

APLICAÇÕES DA CITOMETRIA DE FLUXO EM HORTICULTURA

João Loureiro, Mariana Castro, José Monteiro de Oliveira, Pedro Antunes, Jorge Canhoto & Sílvia Castro

Nos últimos 30 anos, a expansão da utilização da citometria de fluxo ao campo da botânica permitiu a realização de estudos focados na estrutura e função do genoma vegetal. Na horticultura as aplicações são vastas, mas ainda pouco conhecidas. Este artigo pretende elucidar os princípios básicos da citometria de fluxo, em particular das análises do conteúdo em ADN nuclear e como é que esta técnica está a ser aplicada no campo da horticultura, com a apresentação de dois casos de estudos em curso na Universidade de Coimbra.



Introdução

A citometria de fluxo é uma técnica originalmente desenvolvida no final dos anos 50 para a contagem e análise de células sanguíneas. Com o desenvolvimento técnico e com o aparecimento de novos fluorocromos, foi com naturalidade que o uso desta técnica se expandiu a outras áreas científicas, como a botânica e a microbiologia. Nestas áreas com o desenvolvimento de instrumentos cada vez menos dispendiosos (fig. 1), desde os anos 80 que o número de aplicações e publicações tem aumentado continuamente. No nosso país, e dedicados principalmente à área da botânica existem pelo menos três laboratórios que fazem uso regular desta tecnologia.

Princípios básicos

A citometria de fluxo é uma técnica que permite a análise das propriedades ópticas (dispersão da luz e fluorescência) de partículas que fluem a taxas elevadas ($10^2 - 10^3$ partículas/segundo) numa suspensão líquida

(Doležel et al., 2007). A dispersão da luz fornece dados quantitativos relativos ao tamanho e complexidade das partículas que estão a ser analisadas, enquanto através da fluorescência se pode quantificar qualquer composto celular que apresente autofluorescência ou que tenha sido previamente marcado com corantes fluorescentes. Os dados de cada partícula são obtidos em tempo real na forma de histogramas mono- ou biparamétricos, visualizados e interpretados com recurso a programas informáticos. É assim possível obter simultaneamente as distribuições dos valores de frequência e/ou densidade de cada parâmetro óptico medido. As análises a velocidades elevadas e com elevado rigor permitem analisar num curto espaço de tempo numerosas partículas de interesse, incluindo eventos raros que de outra forma poderiam passar despercebidos (Doležel et al., 2007).

Análise do conteúdo em ADN nuclear

A maior parte das aplicações da citometria de fluxo na área da botânica estão relacionadas com a análise do conteúdo em ADN nuclear, seja em termos relativos, como análises do nível de ploidia, seja em termos absolutos, como estimativas do tamanho do genoma. As metodologias desenvolvidas para o efeito são baseadas no isolamento e coloração de núcleos vegetais. O método mais simples e eficaz foi desenvolvido em 1983 por Galbraith e colaboradores (Galbraith et al., 1983) tendo sofrido poucas modificações desde essa data. Em resumo, o tecido vegetal (preferencialmente folhas jovens frescas, mas também sementes ou outros tecidos) é cortado com uma lâmina da barba numa caixa de Petri com um determinado volume de um tampão de isolamento de núcleos. De seguida, a solução é filtrada através de uma rede de nylon com $50 \mu\text{m}$, de forma a eliminar todos os resíduos de maiores dimensões. Por fim, os núcleos são



Figura 1 – Citómetro de fluxo CyFlowSpace disponível no Centro de Ecologia Funcional, Departamento de Ciências da Vida (FCTUC).

Aplicação da citometria de fluxo na horticultura

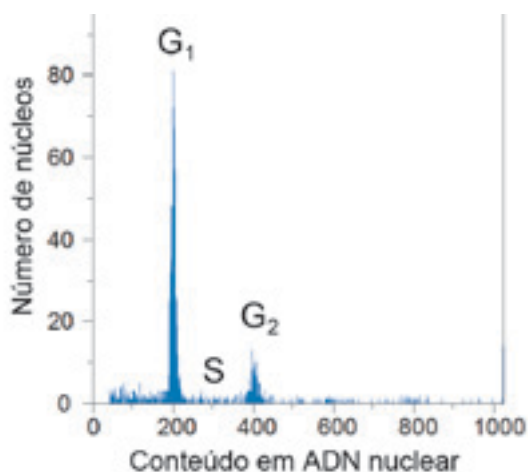


Figura 2 – Distribuição do conteúdo em ADN nuclear (em unidades arbitrárias de fluorescência do iodeto de propídio) de uma população de núcleos isolados de *Solanum lycopersicon* cv. Stupické. As fases do ciclo celular a que corresponde cada pico são igualmente fornecidas.

tratados com um fluorocromo que se liga especifica e estequiometricamente ao ADN. Nas análises do nível de ploidia o fluorocromo mais usado é o DAPI, enquanto para estimativas do tamanho do genoma é imperativa a utilização de iodeto de propídio que se intercala na molécula de ADN e é por isso insensível ao conteúdo de A-T. Como o iodeto de propídio também se liga à cadeia dupla de ARN, tem de ser adicionada RNases à suspensão de núcleos.

Uma análise simples deste tipo permite quantificar o número de células que se encontra nas diversas fases do ciclo celular (G_1 , S e G_2) uma vez que associado a cada fase temos conteúdos em ADN distintos: durante a fase de crescimento celular, G_1 , uma célula diplóide apresenta um conteúdo 2C (i.e., duas cópias de cada gene); durante a fase S ocorre a duplicação do genoma; e na segunda fase de crescimento celular, G_2 , o conteúdo em ADN nuclear é de 4C. Mesmo em folhas bastante jovens, um histograma tipo apresenta um pico dominante que corresponde aos núcleos na fase G_1 do ciclo celular, e um pico menor que corresponde aos núcleos na fase G_2 . O histograma resultante de uma análise deste tipo encontra-se ilustrado na fig. 2.

As análises do conteúdo em ADN nuclear através de citometria de fluxo são efectuadas com recurso a um padrão de referência cujo tamanho do genoma seja previamente conhecido. O uso de padrões de referência vegetais é recomendado por questões técnicas. Estes padrões deverão ser escolhidos de acordo com a espécie que está a ser estudada e deverão ter um conteúdo em ADN próximo, mas não sobreposto aos picos 2C e 4C da planta a analisar. De forma a fornecer um conjunto de padrões de referência vegetais que cubram a variação de tamanhos do genoma existentes nas plantas (0.06-152.20 pg/1C; Doležel et al., 2007), foi compilada uma lista de padrões vegetais recomendados (Doležel et al., 1992), cujas sementes são disponibilizadas gratuitamente (ver <http://olomouc.ueb.cas.cz/>). A única alteração metodológica a efectuar ao protocolo descrito acima é adicionar uma porção de folha do padrão ao tecido da planta em estudo e efectuar o corte de ambos os tecidos simultaneamente.

As aplicações da citometria de fluxo na horticultura estão maioritariamente relacionadas com o controlo da estabilidade do nível de ploidia (e.g., obtenção de plantas “true-to-type” após ensaios de micropropagação *in vitro*; Loureiro et al., 2005); a conformidade de lotes de sementes (de Laat et al., 1987); a detecção de plantas haplóides para posterior produção de linhas dihaplóides, ou seja linhas puras férteis (através de agentes poliploidizantes, como a colquicina e a orizalina; e.g., Gemes-Juhász et al., 2002); a produção e detecção de triplóides estéreis em plantas hortícolas ou para cultivo em parques (e.g., Vainola, 2000); a produção e detecção de novos níveis de ploidia, como plantas tetraplóides, que podem apresentar novas características de interesse económico (e.g., maior produção de frutos e/ou sementes e maior vigor; e.g., Antunes, 2010); e a produção e detecção de híbridos inter-específicos (e.g., Hirsch et al., 2001). Estas aplicações estão intimamente relacionadas com as áreas da biotecnologia e melhoramento vegetal e beneficiam da elevada capacidade de processamento de amostras associada à citometria de fluxo, aspecto fundamental para a detecção das plantas de interesse em estados de desenvolvimento inicial.

As análises por citometria de fluxo, não substituindo por completo as metodologias clássicas, como a contagem de cromossomas, apresentam inúmeras vantagens, a saber: conveniência (fácil preparação de amostras), rapidez (num único dia de trabalho podem ser processadas até 60 amostras), não destrutiva (as quantidades de material vegetal que são necessárias são mínimas), não necessita de células em divisão, é capaz de detectar mixoploidias e, por fim, após a aquisição do instrumento, os custos associados às análises são relativamente diminutos (Loureiro, 2007). Por estas razões, a citometria de fluxo é cada vez mais tida como a metodologia ideal para análises deste tipo em diversas áreas, incluindo a horticultura.

Como exemplos concretos da aplicação desta técnica à horticultura, são apresentados dois casos de estudo que se encontram a decorrer no Centro de Ecologia Funcional (CFE) do Departamento de Ciências da Vida, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.



Figura 3 – Parque Estatal Audra (WestVirginia, EUA) com rododendros em flor, flor de rododendro numa população natural e flores de *Rhododendron calendulaceum* ‘Cherokee’.

CASO DE ESTUDO 1: Estimativas do nível de ploidia em plantas híbridas de rododendros (colaboração com membros da Sociedade Americana de Rododendros, John Perkins e SallyPerkins, <http://www.rosebay.org/chapterweb/index.htm>) (Oliveira et al., 2011).

O género *Rhododendron* (rododendros, família Ericaceae; fig. 3), no qual se incluem as azáleas, engloba plantas com um elevado interesse ornamental e é o foco de interesse de muitos melhoradores quer profissionais, quer amadores. Muitos destes estudos centram-se na obtenção de híbridos que possuam características melhoradas (e.g., combinação de características dos parentais), mantendo ou melhorando as taxas de fertilidade. Associado a este exercício muitas das espécies parentais apresentam níveis de ploidia distintos, que após o cruzamento poderão influenciar a fertilidade masculina e feminina, a fertilidade cruzada e o vigor das plantas. Os programas de melhoramento de muitas espécies, incluindo os rododendros, eram muitas vezes efectuados “às cegas” no que diz respeito ao nível de ploidia dos indivíduos a serem cruzados. Com a crescente aplicação da citometria de fluxo a estudos de melhoramento, esta tarefa é agora factível. A colaboração que encetámos com melhoradores norte-americanos visa identificar o nível de ploidia de azáleas caducas e de rododendros de folha larga que são parentais ou descendentes de poliploides conhecidos, que apresentam fertilidades não esperadas ou que são aparentemente híbridos naturais de populações contendo espécies diplóides e tetraploides.

Os resultados preliminares que já obtivemos evidenciam que as populações naturais do parque estatal Audra (WestVirginia, EUA) representam uma zona híbrida de várias espécies caducas de *Rhododendron* que contém diplóides, triplóides e tetraploides. No que diz respeito às espécies caducas de azáleas, os cruzamentos controlados de diplóides e tetraploides resultaram na maioria dos casos em indivíduos triplóides que, surpreendentemente, muitos revelaram ser férteis. No caso dos rododendros de folha larga, verificou-se que os indivíduos triplóides podem originar descendência diplóide, triplóide, tetraploide ou pentaploide, enquanto os neotetraploides após cruzamento com diplóides podem resultar em descendência diplóide fértil.



Figura 4 – Morfologia de *Cyphomandra betacea* com porte da planta e respectivos frutos.

Esta investigação permitirá perceber como é que indivíduos com nível de ploidia diferente interagem na natureza e fornecerá informação importante para guiar os cruzamentos dos melhoradores interessados em obter plantas férteis com características melhoradas deste género.

CASO DE ESTUDO 2: Monitorização do nível de ploidia de plantas de tamarilho e medronheiro expostas a agentes c-mitóticos para indução de plantas tetraploides (Antunes, 2010).

O tamarilho, *Cyphomandra betacea* (Solanaceae; fig. 4), e o medronheiro, *Arbutus unedo* (Ericaceae), são duas espécies com interesse comercial e que têm sido utilizadas pelo Homem desde longa data. Apesar do reconhecido valor hortícola, essencialmente dos seus frutos, até ao momento foram desenvolvidos poucos esforços para o melhoramento vegetal destas duas espécies. No laboratório de cultura de tecidos, associado ao CFE, ao longo dos últimos anos têm sido dados passos importantes no melhoramento destas espécies. Um desses passos consistiu na tentativa de obter plantas tetraploides que poderão eventualmente apresentar características melhoradas, como uma maior produção de frutos com maiores dimensões. Para tal, plantas propagadas *in vitro* foram expostas a diferentes concentrações de dois agentes c-mitóticos – colquicina e orizalina – durante vários períodos de incubação. O nível de ploidia das plântulas tratadas foi monitorizado por citometria de fluxo numa fase inicial de desenvolvimento e confirmado por contagem de cromossomas. As plântulas com a ploidia desejada (mixoploides ou tetraploides) foram seleccionadas para posterior indução de embriogénese somática ou para enraizamento e aclimação para subsequente obtenção de plantas adultas.

Os resultados destas análises revelaram a indução de tetraploidia com sucesso em ambas as espécies, se bem que a taxas distintas. Para o tamarilho foram obtidas 62 plântulas tetraploides, com uma taxa de indução de 33,3% para o melhor tratamento (2500 μ M/ 2 dias em meio líquido). Nesta espécie a colquicina revelou-se muito mais eficaz na indução de tetraploidia do que a orizalina. Até ao momento, quer durante o crescimento *in vitro*, quer após a transferência de algumas plântulas para aclimação, os tetraploides apresentam uma morfologia e desenvolvimento tidos como normal. Inclusive, foi possível induzir a formação de tecido caloso embriogénico a partir de plântulas tetraploides com taxas semelhantes e com morfologia similar às plântulas diplóides. No caso do medronheiro as condições de cultura e exposição revelaram-se pouco benéficas ao desenvolvimento das plântulas, tendo ocorrido taxas de senescência elevadas. Mesmo assim, foi possível obter uma plântula tetraploide após exposição dos explantes a 125 μ M de orizalina durante 7 dias em meio sólido.

Este estudo representa um exemplo inequívoco da utilidade da citometria de fluxo na rápida monitorização do nível de ploidia em duas espécies onde foi induzida a tetraploidia. As perspectivas que este estudo abre para o melhoramento destas duas espécies são vastas, existindo no presente algumas plantas de tamarilho em processo de aclimação *ex vitro*, sendo dentro de pouco tempo possível quantificar se estas plantas apresentam características melhoradas em comparação com os indivíduos diplóides.

AGRADECIMENTOS

Os autores estão gratos à Universidade de Harvard pelo apoio à investigação dos rododendros (Prémio Deland do Arboreto de Arnold).

BIBLIOGRAFIA

- Antunes, P. 2010. Indução de plantas tetraplóides in vitro através de tratamento com agentes c-mitóticos no tamarilho (*Cyphomandra betaceae*) e no medronheiro (*Arbutus unedo*). Tese de Mestrado, Universidade de Coimbra, Coimbra, Portugal.
- de Laat, A., Göhde, W. & Vogelzang, M. 1987. Determination of ploidy of single plants and plant population by flow cytometry. *Plant Breed.*, 99:303-307.
- Doležal, J., Sgorbati, S. & Lucretti, S. 1992. Comparison of three DNA fluorochromes for flow cytometric estimation of nuclear DNA content in plants. *Physiol. Plant.*, 85:625-631.
- Doležal, J., Greilhuber, J. & Suda, J. 2007. *Flow Cytometry with Plant Cells: Analysis of Genes, Chromosomes and Genomes*. Wiley-VCH Verlag, Weinheim, 454 pp.
- Galbraith, D.W., Harkins, K.R., Maddox, J.M., Ayres, N.M., Sharma, D.P. & Firoozabady, E. 1983. Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissues. *Science*, 220:1049-1051.
- Gemes-Juhasz, A., Balogh, P., Ferenczy, A. & Kristof, Z. 2002. Effect of optimal stage of female gametophyte and heat treatment on in vitro gynogenesis induction in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Plant Cell Rep.*, 21:105-11.
- Hirsch, A.M., Testolin, R., Brown, S., Chat, J., Fortune, F.D., Bureau, J.M. & De Nay, D. 2001. Embryo rescue from interspecific crosses in the genus *Actinidia* (kiwifruit). *Plant Cell Rep.*, 20:508-516.
- Loureiro, J. 2007. Aplicação da citometria de fluxo ao estudo do genoma vegetal. Tese de Doutoramento, Universidade de Aveiro, Aveiro, Portugal.
- Loureiro, J., Pinto, G., Lopes, T., Doležal, J. & Santos, C. 2005. Assessment of ploidy stability of the somatic embryogenesis process in *Quercus suber* L. using flow cytometry. *Planta*, 221:815-822.
- Oliveira, J.M., Castro, M., Nascimento, F., Castro, S., Perkins, J., Perkins, S. & Loureiro, J. 2011. Ploidy level estimations in deciduous and elpidote hybrids of *Rhododendron*. XXXVI Jornadas Portuguesas de Genética, Coimbra, Portugal.
- Vainola A. 2000. Polyploidization and early screening of *Rhododendron* hybrids. *Euphytica*, 112:239-44.

AUTORES



João Loureiro

jloureiro@bot.uc.pt

Professor Auxiliar no Departamento de Ciências da Vida (FCTUC) e Investigador no Centro de Ecologia Funcional (FCTUC)
Especialidade: Evolução das Plantas

Mariana Castro

marian1c@hotmail.com

Bolseira de Investigação do Centro de Ecologia Funcional, Departamento de Ciências da Vida (FCTUC)
Especialidade: Evolução das Plantas

José Monteiro de Oliveira

jose.cerca@gmail.com

Estudante do 1º ciclo, Departamento de Ciências da Vida (FCTUC)
Especialidade: Evolução das Plantas

Pedro Antunes

a23908@ua.pt

Mestre em Biotecnologia Vegetal pela Universidade de Coimbra
Especialidade: Biotecnologia Vegetal

Jorge Canhoto

jorgecan@ci.uc.pt

Professor Auxiliar com Agregação no Departamento de Ciências da Vida (FCTUC) e Investigador no Centro de Ecologia Funcional (FCTUC)
Especialidade: Biotecnologia Vegetal

Silvia Castro

scastro@bot.uc.pt

Investigadora de Pós-Doutoramento no Centro de Ecologia Funcional, Departamento de Ciências da Vida (FCTUC)
Especialidade: Ecologia e Reprodução das Plantas



BELOS CAMPOS
selectis



**Para Belos Campos
e Bons Frutos.**

