

# Aplicación de la citometría de flujo en el estudio del genoma vegetal

J. Loureiro <sup>1,2</sup>

(1) CESAM y Departamento de Biología de la Universidad de Aveiro, Campus Universitário de Santiago, 3810-193 Aveiro, Portugal

(2) Centro de Ecología Funcional, Departamento de Ciencias de la Vida. Facultad de Ciências y Tecnologia de la Universidade de Coimbra, Calçada Martins de Freitas 3001-455 Coimbra, Portugal

➤ Recibido el 14 de enero de 2009, aceptado el 29 de enero de 2009.

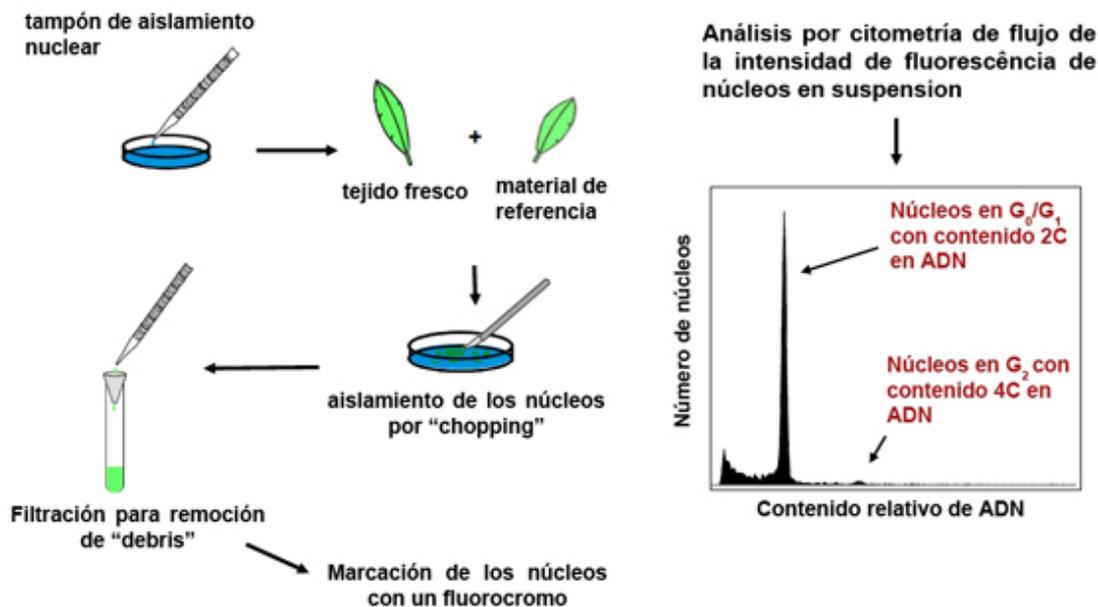
Loureiro, J. (2009). Flow cytometric approaches to study plant genomes. *Ecosistemas* 18(2):103-108.

La citometría de flujo es una técnica que permite el análisis de las propiedades ópticas (dispersión de la luz y fluorescencia) de partículas que fluyen en una suspensión líquida. Esta medición en flujo es efectuada a alta velocidad (e.g., análisis de 100-1000 partículas por segundo) y garantiza un análisis objetivo de las partículas que constituyen la población de interés (Doležel 1997).

Después de su desarrollo en los años 50 con el intento de contar y analizar células sanguíneas, durante la década de los años 80, los investigadores del área de biología vegetal, estimulados por las potencialidades de la citometría de flujo, desarrollaron metodologías para su aplicación al estudio de células vegetales. Desde entonces, el espectro de aplicaciones de la citometría de flujo en plantas ha aumentado de manera exponencial, siendo en nuestros días una técnica rutinaria utilizada en numerosos laboratorios de todo el mundo.

El análisis del contenido de ADN nuclear (en sus valores relativos ó absolutos) fue el fin perseguido en los estudios iniciales (Heller 1973) y hoy en día continua siendo el principal objetivo de la citometría de flujo en plantas. Con las debidas restricciones (algunas de las cuales fueron exploradas en el ámbito de esta Tesis Doctoral), esta técnica permite una discriminación eficaz y precisa de la cantidad de núcleos (previamente aislados y marcados con un fluorocromo) existentes en cada fase del ciclo celular ( $G_0/G_1$ , S y  $G_2/M$ ). Una vez que las medidas de fluorescencia de los núcleos son expresadas en una escala arbitraria, la obtención de estimaciones del contenido en ADN nuclear de un determinado tejido/individuo requiere la comparación con la fluorescencia de núcleos aislados de un estándar de referencia con tamaño de genoma conocido. Este tipo de análisis está teniendo un impacto elevado en diversas áreas de la biología vegetal, especialmente en disciplinas como la biosistemática, la biotecnología y mejora de plantas, la biología de poblaciones y la ecología.

En general, los protocolos desarrollados para el aislamiento de núcleos de tejidos vegetales (**Fig. 1**, Galbraith et al. 1983) son relativamente simples y rápidos (una muestra es preparada en aproximadamente 5 minutos), permitiendo el procesado de un gran número de muestras por día. Sin embargo, el análisis de especies recalcitrantes, como por ejemplo las plantas leñosas, puede implicar un gran número de problemas, esencialmente relacionados con la presencia de metabolitos secundarios en el citosol que son liberados durante la preparación de las muestras.



**Figura 1.** Diagrama de la metodología utilizada para la preparación de muestras para la determinación del contenido en ADN por citometría de flujo.

Figura adaptada de: <http://lmcc.ieb.cz/research/index.php?men=protocols>

El objetivo de esta Tesis Doctoral fue aplicar la citometría de flujo y técnicas relacionadas (microscopía de fluorescencia e hibridación in situ) al estudio del genoma vegetal. Explícitamente, se exploraron en detalle las posibilidades de esta técnica en las áreas de la biotecnología y la biosistemática para estimar el nivel de ploidía y/o el tamaño del genoma, utilizando como modelos de estudio especies leñosas con interés económico. En una segunda fase, se desarrollaron estudios metodológicos innovadores al nivel de desarrollo de los tampones de aislamiento nuclear y se evaluó el efecto de los compuestos secundarios en las estimaciones de contenido en ADN nuclear. Finalmente, se desarrolló una plataforma que reúne la información de un gran número de publicaciones disponibles de citometría de flujo en plantas, creándose una base de datos disponible en internet para toda la comunidad científica.

## Análisis de la estabilidad del nivel de ploidía en plantas leñosas

En biotecnología vegetal, la citometría de flujo es una de las herramientas utilizadas para analizar la estabilidad genética a través del nivel de ploidía de los cultivos in vitro y de las plantas obtenidas. El método alternativo a la citometría (i.e., conteo cromosómico) es, a menudo, difícil de aplicar en el material leñoso debido al requerimiento de necesitar elevadas tasas de división mitótica (generalmente, bajas en los cultivos de tejidos). Por el contrario, la citometría de flujo no requiere células en división (Doležel 1997). Muchos de estos estudios se enfocan en el efecto de las condiciones y edad de los cultivos en la estabilidad ploidíaca de las plantas obtenidas durante el proceso, de forma que se pueda certificar la adecuación del protocolo utilizado en la propagación a gran escala y true-to-type de los genotipos seleccionados (e.g, Pinto et al. 2004).

En el primer caso de estudio de la tesis, la citometría de flujo fue utilizada para verificar la estabilidad genética del proceso de embriogénesis somática en alcornoque (*Quercus suber* L.), una especie de elevado interés económico y ecológico. Los embriones somáticos de *Q. suber* fueron inducidos a partir de hojas de árboles adultos, obteniéndose embriones morfológicamente normales (con dos cotiledones) y anómalos (con uno o tres cotiledones). El nivel de ploidía fue estimado por citometría de flujo para un elevado número de todos los tipos morfológicos de embriones obtenidos, así como para las plantas madre y plántulas regeneradas. Como certificación positiva del protocolo utilizado para propagar esta especie, no se detectaron variaciones somato-clonales en el material estudiado, pudiendo asegurar una estabilidad genética a este nivel.

Un abordaje similar fue utilizado para estudiar la estabilidad ploidíaca del proceso de micropropagación de plantas adultas de *Juniperus phoenicea* L. Igual que en el caso anterior, el nivel de ploidía de las plantas regeneradas fue comparado con el de las plantas madre. Los diversos morfotipos obtenidos durante el proceso fueron igualmente analizados por citometría de flujo. No se observaron diferencias significativas entre las estimaciones obtenidas, sugiriendo que, a este nivel, las plantas obtenidas son genéticamente similares al material de origen.

El estudio de estos grupos de especies recalcitrantes (sus hojas presentan un contenido elevado de compuestos fenólicos) abrió las puertas a la percepción de la necesidad de optimizar los protocolos de aislamiento de núcleos para una precisa aplicación de la citometría de flujo.

## Análisis del contenido de ADN en especies vegetales

El conocimiento del tamaño del genoma es un dato importante en muchas áreas de la investigación vegetal. Esta información tiene aplicaciones directas en estudios moleculares, particularmente para un correcto planteamiento de bibliotecas genómicas y en experiencias basadas en marcadores moleculares, como AFLPs y microsatélites (Fay et al. 2005). Adicionalmente, este conocimiento permite la realización de estudios comparativos a gran escala, como por ejemplo, estudios de la variación del contenido en ADN a lo largo de la evolución de las plantas superiores (Leitch et al. 2005). Finalmente, diversos estudios han evidenciado el carácter predictivo del tamaño del genoma en diversos caracteres fenotípicos, fenología, comportamiento ecológico, entre otros (Bennett et al. 1998; Bennett y Leitch 2005).

Estudios enfocados en la determinación del tamaño del genoma han sido particularmente importantes en las áreas de la taxonomía y la biosistemática. Por ejemplo, la citometría de flujo es una herramienta muy útil en la identificación de especies próximas con un número de cromosomas similar pero con contenidos en ADN distintos (e.g., Dimitrová et al. 1999). A nivel intra-específico, se han realizado diversos estudios dirigidos a investigar la estabilidad del tamaño del genoma, especialmente entre poblaciones aisladas geográficamente. Aunque que en la mayoría de los casos estudiados se encontraron diferencias insignificantes (e.g., Baranyi y Greilhuber 1995; Lysák et al. 2000), en algunos casos se han documentado variaciones intra-específicas significativas (e.g., Šmarda y Bureš 2006), sugiriendo que el genoma nuclear puede, en algunas especies, ser más plástico de lo que previamente se pensaba.

En el ámbito de esta Tesis se desarrollaron tres estudios dirigidos al análisis de la variación inter- e intraespecífica en el contenido de ADN nuclear. El primer caso de estudio fue enfocado en el análisis del genoma de varios cultivares de olivo (*Olea europaea* L. subsp. *europaea* var. *europaea*) y de olivo silvestre (*Olea europaea* L. subsp. *europaea* var. *sylvestris*). Los resultados obtenidos revelaron una baja variación intra-específica entre los diferentes cultivares (variación entre 2,90 y 3,07 pg/2C) y entre éstos y el olivo silvestre (2C = 3,19 pg). Estos resultados difieren de estudios previos realizados en cultivares italianos, donde una elevada heterogeneidad de tamaños de genoma han sido detectados (Bitonti et al. 1999).

En el segundo trabajo, se estimó por primera vez el tamaño del genoma de tres endemismos Ibéricos pertenecientes a la familia *Ulmaceae* (*Ulmus minor* Mill., *U. glabra* Huds. y *Celtis australis* L.), contribuyendo con un aumento del conocimiento de las variaciones del genoma en esta familia. Mientras que el tamaño del genoma de las dos especies de *Ulmus* fue relativamente próximo (2C = 4,25 pg, *U. minor*; 2C = 4,37 pg, *U. glabra*), *C. australis* presentó un contenido de ADN significativamente más reducido (2C = 2,46 pg). Adicionalmente, no se encontraron diferencias significativas en el contenido de ADN nuclear entre los individuos de cada especie.

Una vez más, estos dos estudios tuvieron una fuerte componente metodológica. Los protocolos de aislamiento de núcleos fueron optimizados para contrarrestar el efecto negativo de los metabolitos secundarios liberados del citosol. Así, en el caso de las hojas de olivo, el efecto perjudicial de los compuestos fenólicos fue minimizado por la adición de  $\beta$ -mercaptoetanol (antioxidante fuerte y eficaz) al tampón de aislamiento nuclear. Respecto a las especies de olmo, los compuestos citosólicos detectados fueron distintos – las hojas de estas especies presentan concentraciones elevadas de compuestos mucilaginosos, que reducen las tasas de aislamiento de núcleos y conducen a una disminución progresiva de su fluorescencia. Así, después de sucesivas modificaciones de los tampones, la obtención de núcleos fue únicamente posible utilizando tejidos alternativos, en este caso, obtenidos de las sámaras.

El tercer y último trabajo de esta sección contempló el estudio citológico de diversas especies de *Festuca* L. Este género presenta un importante centro de diversificación en la Península Ibérica, así como un elevado número de especies poliploides. A través de un abordaje citológico integrado, que incluyó el conteo de cromosomas, hibridación fluorescente y genómica in situ y citometría de flujo, se trató de clarificar la posición taxonómica de varias especies de este género, establecer relaciones filogenéticas entre las especies de estudio y analizar la amplitud de la variación del tamaño del genoma en el género. Por primera vez se determinó el número cromosómico para una de las especies de estudio y se descubrieron nuevos niveles de ploidia para dos *taxa*. Para *F. summilusitana* fueron identificados individuos deca- (identificados en estudios previos) y duodecaploides (nuevo nivel de ploidia) en poblaciones distintas, sugiriendo la posible existencia de un taxón desconocido hasta ahora. Respecto a la variación del contenido en ADN nuclear, en cada una de las secciones de este género fue posible verificar una disminución del tamaño del genoma con el aumento del nivel de ploidia. Debido a problemas técnicos (e.g., número variable de puntos de hibridación con el rADN), no fue posible inferir las relaciones filogenéticas entre las especies seleccionadas. Sin embargo, utilizando hibridación genómica in situ fue posible excluir *F. henriquesii* (la única especie del género que es diploide en Portugal) del listado de potenciales progenitores de los *taxa* poliploides estudiados.

## Optimización de las metodologías de aislamiento de núcleos de tejidos vegetales para citometría de flujo

A pesar de que la citometría de flujo constituye el método más apropiado para estimar el contenido en ADN nuclear, existen aún diversos problemas por solucionar, esencialmente relacionados con las metodologías de aislamiento y tinción de los núcleos. Los tejidos de algunas especies presentan compuestos citosólicos que interfieren significativamente con el procedimiento de tinción de los núcleos (Noirot et al. 2000; Price et al. 2000). Estas dificultades fueron detectadas en el estudio de la mayoría de las especies estudiadas en el ámbito de esta Tesis y nos llevaron a plantearnos estudios metodológicos que ayudasen a comprender que constituyentes son más útiles y cómo mejorar la eficacia de los tampones de aislamiento, así como, a comprender los mecanismos de interferencia generados por los compuestos citosólicos sobre los núcleos de células vegetales.

A pesar de que los innumerables tampones de aislamiento nuclear desarrollados hasta el momento presentan distintas y diversificadas composiciones químicas, no existen estudios sistemáticos de comparación de sus eficiencias. Así, con el objetivo de cubrir este vacío existente, cuatro de los tampones más comúnmente utilizados en citometría vegetal (Galbraith's, LB01, Otto's y Tris.MgCl<sub>2</sub>) fueron aplicados para aislar núcleos de hojas de siete especies vegetales. El conjunto de especies fue definido de manera que contemplará un amplio espectro de tamaños de genoma y variedad de tipos de tejidos foliares. Los tampones fueron evaluados cuidadosamente y el estudio realizado independientemente por dos técnicos en tres días distintos para cada una de las especies. Tal y como se esperaba, fueron detectadas diferencias significativas entre los cuatro tampones, con cada tampón respondiendo de forma distinta a cada situación. Adicionalmente, ningún tampón funcionó perfectamente para todas las especies testadas. Los tampones LB01 y Otto ofrecieron los resultados más satisfactorios para un mayor número de especies. Además, también se detectaron diferencias entre los diferentes días de análisis y los técnicos, siendo las primeras más significativas. Los resultados obtenidos son muy importantes en el sentido de que revelan la necesidad de identificar el tampón más adecuado para cada especie de estudio.

En el segundo estudio de esta sección se realizó un esfuerzo por comprender de qué forma un compuesto fenólico habitualmente acumulado en el citosol de las células vegetales, el ácido tánico, afecta a los núcleos de dos especies de referencia en estudios citométricos como *Pisum sativum* L. y *Zea mays* L. Para ello, en una primera fase, fueron aislados núcleos de *P. sativum* usando los cuatro tampones del estudio anterior. Seguidamente, se expuso la suspensión de núcleos a 13 concentraciones diferentes de ácido tánico y se evaluó la calidad de las muestras por citometría de flujo. El efecto del tiempo de incubación en este compuesto fue igualmente analizado. En la segunda fase, las mismas experiencias fueron mimetizadas utilizando suspensiones líquidas que contenían núcleos de *P. sativum* y *Z. mays* aislados simultáneamente. Los análisis de citometría de flujo fueron acompañados de observaciones microscópicas de las suspensiones de núcleos. Este diseño experimental permitió observar los efectos negativos del ácido tánico en la fluorescencia y en las propiedades de difusión de la luz de los núcleos. La acción del ácido tánico resultó ser rápida y acentuada, e independiente del tampón de aislamiento utilizado. Con la excepción del tampón Otto, los núcleos de *P. sativum* y *Z. mays* se vieron afectados de manera diferente, con los núcleos de *P. sativum* exhibiendo pérdidas de fluorescencia más acentuadas. Este resultado revela la posibilidad de que existan igualmente resultados dispares en el nivel de las estimas de contenido en ADN nuclear, a pesar de utilizar el método de estandarización recomendado.

Utilizando los datos relativos al comportamiento de los tampones de aislamiento nuclear de los dos estudios anteriores, se invirtió esfuerzo en el desarrollo de dos nuevos tampones, GPB y WPB, más eficaces para trabajar con la diversidad de especies, tejidos y compuestos citosólicos presentes en el mundo vegetal. Con el objeto de testarlos convenientemente, los tampones fueron utilizados en la preparación de muestras de 37 especies vegetales, incluyendo herbáceas y leñosas, con estructuras foliares y composiciones químicas variadas. Para las especies habitualmente usadas como referencia, ambos tampones mostraron resultados de elevada calidad. Además, en especies recalcitrantes, el tampón WPB mostró ser más eficaz en el aislamiento de núcleos. En comparación con otros tampones/estudios, fue posible mejorar significativamente la resolución de los histogramas de contenido en ADN nuclear para la mayoría de las especies, evidenciando que ambos tampones podrán ser utilizados en el futuro con elevadas tasas de éxito.

## FLOWER – base de datos dedicada a estudios de citometría de flujo en plantas

Desde el inicio de la aplicación de la citometría de flujo en plantas, el número de estudios utilizando esta técnica ha aumentado enormemente, siendo acompañado por un creciente número de manuscritos en revistas científicas. Como consecuencia, resulta cada vez más difícil rastrear todos los manuscritos que son publicados. Con el objetivo de simplificar este problema y facilitar el acceso a la información a la comunidad científica, se desarrolló una base de datos dedicada a estudios de citometría de flujo en plantas, FLOWER, disponible gratuitamente en la siguiente página de internet: <http://flower.web.ua.pt/>. Esta base de datos contiene datos relacionados con la metodología y la instrumentación, extraídos de más de 900 manuscritos científicos. La versión "online" ofrece un número elevado de campos de búsqueda y resultados, que permiten un acceso rápido a la información existente, así como un análisis cuantitativo de los datos relacionados con los tampones de aislamiento nuclear, métodos de estandarización, fluorocromos, entre otros. Es igualmente posible evaluar

críticamente la metodología utilizada por otros autores, teniendo en cuenta las buenas prácticas y las recomendaciones de la comunidad científica, así como, detectar las tendencias actuales, funcionando como una herramienta importante no solo para investigadores, sino también para empresas. Esta base de datos fue construida para ser una fuente primaria de referencias en esta área y para estimular el uso de esta técnica en la biología vegetal.

## Conclusiones

La presente Tesis Doctoral ha permitido evidenciar todo el potencial que la citometría de flujo presenta en el estudio del genoma vegetal, englobando estudios dedicados al nivel de ploidias y tamaño del genoma en áreas tan dispares como la Biotecnología y la Biosistemática. Adicionalmente, se han realizado esfuerzos para mejorar las metodologías utilizadas en la preparación de muestras para citometría de flujo. Finalmente, y a modo de síntesis, se ha presentado la primera base de datos de publicaciones que utilizan la citometría de flujo en plantas. Algunos de los trabajos presentados servirán, por un lado, como ejemplos para estudios similares en otras especies, y por otro, para generar nuevas pistas, especialmente a nivel metodológico, que permitan minimizar los problemas de la aplicación de la citometría de flujo al material vegetal.

## Referencias

- Baranyi, M., Greilhuber, J. (1995) Flow cytometric analysis of genome size variation in cultivated and wild Pisum sativum (Fabaceae). *Plant Systematics and Evolution* 194:231-239.
- Bennett, M.D., Leitch, I. (2005) Genome size evolution in plants. En: Gregory, T. (Ed) *The Evolution of the Genome*. pp 89-162. Elsevier Academic Press. London, UK.
- Bennett, M.D., Leitch, I.J., Hanson, L. (1998) DNA amounts in two samples of angiosperm weeds. *Annals of Botany* 82:121-134.
- Bitonti, M.B., Cozza, R., Chiappetta, A., Contento, A., Minelli, S., Ceccarelli, M., Gelati, M.T., Maggini, F., Baldoni, L., Cionini, P.G. (1999) Amount and organization of the heterochromatin in Olea europea and related species. *Heredity* 83:188-195.
- Dimitrová, D., Ebert, I., Greilhuber, J., Kozuharov, S. (1999) Karyotype constancy and genome size variation in Bulgarian Crepis foetida s. l. (Asteraceae). *Plant Systematics and Evolution* 217:245-257.
- Doležel, J. (1997) Applications of flow cytometry for the study of plant genomes. *Journal of Applied Genetics* 38:285-302.
- Fay, M.F., Conwan, R.S., Leitch, I.J. (2005) The effects of nuclear DNA content (C-value) on the quality and utility of AFLP fingerprints. *Annals of Botany* 95:237-246.
- 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.
- Heller, F.O. (1973) DNA measurement of Vicia faba L. with the pulse cytophotometry. *Bericht der Deutschen Botanischen Gesellschaft* 86:437-441.
- Leitch, I.J., Soltis, D.E., Soltis, P.S., Bennett, M.D. (2005) Evolution of DNA amounts across land plants (embryophyta). *Annals of Botany* 95:207-217.
- Lysák, M.A., Rostková, A., Dixon, J.M., Rossi, G., Doležel, J. (2000) Limited genome size variation in Sesleria albicans. *Annals of Botany* 86:399-403.
- Noirot, M., Barre, P., Louarn, J., Duperray, C., Hamon, S. (2000) Nucleus-cytosol interactions - a source of stoichiometric error in flow cytometric estimation of nuclear DNA content in plants. *Annals of Botany* 86:309-316.
- Pinto, G., Loureiro, J., Lopes, T., Santos, C. (2004) Analysis of the genetic stability of Eucalyptus globulus Labill. somatic embryos by flow cytometry. *Theoretical and Applied Genetics* 109: 580-587.
- Price, H.J., Hodnett, G., Johnston, J.S. (2000) Sunflower (Helianthus annuus) leaves contain compounds that reduce nuclear propidium iodide fluorescence. *Annals of Botany* 86:929-934.

Šmarda, P., Bureš, P. (2006) Intraspecific DNA content variability in Festuca pallens on different geographical scales and ploidy levels. *Annals of Botany* 98:665-678.

## JOÃO LOUREIRO

### Aplicación de la citometría de flujo en el estudio del genoma vegetal

#### Tesis Doctoral

Departamento de Biología de la Universidad de Aveiro, Portugal.

Abril 2007.

Dirección: Conceição Santos y Jaroslav Doležal

#### Publicaciones resultantes de la tesis:

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.

Loureiro, J., Capelo, A., Brito, G., Rodriguez, E., Silva, S., Pinto G., Santos, C. 2007. Micropropagation of Juniperus phoenicea from adult plant explants and analysis of ploidy stability using flow cytometry. *Biologia Plantarum* 51:7-14.

Loureiro, J., Rodriguez, E., Costa, A., Santos, C. 2007. Nuclear DNA content estimations in wild olive (Olea europaea L. ssp europaea var. sylvestris Brot.) and Portuguese cultivars of O. europaea using flow cytometry. *Genetic Resources and Crop Evolution* 54:21-25.

Loureiro, J., Rodriguez, E., Gomes, A., Santos, C. 2007. Genome size estimations on Ulmus minor Mill., Ulmus glabra Huds., and Celtis australis L. using flow cytometry. *Plant Biology* 9:541-544.

Loureiro, J., Kopecký, D., Castro, S., Santos, C., Silveira, P. 2007. Flow cytometric and cytogenetic analyses of Iberian Peninsula Festuca spp. *Plant Systematics and Evolution* 269:89-105.

Loureiro, J., Rodriguez, E., Doležal, J., Santos C. 2006. Comparison of four nuclear isolation buffers for plant DNA flow cytometry. *Annals of Botany* 98:679-689.

Loureiro J., Rodriguez, E., Doležal, J., Santos C. 2006. Flow cytometric and microscopic analysis of the effect of tannic acid on plant nuclei and estimation of DNA content. *Annals of Botany* 98:515-527.

Loureiro, J., Rodriguez, E., Doležal, J., Santos, C. 2007. Two new nuclear isolation buffers for plant DNA flow cytometry: a test with 37 species. *Annals of Botany* 100:875-888.