

## APLICAÇÃO DAS CITOMETRIAS DE FLUXO E DE IMAGEM PARA ESCOLHA DO MELHOR PADRÃO PRIMÁRIO EM ANÁLISES CITOMÉTRICAS

**Milene Miranda Praça-Fontes<sup>1</sup>, Wellington Ronildo Clarindo<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, Brasil, milenemiranda@yahoo.com.br; welbiologo@gmail.com

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

**Resumo-** As citometrias de fluxo e de imagem tem possibilitado o mensuramento do conteúdo de DNA de várias espécies de plantas. Para medir o tamanho do genoma nuclear de uma espécie, padrões de referência com o conteúdo de DNA bem estabelecidos são necessários. No entanto, diferentes valores têm sido descritos para a mesma espécie usada como padrão de referência. Este fato pode favorecer medições imprecisas do genoma, sendo relevante estabelecer padrões com conteúdo de DNA precisos para análises citométricas em plantas. Neste trabalho, o tamanho do genoma de *Arabidopsis thaliana* e de outros padrões, denominados "plantas padrão de Doležel", foram reavaliados. As plantas foram avaliadas por uma medida comparativa de seus valores de conteúdo de DNA, usando cada espécie de planta como padrão primário, como uma cascata, de *A. thaliana* a *Allium cepa*. Os valores do tamanho do genoma obtidos foram comparados com aqueles relatados na literatura por análises estatísticas. Como resultado do teste de *Dunnnett*, *A. thaliana*, *Solanum lycopersicum* e *Pisum sativum* foram considerados os padrões primários mais adequados para análises citométricas.

**Palavras-chave:** Citometria de fluxo, citometria de imagem, conteúdo de DNA, padrão primário

**Área do Conhecimento:** Genética

### Introdução

Um dos aspectos mais relevantes que tem sido observado em análises por citometria de fluxo (CF) e citometria de imagem (CI) consiste na utilização de células de referência (padrão), que possuem o conteúdo 2C de DNA conhecido. A seleção de um padrão apropriado para análises citométricas é importante para a estimativa do tamanho do genoma nuclear em espécies que ainda não tiveram seu genoma quantificado (DOLEŽEL et al., 2007).

Plantas comumente utilizadas como padrão tem sido descritas na literatura com diferentes valores de conteúdo de DNA, o que pode favorecer medições imprecisas do genoma de várias espécies. Em virtude disso, diferentes trabalhos tem relatado o estudo dessas plantas, a fim de minimizar possíveis erros em quantificações genômicas (DOLEŽEL et al., 1998; JOHNSTON et al., 1999).

Um dos primeiros estudos entre grupos de diferentes espécies padrão foi realizado por Doležel et al. (1998). Esses autores mensuraram o DNA desses padrões em quatro diferentes laboratórios, utilizando os fluorocromos IP e DAPI, citômetros de fluxo com fonte à laser ou luz HBO e densitometria por Feulgen. Outro estudo foi conduzido por Johnston et al. (1999) e envolveu

dois laboratórios. O estudo revelou problemas em utilizar eritrócitos de galinha como padrão, e comparado aos valores de DNA obtidos por Doležel et al. (1998), houve discrepâncias nos resultados. Nota-se, então, um desacordo entre os diferentes laboratórios que utilizam padrões vegetais em análises de quantificações genômicas.

Em virtude da falta de um grupo de plantas com o valor C determinado em um mesmo laboratório e utilizando os mesmos parâmetros, a espécie *Pisum sativum* (9,09 pg) tem sido empregada como um bom padrão em estudos de citometria em vegetais (DOLEŽEL et al., 2007). No entanto, para esta espécie também se encontram diferentes valores de DNA na literatura (DOLEŽEL et al., 1998; VILHAR et al., 2001). Sendo assim, existe a necessidade de estabelecer um grupo de padrões com o conteúdo de DNA bem definido, que alcance a quantidade de DNA da maioria das espécies vegetais (BENNETT e LEITCH, 2005).

O objetivo do presente trabalho foi reavaliar o conteúdo de DNA das "plantas padrão de Doležel" por meio da CF e CI em busca dos melhores padrões de referência primária. *Arabidopsis thaliana* foi utilizada como padrão primário interno, pois essa espécie possui tanto a quantidade de DNA conhecida quanto o genoma sequenciado. Todas as plantas foram avaliadas por uma

medida comparativa de seus valores de conteúdo de DNA, usando cada uma como padrão primário, como uma cascata, de *A. thaliana* a *Allium cepa*.

## Metodologia

Citometria de fluxo

### Preparo da suspensão nuclear

Folhas jovens (2 cm<sup>2</sup>) dos padrões *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. 'Columbia' (2C = 0,32 picograma de DNA = pg), *Raphanus sativus* L. 'Saxa' (2C = 1,26 pg), *Solanum lycopersicum* L. 'Stupicke polni tyckove rane' (2C = 1,96 pg), *Glycine Max* (L.) Merr. 'Polanka' (2C = 2,65 pg), *Zea mays* L. 'CE-777' (2C = 5,67 pg), *Pisum sativum* L. 'Ctirad' (2C = 9,09 pg), *Vicia faba* L. 'Inovec' (2C = 27 pg) e *Allium cepa* L. 'Alice' (2C = 34,89 pg) foram fragmentadas aos pares e em ordem crescente de quantidade de DNA. Para extração e coloração dos núcleos realizou-se a metodologia proposta por Galbraith et al. (1983). A suspensão nuclear foi corada com 1,5 mL de solução tampão OTTO-II suplementada com 75 µM de iodeto de propídeo (IP), 2,0 mM de ditiotreitol e 50 µg mL<sup>-1</sup> de RNase. A coloração foi realizada no escuro durante 20 – 40 min e, após, filtrou-se a suspensão nuclear em filtro de nylon de 20 µm de diâmetro de poro em um tubo para análise em citômetro de fluxo.

### Análise em citômetro de fluxo

As suspensões nucleares foram analisadas em um citômetro de fluxo Partec PAS® equipado com fonte de luz a laser (488 nm). A fluorescência do IP emitida pelos núcleos foi coletada por um filtro RG 610 nm. Duas repetições independentes foram realizadas em três dias diferentes, totalizando seis repetições, sendo mais de 10.000 núcleos analisados em cada.

Os valores de DNA utilizados como referência foram descritos por Doležel et al. (1992), Doležel et al. (1994) e Doležel et al. (1998), uma vez que as plantas analisadas correspondem às mesmas variedades utilizadas pelos referidos autores. O tamanho do genoma de cada espécie foi estabelecido relativamente ao pico da espécie comparada, pela aplicação da proporção de suas intensidades relativas de fluorescência.

Citometria de imagem

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

Sementes de *A. thaliana*, *R. sativus*, *S. lycopersicum*, *G. max*, *Z. mays*, *P. sativum*, *V. faba*

e *A. cepa* 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. Estas foram preparadas por dissociação celular.

### Hidrólise e coloração pela reação de Feulgen

As lâminas foram lavadas em água destilada, secadas ao ar e hidrolisadas em HCl 5 M por 45 min a 25 °C. Esta etapa foi realizada conforme recomendações de Greilhuber (2008). A coloração foi realizada com o reativo de Schiff por 14 h a 4 °C. Após isso, as lâminas foram lavadas. Os locais da lâmina que continham os meristemas foram cobertos com óleo de imersão e depois selados com lamínula previamente limpa e esmalte incolor.

### Análise dos dados

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*, as unidades de DOI foram convertidas em picogramas de DNA.

### Análises estatísticas

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

Realizou-se análise multivariada com base em Componentes Principais e agrupamento pelo método Tocher e UPGMA (ligação média entre grupos), com distância Euclidiana média padronizada, para os dados obtidos por CF. Os dados foram comparados com os valores obtidos por Doležel et al. (1992) e por diferentes laboratórios pesquisados por Doležel et al. (1998).

Para realização do teste com CF os laboratórios pesquisados foram separados conforme descrito na tabela 1.

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

#### b- Identificação de padrões mais apropriados:

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

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

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

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

Tabela 1 – Abreviatura dos laboratórios de acordo com os padrões primários, utilizados nas análises multivariadas

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

**Resultados**

Os procedimentos de extração e coloração dos núcleos com IP, para a determinação da quantidade de DNA nuclear por CF, geraram histogramas com resolução que diferenciou as fases G0/G1 e G2 (dados não mostrados).

Após obter os valores do conteúdo de DNA comparando-se uma espécie padrão com outra, calculou-se o índice para todas as espécies tomando-se cada uma dessas como um padrão primário de referência. A partir desses índices calculou-se os valores absolutos de DNA (Tabela 2). Para esse cálculo utilizou-se como DNA de referência os valores descritos por Bennett et al. (2003) para *A. thaliana* e por Doležel et al. (1992), Doležel et al. (1994) e Doležel et al. (1998) para *R. sativus*, *S. lycopersicum*, *G. max*, *Z. mays*, *P. sativum*, *V. faba* e *A. cepa*.

Os valores de DNA obtidos foram comparados com os valores descritos previamente pelos autores citados conforme a tabela 3. Essa comparação foi realizada com os valores de DNA de *A. thaliana*, *R. sativus*, *G. max*, *Z. mays*, *P.*

*sativum*, *V. faba* e *A. cepa* como padrão primário. Evidenciou-se a formação de três grupos pelo método de componentes principais e Tocher: 1 (L2, L3, L2', L3', L5-1, L5-5, L5-6, L5-7, L5-8 e R1); 2 (L1, L4, L1' e L4') e 3 (L5-3 e L5-4) (Figura 1). Pelo método de UPGMA observou-se que os valores de DNA mais próximos foram aqueles obtidos por L5-1 e L5-5. L5-7, L5-8 e L5-6 formaram uma ligação próxima, porém intermediária aos outros valores. L5-3 e L5-4 foram os que mais distanciaram em relação aos demais (Figura 2).

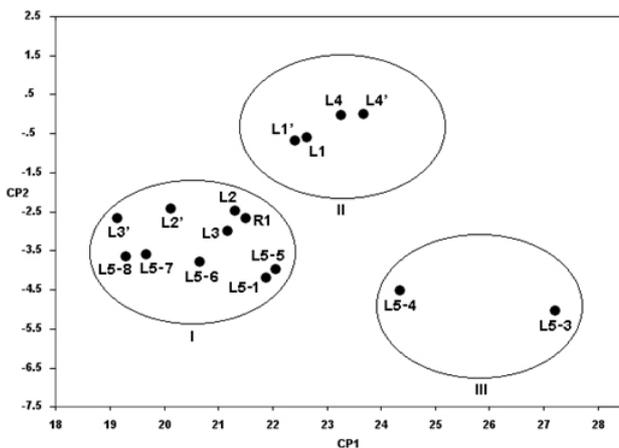


Figura 1 – Dispersão gráfica dos dois primeiros Componentes Principais dos dados dos laboratórios avaliados, conforme descrição da tabela 3. Os valores foram agrupados pelo método de Tocher utilizando distância Euclidiana média padronizada.

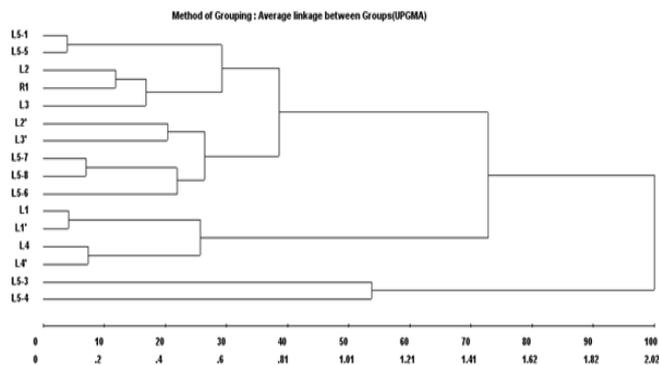


Figura 2- Dendrograma resultante da análise dos dados dos laboratórios, conforme descrição da tabela 3, obtido pelo método de agrupamento UPGMA e utilizando a distância Euclidiana média padronizada.

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

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

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

Tabela 3 – Valores de DNA/2C calculados com base nos padrões primários descritos na tabela 1, obtidos por diferentes laboratórios para sete espécies padrão. Esses valores foram submetidos à análise multivariada

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

Tabela 4 – Resultado do teste de *Dunnnett* aplicado às diferentes médias de conteúdo de DNA para as espécies padrão quando cada uma dessas foi utilizada como padrão primário.

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

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

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

Os valores médios de DNA nuclear obtidos para cada espécie utilizando diferentes padrões primários foram estatisticamente comparados pelo teste de *Dunnnett*. O resultado do teste encontra-se na tabela 4. Os valores de DNA mensurados com o padrão primário *R. sativus* proporcionou o maior número de diferenças comparando-se com os valores de DNA de referência.

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

Os valores médios de DNA 2C obtidos por CI para *R. sativus*, *S. lycopersicum*, *G. max*, *Z. mays*, *P. sativum*, *V. faba* e *A. cepa* foram estatisticamente comparados com os valores determinados pela CF (dados não mostrados). Sendo assim, utilizou-se a análise de regressão polinomial e observou-se uma estreita relação linear entre os resultados obtidos pelas duas metodologias. Um coeficiente de determinação  $R^2 = 99,74\%$  e de correlação  $r = 99,8\%$  pôde ser observado (Figura 3).

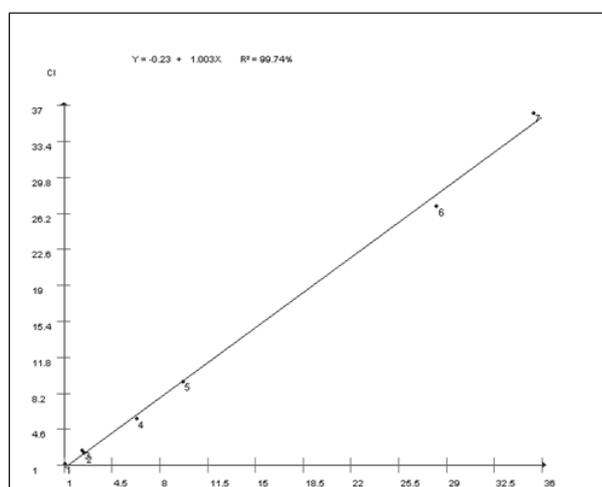


Figura 3 - Relação entre a quantidade de DNA de (1) *R. sativus*, (2) *S. lycopersicum*, (3) *G. max*, (4) *Z. mays*, (5) *P. sativum*, (6) *V. faba* e (7) *A. cepa*, determinada por CF e CI.

## Discussão

Os valores de conteúdo de DNA observados no presente estudo não foram os mesmos daqueles obtidos por Doležel et al. (1992) e Doležel et al. (1998). De acordo com Doležel e Bartoš (2005), os

diferentes padrões primários utilizados podem levar a essa fonte de variação. Outras variantes como o tipo de tampão de extração de núcleos, o tipo de corante (intercalante ou base específico), a fonte de luz do citômetro, também podem causar diferenças nas medições do conteúdo de DNA (DOLEŽEL e BARTOS, 2005).

Nas análises estatísticas (Figura 1) observou-se no grupo I que L2, L3, L2', L3', que utilizaram citômetro com fonte de luz HBO nas análises, formaram um agrupamento com L5-1, L5-5, L5-6, L5-7, L5-8, que utilizaram citômetro com fonte à laser, e com R1. Neste caso, além da fonte de luz do citômetro ter sido diferente, os tampões e os padrões primários utilizados também diferiram. No entanto, pelo método UPGMA, observou-se que os laboratórios 5 apresentaram maior aproximação entre si do que com os referidos laboratórios de Doležel et al. (1998). Dessa forma, evidenciou-se uma maior uniformidade entre os valores de DNA obtidos quando o mesmo tampão e a mesma fonte para o citômetro de fluxo foram utilizados.

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

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

realizar repetições (DOLEŽEL e BARTOS, 2005). Além disso, todas as etapas foram realizadas por um mesmo pesquisador.

As espécies que tiveram seu conteúdo de DNA calibrado com *A. thaliana*, *S. lycopersicum* e *P. sativum*, mostraram valores estatisticamente iguais aos valores de referência, com exceção de *R. sativus* (Tabela 4). Esses resultados foram confirmados pelos dados de citometria de imagem, que pode ser observado pela relação dos valores de conteúdo de DNA obtidos pelas duas metodologias (Figura 3).

Sendo assim, esses novos valores obtidos com base nos padrões primários *A. thaliana*, *S. lycopersicum* e *P. sativum*, poderiam formar um grupo de "Gold standard" para plantas, como idealizado por Bennett e Leitch (2005).

### Conclusões

Com o presente estudo foi possível determinar novos valores de conteúdo de DNA para as "plantas padrão de Doležel" com base em uma espécie de planta com DNA sequenciado. Além disso, *R. sativus* e *G. Max* foram considerados os piores padrões e *A. thaliana*, *S. lycopersicum* e *P. sativum* melhores padrões para serem utilizados em quantificações genômicas.

### Agradecimentos

Agradecemos ao CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico e a FAPES – Fundação de Apoio a Pesquisa no Espírito Santo, pelo suporte financeiro.

### Referências

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.

BENNETT, M.D.; LEITCH, I.J. Plant genome size research: A field in focus. *Ann. Bot.* 95: 1-6, 2005.

CRUZ, C.D. Programa GENES- Aplicativo Computacional em Genética e Estatística. 1st ed. Editora UFV, Minas Gerais, Br. 442 p., 1997.

DOLEŽEL, J.; SGORBATI, S.; LUCRETTI, S. Comparison of three DNA fluorochromes for flow cytometric estimation of nuclear DNA content in plants. *Physiol. Plant.* 85: 625-631, 1992.

DOLEŽEL, J.; DOLEZELOVA, M.; NOVAK, F.J. Flow cytometric estimation of nuclear DNA amount in diploid bananas (*Musa acuminata* and *M. balbisiana*). *Biol. Plant.* 36:351-357, 1994.

DOLEŽEL, 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.

DOLEŽEL, J.; BARTOS, J. Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. *Ann. Bot.* 95: 99-110, 2005.

DOLEŽEL, J.; GREILHUBER, J.; SUDA, J. Flow cytometry with plant cells. Wiley, Weinheim, 2007.

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

GREILHUBER, J. Intraspecific variation in genome size in angiosperms: identifying its existence. *Ann. Bot.* 95:91-98, 2005.

GREILHUBER, J. Cytochemistry and C-values: The less-well-know world of nuclear DNA amounts. *Ann. Bot.* 101:791-804, 2008.

JOHNSTON, J.S.; BENNETT, M.D.; RAYBURN, A.L.; GALBRAITH, D.W.; PREICE, H.J. Reference standards for determination of DNA content of plant nuclei. *Am. J. Bot.* 86: 609-613, 1999.

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

PREICE, H.J.; HODNETT, G.; JOHNSTON, S. Sunflower (*Helianthus annuus*) leaves contain compounds that reduce nuclear propidium iodide fluorescence. *Ann. Bot.* 86: 929-934, 2000.

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.