

# Una herramienta eficaz en el estudio de la Botánica: la citometría de flujo

*E. Cires*<sup>1,\*</sup> y *C. Cuesta*<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> UNIVERSIDAD DE OVIEDO, DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA DE ORGANISMOS Y SISTEMAS, CATEDRÁTICO RODRIGO URÍA S/N, 33071 OVIEDO, ESPAÑA.

<sup>2</sup> CURRENT ADDRESS: DEPARTMENT OF PLANT SYSTEMS BIOLOGY, VIB, TECHNOLOGIEPARK 927, 9052 GHENT, BÉLGICA.

\*CONTACTO: CIRESEDUARDO@GMAIL.COM

## ABSTRACT

Over the last decade there has been a tremendous increase in the use of flow cytometry (FCM) in studies on the biosystematics, ecology and population biology of vascular plants. Most studies, address questions related to spatial distribution and evolutionary significance of genome duplication (polyploidy), chromosomal variation (aneuploidy) and variation in genome size. The unsurpassed speed and reliability of estimating differences in nuclear DNA content by FCM paves the way for large-scale surveys at the landscape, population, individual and tissue levels. Another attractive feature of FCM is the possibility of reformulating former taxonomic concepts to propose robust classifications based on a detailed understanding of population structure and phenotypic variation of plant groups under investigation. In this review, special attention is paid to

FCM as applied to Botany studies, and some new and less wellknown uses of it for plants will be discussed. It is likely that in the future the use of FCM in studies on taxonomy, ecology and population biology of plants will increase both in scope and frequency. Flow cytometry alone, but especially in combination with other molecular and phenotypic approaches, promises advances in our understanding of the functional significance of variation in genome size in plants.

## KEY WORDS

Flow cytometry, genome size, nuclear DNA content, ploidy-level determination, protocols

## INTRODUCCIÓN A LA CITOMETRÍA DE FLUJO

La citometría de flujo (en inglés “flow cytometry”, FCM) es un excelente método para analizar propiedades ópticas, tales como la fluorescencia y dispersión de la luz de partículas microscópicas en suspensión líquida. Las células son inyectadas en un flujo líquido laminar (el flujo laminar se caracteriza por la “no mezcla” de las líneas de flujo del sistema, es decir, al introducir un colorante éste fluye por el sistema como una línea más o menos estrecha sin mezclarse con el líquido circundante) y pasan una a una por un punto de medida iluminado con luz de alta intensidad (láser). Cada célula en el punto de interacción produce una señal fluorescente que es de intensidad proporcional a su contenido en fluorocromo. El impacto del rayo en cada partícula genera señales ópticas que, una vez recogidas por medio de detectores, son convertidas en señales o eventos electrónicos y posteriormente digitalizados y computarizados. La FCM es rápida y fiable, y por lo general la preparación de las muestras ocupa sólo unos pocos minutos y no requiere costosos reactivos. Se trata de un método “no destructivo” porque solamente se necesitan unos pocos miligramos de tejido, obteniendo una gran cantidad de núcleos que pueden ser medidos en poco tiempo (Fig. 1).



Figura 1. Equipo estándar de citometría de flujo

El núcleo celular lleva la mayor parte del material hereditario de la planta y ha sido objeto de intensos estudios. La estimación de contenido de ADN nuclear (C-valor) en unidades absolutas (picogramos de ADN y número de pares de bases), es la aplicación más popular en el área de la Botánica, con más de 800 publicaciones (*FLOWER – Base de datos dedicada a estudios de citometría de flujo en plantas*;

<http://flower.web.ua.pt/>) y más de 6000 especies de angiospermas analizadas (BENNETT & LEITCH, 2011). Estos registros varían entre el tamaño genómico más pequeño detectado en *Genlisea margaretae* Hutch. (Lentibulariaceae; 1C = 0,0648 pg) hasta el mayor tamaño encontrado en *Paris japonica* (Franch. & Sav.) Franch. (Melanthiaceae; 1C = 152,23 pg), es decir una diferencia de casi 2400 veces.

## ¿CÓMO AISLAR LOS NÚCLEOS INTACTOS?

El profesor David W. Galbraith y colaboradores desarrollaron un método universal para la preparación de suspensiones de ADN nuclear (GALBRAITH *et al.*, 1983). En este protocolo, los núcleos celulares procedentes de una pequeña cantidad de tejido fresco de planta son liberados a una solución tamponadora con la ayuda de una cuchilla afilada. Después se procede a realizar una filtración del homogeneizado a través de una malla de nailon, y tras la adición de un fluorocromo de ADN la muestra está lista para su análisis. El método es rápido, conveniente y adecuado para muchas (aunque no todas) de las especies vegetales, órganos y tejidos. Este protocolo también ha sido empleado para la estimación del ADN nuclear procedente de pliegos de herbario y/o tejido congelado. El uso de muestras frescas limita la aplicación de esta técnica por ejemplo en la Botánica, donde a menudo las muestras proceden de zonas remotas de difícil acceso, que no pueden ser analizadas de inmediato.

## TIPOS DE FLUOROCROMOS

El fluorocromo empleado para estimar el contenido de ADN nuclear de las muestras de estudio debe unirse estequiométricamente con los ácidos nucleicos, por lo que la emisión de fluorescencia es directamente proporcional a la cantidad de ADN nuclear. Existe una amplia gama de fluorocromos que se unen específicamente al ADN (ver por ejemplo MCCARTHY, 2007), pero solamente unos pocos son adecuados para la cuantificación del contenido de ADN en plantas (Tabla 1).

Fluorocromo	Modo de unión	Concentración ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	L. O. excitación (nm)	L. O. emisión (nm)
Bromuro de etidio	Intercalante	50-150	523	603
Yoduro de propidio	Intercalante	50-150	538	617
4',6-diamidino-2-fenilindol	AT-selectivo	2-4	359	461
Hoechst 33258	AT-selectivo	2-4	352	455
Mitramicina	GC-selectivo	50-100	445	575

Tabla 1. Características básicas de los principales fluorocromos de ADN utilizados en el análisis de citometría de flujo de plantas.

El bromuro de etidio (EB) y el yoduro de propidio (PI) son agentes intercalantes en la doble cadena de ADN y ARN, y por tanto adecuados para la estimación del contenido de ADN nuclear en unidades absolutas, que además requieren el empleo de RNasas (DOLEŽEL, 1992). Existen fluorocromos como el 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) que se unen preferentemente a regiones del ADN ricas en AT- y otros como la mitramicina que lo hacen en regiones GC-, siendo este grupo de fluorocromos adecuados para la estimación del contenido de ADN, proporcionando histogramas de alta resolución y sin requerir tratamiento con RNasas.

### TIPOS DE TAMPONES DE AISLAMIENTO NUCLEAR

Diversos tampones de aislamiento nuclear han sido utilizados en la citometría de flujo de plantas. Antes de comenzar cualquier estudio, recomendamos un análisis previo con distintos tampones para determinar la eficacia de cada uno de ellos, puesto que dependiendo de la textura, grosor o consistencia del material a analizar, unos tampones podrían ser

más adecuados que otros. A continuación, mostramos los tampones más comúnmente utilizados en la citometría de flujo de plantas (Tabla 2).

### ESTANDARIZACIÓN DE LAS MUESTRAS

Un estándar es un material estable que tiene unos valores determinados de fluorescencia o dispersión de luz. Se usan para alinear o calibrar las prestaciones del citómetro de flujo. La interpretación de los resultados en términos de ploidía y tamaño del genoma requieren un estándar de referencia; es decir, una muestra con nivel de ploidía y/o contenido de ADN nuclear conocido. Se debe elegir un estándar cuyo tamaño del genoma no difiera más del doble respecto a la muestra de estudio para evitar posibles errores de linealidad en el citómetro de flujo. Por otra parte, no deben utilizarse estándares cuyo contenido de ADN sea muy parecido a nuestra muestra de estudio, ya que podría darse el caso de obtener picos superpuestos y no diferenciar cual corresponde al estándar. Los principales estándares empleados en citometría de flujo para la estimación de contenido de ADN son mostrados en la Tabla 3.

Tampón	Composición	Referencia
Galbraith	45 mM $\text{MgCl}_2$ ; 30 mM sodium citrate; 20 mM MOPS; 0.1% (v/v) Triton X-100; pH 7.0	GALBRAITH <i>et al.</i> (1983)
$\text{MgSO}_4$	9.53 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 47.67 mM KCl; 4.77 mM HEPES; 6.48 mM DTT; 0.25% (v/v) Triton X-100; pH 8.0	ARUMUGANATHAN & EARLE (1991)
LB01	15 mM Tris; 2 mM $\text{Na}_2\text{EDTA}$ ; 0.5 mM spermine.4HCl; 80 mM KCl; 20 mM NaCl; 15 mM $\beta$ -mercaptoethanol; 0.1% (v/v) Triton X-100; pH 7.5	DOLEŽEL <i>et al.</i> (1989)
Otto	Otto I: 100 mM citric acid monohydrate; 0.5% (v/v) Tween 20 (pH approx. 2-3) Otto II: 400 mM $\text{Na}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (pH approx. 8-9)	Otto (1990); DOLEŽEL & GÖHDE (1995)
$\text{Tris.MgCl}_2$	200 mM Tris; 4 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ; 0.5% (v/v) Triton X-100; pH 7.5	PFOSSER <i>et al.</i> (1995)

Tabla 2. Tampones de aislamiento nuclear más utilizados en citometría de plantas.

Principales estándares vegetales	Contenido de 2C ADN (pg ADN)	Referencia
<i>Raphanus sativus</i> L. cv. 'Saxa'	1,11	(1)
<i>Solanum lycopersicum</i> L. cv. 'Stupické polní rané'	1,96	(1)
<i>Glycine max</i> Merr. cv. 'Polanka'	2,50	(2)
<i>Zea mays</i> L. cv. 'CE-777'	5,43	(3)
<i>Pisum sativum</i> L. cv. 'Ctirad'	9,09	(4)
<i>Secale cereale</i> L. cv. 'Daňkovské'	16,19	(4)
<i>Vicia faba</i> L. cv. 'Inovec'	26,90	(1)
<i>Allium cepa</i> L. cv. 'Alice'	34,89	(4)

Tabla 3. Principales estándares de referencia para la estimación de la cantidad de ADN nuclear en unidades absolutas en plantas. (1) DOLEŽEL et al. (1992), (2) DOLEŽEL et al. (1994), (3) LYSÁK & DOLEŽEL (1998), (4) DOLEŽEL et al. (1998).

## PROTOCOLO DE AISLAMIENTO

A continuación describimos un sencillo protocolo para la preparación de la suspensión nuclear (Figura 2):

- 1) Colocar en una placa Petri una pequeña cantidad de tejido de la planta de estudio y del estándar de referencia empleado (aproximadamente 30 mg de cada tejido). Colocar ambos tejidos uno encima del otro para uniformizar un posible efecto de compuestos citosólicos.
- 2) Añadir 1 mL del tampón (LB01, Tris.MgCl<sub>2</sub>, etc.) a la placa Petri. Se recomienda probar varios tampones para seleccionar el que mejores resultados aporte para una determinada especie y/o tejido.
- 3) Cortar de inmediato ambos tejidos con una cuchilla o bisturí (usar en cada muestra analizada una cuchilla nueva) en rodajas muy finas en el tampón escogido e incubar en hielo durante al menos 15 minutos.
- 4) Mezclar el homogeneizado pipeteando arriba y abajo varias veces (evitar la formación de burbujas de aire).
- 5) Filtrar la suspensión a través de una malla de

nailon (42 µm) en un tubo de microcentrifuga (comúnmente apodados "Eppendorf", en referencia al mayor fabricante de estos tubos).

- 6) Añadir el fluorocromo (en el caso de DAPI se usa normalmente una concentración de 4 µg mL<sup>-1</sup>; mientras que en el caso de IP y EB es de 50 µg mL<sup>-1</sup> junto con 50 µg mL<sup>-1</sup> de RNasa), y agitar suavemente. En caso de utilizar estándares animales en vez de estándares vegetales (por ejemplo eritrocitos de pollo, CRBC), éstos deben ser añadidos en este punto.
- 7) Incubar la muestra en hielo y oscuridad antes de su análisis (de 15 minutos a 1 hora), agitando ocasionalmente los tubos.

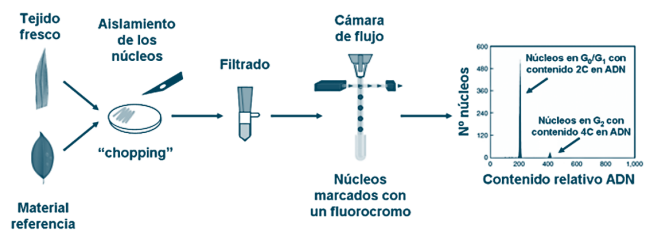


Figura 2. Diagrama de la metodología utilizada en la preparación de muestras para la determinación del contenido en ADN por citometría de flujo.

El ensayo dará lugar a un histograma de intensidades de fluorescencia, donde se podrá valorar el contenido de ADN nuclear. En general, los histogramas solamente contienen picos de núcleos en interfase, ya que la presencia de núcleos en fase S no suele ser habitual. Así, si analizamos material de hojas frescas, obtendremos un histograma con un único pico que representaría los núcleos en la fase G1 del ciclo celular. En ocasiones, también aparece el pico de la fase G2 (Fig. 2).

## ANÁLISIS DE DATOS EN CITOMETRÍA DE FLUJO

El análisis del contenido de ADN nuclear en citometría de flujo puede realizarse de las siguientes maneras:

- Análisis del nivel de ploidía utilizando un estándar externo

Introducir en el citómetro de flujo una muestra de referencia de una planta con ploidía conocida (número de cromosomas). Esta referencia debería pertenecer a la misma especie que la planta de estudio. A continuación debemos determinar el número medio del canal en donde aparece el pico G0/G1 de la muestra de ploidía conocida (estándar externo). Sin cambiar ningún parámetro del citómetro de flujo, analizamos a continuación las diferentes muestras de estudio. Por último, debemos calcular la ploidía de la muestra desconocida de la siguiente manera:

$$= \frac{\text{posición media del pico G0/G1 de la muestra}}{\text{posición media del pico G0/G1 del estándar} \times \text{ploidía del estándar de referencia}}$$

- Análisis del nivel de ploidía utilizando un estándar interno

Es el mismo concepto que el anteriormente descrito, sin embargo la muestra a estudio y el estándar interno (planta de ploidía conocida) son analizados simultáneamente. De esta manera, una perfecta superposición de los picos G0/G1 de la planta de referencia y de la muestra a estudio, indica el mismo nivel de ploidía. Obtendremos por tanto un histograma con un pico G0/G1.

- Estimación del contenido de ADN nuclear en unidades absolutas (tamaño del genoma)

La estimación de tamaño del genoma en unidades absolutas requiere la estandarización interna, es decir, debemos analizar cada una de las muestras de estudio con el estándar interno de referencia seleccionado. Aconsejamos utilizar los estándares vegetales de la Tabla 3. A continuación, la cantidad de ADN nuclear de la muestra desconocida, se calcula de la siguiente manera:

$$\text{Valor 2C de la muestra de estudio (ADN pg o Mbp)} = \frac{\text{posición del pico medio 2C de la muestra}}{\text{posición del pico medio 2C del estándar} \times \text{Valor 2C del estándar de referencia}}$$

Para compensar las pequeñas desviaciones provocadas por el citómetro de flujo, es recomendable

realizar al menos tres mediciones del contenido de ADN nuclear en días distintos. Finalmente, hay que calcular la media de contenido de 2C ADN y realizar el análisis estadístico según sea necesario. Normalmente la media de los valores del contenido de ADN debe ir acompañada de la desviación estándar, valores máximos y mínimos, así como el número de muestras. Si fuera necesario, también se puede convertir los picogramos de ADN en número de pares de bases o viceversa según la fórmula: 1 pg ADN = 0,978 x 10<sup>9</sup> bp (DOLEŽEL *et al.*, 2003). Se supone que la intensidad de fluorescencia es proporcional a la cantidad de fluorocromo, que a su vez es proporcional a la cantidad de ADN de la célula. Sin embargo, hay cierta variación entre el resultado teórico y el obtenido, por ello se define el coeficiente de variación (CV), que da una idea de la semejanza de los resultados obtenidos a la realidad. Los valores CV reflejan la calidad de los histogramas: <5%, la calidad es alta (recomendable); entre 5-10% la calidad es buena; >10% la calidad es baja y sería recomendable repetir los análisis, modificando por ejemplo el tampón empleado o la cantidad de tejido de partida.

Para un correcto uso de la terminología de citometría de flujo en plantas, recomendamos consultar las siguientes publicaciones: GREILHUBER *et al.* (2005); SUDA *et al.* (2006); GREILHUBER & DOLEŽEL (2009).

## PROBLEMAS Y SOLUCIONES

A veces aparecen inconvenientes a la hora de llevar a cabo la FCM. Un primer problema puede ser la dificultad de aislar un número suficiente de núcleos. Este inconveniente a menudo está relacionado con la estructura físico-química de la muestra. Por ejemplo, los núcleos pueden quedar atrapados dentro de las células o adherirse a compuestos mucilaginosos (LOUREIRO *et al.*, 2006; CIRES *et al.*, 2011). Otro problema habitual es la agregación de partículas de desechos a la superficie de los núcleos aislados, la llamada capa de desechos, que se traduce en una disminución de la resolución de los histogramas del contenido de ADN. Un



tercer problema es la interferencia de compuestos citosólicos (por ejemplo, polifenoles). Dado que el estándar y la muestra de estudio pueden diferir en las cantidades y sensibilidad ante estos compuestos, es recomendable evaluar los posibles efectos negativos primero por separado (estándar y muestra de estudio independientemente), y a continuación juntas. Debido a que los núcleos de la muestra a estudiar y el estándar utilizado podrían verse afectados de diferente manera por la presencia de estos compuestos citosólicos, la estimación del contenido de ADN en unidades absolutas podría verse comprometida. Los principales problemas (con sus posibles soluciones) están resumidos en la Tabla 4.

### APLICACIONES DE LA CITOMETRÍA DE FLUJO EN ESTUDIOS DE BIODIVERSIDAD Y CONSERVACIÓN EN PLANTAS

El uso de la FCM en la investigación de plantas se basa principalmente en las diferencias en el tamaño del genoma (unidades absolutas o relativas) de las muestras analizadas. Hay tres líneas principales de investigación en el que los datos del tamaño genómico se suelen emplear: (i) para fines taxonómicos utilizando el tamaño del genoma como un marcador específico para cada taxon de estudio; (ii) para la evaluación del tamaño del genoma en función de características fenotípicas, fisiológicas y/o ecológicas, y (iii) para comprender la dinámica de la evolución del genoma al relacionar el grado de variación inter e intraespecífica en un grupo concreto de plantas.

La variación en el tamaño del genoma puede ser un indicador de la heterogeneidad taxonómica, especiación incipiente o de una historia evolutiva compleja, como por ejemplo en especies aloploides (es decir, un poliploide en el que la dotación cromosómica procede de dos especies diferentes). En consecuencia, el tamaño del genoma puede ser utilizado como una herramienta para determinar nuevas especies o detectar si una especie ha sido mal identificada, con importantes implicaciones a la hora de desarrollar estrategias de conservación. A modo de ejemplo, la planta orófila *Ranunculus parnassii-folius* L., es un complejo poliploide distribuido por las montañas del sur de Europa, donde tradicionalmente han sido reconocidas cinco subespecies. Los resultados obtenidos mediante la estimación del contenido de ADN nuclear mediante citometría de flujo (CIRES & PRIETO, 2011) han revelado que *R. parnassii-folius* subsp. *cabrerensis* debe ser tratada como una especie independiente del complejo poliploide *R. parnassii-folius* y constituye por lo tanto, una línea evolutiva en sí misma: *R. cabrerensis*. Estos resultados proporcionan una valiosa información a la hora de establecer estrategias de conservación en esta especie endémica de la Península Ibérica. Por tanto, la información sobre el tamaño del genoma en plantas proporciona una guía práctica para establecer prioridades de conservación en grupos complejos, y nos permite desarrollar estrategias para mantener la mayor diversidad genética.

Problema	Posible razón	Solución
Precipitación de la solución tamponadora	El agua empleada para la preparación del tampón es de baja calidad	Usar agua de buena calidad desionizada
Las muestras se vuelven marrones/negras	Efecto negativo del citosol. Presencia de compuestos citosólicos como taninos u oxidación de la muestra.	Añadir agentes antioxidantes como el $\beta$ -mercaptoetanol y/o añadir PVP (polivinilpirrolidona); reducir el número de cortes, probar tejidos diferentes; utilizar otro tampón
Bajo número de núcleos en la muestra	La cantidad de tejido y/o la cantidad de cortes son insuficientes	Usar más cantidad de tejido de partida, aumentar la frecuencia de los cortes
Gran cantidad de desechos	Mejorar el protocolo de aislamiento de núcleos y/o reducir el número de cortes del tejido	Usar diferentes tampones para el aislamiento de núcleos; reducir el número de cortes

Tabla 4. Principales problemas durante la realización de la FCM, motivos y posibles soluciones.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARUMUGANATHAN, K. & E. D. EARLE. 1991. Estimation of nuclear DNA amounts of plants by flow cytometry. *Pl. Molec. Biol. Reporter* 9(3): 229-241.
- BENNETT, M. D. & I. J. LEITCH. 2011. Nuclear DNA amounts in angiosperms: targets, trends and tomorrow. *Ann. Bot. (Oxford)* 107(3): 467-590.
- CIRES, E., C. CUESTA, M. A. FERNÁNDEZ CASADO, H. S. NAVA, V. M. VÁZQUEZ & J. A. FERNÁNDEZ PRIETO. 2011. Isolation of plant nuclei suitable for flow cytometry from species with compounds extremely mucilaginous: An example in the genus *Viola* L. (Violaceae). *Anales Jard. Bot. Madrid* 68(2). DOI: 10.3989/ajbm.2273 (en prensa).
- CIRES, E. & J. A. FERNÁNDEZ PRIETO. 2011. The Iberian endemic species *Ranunculus cabrerensis* Rothm.: an intricate history in the *Ranunculus parnassifolius* L. polyploid complex. *Plant Syst. Evol.* DOI: 10.1007/s00606-011-0529-9 (en prensa).
- DOLEŽEL, J., J. BARTOŠ, H. VOGLMAYR & J. GREILHUBER. 2003. Nuclear DNA content and genome size of trout and human. *Cytometry* 51A: 127-128.
- DOLEŽEL, J., P. BINAROVÁ & S. LUCRETTI. 1989. Analysis of nuclear DNA content in plant cells by flow cytometry. *Biologia Plantarum* 31(2): 113-120.
- DOLEŽEL, J., M. DOLEŽELOVÁ & F. J. NOVÁK. 1994. Flow cytometric estimation of nuclear DNA amount in diploid bananas (*Musa acuminata* and *M. balbisiana*). *Biologia Plantarum* 36: 351-357.
- DOLEŽEL, J. & W. GÖHDE. 1995. Sex determination in dioecious plants *Melandrium album* and *M. rubrum* using high-resolution flow cytometry. *Cytometry* 19: 103-106.
- DOLEŽEL, J., J. GREILHUBER, S. LUCRETTI, A. MEISTER, M. LYSÁK, L. NARDI & R. OBERMAYER. 1998. Plant genome size estimation by flow cytometry: interlaboratory comparison. *Ann. Bot. (Oxford)* 82 (Supplement A): 17-26.
- DOLEŽEL, J., S. SGOBATTI & S. LUCRETTI. 1992. Comparison of three DNA fluorochromes for flow cytometric estimation of nuclear DNA content in plants. *Physiol. Pl. (Copenhagen)* 85: 625-631.
- GALBRAITH, D. W., K. R. HARKINS, J. M. MADDOX, N. M. AYRES, D. P. SHARMA & E. FIROOZABADY. 1983. Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissues. *Science* 220: 1049-1051.
- GREILHUBER, J. & J. DOLEŽEL. 2009. 2C or not 2C: a closer look at cell nuclei and their DNA content. *Chromosoma* 118: 391-400.
- GREILHUBER, J., J. DOLEŽEL, M. A. LYSÁK & M. D. BENNETT. 2005. The origin, evolution and proposed stabilization of the terms 'genome size' and 'C-value' to describe nuclear DNA contents. *Ann. Bot. (Oxford)* 95: 255-260.
- LOUREIRO, J., E. RODRIGUEZ, J. DOLEŽEL & C. SANTOS. 2006. Comparison of four nuclear isolation buffers for plant DNA flow cytometry. *Ann. Bot. (Oxford)* 98: 679-689.
- LYSÁK, M. A. & J. DOLEŽEL. 1998. Estimation of nuclear DNA content in *Sesleria* (Poaceae). *Caryologia* 52: 123-132.
- MCCARTHY, D. A. 2007. Fluorochromes and fluorescence. En: M.G. MACEY (ED.), *Flow cytometry: principles and applications*. Humana Press, New Jersey. Pp. 59-112.
- OTTO, F. 1990. DAPI staining of fixed cells for high-resolution flow cytometry of nuclear DNA. En: H. A. CRISSMAN & Z. DARZYNKIEWICZ (EDS.), *Methods in Cell Biology* (Vol. 33). Academic Press, New York. Pp. 105-110.
- PFOSSER, M., A. AMON, T. LELLEY & E. HEBERLEBORS. 1995. Evaluation of sensitivity of flow cytometry in detecting aneuploidy in wheat using disomic and ditelosomic wheat-rye addition lines. *Cytometry* 21: 387-393.
- SUDA, J., A. KRAHULCOVÁ, P. TRÁVNÍČEK, & F. KRAHULEC. 2006. Ploidy level versus DNA ploidy level: an appeal for consistent terminology. *Taxon* 55(2): 447-450.