



**IDENTIFICAÇÃO DE PLOIDIA DE PLANTAS DE CITROS POR TÉCNICA DE CITOMETRIA DE FLUXO, USANDO AMOSTRAS COMPOSTAS (BULKS)**

Thaís Helena Peixoto dos **Santos**<sup>1</sup>; Rodrigo Rocha **Latado**<sup>2</sup>

**Nº 14.137**

**RESUMO** - O presente trabalho teve como objetivo verificar a possibilidade de realizar análises de citometria de fluxo usando amostras compostas (em bulk), para identificação de plantas poliploides de *Citrus spp.*, obtidas em programas de melhoramento. Para tal, dois experimentos foram instalados. Um que avaliou a capacidade do citômetro de fluxo de identificar a presença de tecidos de plantas triploides, misturados em amostras de tecido reconhecidamente diploide, nas proporções de 1:1; 1:3, 1:5, 1:7 e 1:9 (planta triploide:diploide) e, outro, que amostras em bulk de folhas (proporção 1:9) foram preparadas e analisadas. Os resultados demonstraram que o equipamento e a metodologia de citometria de fluxo utilizados têm sensibilidade suficiente para detectar a presença de uma ou mais folhas de plantas triploides, dentro de uma amostra em bulk com até 10 folhas.

**Palavras-chaves:** *Citrus*, poliploide, análise

1 Autor, Bolsista CNPq (PIBIC): Graduação em Engenharia Ambiental e Sanitária, PUCC, Campinas-SP; elia59@live.com

2 Orientador: Pesquisador do Centro de Citricultura Sylvio Moreira/IAC, Cordeirópolis-SP; rodrigo@centrodecitricultura.br



**ABSTRACT-** *This study aimed to verify the possibility of performing flow cytometry analysis using composed samples (in bulk) for identification of polyploid plants of Citrus spp. obtained in breeding program. For this purpose, two experiments were installed. In the first one, we evaluate the ability of flow cytometry method to identify the presence of triploid plant tissues mixed in tissue samples of diploid plants in the proportions of 1:1; 1:3, 1:5, 1:7 and 1:9 (diploid:triploid plant). The second experiment were done by preparing bulk samples of leaves (ratio 1:9) and analyzed it in a blind test. The results showed that the flow cytometry equipment and methodology used were good enough to detect the presence of one or more leaves of triploid plants in a bulk sample of up to 10 leaves.*

**Key-words:** *Citrus*, polyploid, analysis.

## 1 INTRODUÇÃO

A citometria de fluxo é uma técnica que envolve a análise das propriedades ópticas (dispersão da luz e fluorescência) de partículas que fluem numa suspensão líquida. Esta particularidade é uma das diferenças existentes entre a citometria de fluxo e outras técnicas de análise quantitativa de núcleos isolados ou cromossomos (e.g. microespectrofotometria), que necessitam da fixação das partículas a uma superfície (e.g. lâmina). A medição em fluxo permite análises em alta velocidade (e.g.  $10^2 - 10^3$  partículas por segundo) e garante que os genomas analisados serão selecionados aleatoriamente de toda a população, sem qualquer subjetividade associada (Doležel 1997a).

Uma vez que a citometria de fluxo analisa as partículas individualmente e a uma velocidade elevada, populações numerosas de células e organelas podem ser medidas num relativamente curto espaço de tempo, e sub-populações destes genomas podem ser facilmente detectadas (Doležel 1997b).

A estimativa do conteúdo em DNA nuclear foi a primeira (Heller 1973) e continua a ser a principal utilização da citometria de fluxo em plantas. Nas plantas superiores, assim como em outros eucariotos, o crescimento e a divisão celular é um processo cíclico. No modelo de ciclo celular apresentado por Howard e Pelc (1986), o tempo entre cada mitose encontra-se dividido em três fases: G1, S e G2.

Uma vez que as medições do conteúdo em DNA não são perfeitas, as distribuições obtidas experimentalmente apresentam sempre variações. Estas variações estão relacionadas com as metodologias de isolamento dos núcleos, com a coloração com fluorocromos específicos para o



**8º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2014  
12 a 14 de agosto de 2014 – Campinas, São Paulo**

DNA e com a leitura no citômetro de fluxo (Marie e Brown 1993). As variações observadas são expressas num coeficiente de variação (CV = desvio padrão dividido pela média) que geralmente varia em células vegetais entre 1 e 10 % (e.g. Zoldos et al. 1998).

A análise por citometria de fluxo do conteúdo em DNA nuclear baseia-se na intensidade de fluorescência relativa de núcleos corados com um fluorocromo específico para o DNA. A amostra a analisar por citometria de fluxo tem de se encontrar na forma de uma suspensão de partículas individuais (Doležel 1997a). O tecido (approx. 50 mg, no caso de folhas) geralmente é cortado com uma lâmina, numa placa de Petri contendo o tampão de lise (usualmente uma solução tampão hipotônica com um detergente não iônico). Após o isolamento dos núcleos, estes são filtrados por uma rede de nylon com cerca de 50  $\mu$ m, de forma a eliminar a maior parte dos resíduos obtidos. Em seguida, os núcleos são corados com um fluorocromo que se liga especificamente e estequiometricamente ao DNA.

A poliploidia pode ser definida pelo aumento no número de conjuntos cromossômicos ou de genomas de uma dada espécie, sendo denominadas como poliplóides àquelas plantas com três ou mais conjuntos cromossômicos completos. A poliploidia pode ser distinguida em autopoliploidia e alopoliploidia. A autopoliploidia consiste na duplicação do número de cromossomos da própria espécie, de modo que a mesma passa a ter 3, 4, 5, 6 ou mais cópias do mesmo conjunto básico de cromossomos. Já a alopoliploidia, é resultante do cruzamento de duas espécies distintas, onde posteriormente o número de cromossomos é duplicado, resultando na obtenção de indivíduos com dois ou mais genomas distintos duplicados, provenientes de diferentes espécies (Wright, 1976).

No caso específico dos citros, já ficou comprovado que plantas autotetraplóides de várias espécies e algumas plantas alotetraplóides, quando usadas como porta-enxerto, induzem a produção de plantas com porte baixo. Este fato foi observado por Pompeu junior (2001) e Lee et al. (1990) quando plantas autotetraplóides dos citranges Troyer e Carrizo foram usadas como porta-enxertos.

Dentro desta linha de pesquisa, pensando em explorar esta interessante característica das plantas autotetraplóides, recentemente foram produzidos no Centro APTA Citros Sylvio Moreira/IAC plantas autotetraplóides de limão Cravo, tangerinas Cleópatra e Sunki (Latado et al., 2009, comunicação pessoal), assim como há um projeto em andamento que tem como objetivos obter o mesmo para citrumelo Swingle, citrange Troyer e dois citrandarins (PT x CS 23 e 37). Numa fase posterior, após iniciar a fase de frutificação, serão coletadas sementes e novos porta-enxertos serão produzidos a partir destas variedades, para uso em experimentos de avaliação do seu potencial indutivo de nanismo em plantas comerciais de citros.



## 8º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2014 12 a 14 de agosto de 2014 – Campinas, São Paulo

As análises de citometria de fluxo, por si só, podem auxiliar enormemente os programas de melhoramento que envolvem cruzamentos entre plantas de diferentes ploidias, geralmente diploides x tetraploides. No entanto, no caso de programas de melhoramento em que milhares de plantas tem de ser avaliadas anualmente em busca da determinação da sua ploidia, a sua eficiência pode ser aumentada enormemente se forem feitos ajustes na direção da automação ou da introdução de análises em *bulks* (amostras compostas).

Se, por um lado, a automação depende do desenvolvimento de equipamentos por empresas produtoras, o desenvolvimento de análises em *bulk* de amostras, depende do nível de sensibilidade de equipamento, mas, também, da eficiência da análise do operador. Assim, pode ser de interesse verificar a possibilidade de se realizar análises de citometria de fluxo usando amostras compostas (agrupadas), técnica chamada de análise em *bulk*. As vantagens a serem percebidas estão na redução do tempo e dos custos para a realização das análises.

O objetivo do presente estudo é verificar a possibilidade de realizar análises de citometria de fluxo usando amostras compostas (em *bulk*), para identificação de plantas poliploides de *Citrus spp.*, obtidas em programas de melhoramento.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biotecnologia do Centro de Citricultura Sylvio Moreira/IAC, Cordeirópolis-SP.

No primeiro experimento, o objetivo foi avaliar a capacidade do equipamento citômetro de fluxo, modelo Partec *CyFlow Ploidy Analyzer DAPI* (Partec GmbH., Alemanha), de identificar a presença de tecidos de plantas triploides, misturados em amostras de tecido reconhecidamente diploide, nas seguintes proporções: (1:1; 1:3, 1:5, 1:7 e 1:9 – planta triploide:diploide).

As amostras em *bulk* foram confeccionadas artificialmente após a coleta de folhas frescas de plantas diploides e triploides de citros. Vários segmentos de limbo foliar com medidas de 0,5 cm x 0,5 cm foram retirados de cada folha e postos em tubos Falcon de 50 ml. Em seguida, foram confeccionados os bulks a partir da mistura física de folhas nas proporções citadas anteriormente (1:1; 1:3, 1:5, 1:7 e 1:9 – planta triploide:diploide).

O equipamento Partec *CyFlow Ploidy Analyzer DAPI* é equipado com lâmpada UV-LED (emissão com comprimento de onda de 365 nm) e um parâmetro ótico de detecção de fluorescência.



## 8º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2014 12 a 14 de agosto de 2014 – Campinas, São Paulo

As amostras foram compostas por suspensões nucleares isoladas a partir de *bulk* de segmentos de folha (lamina foliar). Os núcleos das células foram expostos com auxílio de lâmina de aço afiada (bisturi), sobre placa de pétri na presença de 0,1 ml do tampão de extração (kit de coloração CyStain UV precise T-DAPI, Partec GmbH.), para cada disco de folha (Exemplo: 0,8 ml de tampão para 8 discos de folha), as amostras foram maceradas cerca de quarenta vezes. Em seguida, 1 ml da solução contendo as suspensões nucleares foi retirado e adicionado a 0,4 ml de solução de coloração do mesmo kit, que usa o 4-6-diamidino-2-fenilindole (DAPI) como fluorocromo, e mais 0,6 ml de água destilada. Em seguida, as amostras foram filtradas em filtro *CellTrics* de 50  $\mu\text{m}$  (Partec GmbH.) e analisadas imediatamente no equipamento.

As amostras foram avaliadas pelo *software* *CyView* (Partec GmbH.) e a calibração do equipamento foi a seguinte: *Gain* = 597 e *Low Level* (LL) = 0,64, resultando em histogramas com o tamanho relativo dos núcleos das células das amostras. As amostras cujos coeficientes de variação (CV) se situaram acima de 10% foram descartadas. O tamanho relativo médio dos núcleos de cada amostra foi calculado em relação a uma amostra controle de citros, reconhecidamente diploide (2n).

Um segundo experimento foi realizado, com a preparação de 20 tubos Eppendorf contendo 10 discos de folha cada, obtidas de plantas diploides. Uma pessoa foi responsável por trocar aleatoriamente um disco de folha diploide por um disco de folha triploide, em um ou mais de tubos Eppendors, alterando assim a sua composição para a proporção (1:9- planta diploide:triploide). Este conjunto de amostras foi entregue ao técnico para proceder a identificação. A identificação correta da amostras em bulk e das amostras contendo apenas folhas de plantas diploides confirmaria o sucesso do método. Ambos os experimentos foram repetidos pelo menos duas vezes.

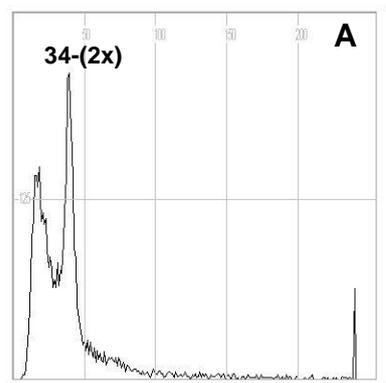
### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos no experimento 1, nas suas duas repetições, demonstraram a possibilidade de se identificar corretamente amostras de folhas de plantas triploides, presentes em bulk de folhas de plantas diploides, até o limite testado (proporção 1:9). A figura 1 demonstra estes resultados. Assim, mesmo na amostra contendo a proporção de 1:9 de folhas diploides e triploides, foi possível observar no histograma a presença do pico da planta triploide (valor relativo = 51).

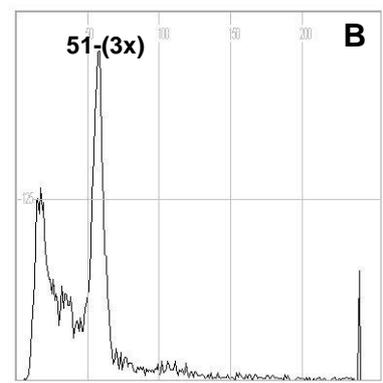
Uma questão importante, observada ao longo da execução dos experimentos, é a necessidade de que o técnico faça a maceração por igual das amostras de folhas na presença da



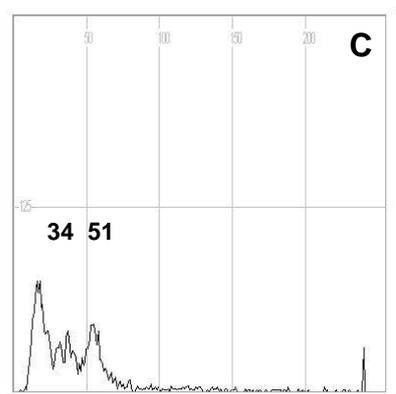
solução tampão de extração, permitindo assim que se mantenha na solução, a mesma proporcionalidade observada nas folhas.



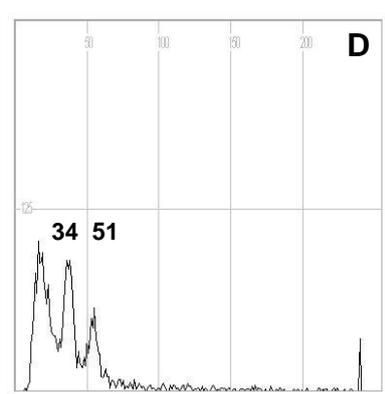
A. Planta diploide (2x)



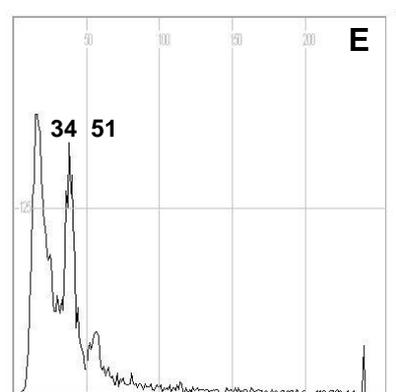
B. Planta triploide (3x)



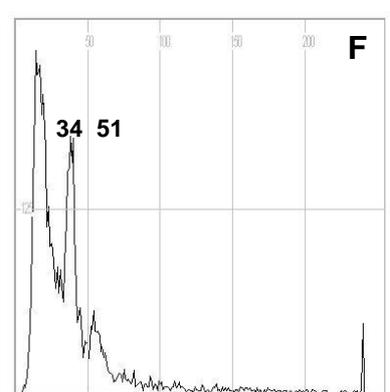
C. Bulk na proporção (1:1)



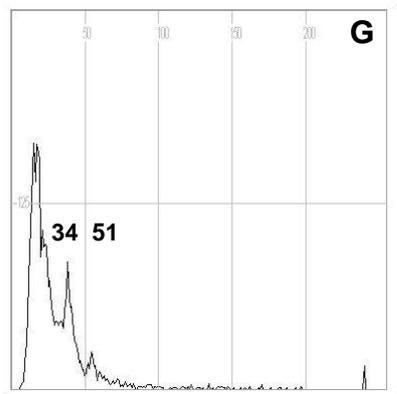
D. Bulk na proporção (1:3)



E. Bulk na proporção (1:5)



F. Bulk na proporção (1:7)



G. Bulk na proporção (1:9)

Figura 1. A a G. Histogramas contendo os picos relativos de tamanho de núcleo de amostras do controle e de amostras em bulk.

Os resultados obtidos no experimento 2 também foram positivos pois foi possível ao técnico determinar inequivocamente quais amostras eram formadas por Bulk e quais amostras apresentavam somente folhas de plantas diploides. Na Figura 2 encontra-se um histograma contendo uma amostra de bulk de folhas na proporção 1:9.

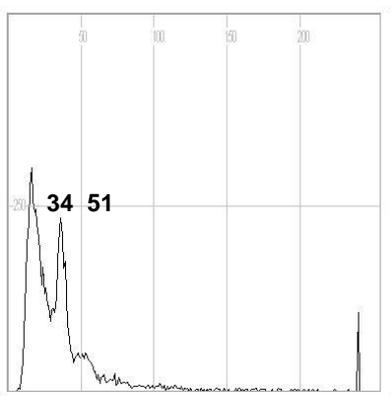


Figura 2. Histograma contendo os picos relativos de tamanho de núcleo de uma amostra em bulk (1:9).

#### 4 CONCLUSÃO

Foi possível comprovar que o equipamento e a metodologia de citometria de fluxo utilizados têm sensibilidade suficiente para detectar a presença de uma ou mais folhas de plantas triploides, dentro de uma amostra em bulk com até 10 folhas.



## **5 AGRADECIMENTOS**

Agradecemos ao CNPq pela bolsa de iniciação científica concedida.

## **6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- Doležel, J. 1997a. Applications of flow cytometry for the study of plant genomes. *Journal of Applied Genetics* 38 (3): 285-302.
- Doležel, J. 1997b. Flow cytometry, its application and potential for plant breeding. *Current Topics in Plant Cytogenetics Related to Plant Improvement* 97: 80-90.
- Heller, F.O. 1973. DNA-measurement of *Vicia faba* L. with pulse cytophotometry. *Berichte Der Deutschen Botanischen Gesellschaft* 86 (5-9): 437-441.
- Howard, A.; Pelc, S.R. 1986. Synthesis of deoxyribonucleic-acid in normal and irradiated-cells and its relation to chromosome breakage. *International Journal of Radiation Biology* 49 (2): 207-218.
- Marie, D.; Brown, S. 1993. A cytometric exercise in plant DNA histograms, with 2C values for 70 species. *Biology of the Cell* 78: 41-51.
- Zoldos, V.; Pape, D.; Brown, S.; Panaud, O.; Siljak-Yakovlev, S. 1998. Genome size and base composition of seven *Quercus* species: inter- and intra-population variation. *Genome* 41: 162-168.