

JÉSSICA COUTINHO SILVA

**QUANTIFICAÇÃO DE DNA DOS CROMOSSOMOS E DOS BRAÇOS
CROMOSSÔMICOS DE *Zea mays* L.**

Dissertação 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
2016

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

S586q
2016
Silva, Jéssica Coutinho, 19-
Quantificação de DNA dos cromossomos e dos braços
cromossômicos de *Zea mays* L. / Jéssica Coutinho Silva. –
Viçosa, MG, 2016.
xii,41f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Carlos Roberto de Carvalho.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f.33-41.

1. Milho - Melhoramento genético. 2. *Zea mays* L.
3. Citogenética vegetal. 4. Citometria de imagem. 5. Ácido
desoxirribonucleico . I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Biologia Geral. Programa de Pós-graduação
em Genética e Melhoramento. II. Título.

CDD. 22 ed. 633.153

JÉSSICA COUTINHO SILVA

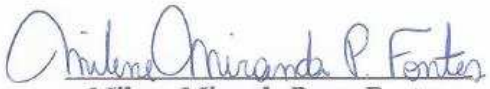
**QUANTIFICAÇÃO DE DNA DOS CROMOSSOMOS E DOS BRAÇOS
CROMOSSÔMICOS DE *Zea mays* L.**

Dissertação 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: 15 de julho de 2016.



Wellington Ronaldo Clarindo



Milene Miranda Praça Fontes



Carlos Roberto de Carvalho
(Orientador)

Ao meu orientador Prof. Carlos Roberto de Carvalho. Aos meus pais, Marluce e Agenário. À minha primeira professora de Genética, Adna Soares Carneiro.

DEDICO

“Não é o mais forte que sobrevive, nem o mais inteligente, mas o que melhor se adapta às mudanças”.

Charles Darwin

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa por fornecer um ensino público de qualidade, sem o qual dificilmente teria acesso ao curso de pós-graduação.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento pela oportunidade.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pelo suporte financeiro.

Ao meu orientador e amigo Prof. Carlos Roberto de Carvalho, pelos grandes ensinamentos e por ser um exemplo de profissional ético e dedicado. Um agradecimento carinhoso por todos os momentos de paciência e compreensão.

Ao meu coorientador Prof. Wellington Ronildo Clarindo, pelas suas correções e incentivos.

À professora Milene Miranda Praça-Fontes pela colaboração no delineamento do trabalho.

À secretaria do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento nas pessoas do Marco Tulio e Odilon pelo auxílio e dedicação em todos os momentos.

Meus agradecimentos aos amigos Alex, Fernanda e Tallita, companheiros de trabalhos e irmãos na amizade que fizeram parte da minha formação e que vão continuar presentes em minha vida com certeza.

Aos amigos do Laboratório de Citogenética e Citometria, Daniel, Natália, Mariana, Mitiko, Guilherme, Paulo, pela torcida e pelos muitos momentos de descontração.

Aqueles que são a base desta conquista: meus pais Marluce e Agenário pelo amor e apoio incondicional em todos os momentos, e por sonhar meus sonhos.

À minha amiga de graduação Lêda que mesmo estando longe, sempre se fez presente com lembranças e palavras de encorajamento.

Agradeço a todos os professores por me proporcionar o conhecimento não apenas racional, mas a manifestação do caráter e afetividade da educação no processo de formação profissional. A palavra mestre, nunca fará justiça aos professores dedicados aos quais sem nominar terão os meus eternos agradecimentos.

À Deus por ter me concedido o dom da sabedoria e por me dar forças e coragem para lutar a cada dia.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	viii
RESUMO	ix
ABSTRACT	xi
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	3
2.1 Caracterização do cariótipo de Zea mays L.....	3
2.2 Quantificação de DNA genômico	5
2.3 Quantificação de DNA cromossômico em Z. mays	7
3 OBJETIVOS	10
3.1 Objetivo geral	10
3.2 Objetivos específicos.....	10
4 MATERIAL E MÉTODOS	11
4.1 Material vegetal	11
4.2 Mensuramento do valor 2C DNA nuclear.....	11
4.3 Preparações cromossômicas	12
4.4 Coloração diferencial com DAPI	12
4.5 Citometria de imagem	13
4.5.1 Hidrólise e reação de Feulgen.....	13
4.5.2 Análise de imagem	13
4.5.3 Mensuramento do conteúdo de DNA cromossômico	14
5 RESULTADOS.....	16
5.1 Determinação do conteúdo de DNA nuclear.....	16
5.2 Preparações cromossômicas	17
5.3 Coloração diferencial com DAPI	18

5.4 Citometria de imagem	19
5.4.1 Hidrólise e reação de Feulgen.....	19
5.4.2 Análise de imagem	20
5.4.3 Mensuramento do conteúdo de DNA cromossômico total e dos braços	23
6 DISCUSSÃO	27
6.1 Alterações no genoma de <i>Z. mays</i>	27
6.2 O cariótipo de <i>Z. mays</i>	28
6.3 Mensuramento do conteúdo de DNA cromossômico total e dos braços.....	30
7 CONCLUSÃO	32
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	33

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Histograma representativo referente ao mensuramento do conteúdo de DNA nuclear de <i>Z. mays</i> ‘AL Bandeirante’.....	17
Figura 2 – Prometáfases e metáfases em meristema radicular de <i>Z. mays</i> obtidas por meio da sincronização do ciclo celular utilizando HU a 1,75 mM por 18 horas.....	18
Figura 3 – Cariograma de <i>Z. mays</i> ‘AL Bandeirante’ evidenciando as regiões DAPI positivas referentes aos knobs localizados nos braços longos dos cromossomos 2 – 9.....	19
Figura 4 – Cariograma representativo de <i>Z. mays</i> ‘AL Bandeirante’.....	20
Figura 5 – Idiograma montado com base na morfometria dos cromossomos.....	21
Figura 6 – Valores médios das áreas de cada cromossomo de <i>Z. mays</i> ‘AL Bandeirante’ gerados a partir de 102 cromossomos (51 kariogramas) pelo programa Image Pro-Plus® 6.1 Media Cybernetics®	22
Figura 7 – Valores médios de DO dos cromossomos de <i>Z. mays</i> ‘AL Bandeirante’ gerados a partir de 102 cromossomos (51 kariogramas) pelo sistema de análise de imagem.....	22
Figura 8 – Médias dos valores de DOI dos cromossomos de ‘AL Bandeirante’ mensurados a partir da relação da área pela DO.....	23
Figura 9 – Médias dos conteúdos de DNA cromossômicos de ‘AL Bandeirante’ mensurados distribuindo o valor 2C médio de DNA nuclear, estabelecido pela CF, em relação aos valores médios da DOI.....	24
Figura 10 – Comparação do conteúdo de DNA cromossômico 1C em pb do presente estudo (citometria de imagem ^b) (<i>Z. mays</i> ‘AL Bandeirante’) com os dados do sequenciamento.....	26

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Quantidade de DNA 1C dos cromossomos de <i>Z. mays</i>	7
Tabela 2 – Conteúdo de DNA referente as cinco repetições.....	16
Tabela 3 – Valores 2C médios de conteúdo de DNA por braço cromossômico em pg ($\pm$ desvio padrão), e em 1C pb.....	24

RESUMO

SILVA, Jéssica Coutinho, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2016.
Quantificação de DNA dos cromossomos e dos braços cromossômicos de *Zea mays* L. Orientador: Carlos Roberto de Carvalho.

O estudo do cariótipo de plantas possibilita a identificação e classificação dos cromossomos provendo informações básicas e aplicadas à taxonomia, sistemática, evolução e melhoramento de plantas. Com o advento dos projetos genômicos e de sequenciamento de plantas, a caracterização do cariótipo da forma tradicional passou a ser insuficiente quanto a contribuição de informação de dados. Dessa forma, a quantificação do conteúdo de DNA dos cromossomos por citometria de imagem (CI) pode ser incorporada à caracterização do cariótipo. Essa metodologia fornece uma análise quantitativa a partir de imagens digitais. As imagens são convertidas em pixels, que estão relacionados a uma cor e uma intensidade em específico, e processadas pelo programa de análise de imagens, gerando valores de absorbância relacionados com a área, denominados valores de densidade óptica integrada (DOI). Por meio da quantificação de DNA cromossômico é possível resolver pequenas diferenças na quantidade de DNA de cromossomos morfológicamente semelhantes e pequenos. A utilização de técnicas que possibilitam uma melhor diferenciação dos homólogos, ou mesmo a análise do conteúdo de DNA cromossômico poderá agregar conteúdo informacional ao cariótipo de *Z. mays* e contribuir com projetos de sequenciamento de genoma. Portanto, o objetivo deste estudo foi determinar o conteúdo de DNA por cromossomo, bem como para os seus respectivos braços via CI em *Zea mays* L. Inicialmente, foi realizado a quantificação de DNA nuclear que resultou em um valor médio de $2C = 6,10$ pg. As análises de CF mostraram variação nos genomas entre os acessos de *Z. mays*. Essa variação foi evidenciada pela comparação do conteúdo de DNA nuclear dos dois cultivares, o ‘CE-777’ e o ‘AL Bandeirante’. A variação no conteúdo nuclear em plantas tem sido atribuída principalmente aos elementos transponíveis. As técnicas de dissociação celular e secagem ao ar foram empregadas no preparo das lâminas, e essas hidrolisadas e coradas com reativo de Schiff. As imagens foram capturadas por uma vídeo-câmera CCD monocromática, acoplada a um microscópio, e analisadas com recursos digitais de análise de imagem. Distribuindo o valor $2C$ médio de DNA nuclear, estabelecido pela citometria de fluxo (CF), em relação aos valores médios da DOI, quantificado pela CI, o conteúdo de DNA foi mensurado para

todos os cromossomos de *Z. mays* e seus braços. Essa metodologia possibilitou quantificar o conteúdo de DNA dos cromossomos, sendo que eles variaram de $2C = 0,803$ pg (cromossomo 1) a $0,385$ pg (cromossomo 10). A média dos valores para os braços cromossômicos em metáfases variaram para o braço curto de $0,376$ (cromossomo 1) a $0,131$ (cromossomo 10), e para o braço longo $0,427$ a $0,255$ dos mesmos cromossomos, respectivamente. O conteúdo de DNA da região satélite do cromossomo 6 também foi mensurado e apresentou $2C = 0,053$ pg. No presente estudo, o cromossomo classificado como 9 apresentou uma maior quantidade de DNA que o cromossomo 8, devido a sua maior área. O conhecimento do conteúdo de DNA nuclear e cromossômico em plantas constitui uma informação básica, importante e útil para estudos taxonômicos e evolutivos.

ABSTRACT

SILVA, Jéssica Coutinho, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2016. **DNA quantification of chromosomes and chromosomes arms of *Zea mays* L.** Adviser: Carlos Roberto de Carvalho.

The plant karyotype studies allows the identification and classification of chromosomes providing basic and applied information to the taxonomy, systematics, evolution and breeding of different crops. With the advent of plant genomic and sequencing projects, the traditional karyotype characterization became insufficient as to the contribution of data information. Thus, the quantification of DNA amount of chromosomes by image cytometry (ICM) can be incorporated to the karyotype characterization. This methodology provides a quantitative analysis from digital images. The images are converted to pixels, which are related specifically to a color and intensity, and processed by an image analysis program, generating absorbance values related with area, denominated values of integrated optical density (IOD). Through the chromosomal DNA quantification, it is possible to resolve small differences in DNA amount of morphologically similar and short chromosomes. Therefore, this study aimed to determine the DNA content by chromosome, as well for its arms by ICM in *Zea mays* L. Initially, nuclear DNA quantification was performed and resulted in medium value of $2C = 6.10$ pg. The cell dissociation and air-drying techniques were employed in the slides preparations, and these were hydrolyzed and stained with Schiff's reagent. The images were captured by a monochrome CCD video camera coupled to a microscope, and analyzed using digital image analysis capabilities. Distributing the average value $2C$ nuclear DNA, as established by the flow cytometry (FCM) in relation to the average values of IOD quantified by ICM, DNA content was measured for all *Z. mays* chromosomes and arms. This methodology allowed to quantify the DNA content of the chromosomes, which ranged from $2C = 0.803$ pg (chromosome 1) to 0.385 pg (chromosome 10). The average values for the chromosomes arms in metaphase ranged from 0.376 short arm (chromosome 1) to 0.131 short arm (chromosome 10) 0.427 long arm to 0.255 long arm of the same chromosome, respectively. The DNA content of the satellite regions of chromosome 6 in metaphase was also measured and presented 0.053 pg. The knowledge of the plant nuclear and chromosomal DNA contents constitutes a basic, important and useful information for taxonomic and evolutionary studies.

Furthermore, the results obtained in the present work may contribute to improve the informational content of maize karyotype and provides subsidies for genome sequencing projects.

1 INTRODUÇÃO

Com o surgimento dos projetos genômicos e de sequenciamento de plantas, a caracterização do cariótipo da forma tradicional passou a ser insuficiente quanto à contribuição de dados. Dessa forma, novas informações, como a quantificação do conteúdo de DNA dos cromossomos por CI, podem ser incorporadas a caracterização do cariótipo, pois a mesma possibilita o reconhecimento de pequenas variações no conteúdo de DNA cromossômico, difíceis de serem detectadas com técnicas convencionais.

O presente estudo buscou a quantificação do conteúdo DNA de cada cromossomo e de seus respectivos braços utilizando a metodologia de CI, para gerar mais informações sobre a distribuição do genoma no cariótipo de *Z. mays*. Os trabalhos empregando a CI para quantificação de DNA cromossômico avaliaram o cromossomo por inteiro e não existe relato dessa ferramenta sendo utilizada para mensurar cada braço cromossômico, além da quantidade de amostra empregada para a quantificação não ser superior a 10 metáfases, utilizou-se 51 metáfases. A utilização de técnicas que possibilitem uma melhor diferenciação dos homólogos, ou mesmo a análise do conteúdo de DNA cromossômico poderá agregar conteúdo informacional ao cariótipo de milho e contribuir com projetos de sequenciamento e genoma.

Nas espécies que possuem seu cariótipo conhecido, se pode atribuir genes a um determinado cromossomo, auxiliar na designação de cada grupo de ligação genético e na integração dos mapas físicos e genéticos, importantes aos programas de melhoramento de plantas.

O objetivo do presente estudo foi determinar o conteúdo de DNA por cromossomo, bem como para os seus respectivos braços via CI em *Z. mays* L. ‘AL Bandeirante’, a fim de avaliar a distribuição do genoma no cariótipo.

De maneira específica o estudo buscou:

- Determinação do conteúdo de DNA nuclear 2C de *Z. mays* ‘AL Bandeirante’ por citometria de fluxo.
- Sincronização do ciclo celular de meristemas radiculares para obtenção de alto índice metafásico.

- Padronização de protocolo citogenético para obtenção de cromossomos metafásicos em alta-resolução, possibilitando identificar os pares homólogos e a montagem dos kariogramas.
- Coloração diferencial dos cromossomos com DAPI para montagem de kariograma de referência, com base nos knobs.
- Montagem dos kariogramas de prometáfases/metáfases coradas por Feulgen.
- Calibração do sistema de análise de imagem, quanto a estabilidade, a linearidade das medidas de densidade óptica e a uniformidade da iluminação na imagem de captura, a fim de obter parâmetro que demonstrem a confiabilidade das medidas de DOI obtidas.
- Mensuramento da área, da densidade óptica (DO) e a densidade óptica integrada (DOI) dos cromossomos e dos braços cromossômicos para todos os kariogramas.
- Comparar os valores de DNA cromossômico em pares de base (pb) obtidos pela CI nesse trabalho com os dados da cariotipagem de fluxo e sequenciamento relatados na literatura.

O estudo teve um caráter experimental e realizado através de ensaios, sendo que as sementes de *Z. mays* L. “CE-777” cedidas pelo Dr. Jaroslav Doležal (Laboratório de Citogenética Molecular e Citometria do Instituto Experimental Botânico – Sokolovska, República Tcheca) serão utilizadas como padrão de referência para as análises de CF. As sementes do cultivar AL Bandeirante (comercial) serão utilizadas como amostra. As análises foram conduzidas no Laboratório de Citogenética e Citometria de plantas, do Departamento de Biologia Geral da Universidade Federal de Viçosa.

O estudo inicia no primeiro capítulo por apresentar os elementos conceituais de caracterização do cariótipo de *Zea mays* L, quantificação de DNA genômico e quantificação de DNA cromossômico em *Z. mays*. No segundo capítulo indicasse os materiais e métodos utilizados no estudo, sendo que no terceiro capítulo a apresentação dos resultados.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Caracterização do cariótipo de *Zea mays* L.

O cariótipo é a descrição das características do conjunto cromossômico de uma espécie, sendo este representado na forma de kariograma ou ideograma. Em plantas, os parâmetros para identificar os cromossomos têm sido o comprimento total dos cromossomos, o comprimento do braço longo e curto, posição do centrômero, bem como a relação de braços (Guerra, 1988).

Nas espécies que possuem seu cariótipo conhecido, é possível localizar genes em um determinado cromossomo, designar cada grupo de ligação genético e integrar os mapas físicos e genéticos, importantes aos programas de melhoramento de plantas (Carneiro e Vieira, 2002).

Segundo Carneiro e Vieira (2002, p. 90):

Em espécies cujo cariótipo é bem conhecido, é possível atribuir genes a um determinado cromossomo, relacionando aberrações cromossômicas com alterações fenotípicas causadas por esses genes. Por exemplo, em trigo, fumo, tomate e milho analisaram-se características em linhagens portadoras de monossomias ou trissomias para cada um de seus cromossomos e, assim, um grande número de genes pôde ser localizado. Essas análises podem ser refinadas utilizando-se aberrações que afetam apenas uma parte do cromossomo, como a ausência de um dos braços ou a duplicação de um pequeno segmento

Em *Zea mays* L. a caracterização do cariótipo proporciona o estudo da estrutura e do comportamento de aberrações cromossômicas (Carlson et al. 1988), além da construção de mapas cromossômicos (Anderson et al. 2006). O cariótipo de *Z. mays* foi inicialmente caracterizado em células mitóticas (células do tapete) da antera. Os cromossomos foram classificados com base no comprimento total e na posição do centrômero (McClintock, 1929). Posteriormente, os cromossomos individuais de milho em células meristemáticas radiculares foram identificados, utilizando a técnica de esmagamento (Chen 1969).

Entretanto, a técnica de esmagamento apresenta alguns problemas, tais como: perda e fragmentação dos cromossomos durante a remoção da lamínula, baixa qualidade no espalhamento dos cromossomos na lâmina, sobreposição dos cromossomos (Rayburn

e Gold 1982; Gould, 1984). Esses fatores dificultam a análise e caracterização cromossômica. Em virtude disso, uma metodologia adaptada por Carvalho e Saraiva (1993) de dissociação celular com secagem ao ar foi empregada em *Z. mays*, possibilitando um melhor espalhamento dos cromossomos na lâmina, reduzindo sobreposições.

O primeiro procedimento para identificar cromossomos de milho em meiose foi desenvolvido por McClintock (1930), que teve sua metodologia refinada e descrita por Longley (1939) e Rhoades (1950). Os cromossomos meióticos em paquíteno, em virtude do nível de compactação da cromatina, apresentam detalhes morfológicos que permitem identificá-los e caracterizá-los com maior resolução. Assim, os bivalentes de *Z. mays* foram classificados quanto ao padrão cromomérico, presença e posição dos knobs, quanto ao comprimento total, razão dos braços curto e longo (posição do centrômero – classe cromossômica) e à localização da região organizadora do nucléolo (RON) no cromossomo 6 (Rhoades, 1955; Caixeta e Carvalho, 2001)

Até a década de 70, as técnicas convencionais de coloração se limitavam apenas a cariotipagem das espécies com base em parâmetros morfométricos (Guerra, 1983). Em adição as técnicas convencionais, os cromossomos de *Z. mays* foram analisados por técnicas de bandeamento, moleculares e citométricas. Com base em técnicas citogenéticas, o cariótipo de *Z. mays* foi classificado com $2n = 2x = 20$ cromossomos, o par de homólogos 6 com presença da RON; possuindo três pares metacêntricos (1, 2 e 5), seis submetacêntricos (3, 4, 6, 7, 9 e 10) e um acrocêntrico (8) (Sadder e Weber, 2001; Rosado et al. 2009).

A citometria de imagem (CI) vem sendo empregada para aprimorar as análises cromossômicas, resolvendo com maior resolução pequenas diferenças entre cromossomos morfológicamente semelhantes em plantas com cariótipos homomórficos (Abreu et al. 2008). Essa metodologia fornece uma análise quantitativa de imagens digitais e foi aplicada aos cromossomos de *Z. mays* em ‘Black Mexican’ com e sem cromossomo B (Rosado et al. 2009).

2.2 Quantificação de DNA genômico

A quantificação do conteúdo de DNA é reconhecida como um importante parâmetro para caracterização genômica, com aplicação aos estudos evolutivos. Além disso, proporciona informações úteis para o planejamento de projetos de sequenciamento, bem como em trabalhos envolvendo marcadores moleculares (Bennett e Leitch, 2005). Segundo Price e Johnston (1996), as duas técnicas mais utilizadas na quantificação do genoma vegetal são as citometrias de fluxo (CF) e a de imagem (CI).

Como apresenta Praça (2009, p. 01) o conjunto de dados que apresente a extensão da variedade do tamanho do genoma entre e intra espécies sendo 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 DNA.

O tamanho do genoma também pode ser conhecido através do sequenciamento, determinando a ordem dos nucleotídeos pela composição de bases nitrogenadas (Klug, 2009). A primeira espécie vegetal que teve seu genoma sequenciado foi *Arabidopsis thaliana*. Com 125 milhões de pares de bases (pb), o seu genoma é relativamente pequeno, se comparado com outras espécies vegetais, o que facilita o seu estudo (Kaul et al. 2000). Posteriormente outras espécies tiveram seus genomas sequenciados, tais como: *Oryza sativa* (~400 Mb), *Glycine max* (~950 Mb) e *Z. mays* (~2,3 Mb) (NCBI, 2016). Entretanto, o sequenciamento genômico ainda não é um processo simples, sendo oneroso e laborioso, principalmente em espécies com grandes genomas (Martins, 2014).

A citometrias de fluxo tem sido considerada uma alternativa valiosa para determinação do tamanho do genoma, sendo amplamente utilizada em diversas espécies vegetais. Esta técnica tem como princípio a análise de células, núcleos ou partículas coradas em suspensão, que passam por um capilar onde recebem, individualmente, a incidência de uma fonte de luz. Assim, cada partícula emite uma fluorescência que é quantificada (Galbraith e Lambert, 2012).

O resultado da análise é apresentado na forma de histograma que representa a intensidade de fluorescência relativa, representando o conteúdo relativo de DNA do material analisado. Nesses histogramas, o pico maior corresponde ao número de núcleos na fase G_0/G_1 e o menor ao número de núcleos na fase G_2/M , enquanto que o número de

núcleos na fase S corresponde à região entre os dois picos (Doležel e Bartoš, 2005). Para mensurar o valor de conteúdo de DNA nuclear é necessário comparar a posição do pico G_0/G_1 da amostra com a posição do pico de uma planta padrão, que tem seu conteúdo de DNA já estabelecido (Praça-Fontes et al. 2011).

Diversas plantas apresentam seu conteúdo de DNA determinado por CF (Garcia, et al. 2014). Além desses estudos, a quantificação de DNA genômico em algumas espécies de plantas também tem sido mensurado pela a CI (Vilhar et al. 2001). Para tanto, é necessário que seja realizada a reação de Feulgen, que consiste na hidrólise ácida do DNA removendo as bases púricas, formando radicais aldeídos nas extremidades das desoxirriboses. A pararosanilina, presente na fucsina básica, usada para preparo do reativo de Schiff, liga-se aos grupamentos aldeídos da desoxirribose, formando um complexo de cor rosa (Chieco e Derenzini, 1999). Assim, a reação de Feulgen é específica para o DNA e, como a intensidade da cor que se forma é proporcional à concentração de DNA, ela permite o estudo quantitativo desse ácido nucléico (Greilhuber, 2008).

Após a coloração do DNA, as imagens são capturadas por uma vídeo-câmera acoplada a um microscópio. Essas imagens são subsequentemente convertidas em pixels e esses valores são processados automaticamente pelo algoritmo do software computacional, gerando valores de absorbância relacionados com a área, denominados densidade óptica integrada (DOI) (Hardie et al. 2002).

Diferentes estudos têm demonstrado que os resultados obtidos por citometrias de fluxo (CF) e a de imagem (CI) sendo estatisticamente idênticos.

Para Clarindo et al (2012, p. 02) em consequência dos núcleos analisados pela citometria de imagem serem corados estequiometricamente e em especial pela técnica citoquímica (...), essa metodologia tem sido importante na quantificação do conteúdo de DNA por permitir análises quantitativas com elevada precisão.

Os autores apontam alta correlação entre os valores mensurados por ambas técnicas para quantificação de DNA genômico, além de apresentarem uma forte associação linear, onde o coeficiente de determinação $R^2 = 99,74\%$ evidência equivalência entre as duas metodologias. Assim, a CI apresenta resultados precisos e reprodutíveis e pode ser usado como uma alternativa para a quantificação de DNA genômico (Doležel et al. 1998; Vilhar et al. 2001; Praça, 2009).

2.3 Quantificação de DNA cromossômico em *Z. mays*

O tamanho do genoma nuclear e o conteúdo de DNA dos dez cromossomos de *Z. mays* foram determinados por meio do sequenciamento e CI (Tabela 1). A quantificação de DNA cromossômico pode prover informação mais precisa sobre a organização do genoma do que apenas o conteúdo de DNA nuclear em si, pois permite a distribuição do DNA entre os cromossomos (Praça-Fontes et al. 2014).

Em *Z. mays* suspensões de cromossomos corados com iodeto de propídeo resultaram numa distribuição de intensidade do sinal de fluorescência gerando um cariótipo de fluxo, no qual foram reconhecidos apenas os cromossomos 1 e 10 (Li et al. 2004). Porém, o tamanho do pico depende da quantidade de DNA, por isso é comum encontrar o mesmo pico para mais de um cromossomo. Uma das limitações do cariótipo de fluxo é a incapacidade de discriminar cromossomos com quantidade de DNA semelhante, além da necessidade de uma grande quantidade de cromossomos morfologicamente preservados (Doležel et al. 2004). Estes fatos dificultaram a determinação do conteúdo de DNA para os dez cromossomo de *Z. mays* empregando esta técnica (Lee et al. 2002; Li et al. 2004).

O tamanho em pb do conteúdo de DNA cromossômico de *Z. mays* também foi mensurado no projeto de sequenciamento (Tabela 1). O sequenciamento do genoma de *Z. mays* se baseou na estratégia de clone-por-clone. Nessa técnica, o conjunto mínimo de clones a ser sequenciado, denominado "caminho de cobertura mínima", foi elaborado com base no mapa físico, o qual é construído a partir da sobreposição de grandes insertos de clones de DNA. Os estudos resultaram na construção de um banco de dados com mais de 2,3 bilhões de pb de DNA armazenados nos 10 cromossomos da espécie, permitindo, dessa forma, a identificação de mais de 32.500 genes (Schnable et al. 2009).

Tabela 1. Quantidade de DNA 1C dos cromossomos de *Z. mays*.

Número cromossômico	1C em pb ^{a c}	1C em pb ^b
1	0,358 x 10 ⁹	0,301 x 10 ⁹
2	0,350 x 10 ⁹	0,238 x 10 ⁹
3	0,302 x 10 ⁹	0,232 x 10 ⁹

4	0,283 x 10 ⁹	0,242 x 10 ⁹
5	0,269 x 10 ⁹	0,218 x 10 ⁹
6	0,261 x 10 ⁹	0,169 x 10 ⁹
7	0,254 x 10 ⁹	0,177 x 10 ⁹
8	0,246 x 10 ⁹	0,175 x 10 ⁹
9	0,238 x 10 ⁹	0,157 x 10 ⁹
10	0,234 x 10 ⁹	0,150 x 10 ⁹

^aQuantificação de DNA cromossômico baseado em CI (Rosado et al. 2009). ^bQuantificação de DNA cromossômico baseado no sequenciamento genômico de *Z. mays* (Gramene, 2016). ^cValores convertidos para pb, considerando que 1 pg de DNA corresponde a 0,978 x 10⁹ (Doležal et al. 2003).

Segundo Martins (2014), os genomas grandes e marcados por abundância de sequências repetitivas ainda representam um grande desafio para o desenvolvimento de algoritmos de montagem a partir de sequências curtas de DNA. Diante deste contexto, o elevado conteúdo de DNA repetitivo (regiões duplicadas) presente no genoma de *Z. mays* e o tamanho do seu genoma, cerca de 2500 Mpb, dificulta o seu completo sequenciamento em virtude da ocorrência de falsas associações, gerando dados imprecisos do valor C (Sanmiguel et al. 1996; Ouyang e Buell, 2004).

Nesse sentido, a CI agrega ferramentas de citogenética clássica e análise de imagem, possibilitando a quantificação de DNA cromossômico independentemente das suas regiões heterocromáticas, provendo valores mais acurados do valor C e permitindo a identificação de pequenas variações no conteúdo de DNA entre cromossomos homomórficos (Praça-Fontes et al. 2014). Além disso, essa técnica pode ser empregada para identificar os genomas parentais em organismos aloploidos, auxiliando nas investigações da estrutura e evolução dos cromossomos e genomas, por meio da análise das características morfológicas e quantidade de DNA (Clarindo e Carvalho, 2009); sendo também possível, determinar pequenas variações no conteúdo de DNA em plantas portadoras de cromossomos B, discriminando e individualizando os complementos A e B em *Z. mays* (Rosado et al. 2009).

Portanto, o conhecimento do perfil genômico de espécies vegetais possibilitam a sua completa inserção biotecnológica (Bai et al. 2012). Além disso, os estudos citogenéticos proveem informações que podem ser usadas em diversos estágios de programas de melhoramento e que vão desde o conhecimento do número e morfologia

dos cromossomos à quantificação de DNA. Essas informações refletem um aspecto fundamental da biologia dos organismos sendo de grande importância nas pesquisas taxonômicas, filogenéticas, evolutivas e moleculares (Matsumoto et al. 2000; Grattapaglia et al. 2012).

Com o advento dos projetos genômicos e de sequenciamento de plantas, a caracterização do cariótipo da forma tradicional passou a ser insuficiente quanto à contribuição de dados. Dessa forma, novas informações, como a quantificação do conteúdo de DNA dos cromossomos por CI, podem ser incorporadas a caracterização do cariótipo, pois a mesma possibilita o reconhecimento de pequenas variações no conteúdo de DNA cromossômico, difíceis de serem detectadas com técnicas convencionais.

O presente estudo realizou a quantificação do conteúdo DNA de cada cromossomo e de seus respectivos braços por meio da CI, agregando informações sobre a distribuição do genoma no cariótipo de *Z. mays*. Os trabalhos empregando a CI para quantificação de DNA cromossômico avaliaram o cromossomo por inteiro e não existe relato dessa ferramenta sendo utilizada para mensurar cada braço cromossômico. A utilização de técnicas que possibilitam uma melhor diferenciação dos homólogos, ou mesmo a análise do conteúdo de DNA cromossômico poderá agregar conteúdo informacional ao cariótipo de *Z. mays* e contribuir com projetos de sequenciamento de genoma.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O objetivo do presente estudo foi determinar o conteúdo de DNA por cromossomo, bem como para os seus respectivos braços via CI em *Z. mays* L. ‘AL Bandeirante’, a fim de avaliar a distribuição do genoma no cariótipo.

3.2 Objetivos específicos

- i. Determinação do conteúdo de DNA nuclear 2C de *Z. mays* ‘AL Bandeirante’ por citometria de fluxo.
Sincronização do ciclo celular de meristemas radiculares para obtenção de alto índice metafásico.
- ii. Padronização de protocolo citogenético para obtenção de cromossomos metafásicos em alta-resolução, possibilitando identificar os pares homólogos e a montagem dos kariogramas.
- iii. Coloração diferencial dos cromossomos com DAPI para montagem de kariograma de referência, com base nos knobs.
- iv. Montagem dos kariogramas de prometafases/metafases coradas por Feulgen.
- v. Calibração do sistema de análise de imagem, quanto a estabilidade, a linearidade das medidas de densidade óptica e a uniformidade da iluminação na imagem de captura, a fim de obter parâmetro que demonstrem a confiabilidade das medidas de DOI obtidas.
- vi. Mensuramento da área, da densidade óptica (DO) e a densidade óptica integrada (DOI) dos cromossomos e dos braços cromossômicos para todos os kariogramas.
- vii. Comparar os valores de DNA cromossômico em pares de base (pb) obtidos pela CI nesse trabalho com os dados da kariotipagem de fluxo e sequenciamento relatados na literatura.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material vegetal

A quantificação de DNA por cromossomo foi conduzida no acesso comercial *Z. mays* L. ‘AL Bandeirante’. Previamente, o conteúdo de DNA nuclear desse acesso foi mensurado utilizando *Z. mays* L. ‘CE-777’ como padrão de referência. Sementes de ‘CE-777’ foram cedidas pelo Dr. Jaroslav Doležal (Laboratório de Citogenética Molecular e Citometria do Instituto Experimental Botânico – Sokolovska, República Tcheca). As análises foram conduzidas no Laboratório de Citogenética e Citometria de plantas, do Departamento de Biologia Geral da Universidade Federal de Viçosa.

4.2 Mensuramento do valor 2C DNA nuclear

Após a germinação *in vitro*, segmentos foliares (1 cm²) de ‘AL Bandeirante’ (amostra) e de ‘CE-777’ (padrão interno, 2C = 5,57 pg de DNA, Praça-Fontes et al. 2011) foram coletados, dispostos em placas de Petri, e retalhados (chopping, Galbraith et al. 1983) em 500 µL de tampão de extração nuclear OTTO-I (0,1 M de ácido cítrico, 0,5% de Tween 20, 50 µg mL⁻¹ RNase), pH = 2,3 (Otto, 1990). Após 5 min, 500 µL do mesmo tampão foi adicionado, as suspensões filtradas em membranas de nylon de 30 µm para um microtubo de 2 mL, e centrifugadas a 100g por 7 min (Clarindo e Carvalho, 2009). O sobrenadante foi descartado, 100 µL do tampão OTTO I foi adicionado ao precipitado que, após vortex, permaneceu incubado por 10 min. A suspensão nuclear foi corada com 1,5 mL de tampão de OTTO-II (0,4 M de Na₂HPO₄·2H₂O, 75 µM de iodeto de propídeo e 50 µg mL⁻¹ RNase, pH = 7,8) no escuro por 20 min. A solução foi filtrada em uma tela de nylon de 20 µm para um tubo de citometria. Cinco repetições foram analisadas em citômetro de fluxo Partec-PAS[®] (Partec[®]), equipado com laser de íon argônio, 488 nm, 20 mW com filtros KG1, BG38, UG1, GG435. O equipamento foi cuidadosamente calibrado e alinhado com o auxílio de microbeads de acordo com as recomendações do fabricante. O tamanho médio do genoma nuclear da amostra foi mensurado em picogramas (pg) por meio da análise dos histogramas com ferramentas do programa FlowMax[®] (Partec[®]).

4.3 Preparações cromossômicas

Após germinação em estufa à temperatura de 30 °C, raízes com 1 cm de comprimento foram incubadas por 18 h a 30 °C em solução contendo 0,2 g L⁻¹ de sais MS (Murashige e Skoog, 1962) e 1,75, 2,0 ou 3,0 mM de hidroxauréia (HU). As raízes foram lavadas com quatro trocas de dH₂O por 15 min a 30 °C, incubadas em 2 – 3 µM de amiprofos-metil (APM) por 1 – 6 h a 30 °C. Em seguida, as raízes foram fixadas em solução gelada de metanol:ácido acético 3: 1 (v/v) por 30 min a -20 °C, com trocas a cada 10 min. Após 24 h, a solução fixadora foi substituída por etanol 95%, com três trocas, e as amostras foram armazenadas a -20 °C (Carvalho et al. 2011).

Para maceração das raízes, um pool enzimático (0,5% celulase Yakult + 2% celulase Sigma[®], C1184 + 0,5% hemicelulase Sigma[®], H0771 + 0,5% macerozyme orozuka R10 Yakult) foi diluído em 50 – 120 µl de tampão citrato (10 mM de ácido cítrico e 10 mM de citrato de sódio tribásico) e, após, acrescentado 1 – 5 µL de pectinase (Sigma[®], P2736). As raízes foram lavadas em dH₂O por 30 min, com trocas a cada 10 min, e submetidas à maceração enzimática por 2 horas a 35 °C. A solução enzimática foi removida, as raízes foram novamente fixadas como descrito acima e armazenadas a -20 °C.

4.4 Coloração diferencial com DAPI

As lâminas contendo preparações cromossômicas na fase de metáfase foram submetidas à desnaturação térmica e química em solução de 70% formamida/ SSC 2X pH 7,0 em banho-maria a 72°C por 5 min. Em seguida, foram submetidas à série alcoólica 70%, 85% e 100% a -20°C por 5 min cada. A coloração fluorescente foi realizada com 5 µM de DAPI em temperatura ambiente por 10 minutos. Após a coloração, as lâminas foram lavadas em tampão PBS por 1 min e montadas com esse mesmo tampão entre lâmina e lamínula para visualização em microscópio de fluorescência.

4.5 Citometria de imagem

4.5.1 Hidrólise e reação de Feulgen

As lâminas foram preparadas por meio da técnica de dissociação celular e secagem ao ar (Carvalho e Saraiva, 1993), mantidas em solução fixadora de metanol: 37% formaldeído: ácido acético (17:5:1) durante 12 h a 25 °C, lavadas em água corrente durante 10 min, secadas ao ar e hidrolisadas em 5 M de ácido clorídrico (Vetec) por 16 – 20 min a 25 °C (Carvalho et al. 2011). Após a hidrólise, as lâminas foram lavadas em dH₂O por três trocas de 2 min, secadas ao ar, recobertas com reativo de Schiff (5 g de fucsina básica Merck[®], 15 mL de HCl 1 M, 2,23 g de K₂S₂O₅, 0,703 g de carvão ativo Synth e 85 mL de dH₂O, Hardie et al. 2002) e mantidas em câmara úmida por 12 h a 4 °C. Posteriormente, as lâminas foram lavadas em 0,5% de SO₂ (Merck[®]) e duas vezes em dH₂O, 3 min cada, e secas ao ar.

4.5.2 Análise de imagem

A calibração do sistema de análise de imagem, quanto a estabilidade, a linearidade das medidas de DO e a uniformidade da iluminação na imagem de captura foram conduzidas como descrito por Carvalho et al. (2011). Prometáfases e metáfases foram capturadas por uma vídeo-câmera CCD acoplada a um microscópio OlympusTM BX-60 equipado com uma fonte de luz estabilizada, uma objetiva de imersão de 100x, um condensador (aplanat achromat) com diafragma 1,4, e filtro de densidade neutra (ND6). A digitalização, a análise morfométrica e de DO das imagens foram feitas usando um o sistema Image Pro-Plus[®] 6.1 Media Cybernetics[®]. As imagens foram selecionadas e segmentadas, usando ferramentas digitais para montar cinquenta e um kariogramas.

Usando o programa de análise de imagem, o tamanho total e dos braços curto e longo de cada cromossomo de Z. mays foi mensurado, e a classificação cromossômica determinada conforme Levan et al. (1964) e revisado por Guerra (1986). Com o mesmo programa, os cromossomos e seus respectivos braços foram segmentados e os valores referentes à área e à DO foram gerados pelo software.

4.5.3 Mensuramento do conteúdo de DNA cromossômico

Com base nos valores de área e DO de cada cromossomo e dos seus respectivos braços, os valores de DOI foram calculados. Assim, o conteúdo médio de DNA nuclear mensurado pela CF foi proporcionalmente distribuído entre o valor médio da DOI cada cromossomo e braço calculado pela CI. Os valores foram estimados conforme a fórmula proposta por Carvalho et al. (2011). As análises de CI foram realizadas em 102 cromossomos.

$$(I) \quad 2C_n = (\sum 2C_n / r)$$

$$(II) \quad DOI_c = (\sum DOI_{pc} \times n) / 2$$

$$(III) \quad DOI_t = \sum DOI_c$$

$$(IV) \quad 2C_c = (2C_n \times DOI_c) / DOI_t$$

Em que:

- $2C_n$ = Conteúdo de DNA nuclear 2C em pg;
- r = número de repetições da CF;
- DOI_c = Valor da DOI do cromossomo com duas cromátides – 2C;
- DOI_{pc} = DOI do cromossomo com duas cromátides – 2C;
- n = número de metáfases;
- DOI_t = DOI de todos os cromossomos;
- $2C_c$ = Conteúdo de DNA cromossômico 2C.

A quantidade de DNA por braço cromossômico foi mensurada por meio da equação:

$$(V) \quad 2C_n = (\sum 2C_n / r)$$

$$(VI) \quad DOI_b = (\sum DOI_{bc} \times n) / 2$$

$$(VII) \quad DOI_t = \sum DOI_c$$

$$(VIII) \quad 2C_b = (1C_n \times DOI_b) / DOI_t$$

Onde:

- $2C_n$ = Conteúdo de DNA nuclear 2C em pg;
- r = número de repetições da CF;
- DOI_b = Valor da DOI do braço cromossômico com duas cromátides – 2C;

- DOI_{bc} = DOI do braço cromossômico com duas cromátides – 2C;
- n = Número de metáfases;
- DOI_t = DOI de todos os cromossomos;
- $2C_b$ = Conteúdo de DNA do braço cromossômico 2C.

Para comparação com os dados gerados pelo sequenciamento, os valores 2C mensurados pela CI foram convertidos para 1C.

5 RESULTADOS

5.1 Determinação do conteúdo de DNA nuclear

A quantificação de DNA nuclear resultou em um valor médio de $2C = 6,10 \pm 0,044$ pg, correspondendo a $2C = 5,96 \times 10^9$ pb (Figura 1). Pelos canais de leitura dos dois picos referentes à fase G_0/G_1 , e assumindo como referência o conteúdo de DNA do padrão ($2C = 5,57$ pg), os valores absolutos em pg de DNA/ $2C$ foram calculados para a amostra. Os picos G_0/G_1 de ‘CE-777’ foram calibrados para o canal 200 e, assim, a amostra apresentou-se no canal 219.

O processamento das suspensões nucleares (amostra/padrão) gerou histogramas cujos picos G_0/G_1 do padrão e da amostra foram diferenciados e identificados (Tabela 2). As análises apresentaram coeficientes de variação (CV) entre 3,0 % a 4,1 %.

Tabela 2 – Conteúdo de DNA referente as cinco repetições. Os picos G_0/G_1 de *Z. mays* ‘CE-777’ (padrão interno) foram calibrados para o canal 200, $2C = 5,57$ pg.

Z. mays (AL Bandeirante)		
Leituras	Canal	Conteúdo 2C de DNA em pg
L1	221	6,15
L2	220	6,13
L3	217	6,04
L4	218	6,07
L5	219	6,10

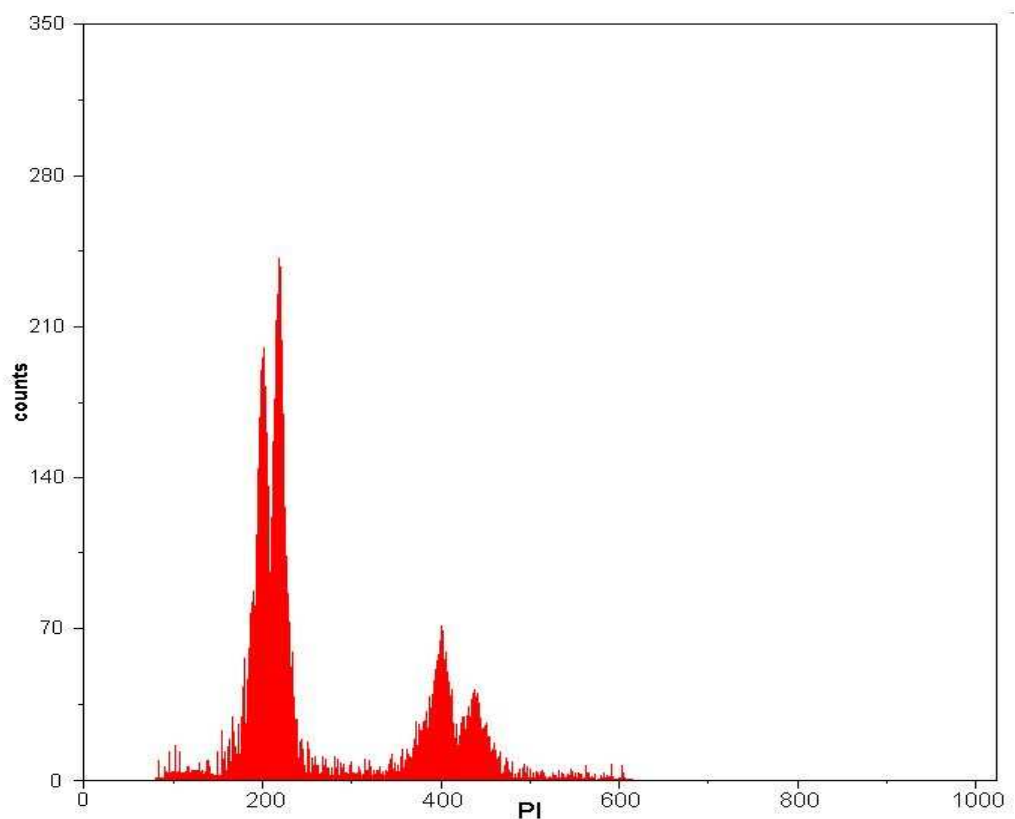


Figura 1 – Histograma representativo referente ao mensuramento do conteúdo de DNA nuclear de *Z. mays* ‘AL Bandeirante’ a partir de suspensões nucleares coradas com iodeto de propídeo. No canal 200 o pico G_0/G_1 de ‘CE-777’ (padrão interno), $2C = 5,57$ pg e $CV = 3,2$ %, no canal 219 o pico G_0/G_1 de ‘AL Bandeirante’, $2C = 6,10$ pg e $CV = 3,8$ %.

5.2 Preparações cromossômicas

O tratamento com HU a 1,75 mM por 18 h inibiu de forma reversível a fase S do ciclo celular, visto que essa concentração e tempo de exposição resultaram em células meristemáticas apenas em G_1 . O procedimento que possibilitou o acúmulo de cromossomos em prometáfase, com diferentes níveis de compactação, e em metáfase foi APM a 3 μ M por 4 h. Testes preliminares (dados não mostrados) revelaram que em meristemas radiculares não tratados o índice metafásico era de 0,8%, enquanto meristemas expostos a HU chegou a 47% no melhor tempo de tratamento de recuperação (4h) (Figura 2). As raízes sincronizados com HU e bloqueadas com APM resultaram em 61% de prometáfases e metáfases.

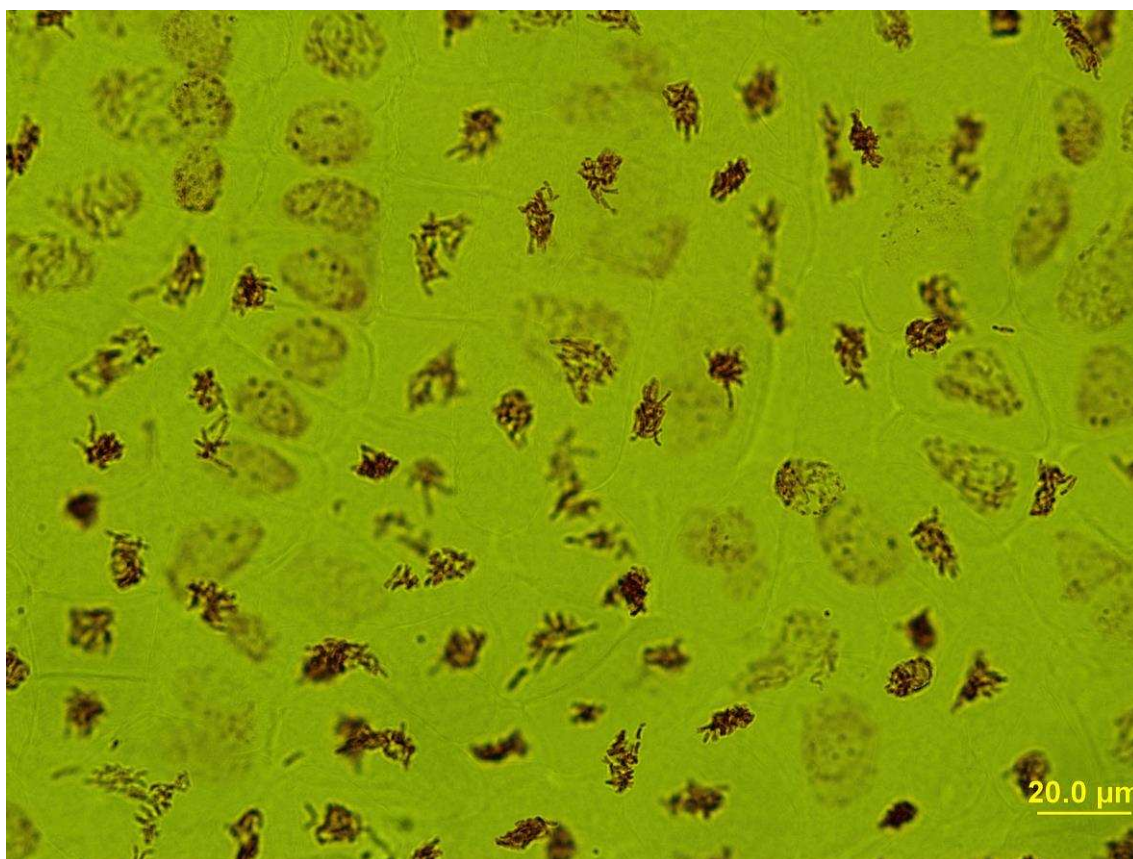


Figura 2 – Prometáfases e metáfases em meristema radicular de *Z. mays* obtidas por meio da sincronização do ciclo celular utilizando HU a 1,75 mM por 18 horas. Observar a quantidade relativamente alta de prometáfases e metáfases.

O procedimento de maceração enzimática que forneceu preparações livres de citoplasma e com cromossomos morfologicamente preservados foi 100 μ L de pool enzimático e 1 μ L de pectinase diluídas em 50 μ L de tampão citrato por 2 h a 35 °C. As lâminas apresentaram prometáfases e metáfases com cromossomos isolados, além das constrições primárias e secundárias bem definidas. Estas características foram essenciais para a montagem dos kariogramas de *Z. mays* ‘AL Bandeirante’ e análise das imagens (Figuras 4 e 5).

5.3 Coloração diferencial com DAPI

Regiões com maior intensidade de fluorescência, correspondentes aos knobs, foram identificadas na porção intersticial dos braços longos dos cromossomos 2 – 9. A identificação dos knobs corroborou com a montagem de um kariograma de referência (Figura 3).

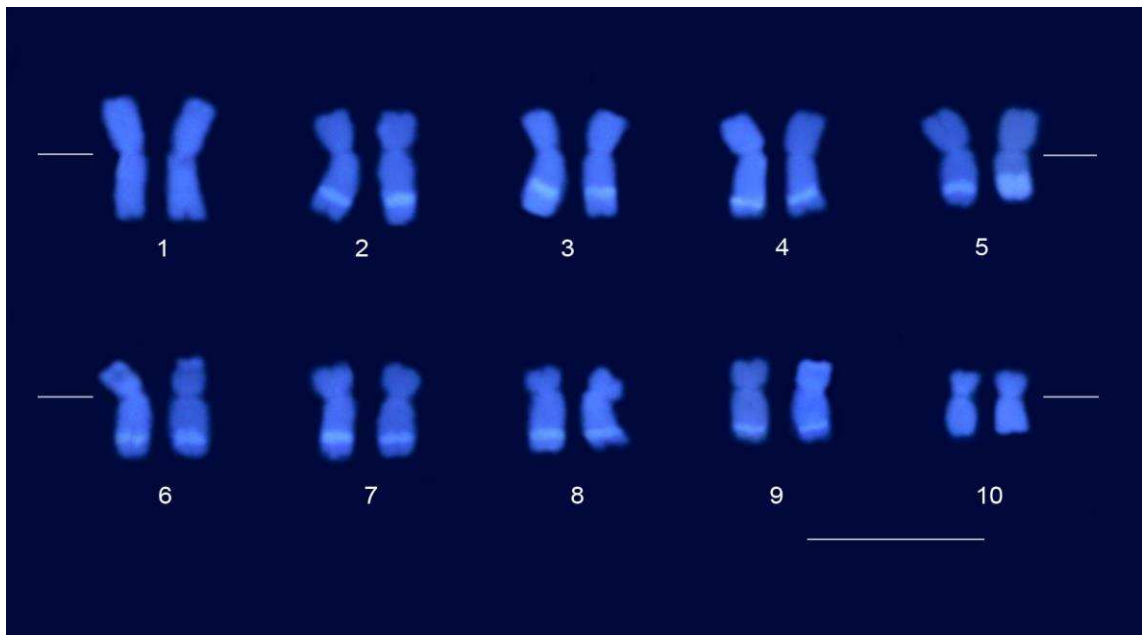


Figura 3 – Cariograma de *Z. mays* ‘AL Bandeirante’ evidenciando as regiões DAPI positivas referentes aos knobs localizados nos braços longos dos cromossomos 2 – 9, e a constrição secundária no braço curto do cromossomo 6. Knobs identificados conforme modelo de mapa citológico dos cromossomos de *Z. mays* (Neuffer et al. 1997). Barra = 10 µm.

5.4 Citometria de imagem

5.4.1 Hidrólise e reação de Feulgen

Cromossomos estequiometricamente corados foram obtidos nas lâminas hidrolisadas com solução 5 M de HCl por 18 min a 25 °C e coradas com reativo de Schiff durante 12 h a 4 °C (Figura 4). Os cromossomos apresentaram as porções teloméricas, centroméricas e de constrição secundária bem definidas, pré-requisitos para caracterização morfométrica e mensuramento dos valores de área, DO e DOI.

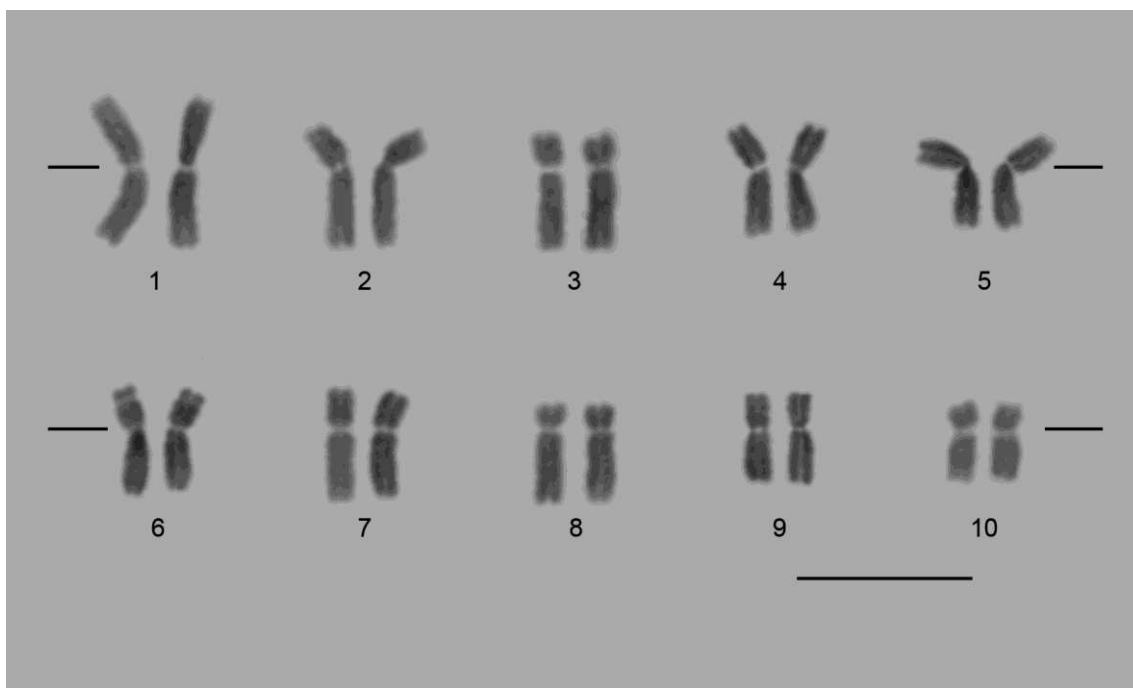


Figura 4. Cariograma representativo de *Z. mays* 'AL Bandeirante'. Prometáfase obtida de meristema radicular tratado com 1,75 mM de HU por 18 h e 3 μ M de APM por 4 h, e submetida à reação de Feulgen. Assim como para as demais preparações, os cromossomos estão estequiometricamente corados e possuem as porções teloméricas, centroméricas e de constrição secundária bem definidas, pré-requisitos para caracterização morfométrica e mensuramento dos valores de área, DO e DOI. Barra = 10 μ m.

5.4.2 Análise de imagem

Os resultados apresentados para o teste de estabilidade foram adequados, o mesmo compreendeu a avaliação do tempo de aquecimento eletrônico do sistema. Os valores médios da DO foram considerados estáveis após 12 min. O software do sistema de análise de imagem calculou um $R^2 = 0,999$ para o teste de linearidade e um CV abaixo de 3% para o teste de uniformidade.

As metáfases coradas com Feulgen foram capturadas para a montagem dos 51 cariogramas de *Z. mays*. Os cariogramas apresentaram $2n = 2x = 20$ cromossomos, sendo dois pares metacêntricos (1 e 5), oito pares submetacêntricos (2 – 4, 6 – 10) e um par (6) que apresenta a região organizadora nucleolar (NOR) na posição terminal do braço curto (Figura 5).

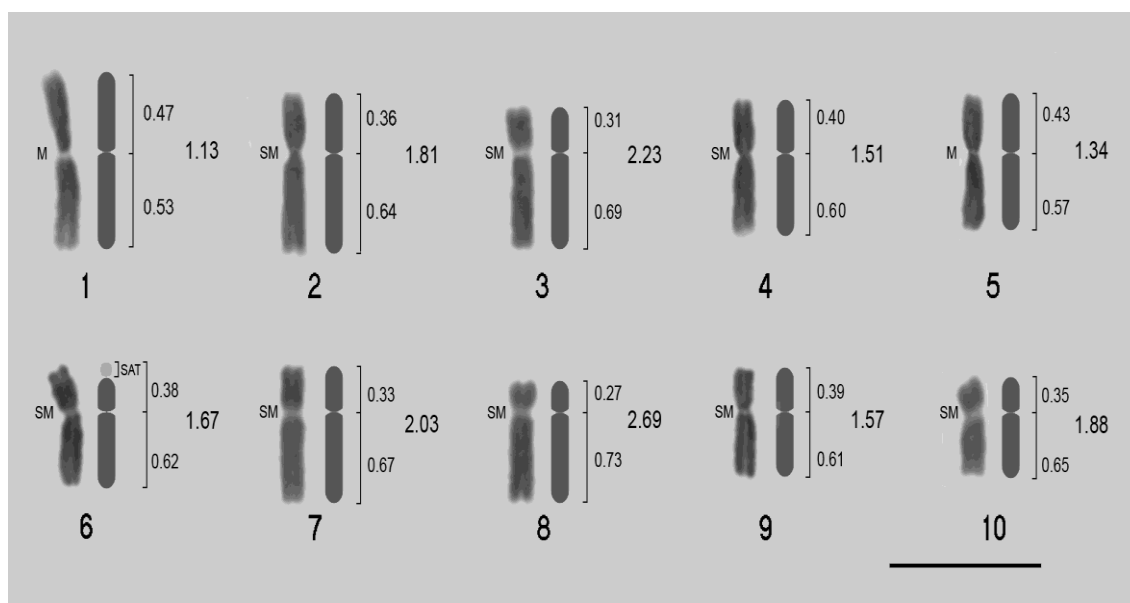


Figura 5 – Idiograma montado com base na morfometria dos cromossomos. Comprimento relativo do braço e razão de braços são mostrados, respectivamente, à direita da representação do cromossomo no idiograma. Barra = 10 μm .

Os valores médios referentes à área e DO calculados para cada cromossomo dos 51 cariogramas estão representados nas figuras 6 e 7, respectivamente. As médias das áreas dos cromossomos variaram entre 9,478 (cromossomo 1) a 4,652 μm^2 (cromossomo 10). O cromossomo 9 apresentou área média (6,672 μm^2) maior que o cromossomo 8 (6,342 μm^2).

As DO variaram de 1,127 (cromossomo 1) a 1,112 (cromossomo 5), sendo que os valores dos cromossomos 4 e 5 (1,112) foram menores em relação aos cromossomos 6 – 10 (1,133 – 1,117). O cromossomo 6 apresentou DO média (1,113) menor que o 7 (1,114), sendo que as DO dos cromossomos 6 e 7 foram menores que o cromossomo 8 – 10 (1,117).

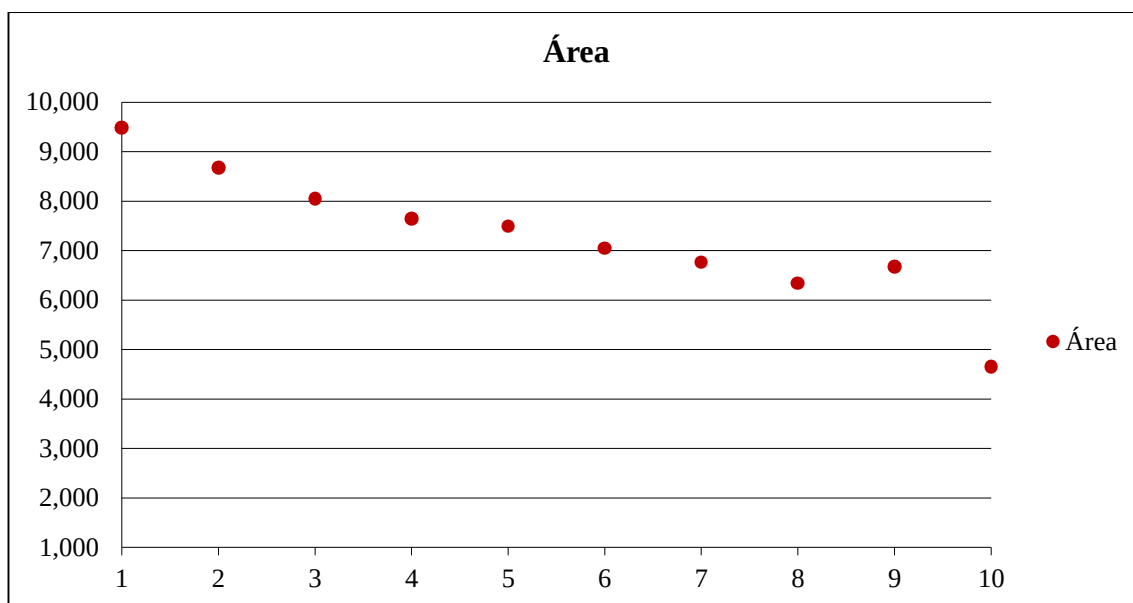


Figura 6 – Valores médios das áreas de cada cromossomo de *Z. mays* ‘AL Bandeirante’ gerados a partir de 102 cromossomos (51 kariogramas) pelo programa Image Pro-Plus® 6.1 Media Cybernetics®. As áreas médias dos cromossomos variaram de 9,478 (cromossomo 1) a 4,652 μm^2 (cromossomo 10). Observar a área do cromossomo 9 (6,672 μm^2) maior em relação ao cromossomo 8 (6,342 μm^2).

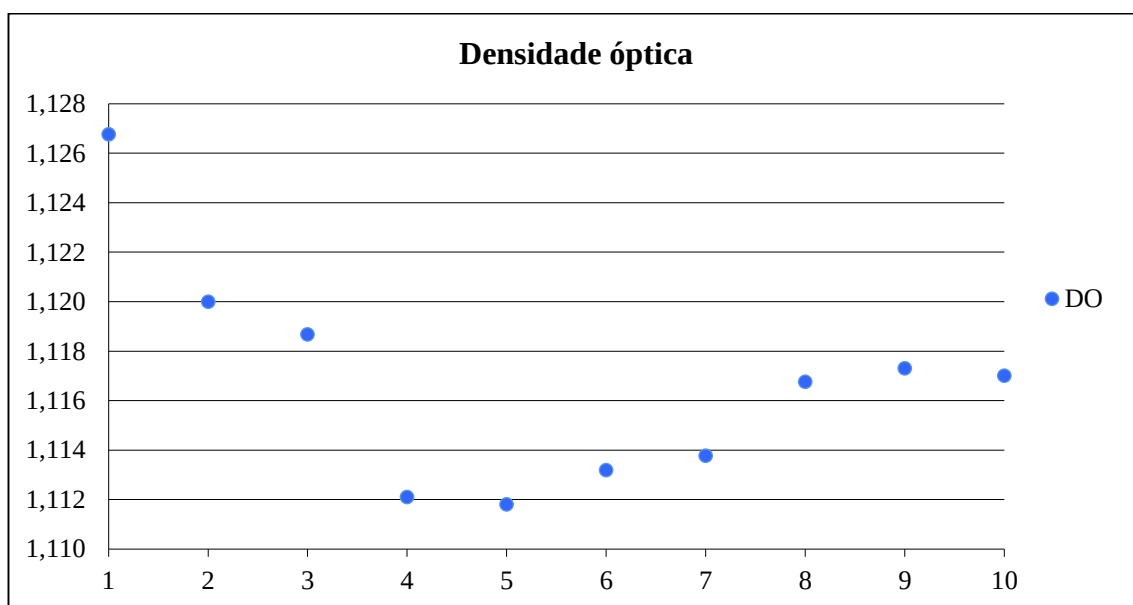


Figura 7 – Valores médios de DO dos cromossomos de *Z. mays* ‘AL Bandeirante’ gerados a partir de 102 cromossomos (51 kariogramas) pelo sistema de análise de imagem. As DO dos cromossomos variaram de 1,127 (cromossomo 1) a 1,112 (cromossomo 5). Observar as densidades dos cromossomos 4 e 5 (1,112) menores em relação aos cromossomos 6 – 10 (1,133 – 1,117); o cromossomo 6 (1,113) menor que o 7 (1,114); e as DO dos cromossomos 6 e 7 menores que os cromossomos 8 – 10 (1,117).

5.4.3 Mensuramento do conteúdo de DNA cromossômico total e dos braços

Os valores de DOI mensurados com base nos valores da área e de DO de cada cromossomo estão representados na Figura 8. O conteúdo de DNA mensurado para todos os cromossomos a partir do valor 2C médio de DNA nuclear, estabelecido pela CF, em relação aos valores médios da DOI, quantificado pela CI, estão mostrados na Figura 9. Os conteúdos de DNA referente aos braços cromossômicos estão detalhados na Tabela 3. Conforme observado para área e DO, o cromossomo 9 ($2C = 0,561$ pg) apresentou conteúdo médio de DNA maior que o cromossomo 8 ($2C = 0,533$ pg) (Figura 9, Tabela 3).

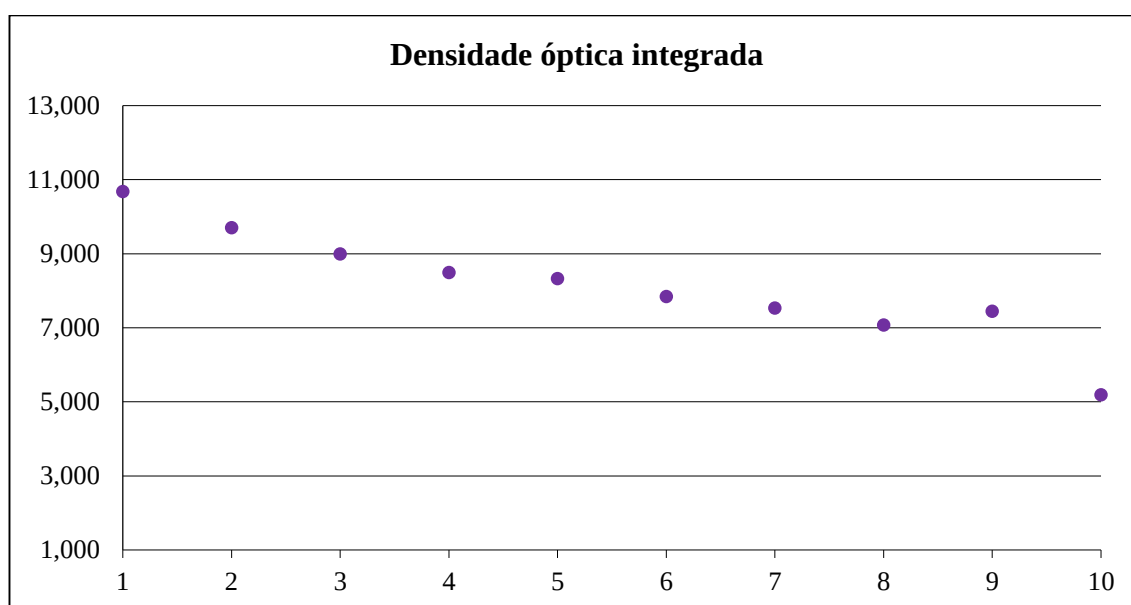


Figura 8 – Médias dos valores de DOI dos cromossomos de ‘AL Bandeirante’ mensurados a partir da relação da área pela DO. Os conteúdos de DOI variaram de 10,679 (cromossomo 1) a 5,196 (cromossomo 10). Observar a DOI do cromossomo 9 (7,454) superior ao do cromossomo 8 (7,083).

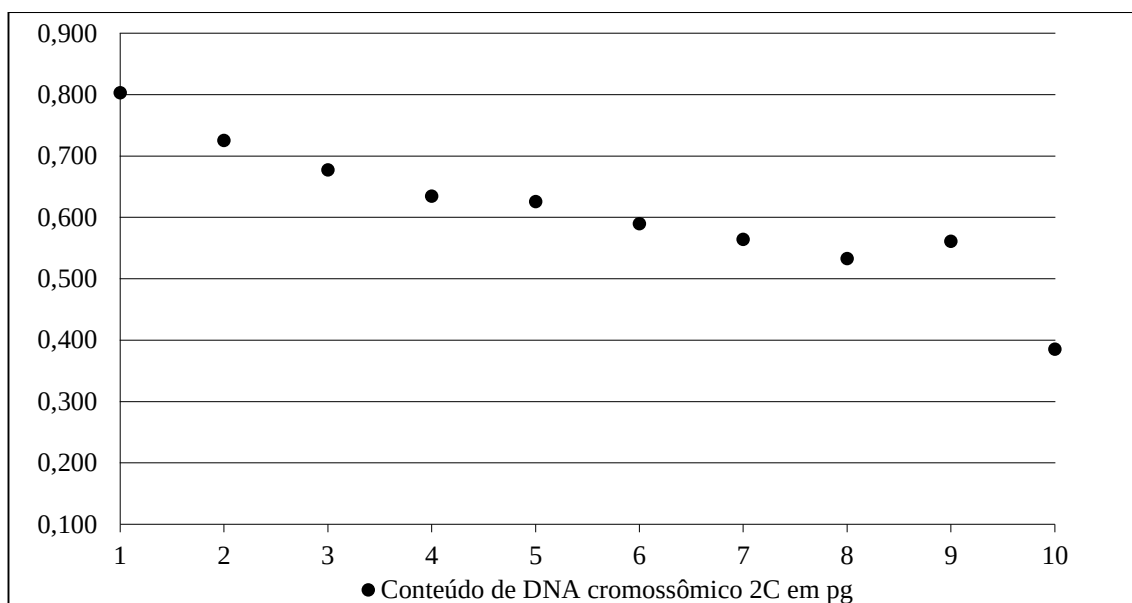


Figura 9 – Médias dos conteúdos de DNA cromossômicos de ‘AL Bandeirante’ mensurados distribuindo o valor 2C médio de DNA nuclear, estabelecido pela CF, em relação aos valores médios da DOI. Os conteúdos de DNA cromossômico variaram de 2C = 0,803 pg (cromossomo 1) a 2C = 0,385 pg (cromossomo 10). Observar o conteúdo de DNA do cromossomo 9 (2C = 0,561 pg) superior ao do cromossomo 8 (2C = 0,533 pg).

Tabela 3 – Valores 2C médios de conteúdo de DNA por braço cromossômico em pg ($\pm$ desvio padrão), e em 1C pb.

Cromossomo	Braço	Conteúdo de DNA 2C por braço cromossômico (pg)	Valor 1C (pb x 10^9) ^a
1	C	0,376 $\pm$ 0,027	0,184
	L	0,427 $\pm$ 0,017	0,209
2	C	0,269 $\pm$ 0,023	0,132
	L	0,456 $\pm$ 0,030	0,223
3	C	0,237 $\pm$ 0,024	0,116
	L	0,440 $\pm$ 0,040	0,215
4	C	0,239 $\pm$ 0,031	0,117
	L	0,395 $\pm$ 0,040	0,193
5	C	0,271 $\pm$ 0,019	0,133
	L	0,355 $\pm$ 0,020	0,174
6	SAT	0,053 $\pm$ 0,009	0,026
	C	0,171 $\pm$ 0,021	0,084

7	L	0,366 ± 0,035	0,179
	C	0,156 ± 0,023	0,076
	L	0,408 ± 0,026	0,200
8	C	0,131 ± 0,013	0,064
	L	0,402 ± 0,030	0,197
9	C	0,215 ± 0,025	0,105
	L	0,346 ± 0,028	0,169
10	C	0,131 ± 0,008	0,064
	L	0,255 ± 0,013	0,125
Total		6,10	2,983

SAT –satélite; C – braço curto; L – braço longo; ^a Valores convertidos para pb, considerando que 1 pg de DNA corresponde a $0,978 \times 10^9$ (Doležel et al. 2003).

A média dos valores para o conteúdo de DNA 2C dos braços cromossômicos variou entre $0,376 \text{ pg} \pm 0,027$ braço curto (cromossomo 1) a $0,131 \text{ pg} \pm 0,008$ braço curto (cromossomo 10), $0,427 \text{ pg} \pm 0,017$ braço longo a $0,255 \text{ pg} \pm 0,013$ braço longo dos mesmos cromossomos, respectivamente. O conteúdo de DNA da região satélite do cromossomo 6 foi também medido e apresentou $2C = 0,053 \text{ pg} \pm 0,009$. Os desvios padrões das análises de quantidade de DNA dos braços cromossômicos variaram de 0,008 – 0,040, sendo que os maiores valores estão associados aos braços longos dos cromossomos 2 – 9 que apresentam knobs (Figura 3, Tabela 3).

A comparação dos valores de DNA por cromossomo obtidos por CI (presente estudo), CI (Rosado et al. 2009) e sequenciamento genômico (Gramene, 2016) está mostrada na Figura 10. Na cariotipagem de fluxo o cromossomo 1 apresentou conteúdo de DNA ($1C = 0,365 \times 10^9 \text{ pb}$) (Lee et al. 2002) 7,1% menor do que o valor atribuído ao cromossomo 1 no presente estudo ($1C = 0,393 \times 10^9$) (citometria de imagem^b). Os valores mensurados para ‘Black Mexican Sweet Corn’ (citometria de imagem^a, Rosado et al. 2009) foram inferiores quando relacionados ao acesso do presente estudo, exceto o cromossomo 10 que foi superior em $1C = 0,046 \times 10^9 \text{ pb}$. Os conteúdos de DNA cromossômicos para ‘AL Bandeirante’ comparados aos valores do sequenciamento (Gramene, 2016), apresentaram de 20% a 43% a mais de DNA, considerando, por exemplo, os cromossomos 10 e 9, respectivamente (Figura 10).

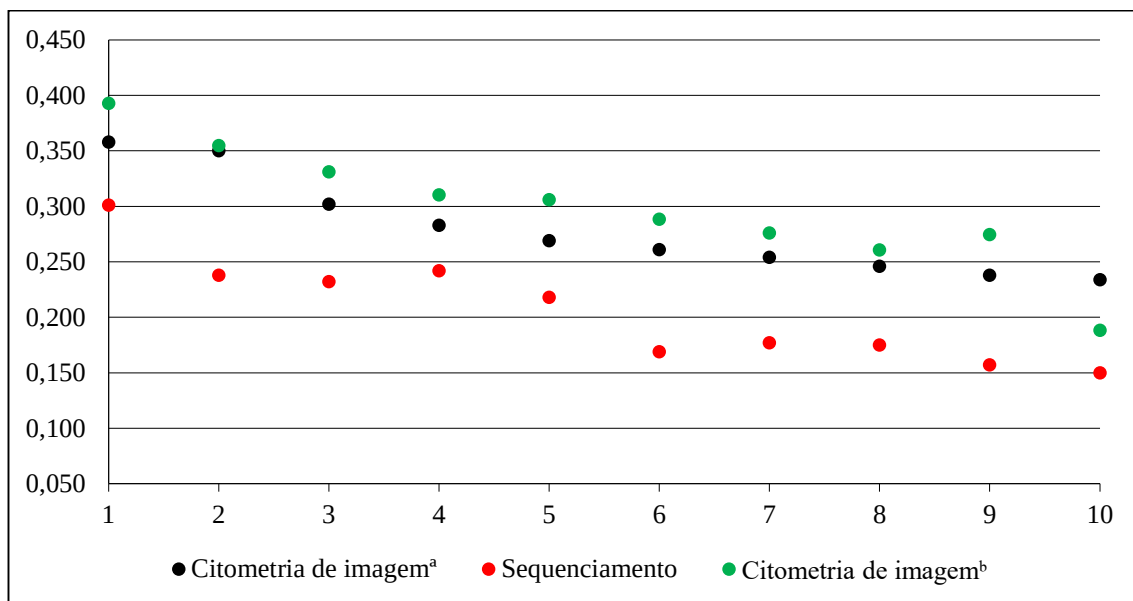


Figura 10 – Comparação do conteúdo de DNA cromossômico 1C em pb do presente estudo (citometria de imagem^b) (*Z. mays* ‘AL Bandeirante’) com os dados do sequenciamento (*Z. mays* ‘B73’, Gramene, 2016), citometria de imagem^a (*Z. mays* ‘Black Mexican Sweet Corn’, Rosado et al. 2009). Observar que todos os valores mensurados para ‘Black Mexican Sweet Corn’ foram inferiores quando relacionados ao acesso do presente estudo, exceto o cromossomo 10 ($1C = 0,234 \times 10^9$ pb). Os valores do sequenciamento oscilaram de $1C = 0,301 \times 10^9$ pb (cromossomo 1) a $1C = 0,150 \times 10^9$ pb (cromossomo 10). Já os valores de DNA cromossômico para ‘AL Bandeirante’ variaram de $1C = 0,393 \times 10^9$ pb (cromossomo 1) a $1C = 0,188 \times 10^9$ pb (cromossomo 10). Valores convertidos para pb, considerando que 1 pg de DNA corresponde a $0,978 \times 10^9$ (Doležel et al. 2003).

6 DISCUSSÃO

6.1 Alterações no genoma de *Z. mays*

As análises de CF mostraram variação nos genomas entre os acessos de *Z. mays*. Essa variação foi evidenciada pela comparação do conteúdo de DNA nuclear dos dois cultivares, o ‘CE-777’ e o ‘AL Bandeirante’. O valor médio em pg de DNA nuclear da amostra apresentou 9% ($2C = 0,53$ pg) a mais quando comparado ao valor do acesso ‘CE-777’ (Figura 1). Outros valores para o tamanho do genoma nuclear de *Z. mays* também têm sido relatados, tais como $2C = 5,25$ pg para ‘A619’ (Lee et al. 2002), $5,72$ pg para ‘Black Mexican Sweet Corn’ (Rosado et al. 2009) e $5,64$ pg para ‘B73’ (Díez et al. 2013). Diferentes fatores podem ter promovido essa diferença de DNA entre os acessos de *Z. mays*, como: os efeitos das metodologias empregadas nas quantificações (Doležel et al. 2005), a presença de cromossomos B (Rosado et al. 2009), número de cópias e sequência de DNA repetitivo, knobs e ativação de elementos transponíveis (Díez et al. 2013). Apesar dos cromossomos Bs serem considerados como uma das possibilidades, no presente estudo essa variação no tamanho do genoma entre os acessos não foi atribuída a essa classe de cromossomos, uma vez que estes não foram identificados em nenhum dos 51 kariogramas (Figura 4).

A fim de superar as dificuldades técnicas que podem criar pseudovariedades, utilizamos para as análises de CF folhas germinadas nas mesmas condições. A elevada qualidade das suspensões nucleares foi certificada pelos valores de CVs abaixo de 4,1%, resultando em resolução suficiente para discriminar os núcleos G_0/G_1 da amostra e do padrão, mesmo estes sendo da mesma espécie.

Comparando os valores de DNA por cromossomo do acesso ‘AL Bandeirante’ em relação ao ‘Black Mexican Sweet Corn’, as maiores diferenças são referentes aos cromossomos que possuem knobs (Figura 3 e 10). No cromossomo 1 não foi detectado nenhum sinal de knobs, mesmo este apresentando uma das maiores diferenças com relação ao DNA cromossômico. No entanto, sua DO é a maior sugerindo uma grande quantidade de heterocromatina dispersas no cromossomo (Figura 7).

A variação no conteúdo nuclear em plantas tem sido atribuída principalmente aos elementos transponíveis (Wang et al. 2016; Wendel et al. 2016). Amplificações em linhagens específicas e deleções de elementos transponíveis são comuns mesmo dentro

de uma mesma espécie, como reportado para diferentes subespécies de *Oryza sativa* (Ma e Bennetzen, 2004). Em *Z. mays*, diferenças no tamanho do genoma estão associadas principalmente aos retrotransposons, que compõem mais de 75% do seu genoma, que essencialmente atuam como parasitas moleculares, replicando e aumentando seus números (Schnable et al. 2009; Tenaillon et al. 2010).

Nessa espécie, retrotransposons são especialmente abundantes nas regiões de knobs heterocromáticos. Tais knobs foram associados com o aumento do tamanho do genoma em *Z. mays* (Chia et al. 2012), sendo observados em 34 regiões distintas nos cromossomos, variando no tamanho e quantidade de uma linhagem para outra (González et al. 2013). A eventual presença de knobs pode explicar a grande quantidade de DNA observado no cromossomo 10 de ‘Black Mexican Sweet Corn’, se comparado com a quantificação feita pelo presente trabalho.

A origem do polimorfismo de knob em *Z. mays*, incluindo número e tamanho, tem sido discutido. Ananiev et al. (1998) propõe que essas regiões se comportam como um megatransposon. A estrutura complexa dos knobs pode surgir a partir da presença de diferentes tipos de elementos retrotransponíveis que podem transpor os knobs de uma região para outra. Outro fator, como a divisão meiótica, pode influenciar nos polimorfismos destas regiões por meio da recombinação (Buckler et al. 1999).

Considerando que o aumento no conteúdo de DNA pode ter ocorrido como consequência da presença de regiões de knobs, podemos inferir que os retrotransposons estão se multiplicando no genoma de *Z. mays* e inserindo-se em regiões muito próximas. Diante deste cenário, as diferentes quantidades de heterocromatina distribuídas pelo genoma de *Z. mays*, a partir da atividade de elementos transponíveis e retrotransponíveis, podem explicar a alteração na quantidade de DNA detectada neste estudo.

6.2 O cariótipo de *Z. mays*

O uso do HU, com posterior tratamento com APM, propiciou o acúmulo de prometáfases e metáfases apropriadas para caracterização morfológica dos cromossomos. Segundo Praça-Fontes et al. (2014), estes compostos propiciam a acumulação de metáfases também em *Pisum sativum* permitindo as análises de citogenética e CI.

Como um pré-requisito para a montagem dos kariogramas e realização da citometria de imagem, as condições ideais para obtenção de cromossomos de *Z. mays*

‘AL Bandeirante’ foram padronizadas. Este procedimento propiciou prometáfases e metáfases em quantidade suficiente para esse tipo de análise, com cromossomos morfológicamente preservados, bem definidos nos centrômeros e nas extremidades e sem vestígios citoplasmáticos. A técnica de dissociação celular meristemática e secagem ao ar foram fundamentais para a preparação da lâmina.

As etapas de fixação e hidrólise contribuíram para manutenção da integridade do cromossomo e, assim, para a coloração estequiométrica pelo reativo de Schiff (Figura 4). Tais aspectos permitiram a segmentação dos cromossomos, dos seus braços e satélite, garantindo a quantificação precisa dos valores de áreas e DO e, consequentemente, da DOI. Hardie et al. (2002) relataram que a depuração que ocorre durante a hidrólise provoca a formação de radicais aldeídos nas desoxirriboses, e estes radicais são essenciais por se associarem aos cromóforos presentes no reativo de Schiff. De acordo com Greilhuber e Temsch (2001), o tempo, concentração e a temperatura devem ser determinados para cada material a ser analisado, a fim de evitar interferência na coloração do DNA.

No presente estudo, os cromossomos foram classificados com base nos dados morfométricos e posição dos knobs (Figura 3 e 5). Associada com a caracterização morfométrica, a coloração com DAPI corroborou a identificação dos pares de homólogos e, assim, a montagem acurada dos kariogramas. O padrão de bandas nos cromossomos, evidenciado pela coloração diferencial com DAPI, foi gerado pela desnaturação térmica e química, e pela ligação específica do DAPI às porções ricas em bases AT.

Embora a caracterização dos kariótipos seja convencionalmente realizada a partir de dados morfométricos, Abreu et al. (2011) consideraram que barreiras para caracterização do kariótipo estão relacionadas à ocorrência de cromossomos relativamente pequenos e morfológicamente similares em plantas e estas características também têm dificultado a identificação dos pares de homólogos. Conforme mostrado por Carvalho e Carvalho (2016), cromossomos mais distendidos apresentam um maior conteúdo informacional e possibilitam a visualização de pequenas diferenças encobertas pela condição supercondensada em metáfase. Kato et al. (2004) consideraram uma alta similaridade dos cromossomos 2 – 4 e 7 – 9 de *Z. mays* de forma que o pareamento dos homólogos só pode ser feito a partir de marcas moleculares. Além da montagem dos kariogramas com base nos dados morfométricos, informações relativas a área e a DO

discriminaram esses pares de cromossomos (2, 4 e 7, 9) a partir de informações de CI (Figura 6 e 7).

Os kariogramas foram montados após acurada identificação e classificação de todos os pares de cromossomos com base na posição do centrômero (Figura 5) e informações de CI (Figura 6 e 7). Diferentes trabalhos têm reportado controvérsias acerca da morfologia dos cromossomos de *Z. mays*, como: três pares metacêntricos (1, 2 e 5), seis submetacêntricos (3, 4, 6, 7, 9 e 10) e um acrocêntrico (8) em ‘KYS’ (Sadder e Weber, 2001), e ‘Black Mexican Sweet Corn’ (Rosado et al. 2009); cinco pares metacêntricos (1, 2, 4, 5, e 9) quatro submetacêntricos (3, 6, 7 e 10) e um acrocêntrico (8) em ‘Jac Duro’ (Mondin et al. 2014). Essas discrepâncias podem estar associadas ao polimorfismo dos knobs já que Kato et al. (2004) reportaram que essas porções afetam 5 – 20% o comprimento do braço. Mondin et al. (2014) destacaram ainda que inversões pericêntricas, deleções, duplicações ou as diferentes quantidades de DNA repetitivo distribuídas pelos cromossomos podem influenciar no comprimento dos braços e em detrimento, comprometer a classificação.

Considerando os dados desse trabalho (Figura 5) e os reportados na literatura, os cromossomos de *Z. mays* tem apresentado problemas com relação a classificação morfométrica dos pares 2, 4 e 8, 9. Dessa forma faz-se necessário o uso da CI para que a montagem de um kariograma definitivo de *Z. mays*. No presente estudo, o cromossomo classificado como 9 apresentou uma área maior e mais DNA que o cromossomo 8 (Figura 6 e 9), essa diferença pode estar relacionada às regiões heterocromáticas, considerando que cromossomos que possuem uma maior proporção de heterocromatina atingem níveis de compactação mais rápido e maiores do que outros, e isso reflete no comprimento. No entanto, regiões heterocromáticas apresentam mais DNA em relação às regiões eucromáticas (Peterson et al. 1995).

6.3 Mensuramento do conteúdo de DNA cromossômico total e dos braços

A calibração e avaliação do sistema de análise de imagem realizados foram consideradas apropriadas para a obtenção das medidas de área, DO e DOI. Essas etapas são essenciais para se obter parâmetros que demonstrem confiabilidade das medidas da área, DO e DOI (Carvalho et al. 2011). A CI possibilitou a identificação e quantificação de DNA de todos os cromossomos de *Z. mays* (Figura 10), enquanto pela cariotipagem

fluxo realizada por Lee et al. (2002) apenas o cromossomo de número 1 das oito linhagens analisadas por ele de *Z. mays* pode ser reconhecido. A incapacidade de discriminar cromossomos com quantidade de DNA semelhante é uma das limitações da cariotipagem de fluxo (Doležel et al. 2014).

A CI é uma importante ferramenta para quantificação de DNA e se mostrou eficiente, os 10 cromossomos de *Z. mays* tiveram sua quantidade de DNA mensurada e comparada aos outros métodos (Figura 9 e 10). Além do conteúdo de DNA cromossômico foram quantificados o DNA dos braços e a região do satélite (Tabela 3), gerando mais informações sobre a distribuição do genoma no cariótipo de *Z. mays*. Segundo Wendel et al. (2016), a maioria dos genomas já sequenciados, incluindo *Z. mays*, serão atualizados, ou mesmo substituídos, em virtude das novas tecnologias que estão sendo desenvolvidas. Diante deste contexto, os resultados obtidos neste estudo proverão para as pesquisas moleculares valores de referência com maior resolução (ao nível do braço cromossômico) a serem comparados com o DNA sequenciado.

A quantidade de DNA cromossômica mensurada pela CI demonstrou valores superiores em todos os cromossomos quando comparados aos do sequenciamento. Este resultado pode estar refletindo a quantidade de DNA a mais encontrado para ‘AL Bandeirante’ (Figura 1), ou a subestimação do número de pb que ocorre durante o sequenciamento, já que dificilmente todas as sequências de um genoma estarão representadas (Bennett, 2003). Além disso, o genoma de *Z. mays* apresenta um elevado conteúdo de DNA repetitivo que muitas vezes são excluídas das montagens (Wendel et al. 2016), e o próprio tamanho do genoma, cerca de 2.500 Mpb, dificultam seu sequenciamento (Sanmiguel et al. 1996; Ouyang e Buell, 2004). Esta exclusão é uma consideração importante, não apenas por uma questão de sequenciar todo o genoma, mas também porque muitas destas repetições são alvos primários de vias de remodelação da cromatina que frequentemente afetam a expressão ou a estrutura dos genes (Bennetzen e Wang, 2014). Diante deste contexto a CI pode ser considerada uma metodologia adequada para se estimar o conteúdo de DNA por cromossomo e braço.

7 CONCLUSÃO

Os resultados citogenéticos juntamente com os da quantificação de DNA obtidos neste estudo mostraram que as diferenças no genoma de diferentes acessos de *Z. mays* podem ocorrer em certas características da heterocromatina, tais como a sua quantidade e organização espacial nos cromossomos metafásicos, possivelmente influenciando na razão de braço. Os valores de conteúdo de DNA mensurados pela CI mostraram-se superiores em todos os cromossomos quando comparados aos do sequenciamento, sugerindo que os dados do sequenciamento podem estar subestimados. Além disso, deve-se considerar que os acessos do sequenciamento e da CI são diferentes podendo também explicar o resultado obtido.

No presente estudo, o cromossomo classificado como 9 apresentou uma maior quantidade de DNA que o cromossomo 8, devido a sua maior área. Além disso, a CI proveu mais informações ao kariograma de *Z. mays* como a revisão da quantidade de DNA dos cromossomos e determinou, pela primeira vez, o conteúdo de DNA dos braços cromossômicos.

Dessa forma, a CI se apresenta como uma importante ferramenta no incremento de informações citogenéticas em espécies vegetais. Sendo possível a determinação do valor de DNA cromossômico, em picogramas, e na identificação de eventuais variações nesse valor. A determinação do conteúdo de DNA também pode ser aplicada em estudos de relações filogenéticas e na análise de possíveis variações no tamanho do genoma inter e intra espécies. Além disso, o conteúdo de DNA cromossômico e dos braços cromossômicos, determinado nesse estudo, agregam conteúdo informacional ao kariótipo de milho e contribuem com novos projetos de sequenciamento do genoma, dessa espécie.

Para finalizar deve-se apresentar que o estudo não buscou determinar de forma completa os resultados, bem como esgotar a temática discutida. De maneira contrária, buscou incentivar mais estudos sobre dos temas discutidos.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, I. S.; CARVALHO, C. R.; CLARINDO, W. R. Chromosomal DNA content of sweet pepper determined by association of cytogenetic and cytometric tools. *Plant cell reports*, v. 27, n. 7, p. 1227-1233, 2008.

ABREU, I. S.; CARVALHO, C.R.; CARVALHO, G. M. A.; MOTOIKE, S. Y. First karyotype, DNA C-value and AT/GC base composition of macaw palm (*Acrocomia aculeata*, Arecaceae) –a promising plant for biodiesel production. *Australian Journal of Botany*, v. 59, n. 2, p. 149-155, 2011.

ANANIEV, E. V.; PHILLIPS, R. L.; RINES, H. W. A knob-associated tandem repeat in maize capable of forming fold-back DNA segments: Are chromosome knobs megatransposons? *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 95, n. 18, p. 10785-10790, 1998.

ANDERSON, L. K.; LAI, A.; STACK, S. M.; RIZZON, C.; GAUT, B.S. Uneven distribution of expressed sequence tag loci on maize pachytene chromosomes. *Genome research*, v. 16, n. 1, p. 115-122, 2006.

BAI, C.; ALVERSON, W. S.; FOLLANSBEE, A.; WALLER, D. M. New reports of nuclear DNA content for 407 vascular plant taxa from the United States. *Annals of Botany*, v.110, n.8, p.1623-9, 2012.

BENNETT, M. D.; LEITCH, I. J. Nuclear DNA amounts in angiosperms: progress, problems and prospects. *Annals of Botany*, v. 95, n. 1, p. 45-90, 2005.

BENNETZEN, J. L.; WANG, H. The contributions of transposable elements to the structure, function, and evolution of plant genomes. *Annual review of plant biology*, v. 65, p. 505-530, 2014.

BUCKLER, E. S. PHELPS-DURR, T. L.; BUCKLER, C. S. A; DAWE, R. K; DOEBLEY, J. F.; HOLTSFORD, T. P. Meiotic drive of chromosomal knobs reshaped the maize genome. *Genetics*, v. 153, n. 1, p. 415-426, 1999.

CAIXETA, E. T.; CARVALHO, C. R. An Improved Cytogenetic Method for Maize Pachytene Chromosomes. *Cytologia*, v. 66, n. 2, p. 173-176, 2001.

CARLSON, W. R.; SPRAGUE, G. F.; DUDLEY, J. W. The cytogenetics of corn. *Corn and corn improvement*. Third edition, p. 259-343, 1988.

CARNEIRO, M. S.; VIEIRA, M. L. C. Mapas genéticos em plantas, *Bragantia*, Campinas, v. 61, n. 2, p. 89-100, 2002.

CARVALHO, C. R.; CLARINDO, W. R.; ABREU, I. S. Image cytometry: nuclear and chromosomal DNA quantification. In: *Light Microscopy*. Humana Press, p. 51 68, 2011.

CARVALHO, C. R.; SARAIVA, L. S. An air drying technique for maize chromosomes without enzymatic maceration. *Biotechnic & histochemistry*, v. 68, n. 3, p. 142-145, 1993.

CARVALHO, G. M. A.; CARVALHO, C. R. The eucalypt karyogram resolved. *Botany*, v. 94, n. 5, p. 411-416, 2016.

CHEN, C. C. The somatic chromosomes of maize. *Canadian Journal of Genetics and Cytology*, v. 11, n. 3, p. 752-754, 1969.

CHIA, J. M. et al. Maize HapMap2 identifies extant variation from a genome in flux. *Nature genetics*, v. 44, n. 7, p. 803-807, 2012.

CHIECO, P.; DERENZINI, M. The Feulgen reaction 75 years on. *Histochemistry and cell biology*, v. 111, n. 5, p. 345-358, 1999.

CLARINDO, W. R.; CARVALHO, C. R. Comparison of the *Coffea canephora* and *C. arabica* karyotype based on chromosomal DNA content. *Plant cell reports*, v. 28, n. 1, p. 73-81, 2009.

DÍEZ, C. M.; GAUT, B. S.; MECA, E.; SCHEINVAR, E.; MONTES-HERNANDEZ, S.; EGUIARTE, L. E.; TENAILLON, M. I.; Genome size variation in wild and cultivated maize along altitudinal gradients. *New Phytologist*, v. 199, n. 1, p. 264-276, 2013.

DOLEŽEL, J.; BARTOŠ, J. A. N. Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. *Annals of Botany*, v. 95, n. 1, p. 99-110, 2005.

DOLEŽEL, J.; BARTOŠ, J.; VOGLMAYR, H.; GREILHUBER, J. Nuclear DNA content and genome size of trout and human. *Cytometry. Part A: the journal of the International Society for Analytical Cytology*, v. 51, n. 2, p. 127, 2003.

DOLEŽEL, J.; GREILHUBER, J.; LUCRETTI, S.; MEISTER, A.; LYSÁK, M. A.; NARDI, L.; OBERMAYER, R. Plant genome size estimation by flow cytometry: inter-laboratory comparison. *Annals of Botany*, v. 82, n.1, p. 17-26, 1998.

DOLEŽEL, J.; KUBALÁKOVÁ, M.; BARTOŠ, J.; MACAS, J. Flow cytogenetics and plant genome mapping. *Chromosome Research*, v. 12, n. 1, p. 77-91, 2004.

DOLEŽEL, J.; VRÁNA, J.; CÁPAL P.; KUBALÁKOVÁ, M.; BUREŠOVÁ, V.; SIMKOVÁ, H. Advances in plant chromosome genomics. *Biotechnology advances*, v. 32, n. 1, p. 122-136, 2014.

GALBRAITH, D. W.; HARKINS, K. R.; MADDOX, J. M.; AYRES, N. M.; SHARMA, D. P.; FIROOZABADY, E. Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissues. *Science*, v. 220, n. 4601, p. 1049-1051, 1983.

GALBRAITH, D.W.; LAMBERT, G.M. High-throughput monitoring of plant nuclear DNA contents via flow cytometry. *Methods in Molecular Biology*, v.918, p.311-25, 2012.

GARCIA, S.; LEITCH, I. J.; ANADON-ROSELL, A.; CANELA, M. A; GÁLVEZ, F.; GARNATJE, T.; GRAS, A.; HIDALGO, O.; JOHNSTON, E.; XAXARS, G. M.; PELLICER, J.; SILJAK-YAKOVLEV, S.; VALLÈS, J.; VITALES, D.; BENNETT, M. D. Recent updates and developments to plant genome size databases. **Nucleic acids research**, v. 42, n. D1, p. D1159-D1166, 2014.

GIORGI, D.; FARINA, A.; GROSSO, V.; GENNARO, A.; CEOLONI, C.; LUCRETTI, S. FISHIS: fluorescence in situ hybridization in suspension and chromosome flow sorting made easy. *PLoS One*, v. 8, n. 2, p. e57994, 2013.

GONZÁLEZ, G.; E.; FOURASTIÉ, M. F.; POGGIO, L. Relevancia del número y composición de secuencias de los nudos cromosómicos en la caracterización de maíz y teocintle. *Revista fitotecnia mexicana*, v. 36, n. 2, p. 127-135, 2013.

GOULD, A. R. Staining and Nuclear Cytology of Cultured Cells. Indra Vasil (Ed.). En *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*. Academic Press, Inc. Vol 1, 699 - 711. 1984.

GRAMENE. Disponível em:

<http://ensembl.gramene.org/Zea_mays/Location/Genome>. Acesso em: 20 de maio 2016.

GRATTAPAGLIA, D.; VAILLANCOURT, R.; SHEPHERD, M.; THUMMA, B.; FOLEY, W.; KÜLHEIM, C.; POTTS, B.; MYBURG, A. Progress in Myrtaceae genetics and genomics: Eucalyptus as the pivotal genus. *Tree Genetics & Genomes*, v.8, p.463-508, 2012.

GREILHUBER, J. Cytochemistry and C-values: the less-well-known world of nuclear DNA amounts. *Annals of Botany*, v. 101, n. 6, p. 791-804, 2008.

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

GUERRA, M. D. Reviewing the chromosome nomenclature of Levan et-al. *Revista Brasileira de Genética*, v. 9, n. 4, p. 741-743, 1986.

GUERRA, M.S. *Introdução à citogenética geral*. Rio de Janeiro: Guanabara, p.140, 1988.

GUERRA, M.S. O uso de Giemsa na citogenética vegetal: comparação entre a coloração simples e o bandeamento. *Ciência e Cultura*, v. 37, n. 2, p 190-193. 1983.

HARDIE, D. C.; GREGORY, T. R.; HEBERT, P. D. N. From Pixels to Picograms a Beginners' Guide to Genome Quantification by Feulgen Image Analysis Densitometry. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, v. 50, n. 6, p. 735-749, 2002.

KATO, A.; LAMB, J. C.; BIRCHLER, J. A. Chromosome painting using repetitive DNA sequences as probes for somatic chromosome identification in maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 101, n. 37, p. 13554-13559, 2004.

KLUG, W. S.; CUMMINGS, M. R.; SPENCER, C. A.; PALLADINO, M. A. *Conceitos de genética*, 2009.

LEE, J. H.; ARUMUGANATHAN, K.; KAEPPLER, S. M.; PARK, S. W.; KIM, K. Y.; CHUNG, Y. S.; KIM, D. H.; FUKUI, K. Variability of chromosomal DNA contents in maize (*Zea mays* L.) inbred and hybrid lines. *Planta*, v. 215, n. 4, p. 666-671, 2002.

LEVAN, A.; FREDGA, K.; SANDBERG, A. A. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas*, v. 52, n. 2, p. 201-220, 1964.

LI, L.; ARUMUGANATHAN, K.; GILL, K. S.; SONG, Y. Flow sorting and microcloning of maize chromosome 1. *Hereditas*, v. 141, n. 1, p. 55-60, 2004.

LONGLEY, A. E. Knob positions on corn chromosomes. *Journal Agricultural Research* v. 59, p.475–490, 1939.

MA, J.; BENNETZEN, J. L. Rapid recent growth and divergence of rice nuclear genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 101, n. 34, p. 12404-12410, 2004.

MARTINS, A. M. Sequenciamento de DNA, montagem de novo do genoma e desenvolvimento de marcadores microsatélites, indels e SNPs para uso em análise genética de *Brachiaria ruziziensis*, 2014. Tese (Doutorado em Biologia Molecular) Universidade de Brasília, Brasília, 2014.

MATSUMOTO, S.T.; MARIN-MORALES, M.A.; RUAS, C.D.; RUAS, P.M. Cytogenetic Analysis of seven species of *Eucalyptus* L'Her. (Myrtaceae). *Caryologia*, v.53, p.205-212, 2000.

McCLINTOCK, B. A cytological demonstration of the location of an interchange between two non-homologous chromosomes of *Zea mays*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 16, n. 12, p. 791-796, 1930.

McCLINTOCK, B. Chromosome morphology in *Zea mays*. *Science*, v. 69, n. 1798, p. 629-629, 1929.

MOLNÁR, I.; KUBALÁKOVÁ, M.; ŠIMKOVÁ, H.; CSEH, A.; MOLNÁR-LÁNG, M.; DOLEŽEL, J. Chromosome isolation by flow sorting in *Aegilops umbellulata* and *Ae. comosa* and their allotetraploid hybrids *Ae. biuncialis* and *Ae. geniculata*. *PLoS One*, v. 6, n. 11, p. e27708, 2011.

MONDIN, M.; SANTOS-SEREJO, J. A.; BERTÃO, M. R.; LABORDA, P.; PIZZAIA, D.; AGUIAR-PERECIN, M. R. L. Karyotype variability in tropical maize sister inbred lines and hybrids compared with KYS standard line. *Frontiers in plant science*, v. 5, 2014.

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

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/genomes-maps/>>. Acesso em: 20 de maio 2016.

NEUFFER, M. G. COE, E. H.; WESSLER, S. R. Mutants of maize. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1997, 468 p.

NEUMANN, P.; POZÁRKOVÁ, D.; VRÁNA, J., DOLEŽEL, J.; MACAS, J. Chromosome sorting and PCR-based physical mapping in pea (*Pisum sativum* L.). *Chromosome Research*, v. 10, n. 1, p. 63-71, 2002.

OTTO, F. J. DAPI staining of fixed cells for high-resolution flow cytometry of nuclear DNA. *Methods in cell biology*, v. 33, p. 105-110, 1990.

OUYANG, S.; BUELL, C. R. The TIGR Plant Repeat Databases: a collective resource for the identification of repetitive sequences in plants. *Nucleic acids research*, v. 32, n. suppl 1, p. D360-D363, 2004.

PETERSON, D. G.; PRICE, H. J.; JOHNSTON, J. S.; STACK, S. M. DNA content of heterochromatin and euchromatin in tomato (*Lycopersicon esculentum*) pachytene chromosomes. *Genome*, v. 39, n. 1, p. 77-82, 1996.

PRAÇA, M. M. Reavaliação dos valores de conteúdo de DNA dos padrões de referência internacionalmente utilizados em quantificações genômicas de plantas. 2009. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2009.

PRAÇA-FONTES, M. M. et al. Revisiting the DNA C-values of the genome size-standards used in plant flow cytometry to choose the “best primary standards”. *Plant cell reports*, v. 30, n. 7, p. 1183-1191, 2011.

PRAÇA-FONTES, M. M.; CARVALHO, C. R.; CLARINDO, W. R. Karyotype revised of *Pisum sativum* using chromosomal DNA amount. *Plant systematics and evolution*, v. 300, n. 7, p. 1621-1626, 2014.

PRICE. H. J.; 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, v.7, p. 32-115, 1996.

RAYBURN, A. L.; GOLD, J. R. A procedure for obtaining mitotic chromosomes from maize. *Maydica*, v. 27, p. 113-121, 1982.

RHOADES, M. M. Meiosis in maize. *Journal of Heredity*, v. 41, p. 59-67, 1950.

RHOADES, M. M. The cytogenetics of maize. *Corn and corn improvement*, p. 123-219, 1955.

ROSADO, T. B.; CLARINDO, W. R.; CARVALHO, C. R. An integrated cytogenetic, flow and image cytometry procedure used to measure the DNA content of *Zea mays* A and B chromosomes. *Plant science*, v. 176, n. 1, p. 154-158, 2009.

SADDER, M. T.; WEBER, G. Karyotype of maize (*Zea mays* L.) mitotic metaphase chromosomes as revealed by fluorescencein situ hybridization (FISH) with cytogenetic DNA markers. *Plant molecular biology reporter*, v. 19, n. 2, p. 117-123, 2001.

SANMIGUEL, P.; TIKHONOV, A.; JIN, Y. K.; MOTCHOULSKAIA, N.; ZAKHAROV, D.; MELAKE-BERHAN, A.; SPRINGER, P. S.; EDWARDS, K. J.; LEE, M.; AVRAMOVA, Z.; BENNETZEN, J. L. Nested retrotransposons in the intergenic regions of the maize genome. *Science*, v. 274, n. 5288, p. 765-768, 1996.

SCHNABLE, P. S. et al. The B73 maize genome: complexity, diversity, and dynamics. *Science*, v. 326, n. 5956, p. 1112-1115, 2009.

SHAPIRO H. M. *Practical Flow Cytometry*. 4th ed. Inc.: John Wiley & Sons; 2003.

TENAILLON, M. I.; HOLLISTER, J. D.; GAUT, B. S. A triptych of the evolution of plant transposable elements. *Trends in plant science*, v. 15, n. 8, p. 471-478, 2010.

KAUL, S.; et al. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *nature*, v. 408, n. 6814, p. 796-815, 2000.

VILHAR, B.; GREILHUBER, J.; KOCE, J. D.; TEMSCH, E. M.; DERMASTIA, M. Plant genome size measurement with DNA image cytometry. *Annals of Botany*, v. 87, n. 6, p. 719-728, 2001.

WANG, K.; HUANG, G.; ZHU, Y. Transposable elements play an important role during cotton genome evolution and fiber cell development. *Science China Life Sciences*, v. 59, n. 2, p. 112-121, 2016.

WENDEL, J. F.; JACKSON, S. A.; MEYERS, B. C.; WING, R. A. Evolution of plant genome architecture. *Genome biology*, v. 17, n. 1, p. 1, 2016.

ZATLOUKALOVÁ, P.; HŘIBOVÁ, E.; KUBALÁKOVÁ, M.; SUCHÁNKOVÁ, P.; SIMKOVÁ, H.; ADORACIÓN, C.; KAHL, G.; MILLÁN, T.; DOLEŽEL, J. Integration of genetic and physical maps of the chickpea (*Cicer arietinum* L.) genome using flow-sorted chromosomes. *Chromosome research*, v. 19, n. 6, p. 729-739, 2011.