



**ANA CATARINA LIMA DE OLIVEIRA**

**CITOMETRIA DE FLUXO E REDES NEURAIS  
ARTIFICIAIS EM VARIEDADES DE  
BANANEIRA, FIGUEIRA, MACIEIRA, E  
PESSEGUEIRO**

**LAVRAS - MG**

**2011**

**ANA CATARINA LIMA DE OLIVEIRA**

**CITOMETRIA DE FLUXO E REDES NEURAIAS ARTIFICIAIS EM EM  
VARIETADES DE BANANEIRA, FIGUEIRA, MACIEIRA, E  
PESSEGUEIRO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fisiologia Vegetal, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador

Dr. Moacir Pasqual

**LAVRAS - MG**

**2011**

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da  
Biblioteca da UFLA**

Oliveira, Ana Catarina Lima de.

Citometria de fluxo e redes neurais artificiais em variedades de  
bananeira, figueira, macieira e pessegueiro / Ana Catarina Lima de  
Oliveira. – Lavras : UFLA, 2011.

125 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2011.

Orientador: Moacir Pasqual.

Bibliografia.

1. Otimização. 2. Metodologia. 3. Caracterização. 4. Modelagem.  
I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 582.130487322

**ANA CATARINA LIMA DE OLIVEIRA**

**CITOMETRIA DE FLUXO E REDES NEURAIS ARTIFICIAIS EM EM  
VARIEDADES DE BANANEIRA, FIGUEIRA, MACIEIRA, E  
PESSEGUEIRO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fisiologia Vegetal, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 28 de julho de 2011.

Dr. Rafael Pio

UFLA

Dra. Roselaine Cristina Pereira

UFLA

Dr. Moacir Pasqual

Orientador

**LAVRAS – MG**

**2011**

*Dedico este trabalho às pessoas mais importantes e que, com perfeição,  
contemplam todos os significados das palavras mãe e pai:  
a minha mãe Silene e a meu pai Antonio.*

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço, em primeiro lugar, a Deus, que, nos momentos mais difíceis, estendeu suas mãos dando força e incentivo para eu continuar esta caminhada com a certeza de nunca estar sozinha.

A minha família, meus pais, Antonio e Silene, e minhas irmãs, Aline e Carol, por todo o apoio, incentivo, amor, e pela prontidão que sempre tiveram quando eu precisei. Vocês são a razão da minha vida.

À Universidade Federal de Lavras, pela oportunidade de realização do curso de mestrado e, em especial, ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal.

Ao meu orientador Prof. Moacir Pasqual, pela confiança, pelos ensinamentos, pela valiosa orientação e, em especial, por seu apoio, pelas oportunidades e pelo seu exemplo de pessoa e de profissional.

Ao Prof. Rafael Pio, por aceitar participar da banca avaliadora e ceder grande parte do material para a realização dos experimentos.

À Dra. Roselaine Cristina Pereira, por aceitar participar da banca avaliadora e, acima de tudo, pela amizade e disponibilidade de esclarecer minhas dúvidas ao longo desses experimentos.

À Leila Aparecida Salles Pio, minha coorientadora, por aceitar participar da banca avaliadora e por ter se tornado uma verdadeira amiga. Obrigada por me acompanhar ao longo deste trabalho, pelo carinho, amizade, auxílio, dedicação e ensinamentos.

As minhas antigas companheiras de república, Dalíhia, Thaís e Lucília, obrigada pelo acolhimento e pela amizade. Serei sempre grata. E a minha atual república “Monarkia”, a Stella, Gabi e Diane, obrigada pela amizade, companheirismo e cumplicidade, e aos agregados Samuel, Franz e Matheus, vocês foram essenciais na conclusão desta etapa.

Aos colegas do Laboratório de Cultura de Tecidos que se tornaram verdadeiros amigos: Rafael, Claudinéia, Verônica, Aurinete, Fran, Ana Paula, Joyce, Renata, Simone, Cida, Ylana, Camila, Filipe e Karine. Obrigada pelos ensinamentos e pela descontração, vocês tornaram tudo isto mais fácil. Ao Claret e ao Vantuil pelo auxílio imprescindível na condução dos experimentos.

Aos alunos e funcionários do Pomar da UFLA, em especial ao Filipe (Viçosa), Pedro e Paula.

Aos alunos do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, em especial ao Leandro e ao André. Obrigada pelas risadas, por estarmos juntos nas longas horas de estudo e, acima de tudo, pela amizade.

Aos meus eternos “mestres” Profa. Maria de Fátima Arrigoni-Blank e Prof. Arie Fitzgerald Blank, por abrirem os caminhos para que eu chegasse até aqui, pelos ensinamentos da época de graduação e pela torcida durante esta fase.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudo.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, a minha eterna gratidão.

## RESUMO

Objetivou-se caracterizar variedades de macieira, figueira e pessegueiro em relação ao conteúdo de DNA por meio da técnica de citometria de fluxo, otimizar o protocolo para essa metodologia para as variedades de bananeira, macieira, figueira e pessegueiro, além de desenvolver um modelo de Redes Neurais Artificiais (RNA) de classificação de bananeira quanto a sua ploidia. Foram analisados: presença ou não de RNase, padrões de referência, dose e tempo de exposição de amostras ao corante Iodeto de Propídeo. As amostras de folhas foram trituradas em uma placa de Petri contendo 1 mL de tampão gelado, para a liberação de núcleos, e em seguida foram corados com Iodeto de Propídeo. Nesse experimento, foram avaliadas as variedades 'NBA', 'Caipira' e 'Bucanero' de bananeira (*Musa acuminata* Colla), variedade Baronesa de macieira (*Malus domestica* Borkh.), variedade Minifigo de figueira (*Ficus carica* L.) e variedade Tropical de pessegueiro [*Prunus persica* (L.) Batsch]. A caracterização em relação ao conteúdo de DNA foi realizada em 7 variedades de macieira ('Baroneza', 'Eva', 'Gala Real', 'Imperatriz', 'Julieta', 'Princesa' e 'Rainha'), 18 variedades de figueira ('Bêbara Branca', 'Bruswick', 'Calabacita', 'Colo de Dama', 'Dauphine', 'Frucôte', 'Lemon', 'Lampa Preta', 'Montes', 'Maia', 'Mini Figo', 'Nazaré', 'Negro de Bursa', 'Princesa', 'Pingo de Mel', 'Roxo de Valinhos', 'Três Num Prato' e 'Troiano') e em 22 variedades de pessegueiro ('Aurora-1', 'Biuti', 'Centenário', 'Charme', 'Delicioso Precoce', 'Diamante', 'Doçura 2', 'Douradão', 'Douradão 2', 'Eldorado', 'Flor da Prince', 'Jóia', 'Kampai', 'Libra', 'Maciel', 'Maravilha', 'Marli', 'Oknawa', 'Oknawa Roxo', 'Régis', 'Rei da Conserva' e 'Tropical'). A RNA foi implementada com a função de classificação e para o treinamento da mesma foram utilizados 90% dos dados e para validação 10% do total de 114 autotetraplóides produzidos artificialmente por meio do tratamento com colchicina. Para a maioria das variedades o melhor tampão utilizado foi o Marie, com uma única exceção a variedade Baronesa de macieira, para a qual o melhor tampão foi o Tris.MgCl<sub>2</sub>. A presença de RNase não é essencial para a qualidade das análises de citometria de fluxo, sendo seu uso, portanto, dispensável. A utilização de 5 µL do fluorocromo Iodeto de Propídeo foi eficiente para as variedades, somente para a variedade de bananeira Bucanero deve-se usar 10 µL desta substância. As leituras podem ser feitas logo depois de adicionar o fluorocromo, porém para a variedade NBA é necessário um tempo de exposição de cinco minutos. A ervilha se mostrou ideal como padrão de referência para os indivíduos analisados. As variedades de macieira presentes na UFLA são estatisticamente semelhantes quanto ao conteúdo de DNA, já as variedades de figueira podem ser separadas em dois grupos, de acordo com seu conteúdo de DNA. As que mais apresentam diferenças são as variedades de pessegueiro, as quais são divididas em quatro



grupos com tamanhos genômicos estatisticamente diferentes. A RNA do tipo *Multi Layer Perceptron* é eficiente na pré-seleção de autotetraplóides artificiais de bananeira, para isso deve-se utilizar o algoritmo de treinamento do tipo *Backpropagation* com taxa de aprendizado e o termo momentum adotados são respectivamente iguais a 0,01 e 0,2.

Palavras-chave: Otimização. Metodologia. Caracterização. Modelagem.

## ABSTRACT

The work objective was to characterize apple, peach and fig varieties the technique of flow cytometry, to optimize of this methodology for banana, apple, peach and fig varieties and finally develop a model of Artificial Neural Networks for classification as a banana ploidy considering their agronomic traits. For this we analyzed the presence or absence of RNase combined with different extraction buffers, benchmarks, amount and exposure time of samples to the dye propidium iodide. The leaf samples were crushed in a petri dish containing 1 mL of ice to release nuclei and then was stained with propidium iodide. In this experiment, the varieties were evaluated 'NBA', 'Caipira' e 'Bucanero' of banana (*Musa acuminata* Colla), 'Baronesa' apple varieties (*Malus domestica* Borkh.), MiniFigo fig varieties (*Ficus carica* L.) and Tropical peach varieties (*Prunus persica* (L.) Batsch). The characterization as the DNA content was performed in 7 apple varieties ('Baroneza', 'Eva', 'Gala Real', 'Imperatriz', 'Julieta', 'Princesa' and 'Rainha'), 18 fig varieties ('Bêbara Branca', 'Bruswick', 'Calabacita', 'Colo de Dama', 'Dauphine', 'Frucôte', 'Lemon', 'Lampa Preta', 'Montes', 'Maia', 'Mini Figo', 'Nazaré', 'Negro de Bursa', 'Princesa', 'Pingo de Mel', 'Roxo de Valinhos', 'Três Num Prato' and 'Troiano') and 22 peach varieties ('Aurora-1', 'Biuti', 'Centenário', 'Charme', 'Delicioso Precoce', 'Diamante', 'Doçura 2', 'Douradão', 'Douradão 2', 'Eldorado', 'Flor da Prince', 'Jóia', 'Kampai', 'Libra', 'Maciel', 'Maravilha', 'Marli', 'Oknawa', 'Oknawa Roxo', 'Régis', 'Rei da Conserva' and 'Tropical') of belonging to UFLA. The Artificial Neural Network (ANN) was implemented with the function of classification, for training were used 90% and to validate were used 10% of the total 114 autotetraplóides produced artificially through treatment with colchicine, which is an antimitotic agent. For most varieties, the best buffer used was Marie, with one exception to varieties Baronesa apple, to which the cap was the best Tris.MgCl<sub>2</sub>. The presence of RNase is not essential to the quality of flow cytometric analysis, and its use therefore expendable. The use of 5 µL of propidium iodide flurocromo was effective for the varieties, only to varieties Bucanero banana must use 10 µL of this substance. Readings can be done on site after the fluorochrome, but for the NBA is necessary to cultivate an exposure time of five minutes the dye. And the pea (*Pisum sativum* L.) has proved ideal as a reference standard for the individuals analyzed. The apple varieties present in the Germplasm Bank of UFLA are statistically similar in DNA content, as fig varieties can be separates into two groups according to their DNA content. The ones who have been different peach varieties, which can be divided into four groups with significantly different genome sizes. The Artificial Neural Network *Multi Layer Perceptron* type is effective in pre-selection of artificial autotetraploid banana, for that you must use the algorithm of the type of

training with Backpropagation learning rate and momentum term adopted are respectively equal to 0,01 and 0,2.

Keywords: Optimization. Methodology. Characterization. Modeling.

## SUMÁRIO

	<b>CAPÍTULO 1 Introdução geral .....</b>	<b>14</b>
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>15</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>17</b>
<b>2.1</b>	<b>Bananicultura .....</b>	<b>17</b>
<b>2.2</b>	<b>Ficicultura .....</b>	<b>19</b>
<b>2.3</b>	<b>Pomicultura .....</b>	<b>22</b>
<b>2.4</b>	<b>Persicultura .....</b>	<b>25</b>
<b>2.5</b>	<b>Citometria de fluxo .....</b>	<b>27</b>
<b>2.5.1</b>	<b>Preparação de material para análise em citometria de fluxo .....</b>	<b>30</b>
<b>2.5.2</b>	<b>Tampão de extração.....</b>	<b>31</b>
<b>2.5.3</b>	<b>Padrões de referência .....</b>	<b>33</b>
<b>2.5.4</b>	<b>Fluorocromos .....</b>	<b>34</b>
<b>2.5.5</b>	<b>Aplicações da citometria de fluxo vegetal .....</b>	<b>35</b>
<b>2.6</b>	<b>Redes neurais artificiais .....</b>	<b>37</b>
<b>2.6.1</b>	<b>Neurônio artificial .....</b>	<b>37</b>
<b>2.6.2</b>	<b>Arquitetura das redes neurais artificiais .....</b>	<b>38</b>
<b>2.6.3</b>	<b>Redes Neurais De Múltiplas Camadas ou <i>Multilayer</i> <i>Perceptron</i> .....</b>	<b>38</b>
<b>2.6.4</b>	<b><i>Backpropagation</i>, um algoritmo de treinamento .....</b>	<b>40</b>
<b>2.6.5</b>	<b>Uso das Redes Neurais Artificiais na solução de problemas agrícolas .....</b>	<b>41</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>43</b>
	<b>CAPÍTULO 2 OTIMIZAÇÃO DO PROTOCOLO DE CITOMETRIA DE FLUXO PARA A BANANEIRA (<i>Musa acuminata</i> COLLA), FIGUEIRA (<i>Ficus carica</i> L.), MACIEIRA (<i>Malus domestica</i> BORKH.) E PESEGUEIRO [<i>Prunus persica</i> (L.) BATSCH].....</b>	<b>56</b>
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>59</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>61</b>
<b>2.1</b>	<b>Material vegetal .....</b>	<b>61</b>
<b>2.2</b>	<b>Preparo das amostras .....</b>	<b>63</b>
<b>2.3</b>	<b>Influência do tampão de extração na qualidade das análises de citometria de fluxo .....</b>	<b>62</b>
<b>2.4</b>	<b>Influência da utilização de RNase na qualidade das análises de citometria de fluxo .....</b>	<b>62</b>
<b>2.5</b>	<b>Influência da quantidade de Iodeto de Propídeo na qualidade das análises de citometria de fluxo .....</b>	<b>63</b>
<b>2.6</b>	<b>Influência do tempo de exposição dos núcleos ao Iodeto de</b>	

	Propídeo na qualidade das análises de citometria de fluxo .	63
2.7	Influência do padrão interno de referência na qualidade das análises de citometria de fluxo .....	64
2.8	Análise estatística .....	65
3	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	66
3.1	Influência do tampão de extração na qualidade das análises de citometria de fluxo .....	66
3.2	Influência da utilização de RNase na qualidade das análises de citometria de fluxo .....	70
3.3	Influência da quantidade de Iodeto de Propídeo na qualidade das análises de citometria de fluxo .....	74
3.4	Influência do tempo de exposição dos núcleos ao Iodeto de Propídeo na qualidade das análises de citometria de fluxo .....	78
3.5	Influência do padrão interno de referência na qualidade das análises de citometria de fluxo .....	81
4	<b>CONCLUSÃO</b> .....	86
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	87
	<b>CAPÍTULO 3 CARACTERIZAÇÃO DE VARIEDADES DE FIGUEIRA (<i>Ficus carica</i> L.), MACIEIRA (<i>Malus domestica</i> BORKH.) E PESSEGUEIRO [<i>Prunus persica</i> (L.) BATSCH] UTILIZANDO A CITOMETRIA DE FLUXO</b> .....	90
1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	93
2	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	96
2.1	Material vegetal .....	96
2.2	Análises de citometria de fluxo .....	96
3	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	98
4	<b>CONCLUSÃO</b> .....	106
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	107
	<b>CAPÍTULO 4 UTILIZAÇÃO DA MODELAGEM MATEMÁTICA (REDES NEURAS ARTIFICIAIS) NA CLASSIFICAÇÃO DE AUTETRAPLOIDES DE bananeira (<i>Musa acuminata</i> COLLA)</b> .....	111
1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	114
2	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	117
2.1	Obtenção dos dados .....	117
2.2	Material vegetal .....	117
2.3	Discos foliares de plantas de bananeira variedade Tong Dok Mak tratadas com colchicina .....	118
2.4	Citometria de fluxo de plantas de bananeira variedade Tong Dok Mak tratadas com colchicina .....	118

2.5	<b>Redes neurais</b> .....	119
3	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	121
4	<b>CONCLUSÃO</b> .....	124
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	125

**CAPÍTULO 1**

**INTRODUÇÃO GERAL**

## 1 INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos principais produtores mundiais de frutíferas, com uma produção superior a 41 milhões de toneladas em 2009 (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE, 2009). Devido a sua extensão territorial e diferenças edafoclimáticas, foi possível a introdução de diversas espécies tais como a bananeira, figueira, macieira e pessegueiro. A banana é a segunda fruta mais produzida no país, enquanto a maçã, o figo e o pêsego, frutas de clima temperado, são, respectivamente, a oitava, a décima quinta e a décima oitava fruta de maior produção.

Apesar deste destaque na produção de frutas, o país enfrenta problemas tais como a incidência de doenças e a não adaptação das culturas ao clima local, sobretudo das culturas de clima temperado que, muitas vezes, necessitam do acúmulo de temperaturas baixas para completar seu ciclo vegetativo.

A bananicultura encontra algumas obstruções relacionadas estreitamente à falta de resistência às principais doenças e pragas, sendo grande parte das variedades comerciais pouco produtivas e estéreis. Para contornar esses entraves, que prejudicam diretamente a produção nacional, uma alternativa é a obtenção de plantas com características desejáveis por meio do melhoramento genético.

Os melhoristas buscam plantas de características interessantes do ponto de vista agrônomo em Bancos de Germoplasma Vegetal (BAG), lugar onde se reúnem espécies, variedades, genótipos e/ou variedades a fim de conservar, caracterizar, avaliar e assegurar o armazenamento de germoplasma para um futuro fornecimento aos programas de melhoramento de plantas.

O melhoramento genético dessas espécies é feito por algumas empresas públicas, tais como o Instituto Agrônomo – IAC, o Instituto Agrônomo do Paraná - IAPAR, a Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de



Santa Catarina - EPAGRI, a EMBRAPA Clima Temperado e Mandioca e Fruticultura Tropical (BA), que inclusive já lançam algumas cultivares.

A caracterização das espécies presentes em um BAG é de grande valia, pois, por meio dela, é possível conhecer melhor as características e a variabilidade de cada planta. Tal caracterização pode ser feita do ponto de vista agrônomo, botânico ou genético.

Existem diversas ferramentas que podem ser usadas com o intuito de caracterização intraespecífica e interespecífica de diversas espécies quanto ao conteúdo de DNA como a parâmetros fitotécnicos, biologia molecular, citogenética, citometria de fluxo, por meio de características morfofisiológicas, dentre outras. A citometria de fluxo é uma técnica que permite, por exemplo, a quantificação do conteúdo de DNA, porém, um dos grandes problemas da citometria atual é a necessidade de padronização dos resultados para que se evitem erros grosseiros e se possibilite a comparação universal dos resultados.

Apesar de todas as vantagens em realizar essas análises, a citometria de fluxo requer um custo elevado e, por isso, nem todas as instituições de pesquisa podem realizá-la. Logo, com o objetivo de classificar as plantas quanto a alguns parâmetros agrônômicos relacionados à ploidia do vegetal, uma alternativa é a utilização de modelagem matemática, em especial de Redes Neurais Artificiais aplicadas a sistemas biológicos. As redes neurais são capazes de generalizar e aprender informações e, assim, se pode utilizá-las em trabalhos futuros, o que ajudaria os locais onde o aparelho citômetro de fluxo é inexistente.

Diante do exposto, objetivou-se, com o presente trabalho, caracterizar quanto ao conteúdo de DNA variedades de macieira, figueira e pessegueiro por meio da técnica de citometria de fluxo, realizar a padronização dessa metodologia para as espécies citadas e para a bananeira e, por fim, considerando atributos agrônômicos, desenvolver um modelo de Redes Neurais Artificiais de classificação de bananeira quanto a sua ploidia.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Bananicultura

A banana apresenta elevado valor nutricional e digestivo, sendo a fruta mais consumida ao natural no mundo, a banana é, em muitas áreas, considerado o principal produto alimentício (CHIN, 1996). O seu cultivo se concentra nos países de clima tropical (FREITAS; RAMOS; COSTA, 2008), e o Brasil é o quarto maior produtor mundial com produção aproximada de 6,7 milhões de toneladas. Os principais estados produtores do país são São Paulo, Bahia, Santa Catarina e Minas Gerais, sendo este último o responsável por 15,84% da produção, aproximadamente 620 mil toneladas (IBGE, 2009).

A banana tem um excelente valor nutricional e é um dos alimentos mais facilmente digeríveis (SILVA NETO; GUIMARÃES, 2011). No Brasil, apesar das condições favoráveis à produção da fruta, a produtividade tem sido baixa em função de problemas de suprimento nutricional, hídrico e de incidência de pragas e doenças (FERNANDES et al., 2008; SANTOS et al., 2009). Geralmente os cultivos são tradicionais, com baixos índices de capitalização e tecnologia, no entanto existem cultivos tecnificados em algumas regiões do país (PIO, 2007).

A bananeira pertence ao gênero *Musa* da família *Musaceae*, os frutos comestíveis são, em sua maioria, variedades de espécies selvagens *Musa acuminata* e *Musa balbisiana*, as quais possuem os genomas AA e BB, respectivamente (ÁLVARES, 2003). A maioria dessas variedades é de ocorrência espontânea, pois foram cultivados, selecionados, multiplicados e divididos vegetativamente pelos fazendeiros. Já que os triplóides se mostraram mais resistentes e produtivos, ganharam a preferência dos produtores e passaram a ser amplamente cultivados (PILLAY et al., 2008). Os genótipos diplóides

tornam-se importantes uma vez que são fontes de alelos de resistência/tolerância a fatores bióticos e abióticos (JENNY et al., 1999).

A caracterização das variedades e a estimativa da variabilidade genética disponível para o melhoramento genético desse gênero são informações úteis na escolha de genitores para cruzamentos entre genótipos divergentes e desenvolvimento de novos diplóides melhorados. A caracterização morfológica é a maneira mais simples e de menor custo na busca de descritores que possibilitem caracterizar uma variedade, no entanto apresenta limitações, como no caso de variedades com grandes semelhanças fenotípicas e também com caracteres altamente influenciados pelo meio ambiente (OLIVEIRA et al., 2000).

A fim de realizar esse tipo de trabalho, existem alternativas mais refinadas, como a citometria de fluxo e os marcadores moleculares. Em razão disso, neste trabalho foi usado o primeiro método citado.

A metodologia de citometria de fluxo é um processo no qual as características físicas e/ou químicas (tais como a dispersão de luz e/ou emissão de fluorescência) de partículas individuais (biológicas ou não) são medidas (LOUREIRO, 2007), e pode ser usada, entre outras funções, para mensuração da quantidade de DNA de um determinado vegetal (DOLEZEL; BARTOS, 2005). No entanto, histogramas com baixos níveis de coeficiente de variação possibilitam detectar a ausência de um único par cromossômico e, portanto, permitem diferenciar variedades de mesma ploidia.

Guimarães et al. (2009) utilizaram a citometria de fluxo com o objetivo de identificar indivíduos variantes somaclonais em viveiros. Tal técnica evidenciou a instabilidade genômica da bananeira cv. Prata-Anã, porém não foi eficiente na identificação de variantes somaclonais. Isso possivelmente pode ter ocorrido devido aos coeficientes de variação das análises que, quando acima do

aceitável (5%), não são capazes de detectar variações relativamente pequenas do conteúdo de DNA.

Já Roux et al. (2003) descreveram a citometria de fluxo como um método rápido para detecção de aneuploidia (perda ou adição de cromossomos inteiros isolados) em *Musa*, pois a classificação baseada na citometria de fluxo concordou plenamente com os resultados obtidos nas análises de citogenética (contagem de cromossomos).

## 2.2 Ficicultura

O figo (*Ficus carica* L.), pertencente à família *Moraceae*, apresenta destaque no comércio internacional de frutíferas. É produzido por ano mais de 1 milhão de toneladas no mundo. O Brasil situa-se como 9<sup>o</sup> colocado no ranking de países produtores (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO, 2009) e as regiões Sul e Sudeste do país concentram os estados com maior produção de figos, entre os quais se destacam os Estados do Rio Grande do Sul, Minas Gerais e São Paulo. Minas Gerais representa mais de 22% da produção nacional (IBGE, 2009).

Trata-se de uma frutífera que se encontra em expansão devido a algumas características que lhe conferem rusticidade e adaptabilidade a diferentes condições climáticas. Essas características proporcionam maior adaptabilidade tanto para cultivo em climas quentes quanto para o cultivo em regiões temperadas (PEREIRA, 1981). Apresenta, porém, problemas relativos a pragas e doenças, tais como doenças fúngicas, cochonilha e mosca das frutas, o que interfere negativamente no seu cultivo comprometendo a produtividade e reduzindo os lucros (ASSUNÇÃO, 2008; FERRAZ; PEREIRA; BOLONHEZI, 1980).

De acordo com a morfologia floral e os hábitos de frutificação, os figos se dividem em quatro grupos. Contudo, no Brasil, o tipo de figo de ocorrência frequente é o *Ficus carica hortensis* que, por sua vez, não possui sementes, já que é produzido por partenocarpia. Esse tipo pertence à classe chamada de comum e também abrange o *Ficus carica violacea*. Existem ainda outros tipos de figo tais como: o Smirna (*Ficus carica smyrniaca*), que apresenta apenas flores femininas; o do tipo caprifigo (*Ficus carica silvestris*), que apresenta apenas flores masculinas; e o São Pedro (*Ficus carica intermedia*), que apresenta tanto partenocarpia como fecundação cruzada. Os três últimos citados, porém, são produzidos principalmente em países do Hemisfério Norte na presença da vespa *Blastophaga psenes* (ULLMANN, 2002). Esse inseto é o agente polinizador da figueira por meio da caprifificação, processo em que a vespa deixa o fruto maduro, carregando o pólen das flores masculinas em direção às flores femininas à procura de um lugar apropriado para deixar seus ovos e, assim, espalha o pólen realizando a polinização (GOMES, 1983). Em lugares onde a vespa não ocorre, essa polinização pode ocorrer artificialmente com a introdução de frutos com o inseto no pomar (VALE, 2010).

A variedade ‘Roxo de Valinhos’ (*Brow Tukey*), pertencente ao tipo de figo *Ficus carica violacea*, tem predomínio na produção nacional devido ao seu grande vigor, rusticidade, produtividade e aceitação por parte de consumidores e produtores. Porém, essa variedade apresenta algumas características indesejáveis, como a suscetibilidade ao vírus do mosaico e ao nematoide *Meloidogyne incognita* (FERREIRA et al., 2009). O cultivo de figo vem sendo feito de maneira tradicional, sem muitas inovações ou melhorias técnicas (ABRAHÃO et al., 1990), fator que pode representar perdas significativas na produção. Diante disso, o melhoramento genético dessa cultura é importante para que se obtenham variedades com características desejáveis, embora pouco se conheça da figueira e de sua base genética relativa às características a serem

melhoradas. Essas variedades podem ser obtidas pelo cruzamento do caprifigo (única classe de figos que apresenta, quando maduros, estames fornecedores de pólen às demais variedades) com uma planta-mãe com características de interesse para que, dessa forma, seja possível a realização de cruzamentos e posteriores seleções e recuperação de um genótipo que associe as características básicas da variedade original e as que se pretendia introduzir (RODRIGUES; CORREA; BOLIANI, 2009).

Para a realização dos métodos clássicos de melhoramento em plantas de propagação vegetativa, como normalmente ocorre com o *Ficus carica*, existem algumas dificuldades (DONINI, 1976). Esse tipo de propagação pode induzir o melhorista ao não aproveitamento de níveis intermediários da característica de interesse, principalmente algumas de difícil mensuração, como é o caso da tolerância ou resistência a doenças. Isso pode acarretar a perda da variabilidade, mas, por outro lado, a vantagem do método é que, em qualquer fase do programa de melhoramento, plantas que apresentem características favoráveis, tanto de ordem qualitativa quanto quantitativa, podem ser fixadas geneticamente por meio da multiplicação e podem ser reproduzidas em larga escala e indefinidamente (DANNER, 2011).

Uma ferramenta auxiliar no melhoramento genético dessa espécie é a citometria de fluxo, com diversas aplicações, tais como: determinação do conteúdo de DNA e ploidia, ciclo celular, complexidade das células, identificação de proteínas presentes no metabolismo desses indivíduos, entre outros.

Ohri e Khoshoo (1987) utilizaram o método de Feulgen que se baseia na coloração do DNA pelo reativo de Schiff. Nesse procedimento, a intensidade da cor é diretamente proporcional à quantidade de DNA (PEARSE, 1986) e, com o objetivo de mensurar o conteúdo de DNA em espécies de *Ficus*, os autores afirmaram que o conteúdo de DNA da espécie *Ficus carica* é de 1,41

picogramas. Após 20 anos, Loureiro et al. (2007), trabalhando com a mesma espécie e usando a mesma metodologia, encontraram um valor médio de DNA de 0,73, praticamente metade do encontrado anteriormente. Essa diferença discrepante pode ter várias explicações e, dentre elas, a mais aceitável é a de que tenham ocorrido diferenças na metodologia aplicada em cada caso.

Assim, a caracterização realizada pela utilização do citômetro de fluxo de diversas variedades presentes no Brasil se torna essencial, uma vez que apenas a variedade ‘Roxo de Valinho’ é cultivada.

### **2.3 Pomicultura**

A macieira (*Malus domestica* Borkh.), pertence à família das *Rosaceae*, subfamília *Maloidae* (*Pomoidae*), gênero *Malus*, é uma planta perene. É a fruta de clima temperado de maior dispersão. O registro do primeiro cultivo no Brasil data de 1926 no município de Valinhos-SP (PETRI; LEITE; PUTTI, 2008). Em 2009, o Brasil produziu aproximadamente 1,2 milhões de toneladas da fruta, o que colocou o país na 121ª posição no ranking mundial. Com cerca de 99% de toda a produção nacional, a principal região produtora é o Sul e, em segundo lugar, vem a região Sudeste com menos de 0,5% da produção total. Nesta região, os únicos produtores são os estados de São Paulo e Minas Gerais, com valores produzidos praticamente iguais (FAO, 2009; IBGE 2009).

No Brasil, a produção de maçã concentra-se em duas importantes variedades, a ‘Gala’ e a ‘Fuji’. Também são cultivadas outras variedades, tais como ‘Eva’, ‘Golden Delicious’, ‘Brasil’, ‘Anna’, ‘Condessa’, ‘Catarina’, ‘Granny Smith’ (SATO; ROBERTO, 2011). Em Minas Gerais são encontrados aproximadamente 150 hectares de pomares de macieira e somente é cultivada a variedade ‘Eva’.

Entre os fatores que apresentam influência no desenvolvimento da macieira podem-se citar a luminosidade, a disponibilidade de nutrientes, as condições de solo e temperatura, sendo este último o que apresenta influência mais marcante (EMPRESA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA E EXTENSÃO RURAL DE SANTA CATARIANA - EPAGRI, 1986). Para produzir, a macieira necessita sair do estado dormente e iniciar a brotação na primavera; para isso, as plantas precisam, no inverno, de certa quantidade de horas de frio abaixo de 7,2° C, embora esses fatores mudem de acordo com a variedade. Quando cultivadas em regiões onde as horas de frio são insuficientes para iniciar esse processo, se torna necessária a aplicação de indutores de brotação, como a cianamida hidrogenada. Devido ao melhoramento genético, existe uma gama de variedades menos exigentes ao frio, mais produtivas, com melhor sabor e aparência, porém ainda não existem variedades resistentes a muitas doenças e pragas (ALDWINCKLE; NORELLI, 2000; PETRI; LEITE; PUTTI, 2008).

As principais doenças da macieira são a sarna (*Venturia inaequalis*), a podridão-amarga (*Glomerella cingulata*), o oídio (*Podosphaera leucotricha*) e mancha foliar de glomerella (*Colletotrichum* spp). Desse modo, a produtividade do pomar depende tanto da qualidade das mudas utilizadas como da variedade escolhida.

Como já foi mencionado anteriormente, o efeito do frio, cumulativo e geneticamente controlado, pode alterar com a variedade (PETRI et al., 1996). As diferentes espécies e variedades possuem características genéticas próprias (RODRIGUES; MELO; ALOUGA, 2006). A temperatura efetiva para acumular frio, a qual muda em relação às variedades, pode chegar até 15°C para variedades de menor exigência em frio, como é o caso da variedade ‘Baronesa’ (PUTTI; PETRI; MENDEZ, 2003).

Como exemplo de variedades dessa baixa exigência, podemos citar a ‘Eva’ (IAPAR 75), que também é resistente à mancha foliar de glomerela,



principal doença foliar da macieira em regiões quentes e úmidas, entretanto é suscetível à sarna (INSTITUTO AGRONÔMICO DO PARANÁ - IAPAR, 2011).

A ‘IPR-Julietta’ é considerada a variedade de macieira para climas quentes, pois sua exigência de frio é de 300 a 500 horas (a variedade ‘Gala’ necessita de 1500 horas). A ‘Gala Real’ tem como principal utilidade servir de polinizadora para a variedade ‘Eva’ (IAPAR 75) (IAPAR, 2011).

Segundo Sato e Roberto (2011), os programas de melhoramento genético visam à criação de variedades com menor exigência em horas de frio e resistência a doenças. Entre estas destacam-se: Imperatriz, Daiane, Baronesa, Catarina e Joaquina.

Para esses programas, a coleta, a caracterização e a manutenção de germoplasma são indispensáveis para ampliar e preservar a variabilidade genética (FURLAN et al., 2010). De vital importância para o pesquisador é o manejo eficiente de germoplasma vegetal, pois este necessita se apresentar geneticamente puro e bem caracterizado para a utilização em pesquisas e em melhoramento genético (MARTINELLO et al., 2001). Essa caracterização pode ser feita de diversas formas, inclusive utilizando a técnica de citometria de fluxo.

Höger e Meister (2010), empregando a técnica de citometria de fluxo com o tampão Tris-MgCl<sub>2</sub> juntamente com o fluorocromo Iodeto de Propídeo, analisaram o conteúdo de DNA das espécies do gênero *Malus* em relação à distância do centro de origem do mesmo. Os autores concluíram que o valor do conteúdo de DNA é proporcional à distância de cultivo das espécies analisadas. Utilizando a técnica anteriormente citada, Korban et al. (2009) também encontraram diferenças significativas no conteúdo de DNA de espécies diplóides do mesmo gênero. O tamanho do genoma variou entre 1,44 e 1,72 pg.

Tatum et al. (2005) propuseram, em seu trabalho, que há certa tendência de diminuição do conteúdo de DNA haploide de *Malus* com o aumento da poliploidia.

## 2.4 Persicultura

No mercado mundial, o pêssego [*Prunus persica* (L.) Batsch] tem grande importância socioeconômica. Em 2009, a produção brasileira de pêssego totalizou mais de 216 mil toneladas, o que colocou o país na 13ª posição no ranking mundial. O pêssego é produzido apenas em duas regiões: no Sul, onde se concentra a maior produção, e no Sudeste, sendo o Estado de Minas Gerais o terceiro produtor brasileiro com mais de 25 mil toneladas de pêssegos produzidas em 2009 (FAO, 2009; IBGE, 2009).

A temperatura é o mais importante fator climático, pois afeta a distribuição das variedades. O homem tem pouco controle sobre esta e, por essa razão, é prudente escolher, cuidadosamente, o local de cultivo e a variedade (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA, 2005).

O potencial de mercado brasileiro, que possui predominância do clima tropical em seu território, é elevado. Porém, a produção nacional de pêssego ainda não atingiu volume suficiente para atender à demanda interna.

Segundo Hauagge (2000), a habilidade de produzir frutos de qualidade em temperaturas, na maioria das vezes superiores à ótima, é fundamental para a adaptação de frutíferas temperadas em regiões quentes, tais como o pessegueiro.

Para Wagner Júnior (2007), a exigência da quantidade de acúmulo de frio hibernal depende da espécie, da variedade e do estado nutricional, além do tipo de gema e de sua localização na planta.

A região Sul, mais importante produtora de pêssego, ainda repousa sobre o emprego de porta-enxertos obtidos de sementes oriundas da indústria de conserva, o que pode acarretar na mistura de variedade e a consequente desuniformidade do pomar, a morte precoce de plantas e a falta de uniformidade genética (FACHINELLO, 2000).

A melhor qualidade de frutos de pêssego é atingida em áreas onde as temperaturas, no verão, em especial próximo à época de colheita, são relativamente altas durante o dia e amenas no período noturno (RASEIRA; NAKASU, 2003).

Se a exigência de frio não é obedecida, ocorre desuniformidade no florescimento e brotação, apresentando então o “erratismo” (FACHINELLO; MORODIN, 2004; HERTER; SACHS; FLORES, 1998).

Um aumento da latitude ou da altitude pode resultar em menores temperaturas. É conveniente se consultar, na região, todos os segmentos envolvidos no cultivo de espécies frutíferas e os dados meteorológicos disponíveis sobre frequência de geadas, além de informar-se sobre temperaturas extremas, frequência de secas, precipitações, granizo e ventos.

O melhoramento do pessegueiro iniciou-se no Brasil em 1947 pelo Instituto Agrônomo de Campinas – IAC, que visava ao desenvolvimento de variedades adaptadas ao clima local, o subtropical semitemperado do Estado de São Paulo, por meio do cruzamento entre nectarinas norte-americanas e pêssegos do IAC. Para a realização desses cruzamentos, um parâmetro importante a ser considerado é o conteúdo de DNA, a fim de verificar a compatibilidade reprodutiva entre os parentais e a variabilidade genética dos indivíduos a serem utilizados (BARBOSA et al., 1997).

Trabalhos que relatam o conteúdo de DNA nessa espécie não são frequentemente encontrados. Baird, Estager e Wells (1994), empregando a citometria de fluxo, afirmaram que o genoma diplóide de pêssego é

relativamente pequeno e foi estimado em  $0,60 \pm 0,03$  pg. Esse baixo conteúdo de DNA pode estar ligado ao baixo número de cromossomos do gênero ( $x = n = 8$ ). O conteúdo de DNA para doze espécies diplóides e duas variedades interespecíficas diplóides analisadas variou entre 0,57-0,79.

As próximas etapas do programa do melhoramento do pessegueiro são: a obtenção de variedades bem precoces e mais rústicas, as novas variedades de nectarinas, o aumento do tamanho dos frutos, a resistência a pragas e o desenvolvimento de pêssegos para indústria (BARBOSA et al., 1997).

## **2.5 Citometria de fluxo**

A citometria de fluxo tem um impacto significativo em muitos campos, pois é uma das poucas tecnologias, se não a única, que permite avaliar diversos parâmetros em uma pequena amostra, em um curto espaço de tempo e utilizando uma única célula (DOLEZEL; GREILHUBER; SUDA, 2007). O primeiro citômetro utilizado foi construído durante a segunda guerra mundial, quando Gucker et al. (1947) elaboraram um equipamento onde as partículas, que fluíam através do sistema de luz difuso por meio de uma lente, produziam sinais elétricos captados por um fotodetector. O instrumento, que podia detectar objetos na ordem de  $0,5 \mu\text{m}$  de diâmetro, é reconhecido como o primeiro citômetro de fluxo utilizado para a observação de células biológicas (SHAPIRO, 2004). Com isso, seria possível tanto identificar em aerossóis as bactérias que, possivelmente, seriam agentes de uma guerra biológica, quanto checar a eficiência dos filtros de máscara de gás contra as partículas.

Nos anos 50, o mesmo princípio foi aplicado para detecção e contagem de células sanguíneas. Por isso, a hematologia e a imunologia celular são as duas áreas biológicas que impulsionaram o desenvolvimento da citometria de fluxo (CAMPOS, 2007). Posteriormente, com a melhoria de equipamentos e

metodologias, a técnica foi adaptada a outras áreas da biologia, incluindo o reino vegetal (DOLEZEL, 1997).

Em 1973, o botânico alemão Friedrich Otto Heller utilizou a *Impulszytphotometrie* (citofotometria de pulso, em alemão). Este cientista não imaginou que lançava um novo campo da pesquisa científica e que, mais tarde, iria ser denominada citometria de fluxo em plantas.

A citometria de fluxo consiste de análises de partículas microscópicas em suspensão, obrigadas a interceptar, dentro de um fluxo de fluido, um foco de luz intensa (SHAPIRO, 2004) e, quando uma partícula absorve a luz, os elétrons são levados do estado fundamental para um estágio excitado. Certas moléculas, que perdem energia por fluorescência emitindo luz (fluorescência), quando excitadas, são separadas pela utilização de uma série de espelhos dicróicos, filtros e fotomultiplicadores (EECKHAUT; LEUS; HUYLENBROECK, 2005). Assim, é possível separá-las da fluorescência emitida por diferentes moléculas excitadas pela mesma fonte de luz, utilizando espelhos dicróicos (KACHEL; MESSESCHMIDT; HUMMEL, 1990).

Os circuitos dentro do aparelho convertem esses sinais fluorescentes em valores digitais que são armazenados e exibidos na forma de histogramas (DOLEZEL; GREILHUBER; SUDA, 2007; OCHATT, 2011). Os sinais de cada partícula vão se acumulando em tempo real nestes histogramas mono ou biparamétricos visualizados no monitor de um computador (CÔRTE-REAL et al., 2002).

Assim, um citômetro de fluxo compõe-se de fluídos, óptica e eletrônica, ajustados para permitir a medição de células em suspensão que fluem juntas através de um volume precisamente iluminado (ROBINSON, 2006).

Devido ao fato de as partículas serem analisadas individualmente e em alta velocidade, grandes populações podem ter o conteúdo de DNA mensurado em um curto espaço de tempo. Além disso, é possível detectar a presença de

subpopulações (SHAPIRO, 2004). Quando o laser contido no citômetro atinge a borda de uma célula, alguns dos fótons de luz são desviados ligeiramente, o que pode indicar o tamanho da célula (BONETTA, 2005).

Em seu trabalho pioneiro, Heller (1973) usou enzimas hidrolíticas para digerir a parede celular e assim liberar os núcleos de tecidos fixados. Para o isolamento de núcleos de plantas, Galbraith et al. (1983) desenvolveram um método rápido e conveniente: o corte de tecidos das plantas em um tampão de lise, tampão que destrói as membranas celular e nuclear da célula permitindo a libertação de DNA. Desde então, este tem sido o principal e mais confiável método de isolamento nuclear na citometria de fluxo vegetal.

O material vegetal tem várias características únicas não encontradas em animais, o que é um desafio para a análise por citometria. Primeiro, as células vegetais têm paredes rígidas e são mantidas juntas por uma matriz extracelular para formar complexos tecidos tridimensionais. Não é uma tarefa fácil produzir uma suspensão líquida de células individuais com formato regular e partículas subcelulares, tais como núcleos, mitocôndrias, cloroplastos e cromossomos. Outros problemas ocorrem devido à composição química do citosol. As células vegetais produzem uma vasta variedade de metabólitos secundários que podem interferir em um determinado ensaio, como, por exemplo, podem alterar a coloração do DNA nuclear (LOUREIRO, 2006b).

Nesse contexto, a disseminação do uso da citometria de fluxo com os tecidos da planta se deve principalmente à genialidade de Galbraith et al. (1983), cuja metodologia inovadora consiste no isolamento de núcleos a partir de protoplastos. Com a utilização de uma lâmina de barbear, para a homogeneização do tecido, os autores revolucionaram a citometria em plantas, simplificando o isolamento de núcleos de células a partir de praticamente qualquer tipo de órgão ou tecido de planta. A quantidade de DNA é expressa em picogramas (pg),  $10^{-12}$  gramas ou em mega pares de bases de nucleotídeos (Mb =

106 pares de bases), sendo que 1 pg corresponde a 965 Mp (BENNETT; LEITCH, 1995).

Johnston et al. (1999) e Rayburn, Auger e McMurphy (1992) definiram a citometria de fluxo como uma técnica eficiente e confiável para a caracterização do conteúdo de DNA de plantas.

### **2.5.1 Preparação de material para análise em citometria de fluxo**

Para o método, foram desenvolvidas diversas modificações que podem ser baseadas no uso de apenas uma etapa, no tampão de isolamento dos núcleos ou na substância de coloração destes (LOUREIRO; SANTOS, 2004).

Diversas metodologias podem ser aplicadas com o intuito de liberar os núcleos vegetais de forma intacta. Porém, o mais utilizado, por sua simplicidade e rapidez, é o de Galbraith et al. (1983).

A maneira de analisar células vegetais é, sem dúvida, o primeiro e mais difundido dos problemas. A forma raramente esférica dessas células, o contrário do que ocorre em animais, pode levar a um erro nas amostras submetidas à análise de citometria de fluxo. Por esse motivo, o isolamento dos núcleos, os quais geralmente são esféricos e possuem tamanho menor que a largura da iluminação do flash de laser, elimina essa restrição. Muitos métodos incorporam a filtração do tecido homogeneizado obtido depois de picar através de uma malha fina de nylon (diâmetro dos poros 20-100- $\mu\text{m}$ ) (OCHATT, 2008).

Esse procedimento é realizado no intuito de remover todo o material maior que os núcleos e, dessa forma, restam na solução apenas estes. Isso pode acarretar outros problemas, porque outros componentes e substâncias solúveis, tais como cloroplastos, mitocôndrias, compostos fenólicos, DNase, RNase, etc, liberados do citosol, podem atravessar esse filtro e estar presentes na suspensão resultante. É possível eliminar os restos ao lavar os núcleos e, para tanto,

utilizam-se a centrifugação e a ressuspensão, a fim de excluir ou bloquear as partículas indesejadas. Em alguns casos, a alteração dos componentes e/ou do pH do tampão é necessária para a obtenção de resultados de melhor qualidade (LOUREIRO et al., 2006a).

Em segundo lugar, quando não se está trabalhando com núcleos isolados, algumas dificuldades ainda são a baixa permeabilidade da parede celular a vários reagentes, a inespecificidade da ligação das células às sondas fluorescentes, a presença de pigmentos autofluorescentes (pode ser difícil distingui-los dos sinais a que se quer medir) e a existência de metabólitos secundários que interferem tanto no conteúdo celular como na coloração do corante fluorescente (ROBINSON, 2006).

Quanto a isso, Price, Hodnett e Johnston (2000) especularam que os inibidores, que diminuía a fluorescência de núcleos corados, eram comuns em plantas. Os autores não apontaram para um composto específico, mas sugeriram o envolvimento de um ou mais compostos do tipo.

Existem fatores fundamentais que interferem na qualidade das amostras de citometria de fluxo, dentre os quais podem-se citar o tampão de extração, o padrão de referência, o fluorocromo, a qualidade da amostra (idade da planta, presença de injúrias, doenças etc), o armazenamento e tempo até a análise, e os associados à amostra (composição química, como a presença de antocianina, composto fenólico que possa inibir a coloração do DNA) (TIMBÓ, 2010).

### **2.5.2 Tampão de Extração**

O tampão de extração tem a função de liberar os núcleos de células intactas. Deve garantir a estabilidade dos núcleos ao longo do experimento, proteger o DNA de degradação e facilitar a coloração estequiométrica. Atualmente, existem cerca de 25 tampões conhecidos, mas apenas seis são



comumente usados (LOUREIRO et al., 2006a). Na Tabela 1, são apresentados seis tampões mais frequentemente utilizados.

Tabela 1 Composição dos tampões de extração mais utilizados na citometria de fluxo vegetal. UFLA, Lavras-MG, 2011.

Tampão	Composição	Referência
<b>Galbraith</b>	45 mM MgCl <sub>2</sub> ; 30 mM citrato de sódio; 20 mM MOPS; 0.1% (v/v) Triton X-100; pH 7.0	Galbraith et al. (1983)
<b>LB01</b>	15 mM Tris; 2 mM Na <sub>2</sub> EDTA; 0.5 mM espermina.4HCl; 80 mM KCl; 20 mM NaCl; 0.1% (v/v) Triton X-100; pH 7.5	Dolezel, Binarová e Lucretti (1989)
<b>Otto's</b>	Otto I: 100 mM ácido citric mono hidratado; 0.5% (v/v) Tween 20 (pH approx. 2–3) Otto II: 400 mM Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .12H <sub>2</sub> O (pH approx. 8–9)	Dolezel e Gohde (1995) e Otto (1990)
<b>Tris.MgCl<sub>2</sub></b>	200 mM Tris; 4 mM MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O; 0.5% (v/v) Triton X- 100; pH 7.5	Pfosser et al. (1995)
<b>Marie</b>	50 mM glucose; 15 mM NaCl; 15 mM KCl; 5 mM Na <sub>2</sub> EDTA; 50 mM citrate de sódio; 0.5% Tween 20, 50 mM HEPES (pH 7.2), 1% (m/v) polyvinylpyrrolidone-10 (PVP-10)	Marie e Brown (1993)

A necessidade de inibir a atividade das nucleases, de preservar a integridade dos núcleos e de fornecer condições ótimas para a coloração do DNA determina as composições desses tampões (LOUREIRO; SANTOS, 2004).

Em razão da composição química diferente e da diversidade dos tecidos vegetais, é comum que cada tecido se comporte de forma diversa. Compostos citosólicos, que são liberados durante o isolamento dos núcleos, interagem com o DNA nuclear e/ou com o fluorocromo, afetam a qualidade da amostra e

causam erros estequiométricos (LOUREIRO et al., 2006b; NOIROT et al., 2000, 2003; PINTO et al., 2004; WALKER; MONINO; CORREAL, 2006).

### **2.5.3 Padrões de referência**

O padrão de referência possui uma quantidade de DNA previamente conhecida e é utilizado para a comparação com o genoma desconhecido da amostra, o que é de primordial importância. Por meio desse tipo de análise, é possível comparar os resultados obtidos com outros realizados em laboratórios diferentes.

As medições de citometria são sempre relativas e um padrão com o tamanho do genoma conhecido é necessário para estimar o tamanho do genoma da amostra desconhecida. Em princípio, isso pode ser feito para que a amostra e o padrão sejam medidos de forma independente e os meios de intensidade de fluorescência de núcleos na mesma fase do ciclo celular (normalmente no G1) sejam comparados. No entanto, essa padronização, chamada externa, como ambas as amostras, pode não ser a ideal (DOLEZEL; GREILHUBER, 2010). Price, Hodnett e Johnston (2000) relataram que para o processamento simultâneo de amostras a partir do alvo e das espécies-padrão foi necessária a obtenção de estimativas confiáveis de DNA. Contudo, a escolha e o uso correto dos padrões de referência são um critério que tem sido largamente negligenciado (DOLEZEL et al., 1998).

É comum o uso de apenas um padrão de referência em todas as análises de um mesmo experimento, entretanto o uso de um único padrão para o conjunto implica o risco de erro devido à não-linearidade (BENETT; LEITCH, 2011; GREGORY, 2009). O padrão vegetal a ser usado deve ter um conteúdo de DNA próximo, nunca sobreposto, aos picos da planta que se deseja analisar (JOHNSTON et al., 1999).

#### 2.5.4 Fluorocromos

Além do padrão de referência, uma questão importante na citometria de fluxo é o uso dos fluorocromos, pois estes se ligam ao DNA, o que interfere diretamente na qualidade das análises que dependem da intensidade de fluorescência dos núcleos ou das células em suspensão, embora a escolha deste dependa do tipo da análise a ser feita (DOLEZEL, 1991). Por isso, segundo Dolezel et al. (1992 citados por BUITENDIJK; BOON; RAMANNA, 1997), o ideal é o uso de fluorocromos intercalantes, ou seja, sem preferência por pares de base, pois, na maioria dos indivíduos, a razão AT:GC do DNA não é conhecida.

Em geral, existem duas classes de fluorocromo utilizadas em citometria de fluxo: as que se ligam não covalentemente às estruturas dentro da célula e as que são covalentemente ligadas a outras sondas (ORMEROD, 2008).

A Mitramicina, a Cromomicina e a Olivomicina, três antibióticos fluorescentes, são altamente específicos a moléculas de DNA. A ligação entre eles ocorre preferencialmente em regiões ricas em G-C (DYKE; DERVAN, 1983), enquanto os corantes Hoechst (33342 e 33258), também específicos para DNA, se ligam a regiões ricas em A-T (PORTUGAL; WARING, 1988). O uso desses corantes pode levar a muitas estimativas incorretas de valores do conteúdo DNA.

O corante DAPI (4'6-diamidino-2-phenylindole) é mais popular que os anteriores e isso pode ser explicado por duas razões: não é influenciado pela estrutura da cromatina, o que resulta em baixos picos de baixo coeficiente de variação (COWDEN; CURTIS, 1981); e a fluorescência ocasionada pelo DAPI, por meio de citômetros de fluxo, é relativamente fácil de ocorrer e medir.

Dolezel, Sgorbati e Lucretti (1992), testando três fluorocromos (DAPI, Iodeto de Propídeo e Mitramicina), obtiveram valores diferentes. Os autores mostraram que a preferência de bases específicas por esses compostos foi significativamente diferente.

Para Michaelson et al. (1991) e Yanpaisan, King e Doran (1999), o Iodeto de Propídeo, por ser intercalante e pelos menores coeficientes de variação obtidos na sua utilização, é o fluorocromo mais indicado para a determinação da quantidade de DNA.

Johnston et al. (1999) também recomendam o uso de Iodeto de Propídeo como fluorocromo na determinação da quantidade do DNA genômico em plantas. Price e Johnston (1996) relataram que, já que o iodeto de propídeo e o brometo de etídeo (LE PECQ; PAOLETTI, 1967) não coram especificamente o DNA, assim como o RNA, a eficiência da determinação do conteúdo de DNA nuclear depende do uso de RNase. Já Dolezel e Bartos (2005) concluíram que o tratamento com RNase só é essencial para os tecidos submetidos a altos níveis de proteína, tais como meristemas e sementes. Em tecidos foliares, a adição dessa enzima pode não ser tão essencial.

#### **2.5.5 Aplicações da citometria de fluxo vegetal**

Na sequência da descoberta do papel-chave do DNA em biologia (WATSON; CRICK, 1953), a investigação dessa molécula vem aumentando sucessivamente a cada década, tendência que tem se intensificado no século 21.

Atualmente, até 20 parâmetros diferentes podem ser analisados por meio de uma combinação de distintos fluoróforos e medidas de dispersão de luz. A tal estudo se dá o nome de abordagem de análise de fluxo policromático (CHATTOPADHYAY et al., 2006; PERFETTO; CHATTOPADHYAY; ROEDERER, 2004).

Duas das aplicações mais populares acerca da citometria de fluxo são a medida do conteúdo de DNA celular e a da análise do ciclo celular. Assim, diversos protocolos de medição de DNA têm sido desenvolvidos, incluindo análise bivariada relacionada à citoqueratina/análise DNA/análise DNA por meio da BrdU, nucleosídeo sintético similar à timina usada no estudo do ciclo celular, e medição multiparamétrica de conteúdo de DNA celular. Essas análises têm sido realizadas em paralelo com o desenvolvimento de software comercial para a análise do ciclo celular (NUNEZ, 2001).

A citometria é usualmente utilizada na verificação de culturas mantidas *in vitro* e de nível da ploidia de plantas regeneradas por essa técnica. Além de também ser utilizada na identificação do sexo de plantas, alguns autores empregaram-na na identificação das bases que compõem o DNA por meio da comparação de intensidades de fluorescência de núcleos corados com fluorocromos intercalantes e específicos para determinadas bases. A técnica pode determinar ainda o modo de reprodução das espécies e, como uma aplicação também atraente, é a análise do efeito de compostos genotóxicos no conteúdo de DNA nuclear (LOUREIRO, 2007).

Existem poucos estudos que aplicam a técnica da citometria de fluxo para seleção de culturas *in vitro*, produção de metabólitos secundários e monitoramento de bioprocessos (YANPAISAN; KING; DORAN, 1999).

A quantidade de DNA nuclear de diplóides de bananeira foi estimada por Dolezel, Dolezelová e Novák (1994). Hülgenhof et al. (1988), trabalhando com cereais, utilizaram a citometria de fluxo com o mesmo intuito.

A citometria também foi utilizada por Roux et al. (2001) na detecção de mixoploidia e aneuploidia (ROUX et al., 2003), avaliação do grau de polisomatia (BAROW; MEISTER, 2002), vias de reprodução (MATZK; MEISTER; SCHUBERT, 2000), celular e cinética do ciclo (SANDOVAL; HOCKER; VERDEIL, 2003).

## 2.6 Redes neurais artificiais

As redes neurais artificiais (RNAs) envolvem modelos matemáticos baseados na constituição estrutural do cérebro, onde neurônios artificiais estão também conectados em rede. As RNAs possuem capacidade de processamento e organização, tendo por consequência resultados inteligentes (ANDRADE, 2010).

As RNAs possuem diversas aplicações e podem ser feitas em várias áreas cujas principais são: sistemas de controle (WHITE; SOFGE, 1992), reconhecimento de padrões (BISHOP, 1995) e aproximação de funções (ZUBEN, 1996).

Esse tipo de rede pode generalizar através de exemplos imperfeitos (ruídos) e pode ainda extrair informações essenciais das entradas com dados tanto relevantes como irrelevantes.

As principais aplicações das RNAs são: reconhecimento de padrões e classificação, agrupamento ou categorização, aproximação de funções e modelagem, previsão, otimização e controle.

### 2.6.1 Neurônio artificial

A unidade básica das redes neurais é o neurônio. MacCulloch e Pitts (1943) apresentaram um modelo básico de um neurônio simples (Figura 1) que, apesar de apresentar somente uma saída (LIMA, 2005).

As entradas do neurônio correspondem ao vetor de entrada  $X = [x_1, x_2, \dots, x_n]$ . Para cada entrada, há um peso correspondente. A soma ponderada

das entradas com seus respectivos pesos é chamada de saída linear  $u$ . A saída de ativação  $y$  é obtida a partir da função de ativação  $f$ .

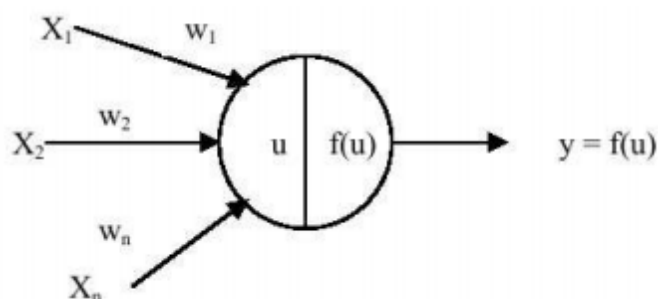


Figura 1 Modelo de neurônio de MacCulloch e Pitts (1943). UFLA, Lavras-MG, 2011. Fonte Adaptado de Karrer et al. (2005).

A função de ativação pode ser de vários tipos. As mais usadas são a linear, a tangente hiperbólica e a sigmoide. Essa função de ativação determinará se a saída do neurônio é linear ou semilinear.

### 2.6.2 Arquitetura das redes neurais artificiais

A arquitetura da Rede Neural Artificial depende da forma como os neurônios estão organizados. Tal organização depende do tipo de problema a ser solucionado. O tipo de arquitetura é fundamental para determinar os algoritmos de aprendizado a serem utilizados, os quais podem ser *feed-forward*, *feed-back* e auto-organizáveis.

### 2.6.3 Redes neurais de múltiplas camadas ou *Multilayer Perceptron*

As redes neurais de Múltiplas Camadas ou *Multilayer Perceptron* (MLP), com os neurônios organizados em duas ou mais camadas, são

atualmente as mais usadas. Na camada de entrada, não é realizado qualquer processamento. As camadas intermediárias são também chamadas de camadas escondidas, e os neurônios da última camada, responsáveis pelas conclusões, são formadores da camada de saída (Figura 2). O número de camadas escondidas, também chamadas de camadas intermediárias, varia de acordo com o problema e com a precisão desejada, devendo-se, portanto, realizar diversos testes para se conhecer a melhor alternativa (SOARES, 2011).

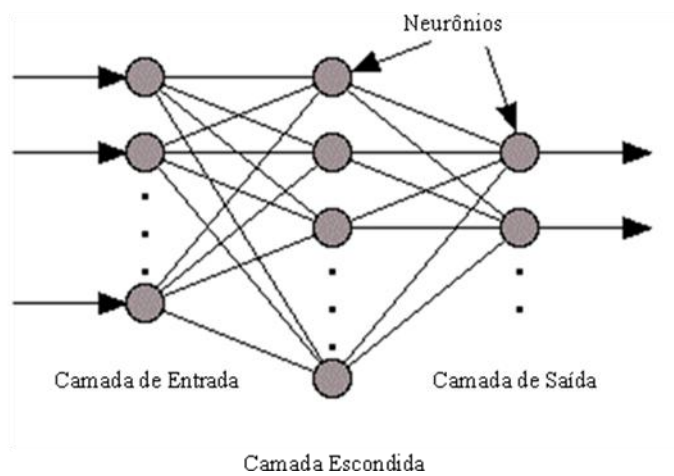


Figura 2 Perceptron multicamadas com uma camada escondida. UFLA, Lavras-MG, 2011.

Fonte Adaptado de Dawson et al. (2011)

Esse tipo de rede é denominado rede direta ou *feedforward*, pois o sentido de propagação parte dos neurônios de entrada para os neurônios de saída somente (CINTRA, 2010). Essa é usada principalmente em problemas que envolvem classificação e regressão.



O algoritmo de treinamento desse tipo de rede é o *backpropagation* ou Regra Delta Generalizada. Esse treinamento compreende o ajuste dos pesos com o intuito de se obter a saída desejada com o menor erro quadrático médio, o qual se refere à diferença elevada ao quadrado do valor estimado e do valor real. Esse processo é feito com dados de entrada e com respostas já estabelecidas: as saídas desses dados são comparadas com as respostas reais e, assim, é obtido o erro. Isso é repetido várias vezes até que se obtenha um erro aceitável. Esse número de vezes é chamado de época e a esse tipo de treinamento dá-se o nome de supervisionado.

Esse treinamento é realizado com um conjunto de dados. Nesse conjunto devem existir todas as saídas possíveis e em número razoável para não comprometer a qualidade dos resultados (ANDRADE, 2010).

#### 2.6.4 *Backpropagation*, um algoritmo de treinamento

Rumelhart e McClelland (1986) propuseram um algoritmo de treinamento que se divide em duas fases: a *forward*, quando o padrão é propagado da camada de entrada à camada de saída sem que haja alguma alteração nos pesos, e a *backward*, quando o erro calculado é retropropagado e ocorre o reajuste dos pesos, algoritmo denominado *backpropagation* (Figura 3).

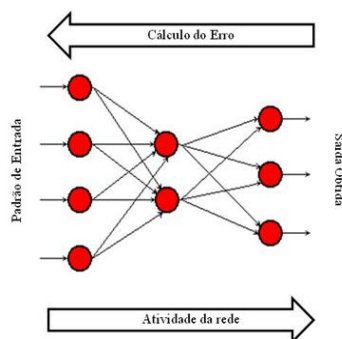


Figura 3 Direções da atividade da rede e do cálculo do erro. UFLA, Lavras-MG, 2011.  
Fonte Rumelhart, Hinton e Williams (1986)

Esse é atualmente o algoritmo de aprendizagem mais utilizado (MÁSSON; WANG, 1990; REFENES, 1993).

#### **2.6.5 Uso das redes neurais artificiais na solução de problemas agrícolas**

As RNAs podem ser aplicadas em diversos campos, desde atividades de pesquisa a aplicações comerciais e industriais. No contexto agrícola, as RNAs podem ser empregadas na previsão de comportamento de pragas e doenças, na avaliação da viabilidade econômica de diversas culturas, na classificação de terras para irrigação, sementes e espécies e, com maior destaque, no controle de elementos meteorológicos.

As RNAs podem definir quais variáveis climáticas influenciam significativamente no molhamento foliar por orvalho, por exemplo. Mathias (2006) verificou que o algoritmo de treinamento do tipo *backpropagation* não foi eficiente, pois apresentou maiores taxas de erro do que os outros analisados. No caso, a inclusão do horário de molhamento influenciou na qualidade dos resultados da RNA.

Pinto et al. (2002) utilizaram 29 variáveis climáticas na elaboração de uma RNA para descrever a epidemia da ferrugem do cafeeiro (*Coffea arabica*). A rede, que se mostrou eficiente para descrever a epidemia, com erro médio de 1,17%, demonstrou a utilidade das RNAs para descrever fenômenos e detectar padrões.

A fim de avaliar a eficiência das redes neurais na predição de índices zootécnicos, utilizou como dados de entrada a temperatura do ar e a frequência respiratória de porcas gestantes e, como variável de saída, o peso ao nascimento e o número de leitões mumificados e RNA do tipo Múltiplas Camadas juntamente com o algoritmo de treinamento do tipo *backpropagation*. A rede

neural apresentou altos valores de predição das variáveis respostas, as quais podem ser utilizadas em sistema de criação de suínos (PANDORFII, 2011).

Utilizando Rede Neural de Múltiplas Camadas, Bucene e Rodrigues (2004), com uma camada intermediária com cinco neurônios, encontraram resultados satisfatórios para a classificação de terras para irrigação utilizando, como parâmetros de treinamento, aspectos químicos do solo, tais como pH, CTC, V%, P, Mg e K.

Empregando imagens de sementes de soja e posterior pré-processamento dessas imagens, Shahin, Symons e Poysa (2006), com a utilização da RNA e de métodos estatísticos, classificaram essas sementes com base na uniformidade das suas dimensões. Os resultados se mostraram eficientes se comparados com a inspeção visual.

A determinação de variáveis, o que explica a maior parte da variação de produtividade de amora-preta (*Rubus glaucus*), foi possível utilizando RNA. Os padrões de entrada foram obtidos em um banco de dados meteorológicos e em dados fornecidos por produtores. A RNA se mostrou eficiente na gestão de informações oriundas de agricultores (JIMÉNEZ et al., 2009).

## REFERÊNCIAS

ABRAHÃO, E. et al. Influência de diferentes tipos de poda no desenvolvimento e produção da figueira (*Ficus carica* L.) Roxo de Valinhos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 12, n. 2, p. 27-31, abr./jun. 1990.

ALDWINCKLE, H.; NORELLI, J. Improvement of apple varieties and rootstocks by biotechnology. **The Compact Fruit Tree**, Hirosaki, v. 13, n. 2, p. 51-52, 2000.

ÁLVARES, V. S. **Amadurecimento e qualidade da banana ‘Prata’ (*Musa* AAB subgrupo Prata) submetida a diferentes concentrações de etileno**. 2003. 70 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2003.

ANDRADE, R. G. **Classificação das castanhas do Brasil por origem e seleção de suas amêndoas utilizando visão computacional**. 2010. 64 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Elétrica) - Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

ASSUNÇÃO, C. **Doenças e pragas de figueira**. Lisboa: Direcção Regional de Agricultura e Pescas de Lisboa e Vale do Tejo, 2008. 2 p. (Boletim Técnico).

BAIRD, W. V.; ESTAGER, A. S.; WELLS, J. K. Estimating nuclear DNA content in peach and related diploid species using laser flow cytometry and DNA hybridization. **Journal American Society for Horticultural Science**, Lisboa, v. 119, n. 6, p. 1312-1316, Nov. 1994.

BARBOSA, W. et al. **Melhoramento do pessegueiro para regiões de clima subtropical-temperado**: realizações do Instituto Agrônômico no período de 1950-1990. Campinas: Instituto Agrônômico, 1997. 22 p.

BAROW, M.; MEISTER, A. Lack of correlation between AT frequency and genome size in higher plants and the effect of nonrandomness of base sequences on dye binding. **Cytometry**, Hoboken, v. 47, n. 1, p. 1-7, Mar. 2002.

BENNETT, M. D.; LEITCH, I. J. Nuclear DNA amounts in angiosperms. **Annals of Botany**, Bristol, v. 76, n. 2, p. 113-176, June 1995.

\_\_\_\_\_. **Plant DNA C-values database**. Disponível em:  
<<http://data.kew.org/cvalues/>>. Acesso em: 2 jul. 2011.

BISHOP, C. M. **Neural networks for pattern recognition**. New York: Oxford University, 1995. 482 p.

BONETTA, L. Flow cytometry smaller and better. **Nature Methods**, New York, v. 2, n. 10, p. 785-795, Oct. 2005.

BUCENE, L. C.; RODRIGUES, L. H. A. Utilização de redes neurais artificiais para avaliação de produtividade do solo, visando classificação de terras para irrigação. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 8, n. 2/3, p. 326-329, 2004.

BUITENDIJK, J. H.; BOON, E. J.; RAMANNA, M. S. Nuclear DNA content in twelve species of *Alstroemeria* L. and some of their hybrids. **Annals of Botany**, Oxford, v. 79, n. 4, p. 343-353, Apr. 1997.

CAMPOS, J. M. S. **Obtenção de variedades hexaplóides e análise genômica de *Pennisetum sp.* por citometria de fluxo**. 2007. 115 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2007.

CHATTOPADHYAY, P. K. et al. Quantum dot semiconductor nanocrystals for immunophenotyping by polychromatic flow cytometry. **Nature Medicine**, New York, v. 12, n. 8, p. 972-977, Aug. 2006.

CHIN, H. F. Germination and storage of banana seeds. In: NEW FRONTIERS IN RESISTANCE BREEDING FOR NEMATODE, FUSARIUM AND SIGATOKA WORKSHOP, 1., 1995, Kuala Lumpur. **Proceedings...** Montpellier: International Network for the Improvement of Banana and Plantain, 1996. p. 218-227.

CINTRA, R. S. C. **Assimilação de dados com redes neurais artificiais em modelo de circulação**. 2010. 172 p. Tese (Doutorado em Computação Aplicada) - Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais, São José dos Campos, 2010.

CÔRTE-REAL, M. et al. Contributos da citologia analítica para estudos de biologia de leveduras. **Boletim de Biotecnologia**, Porto, v. 71, n. 1, p. 19-33, 2002.

COWDEN, R. R.; CURTIS, S. K. Cephalopods. In: \_\_\_\_\_. **Invertebrate blood cells: general aspects, animals without true circulatory systems to cephalopods**. New York: Academic, 1981. p. 301-323.

DANNER, M. **Métodos de melhoramento de plantas de propagação assexuada**. Disponível em:

<<http://www.bespa.agrarias.ufpr.br/paginas/livro/Texto%20resumo%20melhoramento%20fruteiras.pdf>>. Acesso em: 18 jun. 2011.

DAWSON, C. W. et al. **Modelling ranunculus presence in the rivers test and itchen using artificial neural networks**. Disponível em:

<<http://www.geocomputation.org/2000/GC016/Gc016.htm>>. Acesso em: 1 jul. 2011.

DOLEZEL, J. Applications of flow cytometry for the study of plant genomes. **Journal of Applied Genetics**, Poznan, v. 38, n. 3, p. 285-302, June 1997.

\_\_\_\_\_. Flow cytometric analysis of nuclear DNA content in higher plants. **Phytochemical Analysis**, Sussex, v. 2, n. 4, p. 143-154, Dec. 1991.

DOLEZEL, J.; BARTOS, J. Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. **Annals of Botany**, London, v. 95, n. 1, p. 99-110, Dec. 2005.

DOLEZEL, J.; BINAROVÁ, P.; LUCRETTI, S. Analysis of nuclear DNA content in plant cells by flow cytometry. **Biologia Plantarum**, Copenhagen, v. 31, n. 2, p. 113-120, Mar. 1989.

DOLEZEL, J.; DOLEZELOVÁ, M.; NOVÁK, F. Flow cytometric estimation of nuclear DNA amount in diploid bananas (*Musa acuminata* and *M. balbisiana*). **Biologia Plantarum**, Copenhagen, v. 36, n. 3, p. 351-357, Sept. 1994.

DOLEZEL, J. et al. Plant genome size estimation by flow cytometry: inter-laboratory comparison. **Annals of Botany**, London, v. 82, n. 1, p. 17-26, Feb. 1998.

DOLEZEL, J.; GOHDE, W. Sex determination in dioecious plants *Melandrium album* and *M. rubrum* using high-resolution flow-cytometry. **Cytometry**, New York, v. 19, n. 1, p. 103-106, Apr. 1995.

DOLEZEL, J.; GREILHUBER, J. Nuclear genome size: are we getting closer? **Cytometry Part A**, New York, v. 77A, n. 7, p. 635-642, July 2010.

DOLEZEL, J.; GREILHUBER, J.; SUDA, J. Flow cytometry with plants: an overview. In: \_\_\_\_\_. **Flow cytometry with plant cells: analysis of genes, chromosomes and genomes**. Weinheim: Wiley-VCH, 2007. p. 41-65.

DOLEZEL, J.; SGORBATI, S.; LUCRETTI, S. Comparison of three DNA fluorochromes for flow cytometric estimation of nuclear DNA content in plants. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 85, n. 4, p. 625-631, Aug. 1992.

DONINI, B. Breeding methods and applied mutagenesis in fruit plants. In: WORKSHOP EUROPEAN COMMUNITY, 1., 1976, Wageningen. **Proceedings...** Wageningen: University of Wageningen, 1976. p. 445-478.

DYKE, W. W. van; DERVAN, P. B. Chromomycin, mithramycin and olivomycin binding sites on heterogeneous deoxyribonucleic acid: footprinting with (methidiumpropyl-EDTA) iron(II). **Biochemistry**, Washington, v. 22, n. 10, p. 2373-2377, May 1983.

ECKHAUT, T.; LEUS, L.; HUYLENBROECK, J. V. Exploitation of flow cytometry for plant breeding. **Acta Physiologiae Plantarum**, Pozann, v. 27, n. 4B, p. 743-750, 2005.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Cultivo do pessegueiro**. Brasília, 2005. Disponível em: <<http://www.cpact.embrapa.br/publicacoes/catalogo/tipo/sistemas/pessego/autor.es.htm>>. Acesso em: 20 jun. 2011.

EMPRESA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA E EXTENSÃO RURAL DE SANTA CATARIANA. **Manual da cultura da macieira**. Florianópolis, 1986. 562 p.

FACHINELLO, J. C. Problemática das mudas de plantas frutíferas de caroço. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE FRUTAS DE CAROÇO, PÊSSEGOS, AMEIXAS E NECTARINAS, 1., 2000, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: UFRGS, 2000. v. 1, p. 25-40.

FACHINELLO, J. C.; MARODIN, G. A. B. Implantação de pomares. In: MONTEIRO, L. B. et al. (Org.). **Fruteiras de caroço: uma visão ecológica**. Curitiba: UFPR, 2004. p. 33-48.

FERNANDES, L. A. et al. Fertilidade do solo, nutrição mineral e produtividade da bananeira irrigada por dez anos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, n. 11, p. 1575-1581, nov. 2008.

FERRAZ, C. C. B.; PEREIRA, F. M.; BOLONHEZI, A. C. Danos causados por nematoides de galhas em mudas de figueira variedade Roxo-de-Valinhos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 2, n. 2, p. 47-53, 1980.

FERREIRA, E. A. et al. *In vitro* sensivity of fig plantlets to gamma rays. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 66, n. 4, p. 540-542, 2009.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Final 2009 data now available**. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>>. Acesso em: 16 jun. 2011.

FREITAS, W. S.; RAMOS, M. M.; COSTA, S. L. Demanda de irrigação da cultura da banana na bacia do Rio São Francisco. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 12, n. 4, p. 343-349, 2008.

FURLAN, C. R. C. et al. Resistência genética dos acessos do banco de germoplasma de macieira da epagri à mancha foliar de glomerella (*Colletotrichum gloeosporioides*). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 32, n. 2, p. 507-514, 2010.

GALBRAITH, D. W. et al. Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissues. **Science**, New York, v. 220, n. 4601, p. 1049-1051, June 1983.

GOMES, R. P. **Fruticultura brasileira**. 11. ed. São Paulo: Nobel, 1983. 634 p.

GREGORY, T. R. **Animal genome size database**. Disponível em: <<http://www.genomesize.com>>. Acesso em: 11 jul. 2011.

GUCKER, F. T. et al. Photoelectric counter for colloidal particles. **Journal of the American Chemical Society**, Washington, v. 69, p. 2422-2431, 1947.

GUIMARÃES, N. C. C. et al. Identificação de variantes somaclonais em bananeiras 'Prata Anã', utilizando técnicas moleculares e citogenéticas. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, n. 2, p. 448-454, mar./abr. 2009.

HAUAGGE, R. Melhoramento genético de fruteiras de clima temperado para adaptação a regiões subtropicais. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE FRUTEIRAS, 2., 2000, Viçosa, MG. **Anais...** Viçosa, MG: UFV, 2000. p. 56-81.



HELLER, F. O. DNS-Bestimmung an keimwurzeln von *Vicia faba* L. mit hilfe der impulsphotometrie. **Berichte der Deutschen Gesellschaft Botanischen**, Berlin, v. 86, p. 437-441, 1973.

HERTER, F. G.; SACHS, S.; FLORES, C. A. Condições edafo-climáticas para instalação do pomar. In: MEDEIROS, C. A. B.; RASEIRA, M. C. B. (Org.). **A cultura do pessegueiro**. Brasília: EMBRAPA, 1998. p. 20-27.

HÖFER, M.; MEISTER, A. **Genome size variation in *Malus* species**. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/jb/2010/480873/>>. Acesso em: 27 jun. 2006.

HÜLGENHOF, E. et al. Flow cytometric determination of DNA content in isolated nuclei of cereals. **Genome**, Ottawa, v. 30, n. 4, p. 565-569, July 1988.

INSTITUTO AGRONÔMICO DO PARANÁ. **Macieira Eva**. Disponível em: <<http://www.iapar.br/arquivos/File/folhetos/maciera/maciera.html>>. Acesso em: 26 jun. 2011.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção agrícola municipal**. Rio de Janeiro, 2009. Disponível em: <<http://www.IBGE.ibge.gov.br/bda/tabela/listabl1.asp?c=1613&n=0&u=0&z=p&o=23&i=P>>. Acesso em: 5 jun. 2011.

JENNY, C. F. et al. Les bananiers. In: HAMON, P. et al. (Ed.). **Diversité génétique des plantes tropicales**. Montpellier: Cirad, 1999. p. 113-139.

JIMÉNEZ, D. et al. Analysis of andean blackberry (*Rubus glaucus*) production models obtained by means of artificial neural networks exploiting information collected by small-scale growers in Colombia and publicly available meteorological data. **Computers and Electronics in Agriculture**, Toowoomba, v. 69, n. 2, p. 198-208, 2009.

JOHNSTON, J. S. et al. Reference standards for determination of DNA content of plant nuclei. **Journal of the American Chemical Society**, Washington, v. 86, n. 5, p. 609-613, May 1999.

KACHEL, V.; MESSESCHMIDT, R.; HUMMEL, P. Eight-Parameter PC-AT based flow cytometric data system. **Cytometry**, New York, v. 11, n. 7, p. 805-812, Mar. 1990.

KARRER, D. et al. Redes neurais artificiais: conceitos e aplicações. In: PROFUNDAO - ENCONTRO DE ENGENHARIA DE PRODUÇÃO DA UFRJ, 9., 2005, Rio de Janeiro. **Anais...** Rio de Janeiro: UFRJ, 2005. 1 CD-ROM.

KORBAN, S. S. et al. Genome size and nucleotypic variation in *Malus* germplasm. **Genome**, Ottawa, v. 52, n. 2, p. 148-155, Feb. 2009.

LE PECQ, J. B.; PAOLEFFL, C. A fluorescent complex between ethidium bromide and nucleic acids: physical-chemical characterization. **Journal of Molecular Biology**, La Jolla, v. 27, p. 87-106, 1967.

LIMA, I. V. M. **Uma abordagem simplificada de detecção de intrusão baseada em redes neurais artificiais**. 2005. 94 f. Dissertação (Mestrado em Ciencia da Computação) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

LOUREIRO, J. C. M. **Flow cytometric approaches to plant genomes**. 2007. 246 p. Tese (Doutorado em Biologia) - Universidade de Aveiro, Coimbra, 2007.

LOUREIRO, J. C. M. et al. Comparison of four nuclear isolation buffers for plant DNA flow cytometry. **Annals of Botany**, London, v. 98, n. 1, p. 679-689, July 2006a.

\_\_\_\_\_. Flow cytometric and microscopic analysis of the effect of tannic acid on plant nuclei and estimation of DNA content. **Annals of Botany**, London, v. 98, n. 3, p. 515-527, Sept. 2006b.

\_\_\_\_\_. Two new nuclear isolation buffers for plant DNA flow cytometry: a test with 37 species. **Annals of Botany**, London, v. 100, n. 4, p. 875-888, Oct. 2007.

LOUREIRO, J. C. M.; SANTOS, C. Aplicação da citometria de fluxo ao estudo do genoma vegetal. **Boletim de Biotecnologia**, São Paulo, v. 77, p. 18-29, abr. 2004.

MARIE, D.; BROWN, S. C. Acytometric exercise in plant DNA histograms, with 2c values for seventy species. **Biology of the Cell**, London, v. 78, n. 1, p. 41-51, 1993.

MARTINELLO, G. E. et al. Divergência genética em acessos de quiabeiro com base em marcadores morfológicos. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 20, n. 1, p. 52-58, jan./fev. 2001.

MASSON, E.; WANG, Y. Introduction to computation and learning in artificial neural networks. **European Journal of Operational Research**, North-Holand, v. 47, n. 1, p. 1-28, June 1990.

MATHIAS, I. M. **Aplicação de redes neurais artificiais na análise de dados de molhamento foliar por orvalho**. 2006. 120 p. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2006.

MATZK, F.; MEISTER, A.; SCHUBERT, I. An efficient screen for reproductive pathways using mature seeds of monocot and dicots. **The Plant Journal**, Michigan, v. 21, n. 1, p. 97-108, Feb. 2000.

MCCULLOCH, W.; PITTS, W. A logical calculus of the ideas immanent in nervous activity. **Bulletin of Mathematical Biophysics**, Oxford, v. 7, p. 115-133, 1943.

MICHAELSON, M. J. et al. Comparison of plant DNA contents determined by feulgen microspectrophotometry and laser flow cytometry. **American Journal of Botany**, Saint Louis, v. 78, n. 1, p. 183-188, Apr. 1991.

NOIROT, M. et al. Effects of caffeine and chlorogenic acid on propidium iodide accessibility to DNA: consequences on genome size evaluation in coffee tree. **Annals of Botany**, London, v. 92, n. 2, p. 259-264, Aug. 2003.

\_\_\_\_\_. Nucleus: cytosol interaction: a source of stoichiometric error in flow cytometric estimation of nuclear DNA content in plants. **Annals of Botany**, London, v. 86, n. 2, p. 309-316, Aug. 2000.

NUNEZ, R. DNA measurement and cell cycle analysis by flow cytometry. **Current Issues in Molecular Biology**, Norwich, v. 3, n. 3, p. 67-70, 2001.

OCHATT, S. J. Flow cytometry in plant breeding. **Cytometry Part A**, New York, v. 73A, n. 7, p. 581-598, July 2008.

\_\_\_\_\_. **Flow cytometry: ploidy determination, cell cycle analysis, DNA content per nucleus**. Disponível em:  
<<http://www.noble.org/medicagohandbook/index.html>>. Acesso em: 18 jun. 2011.

OHRI, D.; KHOSHOO, T. N. Nuclear DNA contents in the genus *Ficus* (Moraceae). **Plant Systematics and Evolution**, Viena, v. 156, n. 1, p. 1-4, 1987.

OLIVEIRA, R. et al. Frequência de variedades em cruzamentos entre tangerina “Cravo” e laranja “Pêra”: análise de marcadores morfológicos e RAPD. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, n. 9, p. 1895-1903, set. 2000.

ORMEROD, M. **Flow cytometry: a basic introduction**. Oxford: BPR, 2008. 116 p.

OTTO, F. DAPI staining of fixed cells for high-resolution flow cytometry of nuclear DNA. In: CRISSMAN, H. A.; DARZYNKIEWICZ, Z. (Ed.). **Methods in cell biology**. New York: Academic, 1990. p. 105-110.

PANDORFI, H. et al. Uso de redes neurais artificiais para predição de índices zootécnicos nas fases de gestação e maternidade na suinocultura. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 40, n. 3, p. 676-681, maio/jun. 2011.

PEARSE, A. G. E. **Histochemistry: theoretical and applied**. Boston: Little, 1986. 998 p.

PEREIRA, F. M. **Cultura da figueira**. Piracicaba: Livroceres, 1981. 73 p.

PERFETTO, S. P.; CHATTOPADHYAY, P. K.; ROEDERER, M. Seventeen-colour flow cytometry: unravelling the immune system. **Nature Reviews Immunology**, London, v. 4, n. 8, p. 648-655, Aug. 2004.

PETRI, J. L. et al. **Dormência e indução da brotação de fruteiras de clima temperado**. Florianópolis: EPAGRI, 1996. 110 p. (Boletim Técnico, 75).

PETRI, J. L.; LEITE, G. B.; PUTTI, G. L. Apple tree budbreak promoters in mild winter conditions. **Acta Horticulturae**, Leuven, v. 774, p. 291-296, Dec. 2008.

PFOSSER, M. et al. Evaluation of sensitivity of flow cytometry in detecting aneuploidy in wheat using disomic and ditelosomic wheat-rye addition lines. **Cytometry**, New York, v. 21, n. 4, p. 387-393, Dec. 1995.

PILLAY, M. et al. Molecular characterization of genomes in *Musa* and its applications. In: JAIN, S.; SWENNEN, R. (Ed.). **Banana improvement:**

cellular, molecular, biology and induced mutations. New York: Science, 2008. p. 271-286.

PINTO, A. C. S. et al. Descrição da epidemia da ferrugem do cafeeiro com redes neuronais. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, n. 5, p. 517-524, set./out. 2002.

PINTO, G. et al. Analysis of the genetic stability of *Eucalyptus globulus* Labill. somatic embryos by flow cytometry. **Theoretical and Applied Genetics**, Heidelberg, v. 109, n. 3, p. 580-587, Aug. 2004.

PIO, L. A. S. **Indução e identificação de ploidia em bananeira (*Musa acuminata*, Colla)**. 2007. 72 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2007.

PORTUGAL, J.; WARING, M. Assignment of DNA binding sites for dapi and bisbenzimidazole (hoechst 33258): comparative footprinting study. **Biochimica et Biophysica Acta**, Alberta, n. 949, p. 158-168, 1988.

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

PRICE, H. J.; JOHNSTON, J. S. Influence of light on DNA content of *Helianthus annuus* Linnaeus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 93, n. 22, p. 11264-11267, Oct. 1996.

PUTTI, G. L.; PETRI, J. L.; MENDEZ, M. E. Temperaturas efetivas para a dormência da macieira (*Malus domestica* Borkh). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 25, n. 2, p. 210-212, mar./abr. 2003.

RASEIRA, A.; NAKASU, B. H. Cultivares. In: RASEIRA, M. C. B.; CENTELLASQUEZADA, A. **Pêssego: produção**. Brasília: EMBRAPA Informação Tecnológica, 2003. p. 41-59.

RAYBURN, A. L.; AUGER, J. A.; MCMURPHY, L. M. Estimating percentage constitutive heterochromatin by flow cytometry. **Experimental Cell Research**, Estocolmo, v. 1, n. 198, p. 175-178, 1992.

REFENES, A. N. Currency exchange rate prediction and neural network design strategies. **Neural Computing and Applications Journal**, London, v. 1, n. 1, p. 46-58, Apr. 1993.

- ROBINSON, J. P. **Introduction to flow cytometry**: flow cytometry talks. Purdue: Purdue University Cytometry Laboratory, 2006. Disponível em: <<http://www.cyto.purdue.edu/flowcyt/educate/pptslide.html>>. Acesso em: 26 jun. 2011.
- RODRIGUES, M. G. F.; CORREA, L. S.; BOLIANI, A. C. Avaliação de seleções mutantes de figueira variedade Roxo-de-Valinhos. **Revista Brasileira Fruticultura**, Jaboticabal, v. 31, n. 3, p. 771-777, maio/jun. 2009.
- RODRIGUES, M. M.; MELO, M. D.; ALOUGA, M. A. I. Propagação vegetativa in vitro e análise estrutural de macieira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 1, p. 171-173, jan. 2006.
- ROUX, N. et al. Effectiveness of three micropropagation techniques to dissociate cytochimeras in *Musa* spp. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Urbana, v. 66, n. 3, p. 189-197, Sept. 2001.
- \_\_\_\_\_. Rapid detection of aneuploidy in *Musa* using flow cytometry. **Plant Cell Reports**, New Jersey, v. 21, n. 5, p. 483-490, Jan. 2003.
- RUMELHART, D. E.; HINTON, G. E.; WILLIAMS, R. J. Learning representations by backpropagating errors. **Nature**, London, v. 1986, n. 323, p. 533-536, Oct. 1986.
- RUMELHART, D. E.; MCCLELLAND, J. L. **Parallel distributed processing**: explorations in the microstructure of cognition. Cambridge: MIT, 1986. 567 p.
- SANDOVAL, A.; HOCKER, V.; VERDEIL, J. L. Flow cytometric analysis of the cell cycle in different coconut palm (*Cocos nucifera* L.) tissues cultured in vitro. **Plant Cell Reports**, New Jersey, v. 22, n. 1, p. 25-31, Feb. 2003.
- SANTOS, V. P. et al. Fertirrigação da bananeira variedade fertirrigação da bananeira variedade Prata-Anã com N e K em um argissolo vermelho-amarelo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 31, n. 2, p. 567-573, jun. 2009.
- SATO, A. J.; ROBERTO, S. R. **A cultura da macieira no interior do Paraná**. Disponível em: <[http://www.uepg.br/uepg\\_departamentos/defito/htm/labiovegetal/Maca.pdf](http://www.uepg.br/uepg_departamentos/defito/htm/labiovegetal/Maca.pdf)> . Acesso em: 26 jun. 2011.

SHAHIN, M. A.; SYMONS, S. J.; POYSA, V. W. Determining soybean seed size uniformity with image analysis. **Biosystems Engineering**, Saint Albans, v. 94, n. 2, p. 191-198, Apr. 2006.

SHAPIRO, H. M. The evolution of cytometers. **Cytometry Part A**, New York, v. 58A, n. 1, p. 13-20, 2004.

SILVA NETO, S. P. da; GUIMARÃES, T. G. **Evolução da cultura da banana no Brasil e no mundo**. Planaltina: EMBRAPA Cerrados, 2011. Disponível em: <<http://www.cpac.embrapa.br/noticias/artigosmidia/publicados/287/>>. Acesso em: 5 jan. 2011.

SOARES, J. D. R. **Modelagem matemática na previsão de colheita de bananeira**: regressão linear múltipla x redes neurais artificiais. 2011. 113 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.

TATUM, T. C. et al. Variation in nuclear DNA content in *Malus* species and cultivated apples. **Genome National Research Council Canada Genome Conseil National de Recherches**, Ottawa, v. 48, n. 5, p. 924-930, Sept. 2005.

TIMBÓ, A. L. O. **Determinação de protocolo para duplicação cromossômica e identificação do nível de ploidia utilizando citometria de fluxo em *Brachiaria spp.*** 2010. 100 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.

ULLMANN, S. **Figo**: características botânicas. Porto Alegre: UFRGS, 2002. Disponível em: <<http://www.ufrgs.br/alimentus/feira/mpfruta/figo/t%20cabot.htm>>. Acesso em: 23 jun. 2011.

VALE, L. S. R. **Fruticultura**. Goiânia: Instituto Federal Goiano, 2010. 184 p. Disponível em: <<http://pt.scribd.com/doc/51918206/11/a-cultura-do-figo>>. Acesso em: 23 jun. 2011.

WAGNER JÚNIOR, A. W. **Seleção de pessegueiro adaptado ao clima subtropical**. 2007. 109 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2007.

WALKER, D.; MONINO, I.; CORREAL, E. Genome size in *Bituminaria bituminosa* (L.) C.H. Stirton (Fabaceae) populations: separation of 'true'

differences from environmental effects on DNA determination. **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, v. 55, n. 3, p. 258-265, Mar. 2006.

WATSON, J. D.; CRICK, F. H. C. Molecular structure of nucleic acids: a structure for deoxyribonucleic acid. **Nature**, London, v. 171, p. 737-738, 1953.

WHITE, D.; SOFGE, D. **Handbook of intelligent control: neural, fuzzy, and adaptive approaches**. Oxford: V. N. Reinhold, 1992. 568 p.

YANPAISAN, W.; KING, N. J.; DORAN, P. M. Flow cytometry of plant cells with applications in large-scale bioprocessing. **Biotechnology Advances**, Waterloo, v. 17, n. 1, p. 23-27, Mar. 1999.

ZUBEN, C. J. von et al. Theoretical approaches to forensic entomology: I., mathematical model of postfeeding larval dispersal. **Journal of Applied Entomology**, Berlin, v. 120, n. 1/5, p. 379-382, Jan./Dec. 1996.



## **CAPÍTULO 2**

**OTIMIZAÇÃO DO PROTOCOLO DE CITOMETRIA DE FLUXO PARA  
BANANEIRA (*Musa acuminata* Colla), FIGUEIRA (*Ficus carica* L.), MACIEIRA  
(*Malus domestica* Borkh.) E PESSEGUEIRO [*Prunus persica* (L.) Batsch]**

## RESUMO

Para a determinação da quantidade de DNA de plantas, pode-se usar a técnica de citometria de fluxo, porém faltam pesquisas a respeito da padronização do método para várias espécies. Diante disso, neste trabalho, objetivou-se otimizar o protocolo para a análise de citometria de fluxo em bananeira (*Musa acuminata* Colla), figueira (*Ficus carica* L.), macieira (*Malus domestica* Borkh.) e pessegueiro [*Prunus persica* (L.) Batsch]. Para isso foram analisadas a presença ou não de RNase (0 e 200 µg/mL), diferentes tampões de extração, padrões de referência, dose e tempo de exposição de amostras ao corante Iodeto de Propídeo. As amostras de folhas foram trituradas em uma placa de Petri contendo 1 mL de tampão gelado para a liberação de núcleos e, em seguida, foram coradas com Iodeto de Propídeo. A análise foi realizada no citômetro FacsCalibur (Becton Dickinson) e os histogramas foram obtidos pelo software Cell Quest e analisados estatisticamente no software WinMDI 2.8. As médias de coeficiente de variação e conteúdo de DNA foram submetidas ao teste F e, quando significativas, foram comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5%. A ervilha pode ser usada como padrão interno de referência para todos os materiais analisados e não há a necessidade da adição de RNase às soluções nucleares. O tampão Marie é recomendado para todas as espécies, com exceção da macieira, na qual deve-se usar o tampão Tris-Mg.Cl<sub>2</sub>. A quantidade de Iodeto de Propídeo a ser utilizada deve ser igual a 5 µL, porém, para a figueira, deve-se usar 10 µL. As leituras podem ser realizadas imediatamente após a adição do corante, mas a variedade NBA apresenta melhores resultados quando armazenada no gelo com o fluorocromo por ao menos 10 minutos.

Palavras-chave: Citômetro. Padronização. Metodologia.

## ABSTRACT

To determine the amount of DNA of plants, can use the technique of flow cytometry, but research is needed regarding the standardization of this method for several species. Therefore, this work aimed to determine a protocol for the analysis of flow cytometry in banana (*Musa acuminata* Colla), fig (*Ficus carica* L.), apple (*Malus domestica* Borkh.) and peach [*Prunus persica* (L.) Batsch]. To this were analyzed presence or absence of RNase, different extraction buffers, reference standards external, dose and exposure time the samples to dye propidium iodide. The leaf samples were crushed in a petri dish containing 1 mL of ice to release nuclei and then was stained with propidium iodide. The analysis was performed on FACSCalibur cytometer (Becton Dickinson), histograms were obtained by Cell Quest software and analyzed statistically with the software WinMDI 2.8. The means were tested with F, and when significant were compared by Scott-Knott test at 1%. The peas can be used as an external standard of reference for all materials analyzed, there is no need for the addition of nuclear RNase solutions. Marie buffer is recommended for all species, with the exception of the apple tree, which must use the Tris-Mg.Cl<sub>2</sub>. The amount of propidium iodide to be used shall be equal to 5 mL, however the fig tree should use 10 mL. Readings can be taken immediately after adding the dye, but to cultivate NBA had better results when stored on ice with fluorochrome for 10 minutes.

Keywords: Cytometry. Standardization. Methodology.

## 1 INTRODUÇÃO

O Brasil destaca-se no mercado internacional como um dos maiores produtores de frutas do mundo. O país ocupa a terceira posição no ranking mundial com produção de aproximadamente 43 milhões de toneladas anuais e área plantada em torno de 2,5 milhões de hectares. A fruticultura é um dos segmentos mais importantes da agricultura brasileira, respondendo por 25% do valor da produção agrícola nacional (LACERDA; LACERDA; ASSIS, 2004). Entre as frutas produzidas no Brasil, pode-se destacar, entre as tropicais, a banana e entre as temperadas, o figo, a maçã e o pêssego.

Essa produção poderia ser ainda maior com o aprimoramento dos sistemas de cultivo e também com o uso de variedades mais adaptadas ao clima local e resistentes a pragas e doenças. Assim, para contornar esta dificuldade, o melhoramento genético é a melhor alternativa, por meio do cruzamento de variedades de interesse para a obtenção de variedades desejáveis.

Nos programas de melhoramento genético, a citometria pode ser mais usada para identificar variedades interespecíficas e intraespecíficas. Entretanto, essa técnica permite também identificação do nível de ploidia, monitoramento da estabilidade do nível de ploidia, identificação de haploides e duplohaploides e verificação de novos níveis de ploidias resultantes de cruzamentos, entre outros parâmetros (DOLEZEL, 1997). Em 1997, foi relatada a necessidade de garantir e melhorar a qualidade dos dados obtidos por meio da citometria de fluxo, o que é uma preocupação permanente, pois a maioria das quantidades de DNA estimadas por grande parte dos métodos utilizados na citometria de fluxo está sujeita a erros técnicos (BENNETT; LEITCH, 2005).

Os problemas de metodologia na citometria de fluxo podem resultar em dados artificiais e falsas evidências de variação intraespecífica. Dolezel e Bartos (2005) propuseram que a utilização de citometria de fluxo para estimar o

tamanho do genoma de plantas fosse revista, a fim de otimizar a qualidade dos dados e apontar possíveis erros metodológicas.

Durante a elaboração dos protocolos para a avaliação no citômetro de fluxo, de preparo das amostras que serviriam à citometria de fluxo, a calibração dos métodos um contra o outro para que haja uma possível padronização não é frequente e isso, além de ocasionar erros metodológicos na preparação de amostras e análise, torna difícil a comparação de dados obtidos em diferentes laboratórios (DOLEZEL; BARTOS, 2005).

Há a necessidade urgente de padronização da técnica, pois, sem isto, a análise de diferenças muito pequenas no genoma vegetal não pode ser comparada entre laboratórios. Isso somente pode ocorrer entre análises feitas com a mesma metodologia e mesmo equipamento (citômetro de fluxo) (DOLEZEL et al., 1998b).

A técnica de citometria de fluxo já está se consolidando, o que torna necessário que os novos trabalhos conduzam a uma melhoria no preparo das amostras para controlar efeitos negativos externos e padronizar as futuras análises.

Este trabalho foi realizado com o objetivo de otimizar o protocolo para análises de citometria de fluxo em bananeira (*Musa acuminata* Colla), figueira (*Ficus carica* L.), macieira (*Malus domestica* Borkh.) e pessegueiro [*Prunus persica* (L.) Batsch].

## **2 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1 Material vegetal**

Para otimizar o protocolo para análises de citometria de fluxo, os experimentos foram realizados em 3 variedades de bananeira (NBA, Caipira e Bucanero, respectivamente, diplóide - AA, triplóide - AAA e tetraploide - AAAA) e em variedades de macieira (Baronesa), de figueira (Minifigo) e de pessegueiro (Tropical), localizadas na UFLA.

### **2.2 Preparo das amostras**

O preparo das amostras e as análises por citometria de fluxo foram realizados no Laboratório de Cultura de Tecidos/Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras. Com objetivo de estimar o conteúdo de DNA, foram avaliadas três amostras para cada tratamento avaliado, sendo cada uma delas considerada uma repetição, o delineamento utilizado foi inteiramente casualizado com três repetições. As amostras vegetais usadas para quantificar o DNA em citômetro de fluxo foram folhas o mais jovens possível. Foi coletada uma folha de cada planta e retirada uma pequena porção na região mediana. Os fragmentos foram embalados em sacos plásticos juntamente com algodão umedecido, identificados e levados para o laboratório.

Para a determinação do conteúdo de DNA, foram utilizadas aproximadamente 20-30 mg de folhas jovens das plantas, e do padrão de referência externo, os fragmentos foram triturados em placa de Petri contendo 1mL de tampão de extração gelado para a liberação dos núcleos (DOLEZEL; DOLEZELOVÁ; NOVÁK, 1989).

Após o processo de extração, a suspensão de núcleos foi aspirada por meio de duas camadas de gaze, com auxílio de pipeta de Pasteur, e filtrada através de uma malha de 50 µm. Os núcleos foram corados pela adição de 25 µL de uma solução de 1mg/1mL de Iodeto de Propídeo.

O conteúdo de DNA nuclear em (pg) das plantas foi estimado utilizando-se a fórmula a seguir:

$$\text{DNA amostra} = \left( \frac{\text{G1 Amostra}}{\text{G1 padrão}} \right) \times \text{DNA padrão}$$

### **2.3 Influência do tampão de extração na qualidade das análises de citometria de fluxo**

Para verificar a influência do tampão de extração na confiabilidade das estimativas do conteúdo de DNA foram testados seis tampões (LB01, Marie, Otto I, Otto II e Tris.MgCl<sub>2</sub>) (GALBRAITH et al., 1983; OTTO, 1990) e para todas as variedades analisadas [três variedades de bananeira (NBA, Caipira e Bucanero, respectivamente, diplóides, triplóides e tetraploides), uma de macieira (Baronesa), uma de figueira (Minifigo) e uma de pessegueiro (Tropical)]. Em todas as análises, o padrão de referência utilizado foi a ervilha (*Pisum sativum* L.) que apresenta 9,09 pg de DNA.

### **2.4 Influência da utilização de RNase na qualidade das análises de citometria de fluxo**

Para verificar a influência da enzima RNase na confiabilidade do conteúdo de DNA, foram testados dois tipos de Iodeto de Propídeo, com e sem RNase (0 e 200 µg/mL), para todas as variedades analisadas [três variedades de

bananeira (NBA, Caipira e Bucanero, respectivamente, diplóides, triplóides e tetraploides), uma de macieira (Baronesa), uma de figueira (Minifigo) e uma de pessegueiro (Tropical)]. Em todas as análises, o padrão de referência utilizado foi a ervilha (*Pisum sativum* L.) que apresenta 9,09 pg de DNA.

Como tampão de extração foi utilizado o Marie para todas as culturas, exceto para a macieira, na qual foi usado o tampão Tris-MgCl<sub>2</sub>.

### **2.5 Influência da quantidade de Iodeto de Propídeo na qualidade das análises de citometria de fluxo**

Para verificar a influência da quantidade de Iodeto de Propídeo na confiabilidade do conteúdo de DNA, foram testadas quantidades deste corante. Foram testadas seis doses de Iodeto de Propídeo (5, 10, 15, 20, 25 e 30 µL) em todas as variedades analisadas [NBA, Caipira e Bucanero, (diplóides, triplóides e tetraploides, respectivamente), uma de macieira (Baronesa), uma de figueira (Minifigo) e uma de pessegueiro (Tropical)]. Em todas as análises, o padrão de referência utilizado foi a ervilha (*Pisum sativum* L.) que apresenta 9,09 pg de DNA.

Como tampão de extração foi utilizado o Marie para todas as culturas, exceto para a macieira, na qual foi usado o tampão Tris-MgCl<sub>2</sub>.

### **2.6 Influência do tempo de exposição dos núcleos ao Iodeto de Propídeo na qualidade das análises de citometria de fluxo**

Para verificar a influência do tempo de exposição na confiabilidade do conteúdo de DNA, foram testadas quantidades deste corante. Foram testados cinco tempos de exposição (0, 5, 10, 15 e 20 minutos) para todas as variedades analisadas [NBA, Caipira e Bucanero, (diplóides, triplóides e tetraploides,



respectivamente), uma de macieira (Baronesa), uma de figueira (Minifigo) e uma de pessegueiro (Tropical). Em todas as análises, o padrão de referência utilizado foi a ervilha (*Pisum sativum* L.), que apresenta 9,09 pg de DNA.

Como tampão de extração foi utilizado o Marie para todas as culturas, exceto para a macieira, na qual foi usado o tampão Tris-MgCl<sub>2</sub>.

## 2.7 Influência do padrão externo de referência na qualidade das análises de citometria de fluxo

Para verificar a influência dos padrões externos de referência na qualidade das análises de citometria de fluxo, foram testados sete padrões de referência: [ervilha (*Pisum sativum* L.), fava (*Vicia faba* L.), milho (*Zea mays* L.), rabanete (*Raphanus sativus* L.), centeio (*Secale cereale* L.), soja (*Glycine max* L.) e tomateiro (*Lycopersicum esculentum* L.)] para todas as variedades analisadas [NBA, Caipira e Bucanero, (diplóides, triplóides e tetraploides, respectivamente)], uma de macieira (Baronesa), uma de figueira (Minifigo) e uma de pessegueiro (Tropical).

Na Tabela 1 são apresentados os respectivos conteúdos de DNA desses padrões.

Tabela 1 Conteúdo de DNA dos padrões de referência utilizados – Lavras, MG - 2011.

Padrão de Referência	Conteúdo de DNA (pg)	Referência
Ervilha	9,09	Dolezel et al. (1998a)
Fava	26,90	Dolezel, Sgorbati e Lucretti (1992)
Rabanete	5,43	Dolezel, Sgorbati e Lucretti (1992)
Milho	1,11	Lysák e Dolezel (1998)
Centeio	16,19	Dolezel et al. (1998a)
Soja	2,05	Dolezel, Dolezelová e Novák (1994)
Tomateiro	1,96	Dolezel, Sgorbati e Lucretti (1992)

Em todas as análises, o padrão de referência utilizado foi a ervilha (*Pisum sativum* L.), que apresenta 9,09 pg de DNA.

Como tampão de extração foi utilizado o Marie para todas as culturas, exceto para a macieira, na qual foi usado o tampão Tris-MgCl<sub>2</sub>.

## **2.8 Análise estatística**

A análise foi realizada no citômetro FacsCalibur (BD, Biosciences, San Jose, CA, USA), e os histogramas foram obtidos com o software Cell Quest (Becton Dickinson e Companhia, San Jose, CA, USA) e analisados estatisticamente no software WinMDI 2.8 (SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE, 2011).

Os coeficientes de variação (CV) e conteúdos de DNA (pg) obtidos foram submetidos a análises de variância pelo teste F e, quando significativas, as médias dos CVs foram comparadas pelo teste de agrupamento Scott-Knott ( $p \leq 0,01$ ).

### **3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **3.1 Influência do tampão de extração na qualidade das análises de citometria de fluxo**

A qualidade das análises de citometria de fluxo foi baseada no coeficiente de variação das mesmas. Alguns autores consideram este um critério elementar que reflete a qualidade da metodologia aplicada (GALBRAITH et al., 2001; MARIE; BROWN, 1993). No caso, o coeficiente de variação é inversamente proporcional à qualidade das análises, ou seja, quanto menor o coeficiente de variação (CV), mais confiáveis os resultados provenientes da citometria de fluxo. Na Tabela 2 são apresentados os CVs das análises realizadas com os diferentes tampões de extração de núcleos para cada espécie analisada. O tampão Marie foi eficiente na manutenção da qualidade dos núcleos para todas as variedades, com exceção da macieira variedade ‘Baronesa’. Para essa espécie, o único tampão recomendado é o Tris-MgCl<sub>2</sub>. Já o tampão Otto I somente foi eficiente na análise do pessegueiro variedade ‘Tropical’. Não foi possível a formação de pico de DNA para a variedade de bananeira NBA quando utilizado o tampão Otto II. Isso provavelmente ocorreu porque o tampão não é capaz de manter a integridade do material para essa variedade (Figura 1 e 2).

O tampão Marie é formado por glicose (que mantém a integridade nuclear e previne a formação de aglomerados de núcleos), EDTA, que é usado por ligar-se a cátions bivalentes que servem como cofatores de nucleases (enzimas que realizam a degradação de núcleos celulares), e alguns sais inorgânicos (KCl, NaCl) são adicionados à solução com o intuito de manter uma estabilização iônica. O pH da solução varia dentro de um limite estreito (7,0-8,0). A presença de dois detergentes não iônicos, Triton-X-100 e o Tween

20, facilitam a liberação dos núcleos dos citoplasmas, removem restos de citoplasma da superfície dos núcleos, dispersam cloroplastos e diminuem a tendência dos núcleos e dos fragmentos citoplasmáticos de se agregarem (MARIE; BROWN, 1993).

Leal (2006), trabalhando com *Vitis vinifera* e usando o tampão Marie, conseguiu resultados excelentes, capazes de avaliar a estabilidade da ploidia de culturas mantidas *in vitro*. Loureiro et al. (2006b) usaram esse mesmo tampão para também identificar a estabilidade da ploidia de calos embriogênicos de sobreiro (*Quercus suber* L.).

Tabela 2. Coeficientes de variação das análises de citometria de fluxo em função de diferentes tampões de extração em bananeira var. 'NBA', 'Caipira' e 'Bucanero' (*Musa acuminata* Colla), figueira var. 'Minifigo' (*Ficus carica* L.), macieira var. 'Baronesa' (*Malus domestica* Borkh.) e pessegueiro var. 'Tropical' [*Prunus persica* (L.) Batsch]- Lavras-MG - 2011.

Tampão	NBA	Caipira	Bucanero	Figueira	Macieira	Pessegueiro
Galbraith	3,00 c	2,67 b	1,67 a	2,94 b	2,67 c	3,33 b
LB01	1,67 b	1,00 a	2,33 b	1,00 a	1,00 b	1,33 a
Marie	1,00 a	1,00 a	1,00 a	1,00 a	3,33 c	1,33 a
Otto I	2,00 b	2,67 b	3,67 c	4,00 c	3,00 c	1,67 a
Otto II	*	1,67 a	2,67 b	1,33 a	3,33 c	3,34 b
Tris.MgCl <sub>2</sub>	1,00 a	1,33 a	1,00 a	1,00 a	0,33 a	2,00 a
CV (%)	20,75	27,37	22,93	18,75	36,81	24,22

\*Médias seguidas das mesmas letras minúsculas na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knot ( $p \leq 0,05$ ).

\*\*Não foi possível a visualização de picos

Loureiro et al. (2006a), testando quatro tampões (LB01, Otto I e II e Tris.MgCl<sub>2</sub>) (GALBRAITH et al., 1983; OTTO, 1990), verificaram que todos esses tampões renderam histogramas com coeficientes de variação aceitáveis, o que possibilitou um número razoável de núcleos isolados nas espécies *Sedum burrito*, *Lycopersicon esculentum*, *Celtis australis*, *Pisum sativum* variedade

Ctirad, *Vicia faba* variedade Inovec. A espécie *Sedum burrito* foi a mais trabalhosa, possivelmente devido ao alto teor de tanino nas folhas.

Os resultados mais confiáveis do conteúdo de DNA obtidos com o tampão de isolamento Marie foram para as variedades ‘NBA’, ‘Caipira’, ‘Bucanero’ (bananeira), ‘Minifigo’ (figueira), ‘Tropical’ (pessegueiro) e, utilizando o tampão Tris.MgCl<sub>2</sub> para ‘Baronesa’ (macieira), respectivamente, 1,22; 1,62; 2,33; 0,74; 0,63 e 1,29 pg como pode ser verificado na Tabela 3.

Tabela 3. Conteúdo de DNA (pg) em função de diferentes tampões de extração em bananeira var. ‘NBA’, ‘Caipira’ e ‘Bucanero’ (*Musa acuminata* Colla), figueira var. ‘Minifigo’ (*Ficus carica* L.), macieira var. ‘Baronesa’ (*Malus domestica* Borkh.) e pessegueiro var. ‘Tropical’ [*Prunus persica* (L.) Batsch]- Lavras-MG - 2011.

Tampão	NBA	Caipira	Bucanero	Figueira	Macieira	Pessegueiro
Galbraith	0,85 c	1,18 <sup>ns</sup>	1,45 b	0,56 b	0,77 d	1,44 a
LB01	1,14 b	1,70 <sup>ns</sup>	1,89 a	0,75 a	1,55 a	0,61 b
Marie	1,22 a	1,62 <sup>ns</sup>	2,33 a	0,74 a	1,70 a	0,63 b
Otto I	0,65 d	0,72 <sup>ns</sup>	0,70 c	0,71 a	0,65 d	0,64 b
Otto II	**	3,23 <sup>ns</sup>	1,03 c	0,70 a	1,02 c	1,88 a
Tris.MgCl <sub>2</sub>	1,28 a	1,42 <sup>ns</sup>	1,98 a	0,69 b	1,29 b	1,50 a
CV (%)	1,18	57,55	18,95	3,69	11,13	30,54

\*Médias seguidas das mesmas letras minúsculas na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knot ( $p \leq 0,05$ ).

\*\*Não foi possível a visualização de pico.

A espécie *Celtis australis*, a única lenhosa, teve os melhores histogramas quando a suspensão foi preparada com o tampão Tris.MgCl<sub>2</sub>. Essa suspensão foi relativamente mais viscosa que as outras, o que restringiu a liberação dos núcleos e pode ter causado aglomerações.

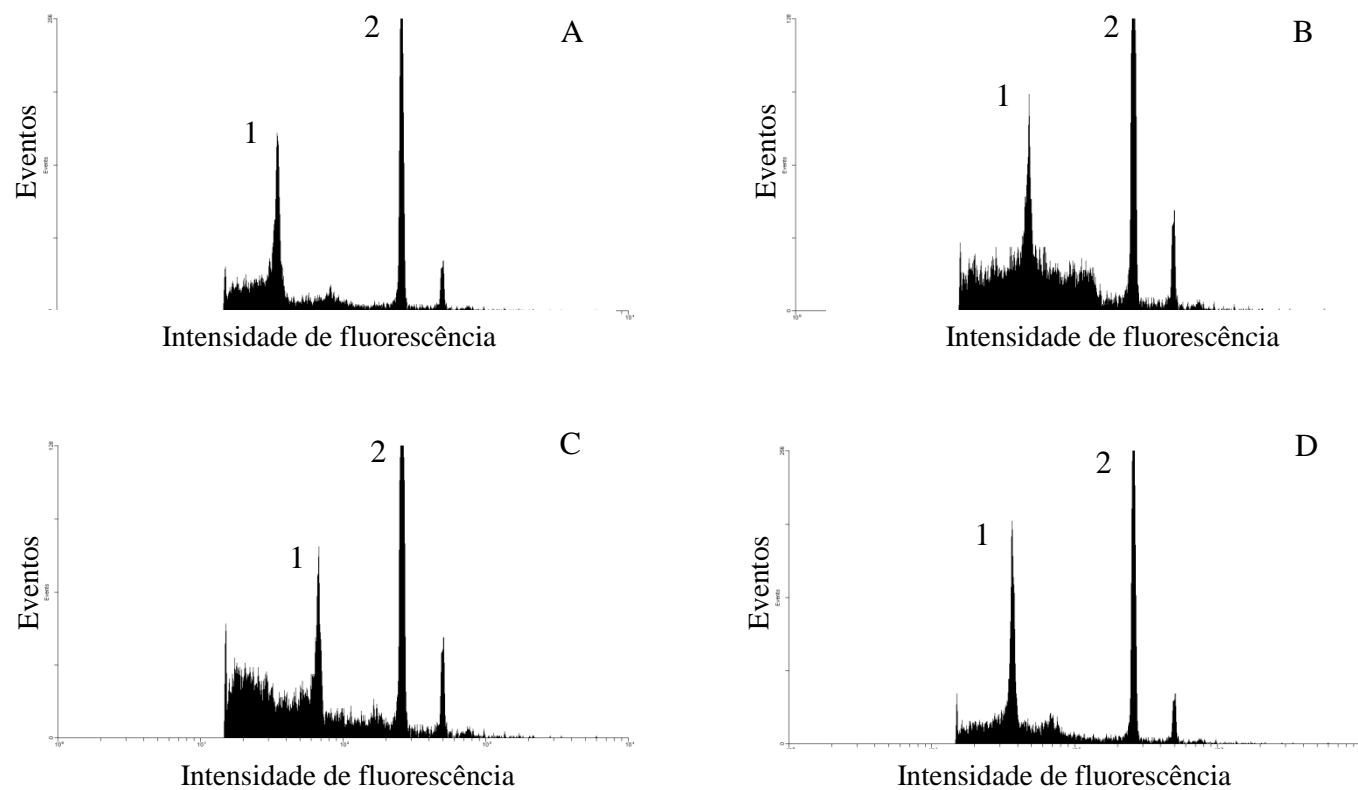


Figura 1 Histogramas de citometria de fluxo obtidos com o tampão de extração Marie. O primeiro pico: A) bananeira variedade NBA (*Musa acuminata* Colla) B) bananeira variedade 'Caipira' (*Musa acuminata* Colla) C) bananeira variedade 'Bucanero' (*Musa acuminata* Colla) D) macieira variedade 'Baronesa' (*Malus domestica* L.) e o segundo pico G1 é da ervilha (*Pisum sativum* L.). UFLA, Lavras, MG, 2011.

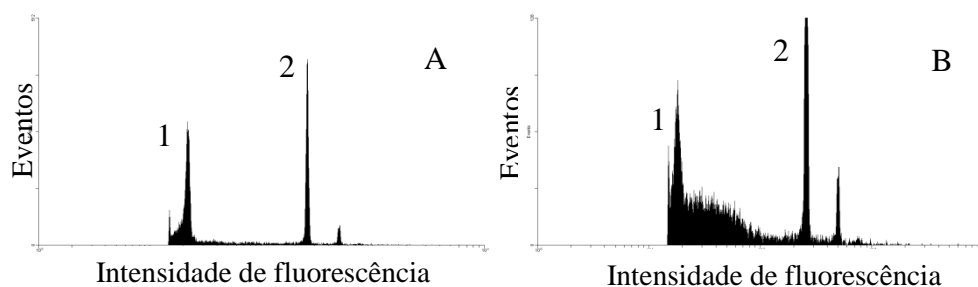


Figura 2 Histogramas de citometria de fluxo obtidos com o tampão de extração Marie. O primeiro pico: A) figueira variedade ‘Minifigo’ (*Ficus carica* L.) B) pessegueiro variedade ‘Tropical’ [*Prunus persica* (L.) Batsche] o segundo pico G1 é o da ervilha (*Pisum sativum* L.). UFLA, Lavras, MG, 2011.

### 3.2 Influência da utilização de RNase na qualidade das análises de citometria de fluxo

Na Tabela 4 são observados os valores dos CVs nas análises coradas com o fluorocromo Iodeto de Propídeo utilizado ou não em conjunto com a enzima RNase. Para as variedades de bananeira NBA e Bucanero, a utilização de RNase mostrou-se indiferente àqueles resultados obtidos na presença desta enzima. Resultados semelhantes a estes foram obtidos para a figueira cultivar ‘Minifigo’ e para o pessegueiro variedade ‘Tropical’. Na ausência de RNase, os resultados obtidos foram melhores se comparados àqueles oriundos de análise na presença dessa enzima para macieira variedade ‘Baronesa’ e para bananeira variedade ‘Caipira’ (Figura 3).

A RNase (ribonuclease), enzima também denominada de endonuclease, é responsável pela degradação de RNA (BROWN, 1999). O tratamento com enzima pode ser necessário para a determinação do conteúdo de DNA, pois alguns corantes, como o Iodeto de Propídeo, se ligam também ao RNA, e isto pode levar a superestimativas.

Tabela 4. Coeficientes de variação das análises de citometria de fluxo em função da utilização de RNase (0 e 200µg/mL) em bananeira var. ‘NBA’, ‘Caipira’ e ‘Bucanero’ (*Musa acuminata* Colla), figueira var. ‘Minifigo’ (*Ficus carica* L.), macieira var. ‘Baronesa’ (*Malus domestica* Borkh.) e pessegueiro var. ‘Tropical’ [*Prunus persica* (L.) Batsch]- Lavras-MG - 2011.

RNase	NBA	Caipira	Bucanero	Figueira	Macieira	Pessegueiro
Presença	1,00 a	2,33 b	1,00 a	1,67 a	3,33 b	1,33 a
Ausência	1,33 a	1,00 a	1,33 a	1,67 a	0,33 a	2,00 a
CV (%)	34,99	24,24	34,99	34,64	31,49	24,49

\*Médias seguidas das mesmas letras minúsculas na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott Knot ( $p \leq 0,05$ ).

Se considerarmos apenas a utilização ou não da Rnase, os resultados mais confiáveis são 1,64; 1,67; 0,66; 1,30 e 0,71 pg para ‘NBA’, ‘Caipira’, ‘Bucanero’ (bananeira), ‘Minifigo’ (figueira), ‘Baronesa’ (macieira), ‘Tropical’ (pessegueiro), respectivamente, considerando os resultados anteriores (Tabela 5).

Tabela 5. Conteúdo de DNA (pg) em função da utilização de RNase (0 e 200µg/mL) em bananeira variedades NBA, Caipira e Bucanero (*Musa acuminata* Colla), figueira variedade Minifigo (*Ficus carica* L.), macieira variedade Baronesa (*Malus domestica* Borkh.) e pessegueiro variedade Tropical (*Prunus persica* (L.) Batsch). Lavras-MG, 2011.

RNase	NBA	Caipira	Bucanero	Figueira	Macieira	Pessegueiro
Presença	1,06 a	1,45 b	2,12 a	0,64 a	1,90 a	0,62 b
Ausência	1,04 a	1,64 a	1,67 a	0,66 a	1,30 b	0,71 a
CV (%)	7,82	1,91	23,34	8,47	5,68	1,22

\*Médias seguidas das mesmas letras minúsculas na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knot ( $p \leq 0,05$ ).

Quando se trabalha com corantes específicos, como a Mitramicina, a Cromomicina, a Olivomicina e a DAPI para determinados pares de base, não há necessidade da adição dessa enzima à solução (LOUREIRO, 2007). Para Greilhuber et al. (2007), muitas vezes a RNase pode não ter efeito devido à baixa quantidade de RNA. Isso ocorre nas folhas, por exemplo, podendo parecer indispensável, porém vale salientar a sua essencialidade em tecidos ricos em



RNA, tais como sementes e meristemas, o que explica os resultados obtidos cuja presença da RNase é dispensável.

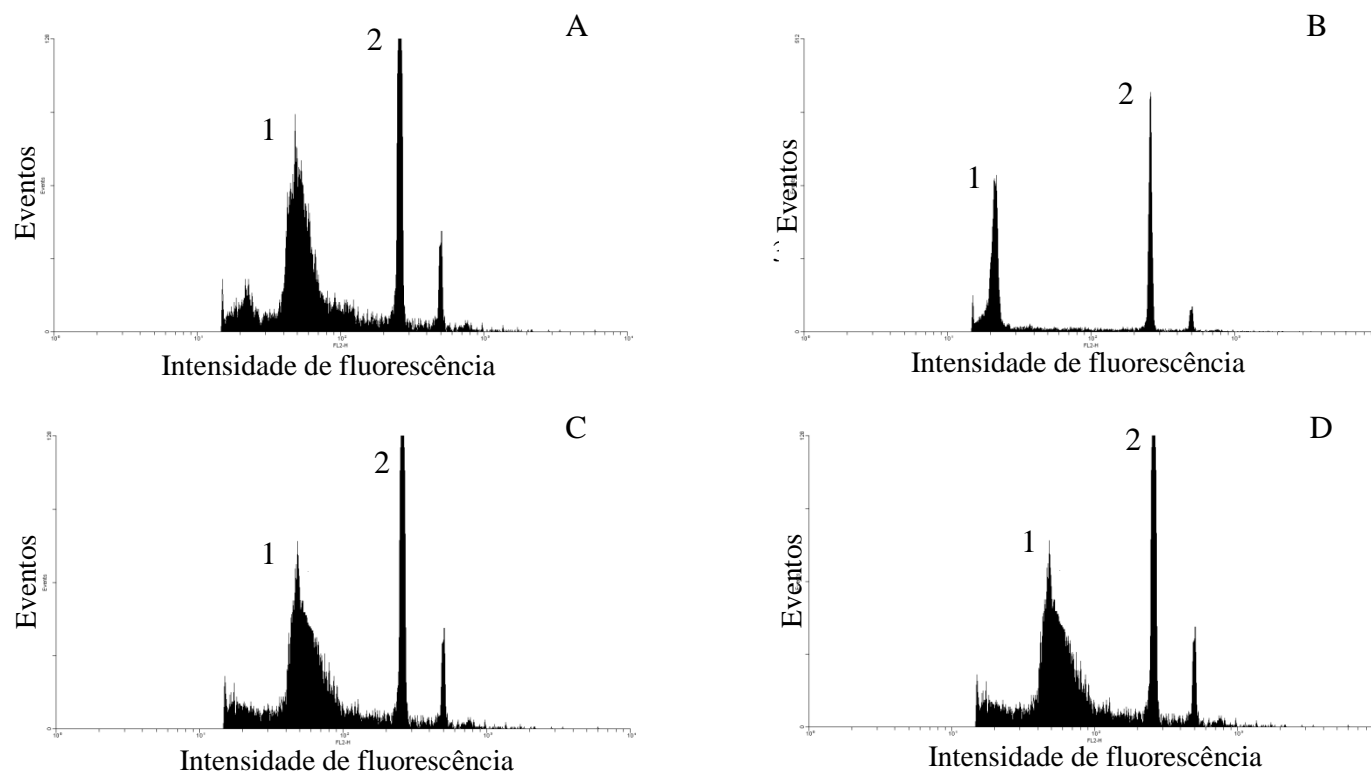


Figura 3 Histogramas de citometria de fluxo obtidos na presença ou ausência da RNase. O primeiro pico: A) macieira variedade 'Baronesa' (*Malus domestica* Borkh.) na presença de RNase B) macieira variedade 'Baronesa' (*Malus domestica* Borkh.) sem RNase C) figueira variedade 'Minifigo' (*Ficus carica* L.) na presença de 200 $\mu$ g/mL de RNase D) figueira var. 'Minifigo' (*Ficus carica* L.) sem RNase e o segundo pico G1 é da ervilha (*Pisum sativum* L.). UFLA, Lavras, MG, 2011.

### **3.3 Influência da quantidade de Iodeto de Propídeo na qualidade das análises de citometria de fluxo**

Não foram observadas diferenças estatísticas no coeficiente de variação das análises de citometria de fluxo utilizando-se diferentes quantidades do fluorocromo Iodeto de Propídeo em macieira variedade 'Baronesa', em pessegueiro variedade 'Tropical' e na bananeira variedade 'Caipira'. Assim, para essas espécies, pode-se utilizar a menor quantidade testada sem causar prejuízos para a qualidade dos gráficos obtidos com o citômetro. A variedade 'NBA' apresentou os menores CVs nas menores quantidades do corante e, dessa forma, o uso da menor dose testada (5  $\mu\text{L}$ ) é eficiente na obtenção de análises de citometria de fluxo (Figura 4). Já a variedade 'Bucanero' apresentou resultado contrário, sendo a menor dose do corante a pior quando se considera a qualidade das análises. As outras doses não diferiram estatisticamente, o que leva a concluir que o uso de 10  $\mu\text{L}$  é recomendado para esta espécie. Isso possivelmente ocorreu devido a compostos citosólicos que interferem na ligação do fluorocromo com o DNA inibindo a fluorescência dos corantes, fato comum em plantas (PRICE; HODNETT; JOHNSTON, 2000). A figueira variedade 'Minifigo' apresentou resultados diferentes dos obtidos até então, pois somente as quantidades 10 e 25  $\mu\text{L}$  foram consideradas ruins para análises de citometria, enquanto as outras quantidades do corante foram melhores e estatisticamente iguais, semelhante ao que aconteceu na macieira, no pessegueiro e nas variedades de bananeira 'Caipira' e 'NBA'. Logo, pode-se recomendar para a figueira o uso de 5  $\mu\text{L}$  de Iodeto de Propídeo na coloração dos núcleos (Tabela 6).

Pode existir uma saturação do corante, isto é, em um determinado ponto, todos os núcleos estão corados e a adição de mais fluorocromos não proporciona um aumento na intensidade.

Tabela 6. Coeficientes de variação das análises de citometria de fluxo usando diferentes quantidades de Iodeto de Propídeo (IP) em bananeira variedades ‘NBA’, ‘Caipira’ e ‘Bucanero’ (*Musa acuminata* Colla), figueira variedade ‘Minifigo’ (*Ficus carica* L.), macieira variedade ‘Baronesa’ (*Malus domestica* Borkh.) e pessegueiro variedade ‘Tropical’ (*Prunus persica* (L.) Batsch). Lavras-MG, 2011.

IP (μL)	NBA	Caipira	Bucanero	Figueira	Macieira	Pessegueiro
5	2,00 a	1,67 <sup>ns</sup>	1,67 b	1,33 a	1,00 <sup>ns</sup>	1,33 <sup>ns</sup>
10	1,00 a	2,00 <sup>ns</sup>	1,00 a	1,67 b	1,00 <sup>ns</sup>	1,33 <sup>ns</sup>
15	1,67 a	1,00 <sup>ns</sup>	1,00 a	1,00 a	1,00 <sup>ns</sup>	1,67 <sup>ns</sup>
20	4,00 b	2,00 <sup>ns</sup>	1,00 a	1,00 a	1,00 <sup>ns</sup>	2,00 <sup>ns</sup>
25	4,00 b	1,67 <sup>ns</sup>	1,00 a	2,34 b	1,00 <sup>ns</sup>	1,34 <sup>ns</sup>
30	4,00 b	1,34 <sup>ns</sup>	1,00 a	1,00 a	1,00 <sup>ns</sup>	1,67 <sup>ns</sup>
CV (%)	22,33	25,34	21,21	29,39	32,64	30,60

\*Médias seguidas das mesmas letras minúsculas na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knot ( $p \leq 0,05$ ).

Os resultados mais seguros do conteúdo de DNA obtidos com a adição de 5 μL/mL do fluorocromo para variedades ‘NBA’, ‘Caipira’, ‘Bucanero’ (bananeira), ‘Minifigo’ (figueira), ‘Baronesa’ (macieira), ‘Tropical’ (pessegueiro) respectivamente 1,17; 1,70; 2,43; 0,91; 1,96; 0,73 pg como descrito na Tabela 7.

Tabela 7. Conteúdo de DNA (pg) em função da utilização de diferentes quantidades de Iodeto de Propídeo (IP) em bananeira variedades ‘NBA’, ‘Caipira’ e ‘Bucanero’ (*Musa acuminata* Colla), figueira variedade ‘Minifigo’ (*Ficus carica* L.), macieira variedade ‘Baronesa’ (*Malus domestica* Borkh.) e pessegueiro variedade ‘Tropical’ (*Prunus persica* (L.) Batsch). Lavras-MG, 2011.

IP (μL)	NBA	Caipira	Bucanero	Figueira	Macieira	Pessegueiro
5	1,17 b	1,70 b	2,16 c	0,91 b	1,96 a	0,73 c
10	1,39 a	1,77 b	2,43 b	0,93 b	0,97 b	0,77 b
15	1,00 a	1,87 a	2,20 c	0,92 b	1,93 a	0,76 b
20	1,30 c	1,87 a	2,46 b	0,96 a	1,87 a	0,71 c
25	1,35 a	1,95 a	2,55 a	0,85 d	1,90 a	0,85 a
30	1,27 a	1,70 b	2,45 b	0,90 c	1,86 a	0,82 a
CV (%)	4,80	3,63	1,12	1,97	6,29	3,60

\*Médias seguidas das mesmas letras minúsculas na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knot ( $p \leq 0,05$ ).

Loureiro et al. (2006b), analisando folhas de *Pisum sativum*, verificou que 1mL de suspensão contendo núcleos celulares se encontrava saturada com a utilização de 750  $\mu$ L, 36 vezes mais que a maior quantidade utilizada nesse experimento. Contudo, uma solução desse tipo pode ter sido corada satisfatoriamente muito antes deste ponto.

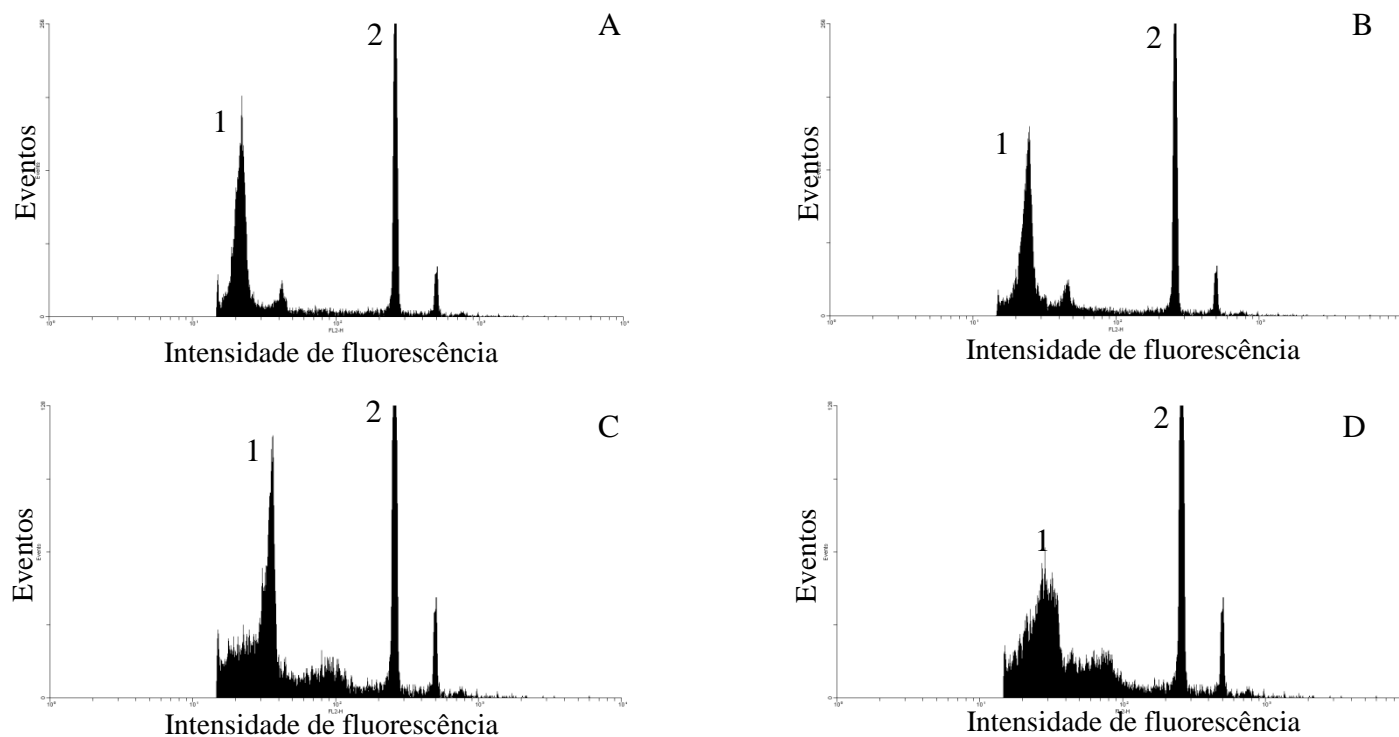


Figura 4 Histogramas de citometria de fluxo obtidos de acordo com a quantidade de Iodeto de Propídeo (IP). O primeiro pico: A) pessegueiro variedade 'Tropical' [*Prunus persica* (L.) Batsch] com 5  $\mu$ L de IP B) pessegueiro variedade 'Tropical' [*Prunus persica* (L.) Batsch] com 30  $\mu$ L de IP C) bananeira variedade 'NBA' (*Musa acuminata* Colla) com 5  $\mu$ L de IP D) variedade 'NBA' (*Musa acuminata* Colla) com 20  $\mu$ L de IP e o segundo pico G1 é o da ervilha (*Pisum sativum* L.). UFLA, Lavras, MG, 2011.

### **3.4 Influência do tempo de exposição dos núcleos ao Iodeto de Propídeo na qualidade das análises de citometria de fluxo**

Quanto ao tempo de exposição da solução contendo os núcleos celulares das espécies analisadas, não houve diferenças significativas para a variedade ‘Caipira de bananeira’, ‘Tropical’ de pessegueiro e ‘Minifigo’ de figueira, podendo estas permanecer expostas ao corante por até 20 minutos sem que haja diminuição da qualidade das análises. Para a variedade ‘NBA’, a análise imediata da solução, após a adição do fluorocromo, não se mostrou eficiente, pois as análises apresentaram CVs maiores quando comparadas aos demais tempos de exposição, sendo estes estatisticamente diferentes (Figura 5).

As análises da variedade ‘Bucanero’ tiveram os maiores coeficientes de variação quando os núcleos ficaram expostos ao corante por 20 minutos. O mesmo aconteceu com a macieira, porém aos 10 minutos de exposição ao corante (Tabela 8).

Para Barre et al. (1996), um período de incubação de 5 a 10 minutos é geralmente suficiente para saturar todos os sítios de DNA. Por mais tempo, a coloração pode levar à diminuição da fluorescência e/ou aumento dos níveis de resíduos, o que compromete sensivelmente as análises de citometria de fluxo.

Loureiro et al. (2006b), trabalhando com *Pisum sativum*, verificaram que, após 60 minutos de exposição da suspensão contendo os núcleos, a fluorescência começa a diminuir. Essa diminuição não foi verificada nesse trabalho, talvez por não ter ocorrido o teste com tempos tão elevados, visto que esse intervalo de tempo usado por Loureiro et al. (2006b) não é alcançado nas análises rotineiras.

Os resultados de conteúdo de DNA obtidos após a adição imediata do fluorocromo para as variedades ‘Caipira’, ‘Bucanero’ (bananeira), ‘Minifigo’

(figueira), ‘Baronesa’ (macieira), ‘Tropical’ (pessegueiro) foram, respectivamente, 1,32; 2,15; 1,71; 0,65; e 0,70 pg.

Tabela 8. Coeficientes de variação das análises de citometria de fluxo em função do tempo de exposição das amostras ao corante Iodeto de Propídeo em bananeira variedades ‘NBA’, ‘Caipira’ e ‘Bucanero’ (*Musa acuminata* Colla), figueira variedade ‘Minifigo’ (*Ficus carica* L.), macieira variedade ‘Baronesa’ (*Malus domestica* Borkh.) e pessegueiro variedade ‘Tropical’ (*Prunus persica* (L.) Batsch). Lavras-MG, 2011.

Tempo (min)	NBA	Caipira	Bucanero	Figueira	Macieira	Pessegueiro
0	1,67 b	2,33 a	1,00 a	2,00 a	1,00 a	1,67 a
5	1,00 a	1,00 a	1,00 a	1,00 a	1,00 a	1,00 a
10	1,00 a	1,00 a	1,00 a	1,67 a	2,00 b	2,00 a
15	1,00 a	1,00 a	1,00 a	1,67 a	1,00 a	2,00 a
20	1,00 a	1,67 a	2,00 b	1,67 a	1,00 a	2,00 a
CV (%)	22,78	41,24	26,02	27,95	24,01	36,08

\*Médias seguidas das mesmas letras minúsculas na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knot ( $p \leq 0,05$ ).

A única exceção é para a variedade ‘NBA’ de bananeira, que deve ser lida no mínimo 5 minutos após a adição do fluorocromo, para esta variedade, o resultado mais confiável de acordo com os anteriores é 1,24 pg (Tabela 9).

Tabela 9. Conteúdo de DNA (pg) em função do tempo de exposição das amostras ao corante Iodeto de Propídeo em bananeira variedades ‘NBA’, ‘Caipira’ e ‘Bucanero’ (*Musa acuminata* Colla), figueira variedade ‘Minifigo’ (*Ficus carica* L.), macieira variedade ‘Baronesa’ (*Malus domestica* Borkh.) e pessegueiro variedade ‘Tropical’ (*Prunus persica* (L.) Batsch). Lavras-MG, 2011.

Tempo (min)	NBA	Caipira	Bucanero	Figueira	Macieira	Pessegueiro
0	1,08 b	1,32 b	2,15 b	0,65 b	1,71 b	0,70 a
5	1,24 a	1,73 a	2,36 a	0,73 a	1,73 b	0,72 a
10	1,23 a	1,72 a	2,34 a	0,68 b	1,40 d	1,20 a
15	1,22 a	1,71 a	2,17 b	0,72 a	1,52 c	0,69 a
20	1,20 a	1,68 a	2,16 b	0,72 a	1,80 a	0,69 a
CV (%)	1,68	6,60	0,99	2,23	1,15	58,31

\*Médias seguidas das mesmas letras minúsculas na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knot ( $p \leq 0,05$ ).



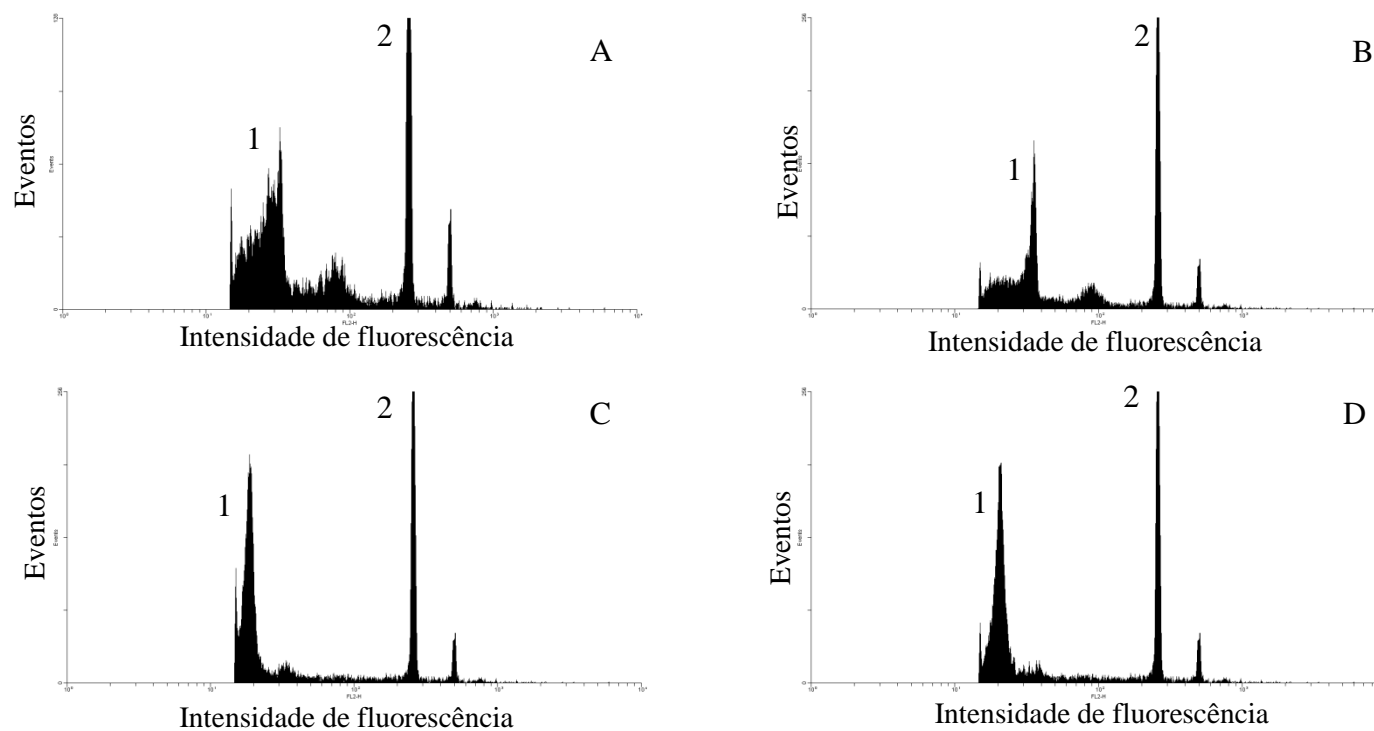


Figura 5 Histogramas de citometria de fluxo obtidos de acordo com o tempo de exposição ao Iodeto de Propídeo A) bananeira variedade 'NBA' (*Musa acuminata* Colla) com 0 min de exposição ao IP B) bananeira variedade 'NBA' (*Musa acuminata* Colla) com 5 min de exposição ao IP C) figueira variedade 'Minifigo' (*Ficus carica* L.) com 0 min de exposição ao IP D) figueira variedade 'Minifigo' (*Ficus carica* L.) com 20 min de exposição ao IP e o segundo pico G1 é o da ervilha (*Pisum sativum* L.). UFLA, Lavras, MG, 2011.

### 3.5 Influência do padrão externo de referência na qualidade das análises de citometria de fluxo

Não foi verificada qualquer diferença estatística em relação aos padrões utilizados nas variedades analisadas, como pode ser observado na Tabela 6. Porém, ocorreram sobreposições, ou seja, os picos da amostra analisada e do padrão utilizado se sobrepuseram, não havendo assim a possibilidade de análise. Isso ocorreu quando foram utilizados os padrões soja e tomate na determinação do conteúdo de DNA das variedades de bananeira ‘Caipira’ (~1,80 pg) e ‘Bucanero’ (~2,42 pg) e na macieira variedade ‘Baronesa’ (~1,70 pg) (Figura 7). Foi ainda verificada sobreposição dos picos do tomate (padrão de referência externo) e da variedade ‘NBA’ (Tabela 10).

Como visto na Tabela 6, isso também ocorreu para as análises de ‘NBA’ (~1,06 pg) e macieira com o padrão interno rabanete. Os padrões que não apresentaram sobreposição, independente das espécies avaliadas, foram a ervilha e o feijão fava. Isso se deve a não proximidade dos valores do padrão de referência e da amostra analisada (Figura 6).

A utilização do padrão de referência milho (*Zea mays* L.) não foi interessante, visto que não formou pico algum. Isso pode ter ocorrido devido aos tampões utilizados, pois, mesmo sendo ideais para cada espécie (experimento realizado anteriormente), esses tampões podem não ser eficientes no isolamento de núcleos do milho (Tabela 10).

Deve-se evitar a fava (26,90 pg) e o centeio (16,19 pg) como padrões de referência, pois o conteúdo de DNA de ambos é muito superior ao das espécies analisadas, podendo levar a erros no resultado. Na tabela 7, estão citados os conteúdos de DNA (em pg) dos padrões de referência utilizados neste experimento.

No início do desenvolvimento da citometria de fluxo vegetal, células de animais eram utilizadas como padrões de referência, e, durante um tempo, acreditou-se que esses padrões eram adequados para as plantas. Michaelson (1991) concluiu que padrões de referências vegetais eram melhores do que os usados até então.

Tabela 10. Coeficientes de variação das análises de citometria de fluxo usando diferentes padrões de referência em bananeira variedades ‘NBA’, ‘Caipira’ e ‘Bucanero’ (*Musa acuminata* Colla), figueira variedade ‘Minifigo’ (*Ficus carica* L.), macieira variedade ‘Baronesa’ (*Malus domestica* Borkh.) e pessegueiro variedade ‘Tropical’ (*Prunus persica* (L.) Batsch). Lavras-MG, 2011.

Padrões de Referência	NBA	Caipira	Bucanero	Figueira	Macieira	Pessegueiro
Ervilha	1,00 a	1,00 a	1,00 a	1,34 a	1,00 a	1,67 a
Feijão Fava	1,00 a	1,00 a	1,00 a	1,00 a	1,00 a	1,67 a
Milho	**	**	**	**	**	**
Rabanete	*	1,34 a	1,00 a	0,67 a	*	1,67 a
Centeio	1,34 a	1,34 a	1,00 a	1,00 a	1,00 a	2,00 a
Soja	1,00 a	*	*	1,00 a	*	1,34 a
Tomate	*	*	*	2,34 a	*	1,67 a
CV (%)	36,66	36,66	17,62	15,87	20,83	26,97

Médias seguidas das mesmas letras minúsculas na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knot ( $p \leq 0,05$ ).

\* Sobreposição dos picos da amostra e do padrão interno.

\*\* Não houve formação de picos, impossibilitando a análise.

Price e Johnston (1996) recomendaram que o padrão de referência utilizado na citometria de fluxo deve possuir valor de DNA próximo ao da amostra cujo conteúdo é desconhecido para evitar a não-linearidade, mas não deve haver sobreposições dos picos.

Tendo como referência o tipo de padrão utilizado, os resultados que podem ser considerados como relativamente confiáveis são 1,70; 1,78; 2,29; 0,72; 1,53 e 0,73, respectivamente para as variedades ‘NBA’, ‘Caipira’,

‘Bucanero’ (bananeira), ‘Minifigo’ (figueira), ‘Baronesa’ (macieira), ‘Tropical’ (pessegueiro) (Tabela 11).

Tabela 11. Conteúdo de DNA (pg) usando diferentes padrões de referência em bananeira variedades ‘NBA’, ‘Caipira’ e ‘Bucanero’ (*Musa acuminata* Colla), figueira variedade ‘Minifigo’ (*Ficus carica* L.), macieira variedade ‘Baronesa’ (*Malus domestica* Borkh.) e pessegueiro variedade ‘Tropical’ (*Prunus persica* (L.) Batsch). Lavras-MG, 2011.

Padrões de Referência	NBA	Caipira	Bucanero	Figueira	Macieira	Pessegueiro
Ervilha	1,70 a	1,78 a	2,29 a	0,72 a	1,53 b	0,73 a
Feijão Fava	0,90 b	1,74 b	2,19 b	0,68 b	1,63 a	0,68 b
Milho	**	**	**	**	**	**
Rabanete	*	0,75 c	0,59 d	0,61 c	*	0,61 c
Centeio	1,04 b	1,73 b	2,26 c	0,64 c	1,67 a	0,64 c
Soja	1,32 b	*	*	0,74 a	*	0,74 a
Tomate	*	*	*	0,68 b	*	0,68 b
CV (%)	12,63	0,89	0,98	3,07	2,17	3,07

Médias seguidas das mesmas letras minúsculas na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knot ( $p \leq 0,05$ ).

\* Sobreposição dos picos da amostra e do padrão interno.

\*\* Não houve formação de picos, impossibilitando a análise.

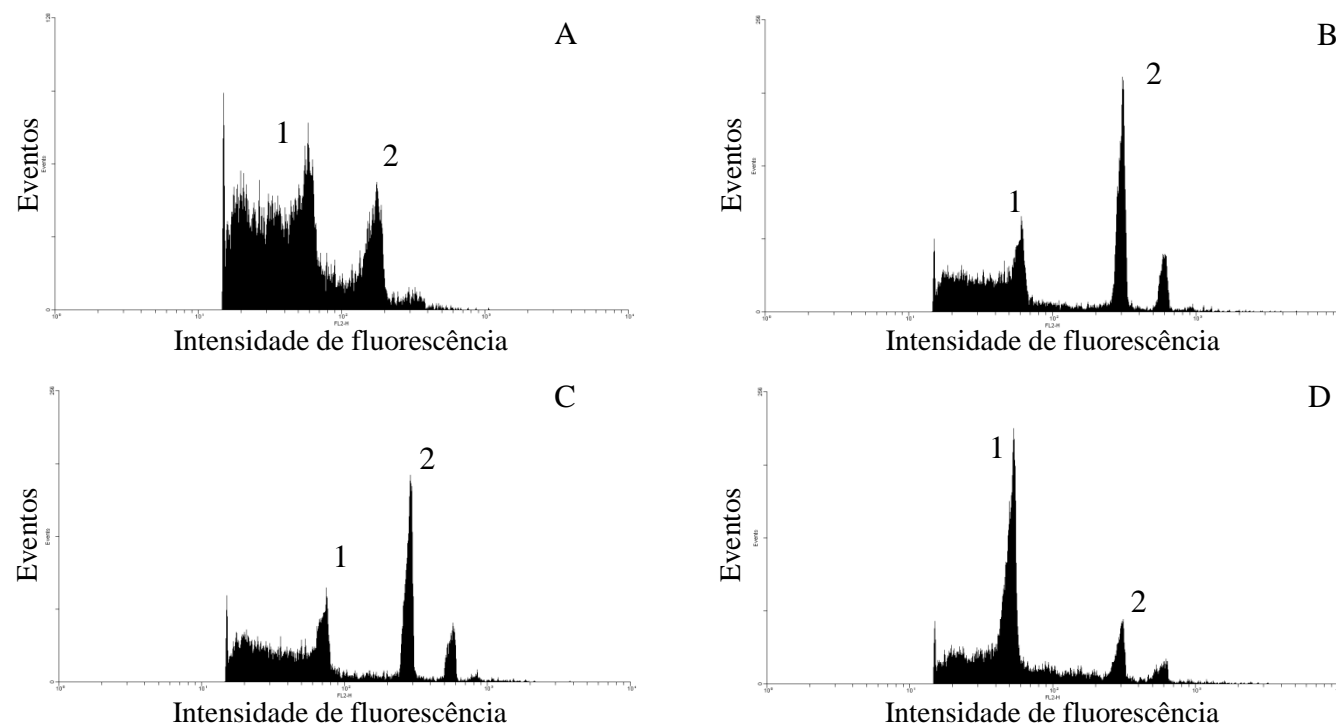


Figura 6 Histogramas de citometria de fluxo obtidos com diferentes padrões externos A) Pico 1: bananeira variedade 'Caipira' (*Musa acuminata* Colla), pico 2: milho (*Zea mays* L.) B) Pico 1: bananeira variedade 'Caipira' (*Musa acuminata* Colla), pico 2: ervilha (*Pisum sativum* L.) C) Pico 1: bananeira variedade 'Bucanero' (*Musa acuminata* Colla), pico 2: ervilha (*Pisum sativum* L.) D) macieira variedade Baronesa (*Malus domestica* Borkh.) pico 2: ervilha (*Pisum sativum* L.). UFLA, Lavras, MG, 2011.

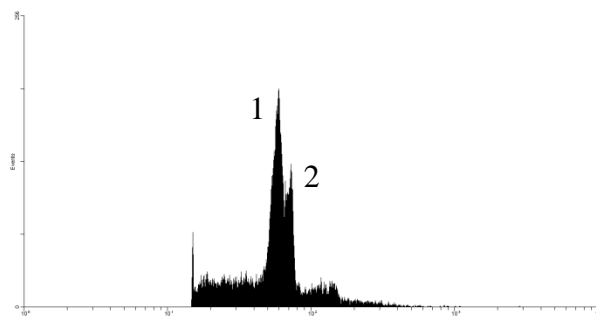


Figura 7. Histograma de citometria de fluxo obtido de pico 1: macieira variedade 'Baronesa' (*Malus domestica* Borkh.), pico 2: tomateiro (*Lycopersicon esculentum* L.). UFLA, Lavras, MG, 2011.

#### 4. CONCLUSÃO

O tampão mais apropriado para o preparo de amostras foliares de todas as variedades estudadas é o Marie, exceto para macieira 'Baronesa', para a qual recomenda-se o tampão Tris.MgCl<sub>2</sub>.

O volume do fluorocromo Iodeto de Propídeo deve ser de 5µL/ml e as soluções podem ser lidas imediatamente após a adição do mesmo. A RNase é dispensável na solução nuclear e o fluorocromo deve permanecer em contato com a suspensão de núcleos de bananeira variedade 'NBA' por 5 minutos antes da realização da análise pelo citômetro de fluxo.

O padrão de referência recomendado para todas as variedades analisadas é a ervilha (*Pisum sativum* L.).

## REFERÊNCIAS

BARRE, P. et al. Reliable flow cytometric estimation of nuclear DNA content in coffee trees. **Cytometry**, New York, v. 24, n. 1, p. 32-38, Feb. 1996.

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

BROWN, J. W. The ribonuclease p database. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 27, n. 1, p. 3660-3662, Feb. 1999.

DOLEZEL, J. Applications of flow cytometry for the study of plant genomes. **Journal of Applied Genetics**, Poznan, v. 38, n. 3, p. 258-302, June 1997.

DOLEZEL, J.; BARTOS, J. Plant DNA por citometria de fluxo e estimativa do tamanho do genoma nuclear. **Annals of Botany**, London, v. 95, n. 1, p. 99-110, Jan. 2005.

DOLEZEL, J.; BINAROVÁ, P.; LUCRETTI, S. Analysis of nuclear DNA content in plant cells by flow cytometry. **Biologia Plantarum**, Copenhagen, v. 31, n. 1, p. 113-120, Feb. 1989.

DOLEZEL, J.; DOLEZELOVÁ, M.; NOVÁK, F. Flow cytometric estimation of nuclear DNA amount in diploid bananas (*Musa acuminata* and *M. balbisiana*). **Biologia Plantarum**, Copenhagen, v. 36, n. 3, p. 351-357, Sept. 1994.

DOLEZEL, J. et al. Estimativa do tamanho do genoma da planta por citometria de fluxo: comparação laboratório Inter. **Annals of Botany**, London, v. 82, p. 17-26, 1998a. Supplement.

\_\_\_\_\_. Plant genome size estimation by flow cytometry: inter-laboratory comparison. **Annals of Botany**, London, v. 82, n. 1, p. 27-35, 1998b.

DOLEZEL, J.; SGORBATI, S.; LUCRETTI, S. Comparison of three DNA fluorochromes for flow cytometric estimation of nuclear DNA content in plants. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 85, n. 4, p. 625-631, Aug. 1992.

EVANS, G. M.; DURRANT, A.; REES, H. Associated nuclear changes in the induction of flax genotrophs. **Nature**, London, v. 212, p. 697-699, 1966.



GALBRAITH, D. W. et al. Analysis of nuclear DNA content and ploidy in higher plants. **Current Protocols in Cytometry**, Somerset, v. 7, n. 6, p. 7-22, 2001.

\_\_\_\_\_. Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissues. **Science**, New York, v. 220, n. 4601, p. 1049-1051, June 1983.

GREILHUBER, J. et al. **Flow cytometry with plant cells: analysis of genes, chromosomes and genomes**. Weinheim: Wiley-VCH, 2007. 99 p.

LACERDA, M. A. D.; LACERDA, R. D.; ASSIS, P. C. O. A participação da fruticultura no agronegócio brasileiro. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, João Pessoa, v. 4, n. 1, p. 1-9, jan./jun. 2004.

LEAL, F. et al. Nuclear DNA content of *Vitis vinifera* variedades and ploidy level analyses of somatic embryo-derived plants obtained from another culture. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 25, n. 9, p. 978-985, Sept. 2006.

LOUREIRO, J. et al. Comparison of four nuclear isolation buffers for plant DNA flow cytometry. **Annals of Botany**, London, v. 98, n. 3, p. 679-689, June 2006a.

\_\_\_\_\_. Flow cytometric and microscopic analysis of the effect of tannic acid on plant nuclei and estimation of DNA content. **Annals of Botany**, London, v. 98, n. 3, p. 515-27, June 2006b.

LOUREIRO, J. C. M. **Flow cytometric approaches to plant genomes**. 2007. 246 p. Tese (Doutorado em Biologia) - Universidade de Aveiro, Coimbra, 2007.

LYSÁK, M.; DOLEŽEL, J. Estimation of nuclear DNA content in *Sesleria* (Poaceae). **Caryologia**, Firenze, v. 52, n. 1, p. 123-132, 1998.

MARIE, D.; BROWN, S. C. A cytometric exercise in plant DNA histograms, with 2c values for seventy species. **Biology of the Cell**, London, v. 78, n. 1, p. 41-51, Mar. 1993.

MICHAELSON, M. J. et al. Variation of nuclear DNA content in *Helianthus annuus* (Asteraceae). **American Journal of Botany**, Columbus, v. 78, n. 9, p. 1238-1243, Sept. 1991.

OTTO, F. J. DAPI staining of fixed cells for high-resolution flow cytometry of nuclear DNA in methods in cell biology. In: CRISSMAN, H. A.;

DARZYNKIEWICZ, Z. (Ed.). **Methods in cell biology**. New York: Academic, 1990. p. 105-110.

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

PRICE, H. J.; JOHNSTON, J. S. Influence of light on DNA content of *Helianthus annuus* Linnaeus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 93, n. 5, p. 11264-11267, Nov. 1996.

SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE. **WinMDI version 2.8**. Disponível em: <<http://facs.scripps.edu/software.html>>. Acesso em: 10 jan. 2011.

### **CAPÍTULO 3**

**CARACTERIZAÇÃO DE VARIEDADES DE FIGUEIRA (*Ficus carica* L.),  
MACIEIRA (*Malus domestica* BORKH) E PESSEGUEIRO [*Prunus persica* (L.)  
BATSCH] UTILIZANDO A CITOMETRIA DE FLUXO**

## RESUMO

A determinação do conteúdo de DNA em variedades pertencentes à mesma espécie e a seleção de genótipos de variedades que apresentam características desejáveis, como melhor adaptação ao clima local, serve como ferramenta para os programas de melhoramento de plantas. O objetivo, neste trabalho, foi de caracterizar, de acordo com o conteúdo relativo de DNA, variedades de figueira (*Ficus carica* L.), macieira (*Malus domestica* Borkh) e pessegueiro (*Prunus persica* (L.) Batsch). Foram avaliadas 7 variedades de macieira ('Baronesa', 'Eva', 'Gala Real', 'Imperatriz', 'Julieta', 'Princesa' e 'Rainha'), 18 variedades de figueira ('Bêbara Branca', 'Bruswick', 'Calabacita', 'Colo de Dama', 'Dauphine', 'Frucôte', 'Lemon', 'Lampa Preta', 'Montes', 'Maia', 'Mini Figo', 'Nazaré', 'Negro de Bursa', 'Princesa', 'Pingo de Mel', 'Roxo de Valinhos', 'Três Num Prato' e 'Troiano') e 22 variedades de pessegueiro ('Aurora-1', 'Biuti', 'Centenário', 'Charme', 'Delicioso Precoce', 'Diamante', 'Doçura 2', 'Douradão', 'Douradão 2', 'Eldorado', 'Flor da Prince', 'Jóia', 'Kampai', 'Libra', 'Maciel', 'Maravilha', 'Marli', 'Oknawa', 'Oknawa Roxo', 'Régis', 'Rei da Conserva' e 'Tropical') pertencentes ao BAG da UFLA. Para a determinação do conteúdo de DNA, aproximadamente 20-30 mg de folhas jovens das plantas e de *Pisum sativum* (padrão de referência externo) foram triturados em placa de Petri contendo 1mL de tampão Marie (Figueira e Pessegueiro) ou Tris-MgCl<sub>2</sub> (Macieira). A suspensão nuclear foi corada com o fluorocromo Iodeto de Propídeo. As variedades de pessegueiro mostram diferenças significativas na análise de conteúdo de DNA pela técnica de citometria de fluxo. As sete variedades de macieira são estatisticamente semelhantes entre si. As variedades de figo foram separadas em dois distintos grupos. A estimativa do conteúdo de DNA obtida pela citometria de fluxo permite a classificação das variedades intraespecíficas das espécies frutíferas analisadas.

Palavras-chave: Caracterização. Frutíferas temperadas. Conteúdo de DNA.

## ABSTRACT

The determination of DNA content in variedades belonging to the same species and the selection of hybrid genotypes that have desirable characteristics, such as better adaptation to local climate, serve as a tool for plant breeding programs. The objective of this study was to characterize, according to the relative content of DNA variedades fig (*Ficus carica* L.), apple (*Malus domestica* Borkh) and peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] belonging to the BAG of UFLA. It was evaluated 7 apple variedades (Baronesa, Eva, Gala Real, Imperatriz, Julieta, Princesa e Rainha), 18 figs variedades (Bêbara Branca, Bruswick, Calabacita, Colo de Dama, Dauphine, Frucôte, Lemon, Lampa Preta, Montes, Maia, Mini Figo, Nazaré, Negro de Bursa, Princesa, Pingo de Mel, Roxo de Valinhos, Três Num Prato, Troiano) and 22 peach variedades (Aurora-1, Biuti, Centenário, Charme, Delicioso Precoce, Diamante, Doçura 2, Douradão, Douradão 2, Eldorado, Flor da Prince, Jóia, Kampai, Libra, Maciel, Maravilha, Marli, Oknawa, Oknawa Roxo, Regis, Rei da Conserva e Tropical) of belonging to BAG UFLA. To determine the DNA content, approximately 20-30 mg of leaves of young plants and *Pisum sativum* (external reference standard) were crushed in a Petri dish containing 1 ml of buffer Marie (Fig and Peach) or Tris-MgCl<sub>2</sub> (Apple). The nuclei were stained with the fluorochrome propidium iodide. Peach variedades showed significant differences between them, the analysis of DNA content by flow cytometry technique and seven apple variedades are statistically similar. Fig variedades were separated into two distinct groups. We conclude that it is possible to classify these kinds of fruit for the amount of DNA, the technique of flow cytometry, which can be used as a useful tool for the improvement of these species.

Keywords: Characterization. Temperate fruits. DNA content.

## 1 INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos maiores produtores mundiais de frutas, com área cultivada superior a 6,2 milhões de hectares e produção de 34 milhões de toneladas anuais. A região Sul do Brasil, principal produtora de frutas de clima temperado, é a responsável por 99,65%, 74,08% e 73,30% da produção nacional de maçãs, pêssegos e figos, respectivamente (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE, 2009).

A expansão dos cultivos de frutíferas temperadas no mundo, em regra, deve-se ao desenvolvimento de variedades adaptadas aos diferentes ambientes, na medida da diversidade genética das espécies.

Os programas de melhoramento genéticos dessas espécies proporcionaram o desenvolvimento e a seleção de genótipos adaptados a locais de inverno ameno, o que possibilitou a expansão do cultivo na região sudeste brasileira. O melhoramento dessas espécies baseia-se no cruzamento de variedades de interesse com o objetivo de obter indivíduos semelhantes aos seus progenitores. Para tanto, há a necessidade de realizar a distinção das variedades e relacioná-las ao tamanho do genoma de cada um, para, assim, evitar, por exemplo, a incompatibilidade reprodutiva. Nesse âmbito, a técnica de citometria de fluxo se apresenta como uma ferramenta útil a fim de verificar o conteúdo de DNA e possibilitar a seleção de genótipos de variedades pertencentes a uma mesma espécie, os quais apresentem características desejáveis para o melhoramento de plantas, como a melhor adaptação ao clima local (KIM et al., 2003).

A citometria de fluxo pode ser definida como um método útil, novo e rápido para determinar, de forma eficiente e reprodutível, o conteúdo relativo de DNA nuclear e o nível de ploidia de um grande número de espécies (vegetais e animais). Pode ser utilizada também para distinguir células com características

diferentes, mas pertencentes a uma mesma população mista, e, atualmente, está sendo utilizada para a análise da composição de vários componentes químicos em diferentes tecidos (OCHATT, 2011). Bennett, Bhandol e Leitch (2000) afirmaram que a estimativa do conteúdo de DNA nuclear é uma das importantes aplicações da citometria de fluxo, uma técnica confiável e eficiente para a caracterização do conteúdo de DNA nuclear vegetal.

A descoberta da quantidade de DNA nuclear de determinada espécie, utilizando-se a citometria de fluxo, somente pode ser obtida por meio de comparação com núcleos pertencentes a um padrão de referência, cujo conteúdo de DNA é previamente conhecido (DOLEZEL; BARTOS, 2005).

Com a verificação do conteúdo em DNA nuclear, a citometria de fluxo consegue detectar variações interespecíficas de acordo com os valores de DNA intermedirios, mas isso apenas quando diferem o suficiente (HIRSCH et al., 2001; KELLER et al., 1996). O estudo da variação do tamanho do genoma dentro da mesma espécie começou quando Evans, Durrant e Rees (1966) publicaram o primeiro artigo sobre o assunto.

Variabilidades intraespecíficas já foram relatadas na espécie *Dasypyrum villosum* (CACERES et al., 1998), entre as variedades de milho (RAYBURN et al., 1985), em *Milium effusum* (BENNETT; BENNETT, 1992), em *Dactylis glomerata* (REEVES et al., 1998) e em *Eleusine coracana* (HIREMATH; SALIMATH, 1991). Contudo, a variação intraespecífica continua a ser um dos temas mais controversos no estudo do genoma do tamanho da planta, pois tais variações ocorrem em razão da heterogeneidade genômica ou das limitações técnicas. Por isso, a qualidade das análises deve ser padronizada e os erros metodológicos, evitados (BENNETT; LEITCH, 2005). Já Temsch e Greilhuber (2000), estudando o amendoim (*Arachis hypogaea*), encontraram uniformidade do tamanho do genoma na espécie, o que pode estar ligado à baixa variabilidade molecular.

Quando se trabalha com número muito grande de indivíduos, como por exemplo em bancos de germoplasma, a determinação da quantidade de DNA nuclear por meio da citometria de fluxo pode substituir a contagem de cromossomos. O conhecimento do número de cromossomos, do nível de ploidia ou do conteúdo de DNA nuclear, além de importantíssimo para a caracterização do germoplasma, é imprescindível para os trabalhos de melhoramento genético, na programação dos cruzamentos (SCHIFINO-WITTMANN, 2001).

Este trabalho foi realizado com o objetivo de caracterizar, de acordo com o conteúdo relativo de DNA, variedades de figueira (*Ficus carica* L.), macieira (*Malus domestica* Borkh) e pessegueiro [*Prunus persica* (L.) Batsch], com baixa exigência em frio.



## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Material vegetal**

A caracterização do conteúdo de DNA foi realizada em 7 variedades de macieira ('Baronesa', 'Eva', 'Gala Real', 'Imperatriz', 'Julieta', 'Princesa' e 'Rainha'), 18 variedades de figueira ('Bêbara Branca', 'Bruswick', 'Calabacita', 'Colo de Dama', 'Dauphine', 'Frucote', 'Lemon', 'Lampa Preta', 'Montes', 'Maia', 'Minifigo', 'Nazaré', 'Negro de Bursa', 'Princesa', 'Pingo de Mel', 'Roxo de Valinhos', 'Três Num Prato' e 'Troiano') e em 22 variedades de pessegueiro ('Aurora-1', 'Biuti', 'Centenário', 'Charme', 'Delicioso Precoce', 'Diamante', 'Doçura 2', 'Douradão', 'Douradão 2', 'Eldorado', 'Flor da Prince', 'Joia', 'Kampai', 'Libra', 'Maciel', 'Maravilha', 'Marli', 'Oknawa', 'Oknawa Roxo', 'Regis', 'Rei da Conserva' e 'Tropical') pertencentes ao pomar da UFLA.

### **2.2 Análises de citometria de fluxo**

O preparo das amostras e as análises por citometria de fluxo foram realizados no Laboratório de Cultura de Tecidos/Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras. Com objetivo de estimar o conteúdo de DNA, foram avaliadas três amostras de três plantas diferentes de cada variedade analisada, sendo cada uma delas considerada como uma repetição (três repetições). O material utilizado para a análise foram folhas jovens. Foi coletada uma folha de cada planta e retirada uma pequena porção na região mediana. Os fragmentos foram embalados em sacos plásticos juntamente com algodão umedecido, identificados e levados para o Laboratório.

Para a determinação do conteúdo de DNA, aproximadamente 20-30 mg de folhas jovens das plantas e de *Pisum sativum* (padrão de referência interno) foram triturados em placa de Petri contendo 1mL de tampão Marie (figueira e pessegueiro) ou Tris-MgCl<sub>2</sub> (macieira) gelado para a liberação dos núcleos (DOLEZEL; BINAROVA; LUCRETTI, 1989). A suspensão de núcleos foi aspirada através de duas camadas de gaze, com auxílio de uma pipeta Pasteur, e filtrada através de uma malha de 50 µm. Os núcleos foram corados pela adição de 25 µL de uma solução de 1mg/1mL de Iodeto de Propídeo. Para cada amostra, pelo menos 5 mil núcleos foram analisados utilizando-se uma escala logarítmica. A análise foi realizada no citômetro FacsCalibur (BD, Biosciences, San Jose, CA, USA). Os histogramas foram obtidos com o software Cell Quest (Becton Dickinson e Companhia, San Jose, CA, USA) e analisados estatisticamente no software WinMDI 2.8 (SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE, 2011).

O conteúdo de DNA nuclear em (pg) das plantas foi estimado utilizando-se a fórmula a seguir:

$$\text{DNA amostra} = \left( \frac{\text{G1 Amostra}}{\text{G1 padrão}} \right) \times \text{DNA padrão}$$

Os conteúdos de DNA obtidos foram submetidos a análises de variância pelo teste F e, quando significativas, as médias dos conteúdos foram comparadas pelo teste de agrupamento Scott-Knott ( $p \leq 0,01$ ).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com o conteúdo de DNA, as variedades de figueira puderam ser separadas em dois grupos. ‘Lampa Preta’, ‘Três Num Prato’, ‘Nazaré’, ‘Troiano’, ‘Bêbara Branca’, ‘Montes’, ‘Princesa’ e ‘Brunswick’ pertencem ao grupo que apresentou maiores quantidades de DNA, com a média do conteúdo de DNA observado entre todas as variedades analisados de 0,944 pg. As demais variedades apresentaram média de 0,814 pg, conteúdo este menor do que o primeiro grupo (Figura 1).

Tabela 1. Conteúdo de DNA relativo e desvio padrão de variedades de figueira (*Ficus carica* L.). UFLA, Lavras, MG, 2011.

Variedade	Nº de Repetições	Conteúdo de DNA (pg) <sup>1</sup>	MSK <sup>2</sup>	Desvio Padrão
Bêbara Branca	3	0,93	a	0,0015
Brunswick	3	1,00	a	0,0031
Calabacita	3	0,85	b	0,0060
Colo de Dama	3	0,82	b	0,0163
Dauphine	3	0,84	b	0,0070
Frucote	3	0,76	b	0,0047
Lemon	3	0,81	b	0,0675
Lampa Preta	3	0,86	b	0,0019
Montes	3	0,96	a	0,0110
Maia	3	0,84	b	0,0091
Minifigo	3	0,75	b	0,0010
Nazaré	3	0,91	a	0,1059
Negro de Bursa	3	0,83	b	0,0030
Princesa	3	0,97	a	0,1656
Pingo de Mel	3	0,81	b	0,0040
Roxo de Valinhos	3	0,78	b	0,0029
Três Num Prato	3	0,91	a	0,0043
Troiano	3	0,93	a	0,0053
CV(%)			7,01	

<sup>1</sup>Valor médio do conteúdo de DNA.

<sup>2</sup>Médias seguidas por letras iguais pertencem ao mesmo grupo pelo teste de agrupamento Scott-Knott a 1% de probabilidade.

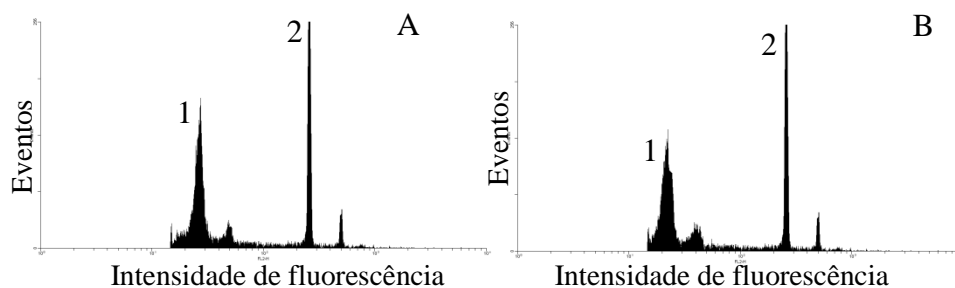


Figura 1. Histograma de citometria de fluxo na quantificação de DNA de figueira obtido usando o tampão Marie. O primeiro pico corresponde a: A) variedade ‘Bêbara Branca’ B) variedade ‘Roxo de Valinhos’; o segundo pico corresponde à ervilha (*Pisum sativum* L.). UFLA, Lavras, MG, 2011.

Esse agrupamento foi diferente do esperado, pois, nos dois grupos ocorrem figos pertencentes a tipos distintos. O ‘Lampa Preta’ e o ‘Brunswick’, por exemplo, pertencem ao tipo São Pedro e Comum, respectivamente (Tabela 1).

A diferença do conteúdo de DNA de algumas variedades pode ser atribuída ao efeito nucleotípico que atribui às variações no conteúdo de DNA importância tanto no desenvolvimento quanto na adaptação por meio de seus efeitos em parâmetros, como volume nuclear e celular, tempo dos ciclos mitótico e meiótico (NUNES, 2008).

Para Williams et al. (2002), pode haver essa ligeira variação na quantidade de DNA porque há pequenas amplificações ou deleções de sequências de DNA nos cromossomos durante o processo de hibridização. Então, essa hibridização pode eventualmente alterar o tamanho do genoma sem mudança simultânea no número de cromossomos.

Loureiro et al. (2007) relataram que, utilizando análises feitas em citometria de fluxo e coradas com fluorocromo Iodeto de Propídeo, procedimento similar ao feito neste trabalho, foi obtido um conteúdo de DNA de uma planta diplóide de *Ficus carica* de 0,7 pg, o que está bem próximo ao do grupo de menor conteúdo de DNA apresentado neste trabalho. Esse resultado

significa que os autores podem então ter utilizado as análises com uma variedade de figueira pertencente a este grupo. O resultado é diferente do que havia sido previamente relatado por Ohri e Khoshoo (1986), em que a mesma espécie, embora analisada pela metodologia de microespectrofotometria de Feulgen, apresentou o dobro do valor, 1,41 pg de conteúdo de DNA. Isso pode ser explicado pela diferença entre as metodologias empregadas e pelo uso de variedades diferentes das utilizadas nesta caracterização, o que evidencia a necessidade de análise de variedades distintas.

Os sete indivíduos de macieira apresentados foram estatisticamente semelhantes com respeito ao conteúdo de DNA, o qual variou entre 1,42 e 2,19 pg em média, como descrito na Tabela 2. Com isso, a variação intraespecífica do conteúdo de DNA nuclear se mostrou insignificante (Figura 2).

Tabela 2. Conteúdo médio de DNA relativo (pg) e desvio padrão de variedades de macieira (*Malus domestica* Borkh). UFLA, Lavras, MG, 2011.

Variedade	Nº de Repetições	Conteúdo de DNA (pg) <sup>1</sup>	MSK <sup>2</sup>	Desvio Padrão
Baronesa	3	1,88	a	0,0169
Eva	3	2,19	a	0,0092
Gala Real	3	1,76	a	0,0390
Imperatriz	3	1,71	a	0,0177
Julieta	3	1,42	a	0,4865
Princesa	3	2,00	a	0,0030
Rainha	3	1,68	a	0,0171
CV(%)		12,55		

<sup>1</sup>Valor médio do conteúdo de DNA

<sup>2</sup>Médias seguidas por letras iguais pertencem ao mesmo grupo pelo teste de agrupamento Scott-Knott a 1% de probabilidade.

Nessas variedades possivelmente ocorreu a disploidia, que, segundo Guerra (1988, 2008), consiste na alteração do número cromossômico sem variação no conteúdo de DNA e, geralmente, ocorre devido à quebra nos cromossomos, originando cromossomos telocêntricos (fissão cêntrica) ou o

inverso (fusão cêntrica). Tal disploidia pode resultar em citótipos diferentes com conteúdos de DNA semelhantes, porém diferentes quanto ao número de cromossomos (STEDJE, 1987).

Em um estudo com 12 variedades de soja (*Glycine max* L.), Chung et al. (1998) encontraram uma pequena variação do conteúdo de DNA (1,046 vezes) das variedades. Essa variação foi correlacionada a características agrônomicas, tais como peso de semente e área foliar.

Schuster e Buttner (1995) relataram diferentes níveis de ploidia em oito espécies do gênero *Malus*. Os autores sugeriram que as diferenças de conteúdo de DNA na mesma espécie podem ser atribuídas à hibridação frequente neste gênero. Essa hipótese é reforçada pelo grande número de variedades encontradas em comparação com as espécies primárias.

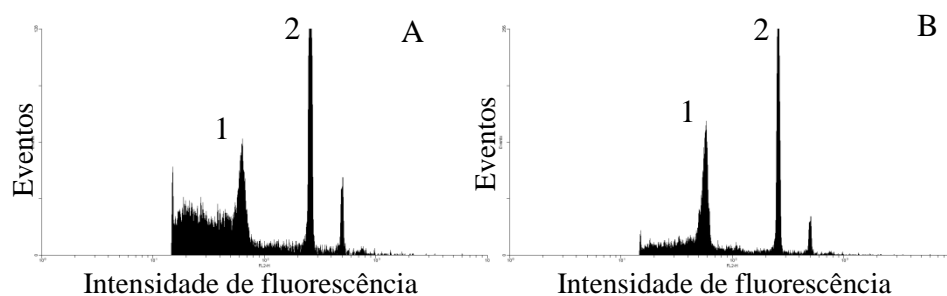


Figura 2. Histograma de citometria de fluxo na quantificação de DNA de macieira obtido usando o tampão Marie. O primeiro pico corresponde a: A) var. Baronesa B) var. Princesa e o segundo pico corresponde à ervilha (*Pisum sativum* L.). UFLA, Lavras, MG, 2011.

Baranyi e Greilhuber (1996) também encontraram uniformidade do conteúdo de DNA acessos selvagens de *Pisum sativum* em todo mundo, provavelmente porque esses indivíduos ainda não sofreram as consequências das pressões do meio ambiente, como o processo de seleção de indivíduos de genomas menores e o desenvolvimento mais rápido. Isso explicaria a igualdade desses acessos quanto ao tamanho do genoma. Para Greilhuber (2005), a

velocidade do desenvolvimento do vegetal depende em parte do tamanho do genoma; assim, os vegetais de menor conteúdo de DNA apresentam desenvolvimento e ciclo celular mais rápido do que aquelas variedades com maiores conteúdos. Em outras palavras, plantas de ciclos reprodutivos curtos, tais como plantas anuais, têm em média genomas menores do que aquelas com ciclos longos, como plantas perenes.

As variedades de pessegueiro apresentaram as maiores diferenças quanto ao conteúdo de DNA. Pôde-se agrupá-las em quatro distintos grupos (Tabela 3). Os maiores conteúdos de DNA foram observados nas variedades ‘Doçura 2’, ‘Maciel’, ‘Maravilha’ e ‘Regis’ (0,796; 0,786; 0,815 e 0,817 pg respectivamente). Os menores conteúdos de DNA foram encontrados nas variedades ‘Aurora-1’, ‘Douradão 2’, ‘Oknawa Roxo’ e ‘Rei da Conserva’ (0,676; 0,657; 0,675; 0,628 pg respectivamente). As outras variedades tiveram conteúdo intermediário, variando de 0,628 a 0,676 pg (Figura 3).

Investigações moleculares de plantas afirmam ainda que a variabilidade do tamanho do genoma está mais associada a diferenças no conteúdo de DNA repetitivo. Em todas as espécies investigadas, as contribuições mais significativas para o tamanho do genoma são relativas a uma classe de DNA celular chamada retroelementos ou retrotransposons (BENETTEZEN; MA; DEVOS, 2005). Esses elementos correspondem a sequências de DNA que têm a capacidade de mudar de posição no genoma, independente de homologias entre as regiões, e, conhecidos como parasitas moleculares, aproveitam-se da estrutura proporcionada pela célula e promovem sua própria duplicação (CORDEIRO, 2005).

Capy et al. (1998) e Kidwell e Lisch (1997) propuseram, como característica desse elemento de transposição, a variabilidade no número de cópias do mesmo entre e dentro das espécies. Quando estão no estado ativado,

são independentes capazes de autoduplicação, podendo gerar variabilidade no conteúdo de DNA intraespécies.

Tabela 3. Conteúdo de DNA relativo e desvio padrão de variedades de pessegueiro (*Prunus persica* (L.) Batsch). UFLA, Lavras, MG, 2011.

Variedade	Nº de Repetições	Conteúdo de DNA (pg) <sup>1</sup>	MSK <sup>2</sup>	Desvio Padrão
Aurora-1	3	0,676	d	0,0340
Bonão	3	0,773	b	0,0167
Biuti	3	0,768	b	0,0092
Centenário	3	0,725	c	0,0052
Charme	3	0,753	b	0,0164
Delicioso Precoce	3	0,736	c	0,0153
Diamante	3	0,765	b	0,0321
Doçura	3	0,701	c	0,0167
Doçura 2	3	0,796	a	0,0299
Douradão	3	0,729	c	0,0166
Douradão 2	3	0,657	d	0,0299
ElDouradão	3	0,719	c	0,0242
Flor da Prince	3	0,726	c	0,0158
Joia	3	0,738	c	0,0214
Kampai	3	0,748	b	0,0183
Libra	3	0,718	c	0,0121
Maciel	3	0,786	a	0,0064
Maravilha	3	0,815	a	0,0035
Oknawa Roxo	3	0,675	d	0,0146
Regis	3	0,817	a	0,0101
Rei da Conserva	3	0,628	d	0,0320
Tropical	3	0,718	c	0,0185
CV(%)			3,15	

<sup>1</sup>Valor médio do conteúdo de DNA.

<sup>2</sup>Médias seguidas por letras iguais pertencem ao mesmo grupo pelo teste de agrupamento Scott-Knott a 1% de probabilidade.

Arumuganathan e Earle (1991), Baird, Estager e Wells (1994) e Dickson, Arumuganathan e Doyle (1992), encontraram valores de conteúdo de DNA para pessegueiro variando entre 0,54 e 0,57 pg. Já Loureiro et al. (2007) encontraram, para essa mesma espécie, o valor de  $0,62 \pm 0,01$  pg, o que está



abaixo do avaliado neste trabalho. Essa diferença pode ser explicada pela falta de padronização da técnica de citometria de fluxo até então, fato que pode ocasionar: erros instrumentais ou metodológicos e interferência de metabólitos secundários na coloração do DNA com potencial de flutuação sazonal resultando em diferenças nas medições entre diferentes laboratórios (DOLEZEL; GREILHUBER; SUDA, 2007).

Em seu trabalho, Baird, Estager e Wells (1994) determinaram o conteúdo de DNA de 22 genótipos de *Prunus* e relataram que um genoma nuclear relativamente pequeno e estável é característico da espécie *Prunus*, coerente com o número de cromossomos pequenos ( $x = 8$ ) desta espécie. Esse baixo conteúdo de DNA foi também encontrado neste trabalho.

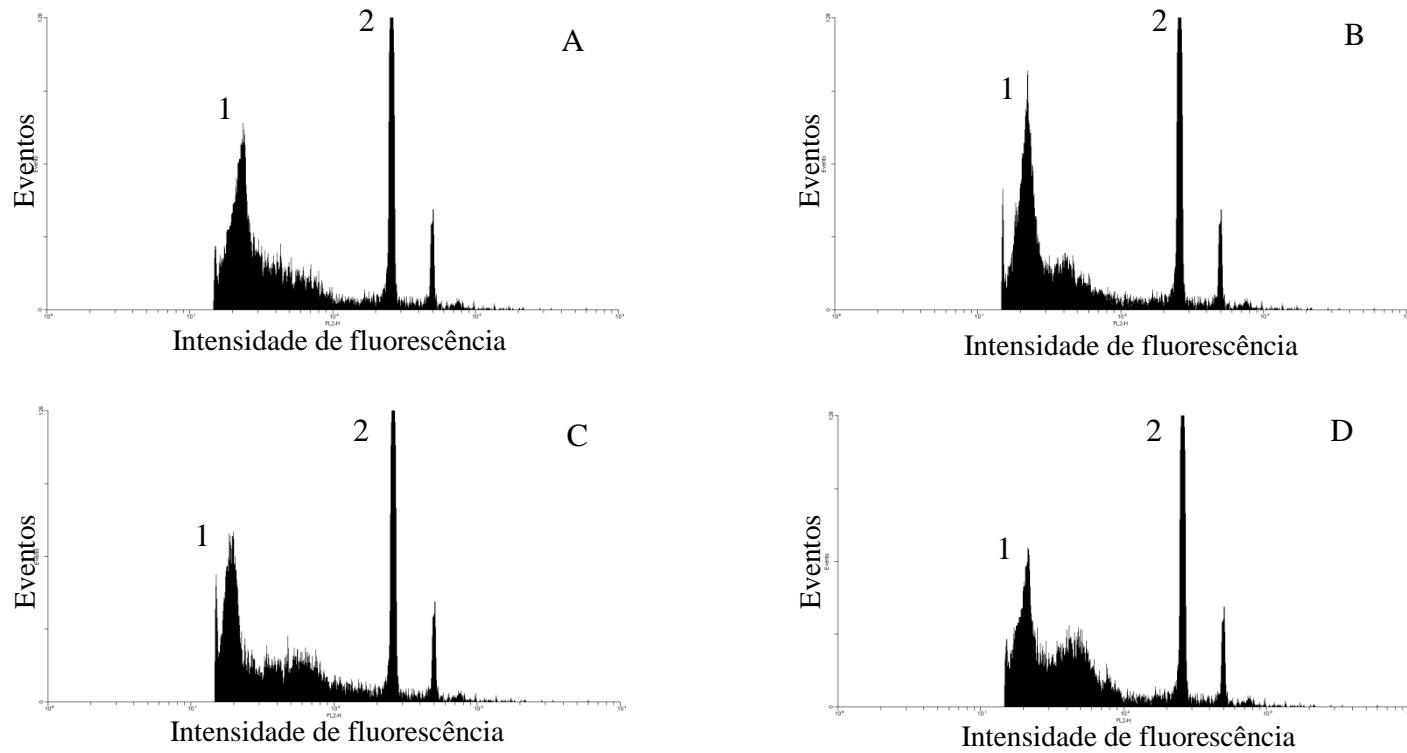


Figura 3. Histograma de citometria de fluxo na quantificação de DNA de pessegueiro obtido usando o tampão Marie. O primeiro pico corresponde a: A) variedade Doçura 2 B) variedade Biuti C) variedade Centenário D) variedade Aurora-1; e o segundo pico corresponde à ervilha (*Pisum sativum* L.). UFLA, Lavras, MG, 2011.

#### **4 CONCLUSÃO**

A estimativa do conteúdo de DNA obtido pela citometria de fluxo possibilita a distinção de variedades de figueira e pessegueiro.

Há pouca variação no conteúdo de DNA das cultivares avaliadas, principalmente nas variedades de macieira.

## REFERÊNCIAS

- ARUMUGANATHAN, S. K.; EARLE, E. Estimation of nuclear DNA content of plants by flow cytometry. **Plant Molecular Biology**, Zurich, v. 9, n. 3, p. 229-241, Aug. 1991.
- BAIRD, W. V.; ESTAGER, A. S.; WELLS, J. K. Estimating nuclear DNA content in peach and related diploid species using laser flow cytometry and DNA hybridization. **Journal of the American Society of Horticultural Science**, Alexandria, v. 119, n. 6, p. 1312-1316, Nov. 1994.
- BARANYI, M.; GREILHUBER, J. Flow cytometric and Feulgen densitometric analysis of genome size variation in *Pisum*. **Theoretical and Applied Genetics**, Heidelberg, v. 92, n. 2, p. 297-307, Apr. 1996.
- BENNETT, M. D.; BHANDOL, P.; LEITCH, I. J. Nuclear DNA amounts in angiosperms and their modern uses-807 new estimates. **Annals of Botany**, London, v. 86, n. 4, p. 859-909, Aug. 2000.
- BENNETT, M. D.; LEITCH, I. J. Plant genome size research: a field in focus. **Annals of Botany**, London, v. 95, n. 1, p. 1-6, Feb. 2005.
- BENNETT, S. T.; BENNETT, M. D. Variation in nuclear DNA amount between wild and cultivated populations of *Milium effusum* ( $2n = 28$ ). **Genome**, Ottawa, v. 35, n. 6, p. 1050-1053, Dec. 1992.
- BENNETZEN, J. L.; MA, J.; DEVOS, K. M. Mechanisms of recent genome size variation in flowering plants. **Annals of Botany**, London, v. 95, n. 1, p. 127-132, Feb. 2005.
- CACERES, M. E. et al. Genome size variations within *Dasyphyrum villosum*: correlations with chromosomal traits, environmental factors and plant phenotypic characteristics and behavior in reproduction. **Theoretical and Applied Genetics**, Heidelberg, v. 96, n. 5, p. 559-567, Apr. 1998.
- CAPY, P. et al. **Dynamics and evolution of transposable elements**. Austin: Landes Bioscience, 1998. 197 p.
- CHUNG, J. et al. Relationships between nuclear DNA content and seed and leaf size in soybean. **Theoretical and Applied Genetics**, Heidelberg, v. 96, n. 8, p. 1064-1068, June 1998.

CORDEIRO, J. **Investigação sobre a presença de retrotransposons em populações naturais do grupo *Cardini* do gênero *Drosophila* (Diptera: Drosophilidae) do sul do Brasil.** 2005. 84 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2005.

DICKSON, E. E.; ARUMUGANATHAN, S. K.; DOYLE, J. J. Nuclear DNA content variation within the Rosaceae. **American Journal of Botany**, Saint Louis, v. 79, n. 9, p. 1081-1086, Sept. 1992.

DOLEZEL, J.; BARTOS, J. Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. **Annals of Botany**, London, v. 95, n. 1, p. 99-110, Feb. 2005.

DOLEZEL, J.; BINAROVA, P.; LUCRETTI, S. Analysis of nuclear DNA content in plant cells by flow cytometry. **Biologia Plantarum**, Copenhagen, v. 31, n. 1, p. 113-120, Feb. 1989.

DOLEZEL, J.; GREILHUBER, J.; SUDA, J. **Flow cytometry with plant cells: analysis of genes, chromosomes and genomes.** Weinheim: Wiley-VCH, 2007. 454 p.

GREILHUBER, J. Intraspecific variation in genome size in angiosperms: identifying its existence. **Annals of Botany**, London, v. 95, n. 1, p. 91-98, Feb. 2005.

GUERRA, M. Chromosome numbers in plant cytotaxonomy: concepts and implications. **Cytogenetic and Genome Research**, Würzburg, v. 120, n. 3/4, p. 339-350, May 2008.

GUERRA, M. S. **Introdução à citogenética geral.** Rio de Janeiro: Guanabara, 1988. 142 p.

HIREMATH, S. C.; SALIMATH, S. S. Quantitative nuclear DNA changes in *Eleusine* (Gramineae). **Plant Systematics and Evolution**, Vienna, v. 178, n. 3/4, p. 225-233, July 1991.

HIRSCH, A. M. et al. Embryo rescue from interspecific crosses in the genus *Actinidia* (kiwifruit). **Plant Cell Reports**, New Jersey, v. 20, n. 6, p. 508-516, Sept. 2001.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção agrícola municipal.** Rio de Janeiro, 2009. Disponível em:

<<http://www.IBGE.ibge.gov.br/bda/tabela/listab11.asp?c=1613&n=0&u=0&z=p&o=23&i=P>>. Acesso em: 5 jun. 2011.

KELLER, E. R. J. et al. Interspecific crosses of onion with distant *Allium* species and characterization of the presumed hybrids by means of flow cytometry, karyotype analysis and genomic in situ hybridization. **Theoretical and Applied Genetics**, Heidelberg, v. 92, n. 3/4, p. 417-424, Mar. 1996.

KIDWELL, M. G.; LISCH, D. R. Transposable elements as source of variation in animals and plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 94, n. 15, p. 7704-7711, 1997.

KIM, K. et al. Characterization of ploidy levels of wheat microspore-derived plants using laser flow cytometry. **In Vitro Cellular and Developmental Biology, Plant**, New York, v. 39, n. 6, p. 663-668, Dec. 2003.

LOUREIRO, J. et al. Two new nuclear isolation buffers for plant DNA flow cytometry: a test with 37 species. **Annals of Botany**, London, v. 100, n. 4, p. 875-888, Oct. 2007.

NUNES, J. D. **Bandeamento cromossômico e conteúdo de DNA em espécies tropicais de Pinus**. 2008. 53 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.

OCHATT, S. J. **Flow cytometry**: ploidy determination, cell cycle analysis, DNA content per nucleus. Disponível em: <<http://www.noble.org/medicagohandbook/index.html>>. Acesso em: 11 jun. 2011.

OHRI, D.; KHOSHOO, T. N. Genome size in gymnosperms. **Plant Systematics and Evolution**, Vienna, v. 153, n. 1, p. 119-132, 1986.

RAYBURN, A. L. et al. C-band heterochromatin and DNA content in *Zea mays*. **American Journal of Botany**, Saint Louis, v. 72, n. 10, p. 1610-1617, Oct. 1985.

REEVES, G. et al. Genome size is negatively correlated with altitude in natural populations of *Dactylis glomerata*. **Annals of Botany**, London, v. 82, p. 99-105, 1998. Supplement A.

SCHIFINO-WITTMANN, M. T. Determinação da quantidade de DNA nuclear em plantas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 31, n. 5, p. 897-902, set./out. 2001.

SCHUSTER, M.; BUTTNER, R. Chromosome numbers in the *Malus* wild species collection of the genebank Dresden-Pillnitz. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Secaucus, v. 42, n. 4, p. 353-361, 1995.

SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE. **WinMDI version 2.8**. Disponível em: <<http://facs.scripps.edu/software.html>>. Acesso em: 10 jan. 2011.

STEDJE, B. Chromosome evolution within the *Ornithogalum tenuifolium* complex (Hyacinthaceae), with special emphasis on the evolution of bimodal karyotypes. **Plant Systematics and Evolution**, Vienna, v. 166, n. 1, p. 79-79, 1989.

TEMSCH, E. M.; GREILHUBER, J. Genome size variation in *Arachis hypogaea* and *A. monticola* re-evaluated. **Genome**, Ottawa, v. 43, n. 3, p. 449-451, June 2000.

WILLIAMS, B. R. et al. A murine model of Nijmegen breakage syndrome. **Current Biology**, London, v. 12, n. 8, p. 648-653, Apr. 2002.

## **CAPÍTULO 4**

### **UTILIZAÇÃO DA MODELAGEM MATEMÁTICA (REDES NEURAIIS ARTIFICIAIS) NA CLASSIFICAÇÃO DE AUTOTETRAPLOIDES DE BANANEIRA (*Musa acuminata* COLLA)**



## RESUMO

Objetivou-se desenvolver uma metodologia para possibilitar a classificação de plantas de bananeira submetidas à indução de duplicação cromossômica utilizando Redes Neurais Artificiais (RNA). Os dados utilizados neste trabalho foram retirados de uma tese já apresentada, cujo autor estudou a correlação entre a massa fresca de discos foliares e o conteúdo de DNA. A RNA foi implementada com a função de classificação. A taxa de aprendizado e o termo *momentum* adotados foram respectivamente iguais a 0,01 e 0,2, o número de épocas de treinamento foi 1000. Esses valores foram determinados por meio de tentativa e erro. Para o treinamento, 90% das plantas foram utilizadas e, para validação, 10% do total de 114 autotetraploides produzidos artificialmente por meio de exposição ao antimitótico colchicina. A RNA classificou corretamente 10 das 11 amostras utilizadas para validação. A estatística Kappa foi de 63,33%, o que indica que a RNA pode ainda ser melhorada. A rede neural artificial do tipo *Multi Layer Perceptron* implementada é eficaz na pré-seleção de poliploides desejáveis de bananeira Tong Dok Mak.

Palavras-chave: Modelagem Matemática. Aprendizagem. Neurônios.

## ABSTRACT

The objective of this work to develop a methodology that enables the classification of banana plants subjected to chromosome doubling using artificial neural networks. The data used in this study were taken from a thesis already presented, where the author studied the correlation between the mass and leaf cutter disk DNA content. The learning rate and momentum term were adopted as 0.01 and 0.2 respectively, the number of training epochs was 1000. These values were determined through trial and error. The Artificial Neural Network (ANN) was implemented with the rate function for the training were the same 90% of the plants used for validation and 10% of the total 114 polyploids produced artificially by means of their exposure to colchicine, a antimitótico. The ANN correctly classified 10 of the 11 samples used for validation. The Kappa statistic was 63.33%, which indicates that the RNA can still be improved. The Artificial Neural Network implemented the Multi Layer Perceptron is effective in pre-selection of desirable polyploids banana Tong Dok Mak.

Keywords: Mathematical modeling. Learning. Neurons.

## 1 INTRODUÇÃO

Embora exista um número expressivo de variedades de bananeira no Brasil, quando se considera preferência dos consumidores, produtividade, tolerância a pragas, porte adequado, resistência à seca e ao frio, restam poucas variedades com potencial agrônômico para utilização comercial (SILVA et al., 2002). A maioria das variedades comerciais é pouco produtiva, possui porte alto e ainda está associada à falta de resistência às principais doenças e pragas.

O melhoramento genético da bananeira, em especial dos genótipos diplóides (AA), visa ao desenvolvimento de variedades comerciais resistentes às principais doenças, tais como Mal-do-panamá, Sigatoka Amarela e Negra, Moko, dentre outras características indesejáveis. Porém, esse processo tem sido dificultado pela ausência de sementes ou pela inviabilidade frequente do pólen (SILVA et al., 1999). Esse fato dificulta o melhoramento convencional da bananeira, em especial nas bananeiras triplóides (AAA) pertencentes ao subgrupo Cavendish, devido à presença da partenocarpia e esterilidade.

A fim de contornar esse entrave, os programas de melhoramento genético têm dado atenção especial à obtenção de autotetraploides induzidos em bananeira. Esses autotetraploides são obtidos por meio da duplicação do número básico de cromossomos de um diplóide, o que resultará em um indivíduo com quatro genomas idênticos. Esse processo pode ser realizado com a utilização de substâncias antimitóticas, sendo a colchicina a mais amplamente empregada. Esses tetraploides artificiais serão utilizados no cruzamento com outros diplóides, gerando triplóides com características desejáveis incorporadas. Um dos problemas encontrados no processo de indução artificiais de ploidia é a regeneração de plantas mixoploides, isto é, plantas que apresentam células com variação no número cromossômico em um mesmo tecido ou entre órgãos de uma mesma planta.

Após a indução da poliploidia, o procedimento seguinte é a confirmação da duplicação cromossômica, cujos principais métodos de análise são: contagem cromossômica, avaliação de caracterização citoanatômicos e estimativa do conteúdo de DNA pela citometria de fluxo, e a contagem do número de cromossomos de células mitóticas. Contudo, esse procedimento é moroso e trabalhoso, não recomendado, portanto, quando se trabalha com um grande número de plantas. Outro método é a caracterização citoanatômica, que se dá pela observação do “efeito gigas” no qual órgãos e células de uma planta aumentam proporcionalmente a quantidade de DNA, no entanto, isso pode levar a resultados errôneos, pois essas características podem perfeitamente ser influenciadas pelo ambiente de cultivo (SARI; ABAK; PITRAT, 1999; SOUZA; QUEIROZ, 2004; VILLA, 1995).

Assim para avaliar maior número de indivíduos de citometria de fluxo é útil apesar da facilidade a citometria de fluxo é um método caro e que requer mão-de-obra qualificada.

Nesse contexto, a modelagem matemática surge como uma ferramenta auxiliar no melhoramento genético dessa cultura, pois se pode realizar a classificação dessas plantas expostas a antimitóticos, em diplóides, mixoploides e tetraploides. Nos últimos anos, o desenvolvimento da inteligência artificial, em especial das redes neurais artificiais (RNA) aplicadas à agricultura, facilitou diversos trabalhos de previsão, reconhecimento e classificação e resolveu problemas nas diversas áreas do conhecimento. Esse tipo de rede visa à representação do comportamento humano através de modelos computacionais, de maneira geral projetados para modelar a maneira como o cérebro realiza uma tarefa particular ou uma função de interesse (RUSSEL; NORVIG, 1995).

Louro, Mendonça e Gonzaga (2006), na tentativa de minimizar a perda de fruto, aplicou um RNA no sistema de produção de tomate. Essa rede classificava o tomate quanto à preferência do consumidor. Esse autor relatou que

houve uma diminuição da perda de frutos, visto que o fator humano não mais afetava a seleção, pois os critérios eram matemáticos e pré-estabelecidos. Entretanto, deve-se tomar cuidado na escolha das variáveis, porque grande quantidade de materiais não garante bom desenvolvimento da rede. Os tomates foram classificados como verdes ou maduros, pequenos ou grandes.

Por meio da classificação feita pela RNA e por métodos estatísticos, Shahin, Symons e Poysa (2006) classificaram as sementes de soja quanto à dimensão por meio de processamento de imagens.

Objetivou-se, com este trabalho, desenvolver uma metodologia que possibilite a classificação de plantas de bananeira submetidas à duplicação cromossômica utilizando redes neurais artificiais.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Obtenção dos dados**

Os dados utilizados neste trabalho foram obtidos junto à Universidade Federal de Lavras (UFLA) e se refere a experimentos relacionados à tese intitulada *Respostas Morfogenéticas de Bananeira submetida à Poliploidização* localizadas no município de Cruz Das Almas, Bahia (COSTA, 2010).

### **2.2 Material vegetal**

A variedade utilizada foi a Tong Dok Mak (TDM). Os ápices caulinares dessa variedade foram submetidos à duplicação cromossômica por meio de tratamento com colchicina (0; 1,25; 2,5; 3,75 e 5 mM, por 24 e 48 horas). Para aclimatização, as plantas alongadas e enraizadas em sala de crescimento de luz natural foram retiradas dos frascos de cultivo, submetidas à lavagem e poda das suas raízes e, imediatamente, transferidas para sacos de polietileno de três litros de capacidade preenchidos com substrato composto do substrato casca de *Pinus* grânulos médios.

Em seguida, as plantas foram mantidas em telhado por 90 dias, coberto com filme de polietileno transparente (150 microns) e sombrite (50% de interceptação luminosa). A irrigação foi feita de forma manual e, a cada 15 dias, realizou-se a adubação foliar com macro e micronutrientes.

### **2.3 Discos foliares de plantas de bananeira variedade Tong Dok Mak tratadas com colchicina**

Para a obtenção dos discos foliares, as folhas foram coletadas de plantas da mesma idade, nas primeiras horas de cada manhã, especificamente entre seis e sete horas. Imediatamente após a excisão, as folhas foram mantidas em sacos plásticos fechados para manter a umidade e evitar a perda excessiva de água por transpiração. Ao final da coleta, foram conduzidas ao laboratório para a determinação da massa fresca dos discos. Os discos foliares foram retirados na região mediana do limbo foliar da segunda folha expandida (direção ápice base). Para tanto, utilizou-se um vazador de 1,608 cm de diâmetro (2,0297 cm<sup>2</sup> de área interna).

### **2.4 Citometria de fluxo de plantas de bananeira variedade Tong Dok Mak tratadas com colchicina**

As mesmas plantas, das quais foram retirados os discos foliares, foram analisadas utilizando a técnica de citometria de fluxo. O preparo das amostras e as análises foram conduzidos nos Laboratórios de Genética e Imunologia da Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, Minas Gerais.

Foram utilizados aproximadamente 20-30mg de tecido foliar fresco obtido a partir de uma amostra da folha mais jovem de cada planta. Como padrão externo de referência, utilizou-se a mesma quantidade de tecido foliar de *Glycine Max*. Para preparação das amostras e obtenção de suspensão nuclear, o tecido foliar foi triturado em placa de Petri contendo 1mL de tampão LB01.

A suspensão de núcleos foi aspirada através de duas camadas de gaze, com auxílio de uma pipeta plástica, e filtrada através de uma malha de 50 µm. Os núcleos foram corados pela adição de 25 µL de uma solução de 1mg/1mL de

Iodeto de Propídeo. As amostras foram armazenadas em refrigerador e analisadas após 1-2 horas. Para cada amostra, pelo menos 5 mil núcleos foram analisados utilizando-se uma escala logarítmica. A análise foi realizada no citômetro FacsCalibur (BD, Biosciences, San Jose, CA, USA), e os histogramas foram obtidos com o software Cell Quest (Becton Dickinson e Companhia, San Jose, CA, USA) e analisados estatisticamente no software WinMDI 2.8 (SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE, 2011).

O conteúdo de DNA nuclear em (pg) das plantas foi estimado utilizando-se a fórmula a seguir:

$$\text{DNA amostra} = \left( \frac{\text{G1 Amostra}}{\text{G1 padrão}} \right) \times \text{DNA padrão}, \text{ onde o DNA da}$$

amostra refere-se à quantidade de DNA nuclear da amostra, o G1 da amostra corresponde à posição do pico G1 da amostra. O G1 padrão à posição do pico G1 da espécie padrão de referência usado e o DNA padrão ao conteúdo de DNA da espécie padrão de referência utilizada.

## 2.5 Redes neurais

Cada planta foi classificada de acordo com seu conteúdo de DNA, como visto na Tabela 1.

Tabela 1 Quantidade de plantas classificadas de acordo com a ploidia. UFLA, Lavras, MG, 2011.

Ploidia	Número de Plantas
Diplóide	13
Mixoploide	36
Tetraploide	65



Esses dados foram correlacionados com a massa fresca de discos foliares das respectivas plantas, sendo este o atributo utilizado como variável de entrada para a implementação da RNA. Não foi necessária a padronização desses dados, pois todos já se encontravam entre 0 e 1. A mineração dos dados, que se encontravam em um arquivo de formato “.xls”, foi realizada no software livre WEKA®.

O algoritmo de treinamento de dados utilizado foi o de classificação e a variável de saída foi a ploidia (diplóide, mixoploide e tetraploide).

Os resultados foram obtidos utilizando *percentage split*. Esse método de amostragem particiona o conjunto de dados em partes que o usuário escolhe. Nesse caso, 90% dos dados foram escolhidos para treinamento (103 plantas) e 10% para a validação (11 plantas).

Foram utilizadas RNAs do tipo MLP - *MultiLayer Perceptron* (Perceptron de multicamadas) que possuem uma ou mais camadas escondidas. O algoritmo de treinamento utilizado foi o *backpropagation* (RUMELHART; HINTON; WILLIAMS, 1986), com termo *momentum* adicionado. A taxa de aprendizado e o termo *momentum* adotados foram respectivamente iguais a 0,01 e 0,2. O número de camadas ocultas da rede foi igual a dois. Sendo assim, a arquitetura da rede foi 2, 10, 10, 3, ou seja, dois neurônios na camada de entrada, dez em cada camada oculta e três na camada de saída, o número de épocas de treinamento foi estipulado em 1000. Esses valores foram determinados por meio de tentativa e erro.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O tipo MLP de Rede Neural foi utilizado, pois os dados de saída não são linearmente separáveis. No conjunto de validação, apenas uma planta foi classificada incorretamente.

Tabela 2 Matriz de confusão com as taxas de acerto médio obtidas para cada classe, de acordo com os conjuntos de teste. UFLA, Lavras, MG, 2011.

Ploidia	Mixoplóide	Tetraplóide	Diplóide
Mixoploide	<b>9</b>	0	0
Tetraploide	0	<b>9</b>	0
Diplóide	0	1	<b>0</b>

Na Tabela 3, é observado o peso médio para os principais parâmetros de treinamento. O Gráfico 1 apresenta o valor da estatística Kappa de 63,33%, que indica quão próximos estão os dados obtidos do observado. Esse valor de Kappa é satisfatório, porém pode ser melhorado. Costa (2010) encontrou correlação entre poliploides identificados pela técnica de discos foliares e aquelas analisadas por citometria de fluxo. Utilizando a estatística convencional, por meio da análise de variância e de comparação das médias pelo Teste de Tukey a 1% de probabilidade, esse mesmo autor relatou que, por meio da massa fresca de discos foliares, foi possível diferenciar plantas diplóides não tratadas com antimetabólitos de poliploides. Entretanto, esse tipo de análise não possibilita a classificação de outras plantas, além das analisadas no experimento. A RNA, diferente disso, é uma ferramenta pela qual é possível a classificação de outras plantas, não apenas as analisadas.

A rede neural apresentou resultados satisfatórios, porém, para a classificação, pode ser melhorada. Dessa forma, como pode diminuir o total de amostras analisadas no citômetro de fluxo, há apenas a necessidade de realizar

as amostras nas que apresentarem características agronômicas que levem à incerteza da classificação realizada com a utilização da RNA.

Tabela 3 Taxa de Verdadeiro Positivo, Falso Positivo, Precisão e Recall e Classes. UFLA, Lavras, MG, 2011.

	Taxa de Verdadeiro Positivo	Taxa de Falso Positivo	Precisão	Recall	Classes
Média Ponderada	0,909	0,409	0,827	0,909	Mixoploide Diplóide Tetraploide

Chagas et al. (2009), trabalhando com a classificação dos níveis de degradação de pastagens na zona da mata mineira por meio de RNA, constatou que esse é um classificador viável para este fim, principalmente em grandes áreas. A eficiência da utilização de redes neurais se baseou na sua arquitetura. Nesse trabalho, os autores usaram uma rede do tipo MLP de uma camada interna com seis neurônios e os pesos foram inicializados com pequenos pesos aleatórios (variando entre -0,5 e 0,5), com a taxa de aprendizagem de 0,2 e o número de épocas igual a 10000. Esses valores foram obtidos também pela tentativa e erro.

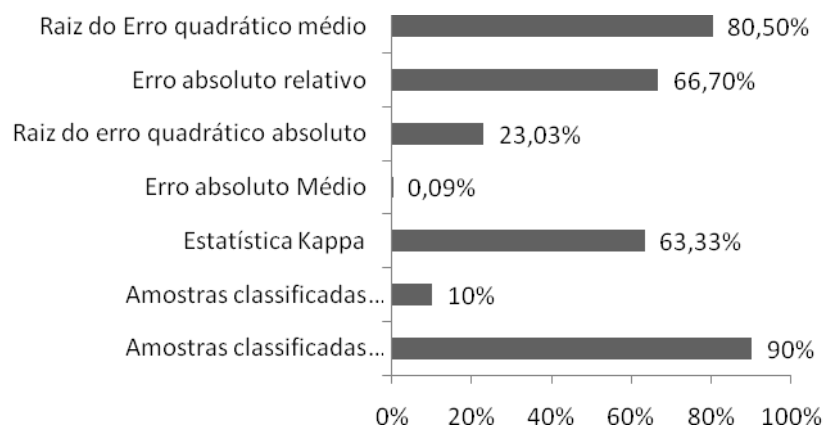


Gráfico 1. Valores de parâmetros após o treinamento. UFLA, Lavras, MG, 2011.

A rede neural artificial do tipo MLP também foi eficaz na classificação de três espécies de Iris (*Iris setosa*, *Iris virginica* e *Iris versicolor*) com base nas características da flor de cada uma. A rede também possuía apenas uma camada interna e a topologia adotada foi 4x3x2 (quatro neurônios na camada de entrada, três neurônios na camada oculta e dois neurônios na camada de saída). O algoritmo de treinamento utilizado foi o *backpropagation*. O programa utilizado na execução dos treinamentos foi o Matlab©. O menor erro encontrado foi de 0,00001, quando a rede neural utilizou 80% dos dados para treinamento e os outros 20% para validação, resultado este considerado como satisfatório (PLOTZE, 2004).

#### **4 CONCLUSÃO**

A rede neural artificial do tipo MLP implementada é eficaz na pré-seleção de poliploides desejáveis de bananeira Tong Dok Mak.

## REFERÊNCIAS

- CHAGAS, C. S. et al. Utilização de redes neurais artificiais na classificação de níveis de degradação em pastagens. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 13, n. 3, p. 319-327, 2009.
- COSTA, F. H. da S. **Respostas morfogenéticas de bananeira submetida à poliploidização**. 2010. 134 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.
- LOURO, A. H. F.; MENDONÇA, M. M.; GONZAGA, A. Classificação de tomates utilizando redes neurais artificiais. In: WORKSHOP DE VISÃO COMPUTACIONAL, 2., 2006, São Carlos. **Anais...** São Carlos: UFSCar, 2006. p. 239-244.
- PLOTZE, R. O. **Identificação de espécies vegetais através da análise da forma interna de órgãos foliares**. 2004. 152 p. Dissertação (Mestrado em Ciência da Computação e Matemática Computacional) - Universidade de São Paulo, São Carlos, 2004.
- RUMELHART, D. E.; HINTON, G. E.; WILLIAMS, R. J. Learning internal representations by error propagation. In: RUMELHART, D. E.; MCCLELLAND, J. L. (Ed.). **Parallel distributed processing: explorations in the microstructure of cognition**. Cambridge: MIT, 1986. p. 45-76.
- RUSSEL, S. J.; NORVIG, P. **Artificial intelligence: a modern approach**. Upper Saddle River: Prentice-Hall, 1995. 932 p.
- SARI, N.; ABAK, K.; PITRAT, M. Comparison of ploidy level screening methods in watermelon: *Citrullus lanatus* (Thunb.). **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 82, n. 3/4, p. 265-277, Apr. 1999.
- SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE. **WinMDI version 2.8**. Disponível em: <<http://facs.scripps.edu/software.html>>. Acesso em: 10 jan. 2011.
- SHAHIN, M. A.; SYMONS, S. J.; POYSA, V. W. Determining soybean seed size uniformity with image analysis. **Biosystems Engineering**, Saint Albans, v. 94, n. 2, p. 191-198, Apr. 2006.
- SILVA, S. de O. et al. Bananeira. In: BRUCKNER, C. H. (Ed.). **Melhoramento de fruteiras tropicais**. Viçosa, MG: UFV, 2002. p. 101-157.

SILVA, S. de O. et al. Variabilidade genética e melhoramento da bananeira. In: QUEIRÓZ, M. A. de; GOEDERT, C. O.; RAMOS, S. R. R. (Ed.). **Recursos genéticos e melhoramento de plantas para o nordeste brasileiro**. Petrolina: EMBRAPA Semi-Árido; Brasília: EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1999. Disponível em: <<http://www.cpatia.embrapa.br>>. Acesso em: 28 jun. 2011.

SOUZA, F. F.; QUEIRÓZ, M. A. Avaliação de caracteres morfológicos úteis na identificação de plantas poliploides de melancia. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 22, n. 3, p. 516-520, maio/jun. 2004.

VILLA, V. B. **Análise citomorfoanatômica e eletroférica de variedades de *Solanum tuberosum* L. X. (*Solanum Tuberosum* L. X *Solanum chacoense* Bitt)**. 1995. 76 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1995.