Tabelas 1 a 4). As razões entre os valores do conteúdo de DNA das prófases e telófases, obtidas para as plantas que tiveram seu genoma mensurado, apresentaram proporção próxima de 2:1 (Tabelas 1 a 4).

Os conteúdos médios de DNA/2C, em picograma, para todas as espécies mensuradas, foram obtidos dividindo os valores de DNA 4C por dois e em seguida somando o resultado ao valor de DNA 2C, e novamente dividindo por dois. Esses valores foram 1,13; 2,22; 2,51 e 5,64 para *R. sativus*, *S. lycopersicum*, *G. Max* e *Zea mays*, respectivamente.

Os valores de conteúdo de DNA determinados quando *A. thaliana* foi utilizada como padrão primário para *R. sativus*, *S. lycopersicum*, *G. Max* e *Zea mays* foi 1,13; 1,19; 2,54; 5,40, respectivamente.

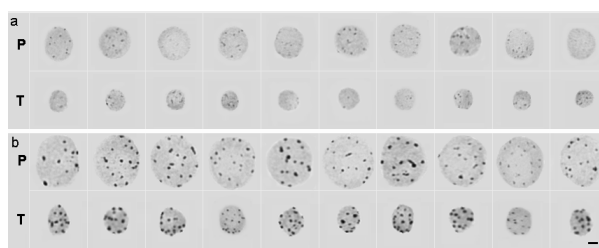


Figura 1 – Núcleos de *A. thaliana* e *R. sativus*. (a) *A. thaliana* em prófase (P) e telófase (T) e (b) *R. sativus* em prófase (P) e telófase (T). Barra = 10 µm.

Tabela 1 – Valores médios de densidade óptica integrada (DOI), coeficiente de variação (CV) e DNA 2C e 4C obtidos por CI referente à figura 1.

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

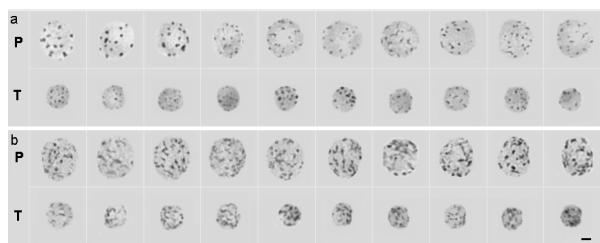


Figura 2– Núcleos de *R. sativus* e *S. lycopersicum*. (a) *R. sativus* em prófase (P) e telófase (T) e (b) *S. lycopersicum* em prófase (P) e telófase (T). Barra = 10 µm.

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

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

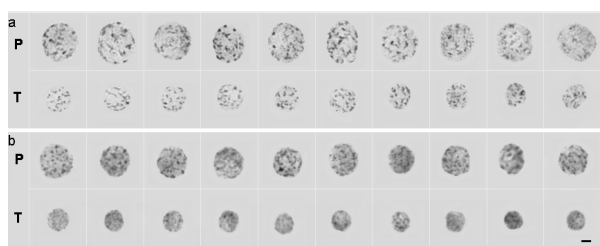


Figura 3 – Núcleos de *S. lycopersicum* e *G. max*. (a) *S. lycopersicum* em prófase (P) e telófase (T) e (b) *G. max* em prófase (P) e telófase (T). Barra = 10 µm.

Tabela 3 – Valores médios de densidade óptica integrada (DOI), coeficiente de variação (CV) e DNA 2C e 4C obtidos por CI referente à figura 3.

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

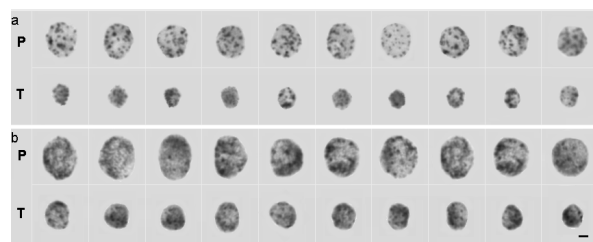


Figura 4 – Núcleos de *G. max* e *Z. mays*. (a) *G. max* em prófase (P) e telófase (T) e (b) *Z. mays* em prófase (P) e telófase (T). Barra = 10 µm.

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

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



## Discussão

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

A adequação das metodologias, assim como a coloração homogênea dos núcleos possibilitaram o processamento das imagens digitais no programa de análise de imagem com CVs abaixo de 4,97% (Tabelas 1 a 4). Haroske et al. (2001) considera o CV abaixo de 5% aceitável para esse tipo de análise.

Além do CV, a razão 4C/2C obtida pelo conteúdo de DNA de prófases e telófases também foi utilizada como controle de qualidade das preparações nucleares. Observou-se que em todas as análises essa razão ficou entre o valor recomendado por Böcking e Nguyen (2004) (Tabelas 1 a 4). Segundo esses autores o valor ideal seria 2, mais ou menos 10%, para a razão 4C/2C de cada espécie. Tais proporções demonstram a linearidade dos dados dentro de cada padrão. Hardie et al. (2002) afirmaram que algumas variações entre os núcleos são esperadas. Estas inconstâncias são baseadas em diferenças de coloração, orientação e condições do background local. De acordo com Price (1988), um fator que pode influenciar as medidas de telófases e prófases são as diferentes densidades que o núcleo pode apresentar, principalmente quando há maior quantidade de heterocromatina. Duijndam e Duijn (1975), analisando a influência da compactação da cromatina na coloração pela reação de Feulgen, concluíram que quanto maior a compactação, menor a intensidade da coloração com o mesmo tempo de hidrólise.

Diferenças entre a heterocromatina das plantas padrões podem ser visualizadas nas Figuras 1 a 4. De acordo com Price e Johnston (1996), o grau de compactação da cromatina interfere na formação de grupos aldeídos, consequência da proporção diferencial de depurinação entre a cromatina condensada e descondensada durante a hidrólise. Hardie et al. (2002) afirmaram que diferenças no nível de

compactação do DNA podem ser um obstáculos na comparação entre núcleos do padrão com a amostra.

Os valores de conteúdo de DNA apresentados nas tabelas 1 a 4 evidenciam que existem diferenças com os valores descritos previamente na literatura. Por esse motivo em uma segunda análise utilizou-se uma espécie que possui o genoma seqüenciado para realizar comparação (dados não mostrados). De acordo com Bennett e Leitch (2005), *A. thaliana* seria um bom padrão primário para calibrar as espécies vegetais utilizadas como padrão em análises citométricas. Essa espécie possui o DNA seqüenciado e calibrado com outra espécie que também possui o DNA totalmente seqüenciado, *Caenorhabditis elegans* (BENNETT et al., 2003). Dessa forma, pode-se considerar que os valores revisados para as espécies *R. sativus*, *S. lycopersicum*, *G. Max* e *Zea mays* obtidos quando *A. thaliana* foi utilizada como padrão primário podem ser 1,13; 1,19; 2,54; 5,40, respectivamente.

## Conclusão

Os resultados do presente estudo sugerem que os valores revisados de DNA, em picograma, para *R. sativus*, *S. lycopersicum*, *G. max*, *Z. mays* podem ser 1,13; 1,19; 2,54; 5,40, respectivamente.

## Referências

- BENNETT, M.D.; LEITCH, I.J. Plant genome size research: A field in focus. *Ann. Bot.* 95: 1-6, 2005.
- BENNETT, M.D.; LEITCH, I.J.; PRICE, H.J.; JOHNSTON, J.S. Comparison with *Caenorhabditis* (~100 Mb) and *Drosophila* (~175 Mb) using flow cytometry show genome size in *Arabidopsis* to be ~157 Mb and thus ~25% larger than the *Arabidopsis* Genome Initiative estimate of ~125 Mb. *Ann. Bot.* 91: 547-557, 2003.
- BOCHING, A.; NGUYEN, V.Q.H. Diagnostic and prognostic use of DNA image Cytometry in cervical squamous intraepithelial lesions and invasive carcinoma. *Cancer Cytopathol.* 102: 41-54, 2004.
- CARVALHO, C.R. Desenvolvimento de tecnologia citogenética em milho (*Zea mays* L.). Viçosa: UFV, 1995, 127p. (Tese Doutorado/Genética e Melhoramento).
- DOLEZEL, J.; GREILHUBER, J., SUDA, J. Flow cytometry with plant cells: Analysis of genes chromosomes and genomes. Editora Wiley- VCH, 454p, 2007.

- DOLEZEL, J.; GREILHUBER, J.; LUCRETTI, S.; MEISTER, A.; LYSAK, M.A.; NARDI, L.; OBERMAYER, R. Plant genome size estimation by flow cytometry: inter-laboratory comparison. *Ann. Bot.* 82: 17-26, 1998.
- DOLEZEL, J.; SGORBATI, S.; LUCRETTI, S. Comparison of three DNA fluorochromes for flow cytometric estimation of nuclear DNA content in plants. *Physiol. Plant.* 85: 625-631, 1992.
- DUIJNDAM, W.A.L.; VAN DUIJN, P. The influence of chromatin compactness on the stoichiometry of the Feulgen-Schiff procedure studied in model films. II Investigations on films containing condensed or swollen chicken erythrocyte nuclei. *J. Histochem. Cytochem.* 23: 891-900, 1975.
- GREIHLUBER, J. Intraspecific variation in genome size in angiosperms: identifying its existence. *Ann. Bot.* 95:91-98, 2005.
- GREILHUBER, J.; EBERT, I. Genome size variation in *Pisum*. *Genome* 37: 646-655, 1994.
- HARDIE, D.C.; GREGORY, T.R.; HEBERT, P.D.N. From pixels to picograms: a beginners' guide to genome quantification by Feulgen image analysis densitometry. *J. Hist. Cyt.* 50: 735-749, 2002.
- HAROSKE, G.; BAAK, J.P.A.; DANIELSEN, H.; GIROUD, F.; GSCHWENDTNER, A.; et al. Fourth updated ESACP consensus report on diagnostic DNA image cytometry. *Anal. Cell. Pathol.* 23: 89-95, 2001.
- KNIGHT, C.A., BEAULIEU J.M. Genome size scaling through phenotype space. *Ann. Bot.* p. 1-8, 2008.
- KOLAR, F.; STECH, M.; TRAYNICEK, P.; RAUCHOVA, J.; UUFUS, T.; VIT, P.; KUBESOVA, M., SUDA, J. Towards resolving the *Knautia arvensis* agg. (Dipsacaceae) puzzle: primary and secondary contact zones and ploidy segregation at landscape and microgeographic scales. *Ann. Bot.* 103: 963-974, 2009.
- PRICE, H.J. DNA content variation among higher plants. *Ann. Miss. Bot. Garden* 75: 1248-1257, 1988.
- PRICE, H.J., JOHNSTON, J.S. Methods of genome analysis in plants. In *Analysis of plant DNA content by Feulgen microspectrophotometry and flow cytometry*. 1st ed. CRC Press LLC . Florida, USA. pp. 115 – 32, 1996.
- PUECH, M.; GIROUD, F. Standardisation of DNA quantitation by image analysis: quality control of instrumentation. *Cytometry* 36: 11-17, 1999.
- VILHAR, B.; GREILHUBER, J.; KOCE, J.D.; TEMSCH, E.M.; DERMASTIA, M. Plant genome size measurement with DNA image cytometry. *Ann. Bot.* 87: 719-728, 2001.