

## Aplicação da Citometria de Fluxo ao estudo do Genoma Vegetal

João Loureiro<sup>1,2</sup>, Conceição Santos<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Biologia, Universidade de Aveiro

Laboratório de Biotecnologia e Citômica Vegetal, Campus Universitário de Santiago, 3810-193 Aveiro, Portugal

<sup>2</sup> E-mail: [jloureiro@bio.ua.pt](mailto:jloureiro@bio.ua.pt)

<sup>3</sup> E-mail: [csantos@bio.ua.pt](mailto:csantos@bio.ua.pt)

### Resumo

A citometria de fluxo foi originalmente desenvolvida, no fim dos anos 50, para a contagem e análise de células sanguíneas. A hematologia e a imunologia celular foram indubitavelmente as duas áreas da Biologia que impulsionaram o desenvolvimento da tecnologia da citometria de fluxo (Côrte-Real et al. 2002). No entanto, com a natural evolução técnica e com o aparecimento de novos marcadores fluorescentes, a utilização desta instrumentação generalizou-se a outras áreas e a estudos com outras células, como células vegetais e microbianas (Doležel 1997a). No domínio das células vegetais, apesar da utilização da citometria de fluxo ter ocorrido apenas no início dos anos 80, o número de aplicações tem aumentado continuamente desde então, sendo, hoje em dia, uma<sup>1</sup> técnica rotineiramente usada em vários laboratórios por todo o mundo (Doležel 1991). A oportunidade de separar subpopulações de partículas celulares/subcelulares ("cell sorting") aumentou ainda mais o espectro de aplicações desta técnica. Apesar da citometria de fluxo aplicada ao estudo de células e organelos vegetais apresentar ainda algumas limitações, esta técnica permite análises rápidas ("real time") do conteúdo em ADN e ARN, da expressão de transgenes e contagem de células, entre outras aplicações (Yanpaisan et al. 1999). Associada com outras técnicas citológicas a citometria de fluxo é considerada uma ferramenta muito importante para o estudo de citomas vegetais. O conceito de citoma foi originalmente introduzido por Valet (2002), referindo-se a qualquer tipo de partícula<sup>1</sup> (estruturas celulares, órgãos e indivíduos). A citômica é uma análise citométrica multimolecular dos citomas onde se obtém o máximo de informação referente à expressão global que um aparente fenótipo celular pode fornecer como resultado do seu genótipo e/ou ambiente (Valet 2002).

O objectivo deste artigo é fazer uma revisão da citometria de fluxo aplicada ao estudo de citomas vegetais, dando-se particular atenção aos princípios básicos e à instrumentação associados a esta técnica, às aplicações, nomeadamente as relacionadas com a análise do conteúdo em ADN nuclear, aos estudos que estão a ser desenvolvidos no nosso laboratório e aos estudos futuros.

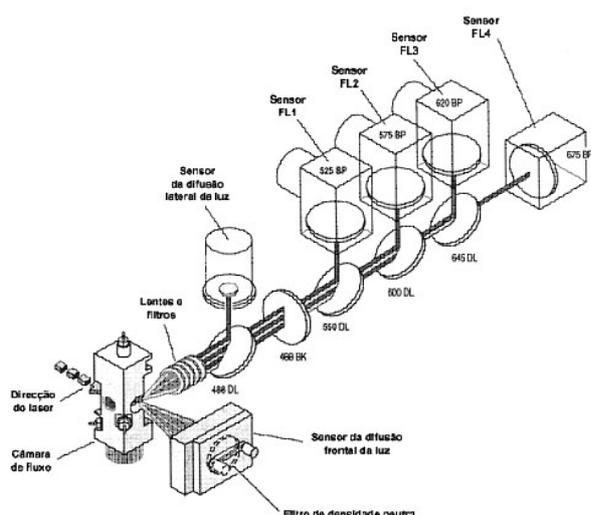
### Princípios básicos e instrumentação

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 cromossomas (e.g. microespectrofotometria), que necessitam da fixação das partículas a uma superfície (e.g. lâmina). A medição em fluxo permite análises a alta velocidade (e.g.  $10^2 - 10^3$  partículas por segundo) e garante que os citomas analisados são seleccionados aleatoriamente de toda a população, sem qualquer subjectividade associada (Doležel 1997a).

A suspensão líquida, que contém os citomas a analisar, é introduzida no centro da câmara de fluxo que se encontra preenchida por um fluido envolvente ("sheath fluid") e que apresenta uma velocidade muito superior à da suspensão líquida. Através de um fenómeno físico designado por focagem hidrodinâmica, as partículas são forçadas a moverem-se, em fluido laminar e uma a uma, no centro do fluxo (Doležel 1997a). Estas partículas intersectam um feixe de iluminação bastante intenso, com origem numa ou mais fontes de iluminação (laser(s) e/ou lâmpada de vapor de mercúrio). Quando as partículas intersectam o feixe de luz, ocorre um processo de dispersão fotónica e/ou de emissão de fluorescência, cuja intensidade está dependente das características das partículas (Côrte-Real et al. 2002). Os fotões que são dispersos frontalmente vão ser recebidos e analisados por um fotodiodo (detector da dispersão frontal) e os que são dispersos ortogonalmente (90°) são recebidos por uma série de filtros ópticos e são analisados em tubos fotomultiplicadores (dispersão lateral e fluorescência) (Côrte-Real et al. 2002). Os diferentes tipos de filtros ópticos ("long-pass", "short-pass", passagem de banda e espelhos dicróicos) dividem a emissão fluorescente permitindo a medição simultânea de vários corantes fluorescentes (Doležel 1991).

<sup>1</sup> Neste trabalho manter-se-á o conceito de partículas relativo a todos os eventos que são analisados. São assim englobados os citomas de interesse e todas as outras partículas que são analisadas, mas que são posteriormente excluídas como ruídos.

Hoje em dia a maior parte dos citómetros possui pelo menos 5 tubos fotomultiplicadores: um para a dispersão lateral e quatro para as fluorescências (Côrte-Real *et al.* 2002). Alguns dos citómetros mais recentes apresentam a possibilidade de medir até oito fluorescências simultaneamente. Os tubos fotomultiplicadores convertem e amplificam os sinais luminosos recebidos em pulsos electrónicos e estes pulsos são por sua vez convertidos em pulsos analógico-digitais que são processados por analisadores em vários canais. Os sinais de cada partícula vão-se acumulando em tempo real na forma de histogramas mono- ou biparamétricos, que são visualizados no monitor de um computador (Côrte-Real *et al.* 2002). Desta forma podem-se verificar simultaneamente, as distribuições dos valores da frequência e/ou densidade de cada parâmetro. Uma vez que a citometria de fluxo analisa as partículas individualmente e a uma velocidade elevada, populações numerosas de células e organelos podem ser medidas num relativamente curto espaço de tempo, e sub-populações destes citomas podem ser facilmente detectadas (Doležel 1997b). Na figura 1 apresenta-se um esquema ilustrativo do princípio de funcionamento de um citómetro de fluxo.



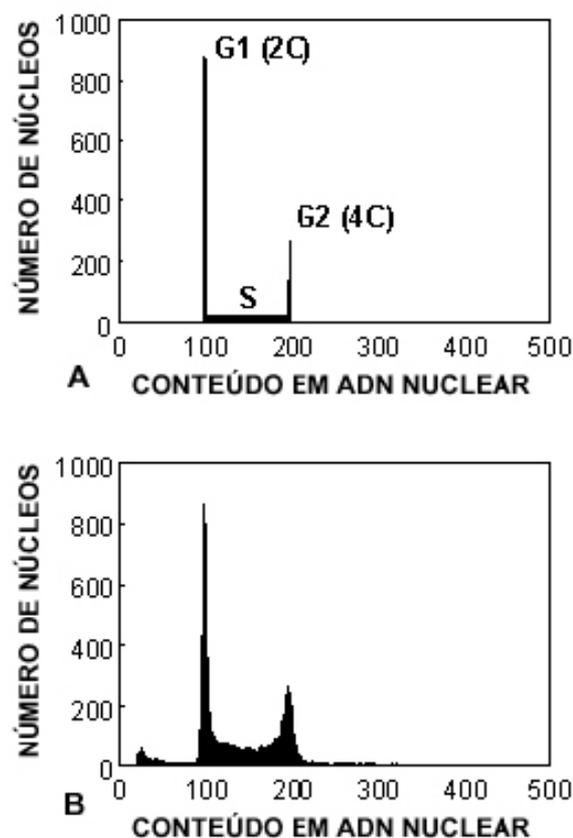
**Figura 1** – Representação esquemática do citómetro de fluxo Coulter EPICS-XL presente no Laboratório de Biotecnologia e Citómica Vegetal do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro (adaptado de (Coulter 1998)).

### Análise do conteúdo em ADN nuclear

A estimativa do conteúdo em ADN nuclear foi a primeira (Heller 1973) e continua a ser a principal utilização da citometria de fluxo em plantas. Presentemente, a citometria de fluxo é considerada a metodologia mais apropriada para este tipo de ensaios. Os métodos bioquímicos clássicos fornecem valores médios para números elevados de núcleos e não permitem a detecção de subpopulações. Metodologias mais recentes como a microespectrofotometria, a citofluorimetria e a análise de imagens não conseguem competir

em velocidade e conveniência com a citometria de fluxo (Doležel 1997a).

Nas plantas superiores, assim como noutros eucariotas, o crescimento e 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:  $G_1$ , S e  $G_2$ . Durante o período de crescimento celular (fase  $G_1$ ) uma célula diplóide apresenta um conteúdo 2C (C – conteúdo de um conjunto haplóide de cromossomas) em ADN nuclear, i.e., possui duas cópias de cada gene. Durante a fase S ocorre a duplicação do genoma nuclear e na fase seguinte (fase  $G_2$ ) ocorre o segundo período de crescimento celular, durante o qual o conteúdo em ADN nuclear é mantido no nível 4C. De seguida ocorre a mitose (fase M) durante a qual a célula se divide, formando-se duas células filhas, cada uma com um conteúdo 2C em ADN. O resultado da distribuição do conteúdo em ADN nuclear de uma população de células em crescimento assíncrono está expresso na figura 2A. Todavia, uma vez que as medições do conteúdo em ADN não são perfeitas, as distribuições obtidas experimentalmente apresentam sempre variações (figura 2B).



**Figura 2** – Distribuição do conteúdo em ADN nuclear (em unidades arbitrárias, expressas em número de canais) numa população de células em crescimento assíncrono (adaptado do endereço de Internet: <http://www.ueb.cas.cz/Olomouc1/lcgcm/index.htm>). (A) Distribuição ideal; (B) Distribuição obtida após análise dos núcleos por citometria de fluxo.

Estas variações estão relacionadas com as metodologias de isolamento dos núcleos, com a coloração com fluorocro-

mos específicos para o ADN e com a leitura no citómetro 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; para revisão ver Doležel 1991). Marie e Brown (1993) consideram que o CV é um critério elementar na validação de métodos citológicos e definem uma gama de valores entre 1 e 2 % para análises de alta qualidade e 3 % como um valor de rotina. Por sua vez Galbraith *et al.* (2002) estabeleceu um CV <5 % como critério de aceitação. Todavia, para algumas espécies vegetais recalcitrantes, como muitas plantas lenhosas, a obtenção destes valores recomendados é bastante complicada ou em alguns casos ainda impossível.

### Metodologia

A análise por citometria de fluxo do conteúdo em ADN nuclear baseia-se na intensidade de fluorescência relativa de núcleos corados com um fluorocromo específico para o ADN. A amostra a analisar por citometria de fluxo tem de se encontrar na forma de uma suspensão de partículas individuais (Doležel 1997a). O uso de protoplastos para este tipo de determinações tem sido progressivamente abandonado devido a alguns problemas associados a estas estruturas (e.g. elevada autofluorescência e baixa penetração dos corantes na membrana citoplasmática). Os problemas associados à baixa capacidade de penetração dos fluorocromos específicos para o ADN são facilmente

ultrapassados se se libertarem os núcleos antes da coloração. Esta abordagem elimina também o efeito da coloração do ADN citoplasmático e o problema da fluorescência não específica das clorofilas, uma vez que os cloroplastos individuais apresentam níveis de fluorescência muito baixos, em comparação com os núcleos (Doležel 1991).

Até ao momento foram desenvolvidas várias metodologias para libertar núcleos intactos de células vegetais. Todavia, o método clássico desenvolvido por Galbraith *et al.* (1983) continua a ser o mais utilizado, dada a simplicidade e rapidez, com que consegue libertar directamente núcleos de tecidos vegetais (Figura 3). O tecido (approx. 50 mg, no caso de folhas) é cortado ("chopped") com uma lâmina da barba numa caixa de Petri contendo o tampão de lise (usualmente uma solução tampão hipotónica com um detergente não iónico). Apesar de toda a sua simplicidade e rapidez este método fornece resultados bastante bons para a maioria das espécies vegetais. de Laet *et al.* (1987) utilizaram esta metodologia para isolar núcleos de folhas de beterraba e obtiveram histogramas de fluorescência com CVs entre 1,2 e 1,5 %, para o pico G<sub>1</sub>. A metodologia desenvolvida por Price e Johnston (1996) inclui a centrifugação dos núcleos antes da adição do corante para o ADN, mas os histogramas obtidos apresentaram CVs mais elevados e uma quantidade maior de ruído. Alguns investigadores isolaram núcleos de células ou tecidos fixados (Sgorbati *et al.* 1986, Pfosser 1989), todavia esta metodologia tem sido cada vez mais abandonada dado apresentar uma série de desvantagens (e.g. tendência para a formação de aglomerados de núcleos, alterações na estrutura da cromatina e



Figura 2 – Diagrama da metodologia utilizada para analisar o conteúdo em ADN nuclear utilizando tecido foliar.

diminuição da resolução dos histogramas obtidos).

Têm sido usados vários tampões no isolamento de núcleos de células vegetais (e.g. Galbraith *et al.* 1983). A sua composição é determinada pela necessidade de inibir a actividade das nucleases (protecção contra a degradação do ADN), de preservar a integridade dos núcleos e de fornecer condições óptimas para a coloração do ADN. Os tampões mais utilizados apresentam geralmente, catiões  $Mg^{2+}$  (Galbraith *et al.* 1983, Arumuganathan e Earle 1991) ou poliaminas (de Laat *et al.* 1987, Doležel *et al.* 1989), para estabilizar a cromatina. O Triton X-100 é geralmente usado em todos os tampões como detergente não iónico. Por vezes, são adicionados ao tampão, agentes redutores (mercaptoetanol, PVP, etc.) que têm como função inibir a acção de compostos fenólicos (Endemann *et al.* 2002, Galbraith *et al.* 2002). Até ao momento foram efectuados muito poucos estudos (e.g. de Laat *et al.* 1987) para comparar a eficiência dos tampões de lise nuclear. Uma vez que não existe um tampão que funcione optimamente para todos os tecidos e/ou espécies vegetais seria porventura interessante fazer um estudo da eficiência dos tampões mais usados hoje em dia, de forma a tentar perceber e optimizar a composição dos mesmos e assim obter um tampão mais versátil e universal.

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. De seguida os núcleos são corados com um fluorocromo que se liga especificamente e estequiometricamente ao ADN. A tabela I apresenta os fluorocromos mais utilizados na estimativa do conteúdo em ADN nuclear. O iodeto de propídio (IP) e o brometo de etídio (BE) intercalam-se quantitativamente na cadeia dupla do ADN (Lepecq e Paoletti 1967). Os primeiros estudos foram efectuados utilizando BE no entanto Crissman *et al.* (1976) mostraram que o IP produz histogramas de fluorescência com CVs ligeiramente inferiores aos obtidos com BE. Hoje em dia, o IP é o corante intercalar mais usado em estimativas do conteúdo em ADN nuclear. Como ambos os corantes também se ligam à cadeia dupla de ARN, a precisão das determinações do conteúdo em ADN utilizando estes corantes, está dependente da destruição do ARN por RNases (Price e Johnston 1996). O Hoechst 33258 e o DAPI ligam-se preferencialmente às regiões

ricas em A-T do ADN (Portugal e Waring 1988), enquanto que a coromicina A3 e a mitramicina se ligam preferencialmente às regiões ricas em G-C (Van Dyke e Dervan 1983). Os corantes que se ligam a pares de base específicos fornecem geralmente resultados com CVs mais baixos (CV <2) do que os corantes intercalares. Todavia, os corantes específicos de determinados pares de bases não fornecem estimativas correctas do conteúdo em ADN nuclear quando se utilizam padrões de referência cuja composição em bases não seja idêntica à composição da amostra em estudo. Doležel (1991) descreve este problema e sugere que os corantes intercalares devem ser preferencialmente utilizados quando se pretendem efectuar estimativas exactas do conteúdo em ADN nuclear.

Apesar de todos os corantes apresentados poderem ser usados para quantificar o conteúdo em ADN nuclear, é preciso ter em conta que uma porção do ADN nuclear da cromatina nativa permanece não corada. Darzynkiewicz e Traganos (1988) mostraram que para alguns corantes (e.g. IP e BE) a quantidade de ADN não corado depende da estrutura da cromatina. Esta descoberta indica que a estrutura da cromatina nativa (que em algumas espécies varia entre tecidos da mesma planta), e que alterações na cromatina (induzidas, p.e., por fixação do material) influenciam a afinidade do ADN para vários fluorocromos. O modo de ligação e as propriedades espectrais dependem ainda de outros factores como o rácio ADN/corante, força iónica e pH da solução de coloração. Assim, é necessário ter em consideração todos estes factores quando se comparam as estimativas do conteúdo em ADN nuclear. Para além da preparação e coloração da amostra, existem também factores instrumentais que afectam a precisão da análise do conteúdo em ADN nuclear por citometria de fluxo. No entanto, esta precisão pode ser controlada, usando padrões de instrumento como fluoroesferas marcadas, núcleos corados de glóbulos vermelhos de galinha (CRBC) ou leucócitos humanos (Fulwyler 1979, Pijnacker *et al.* 1989). Estes padrões permitem fazer o ajuste do citómetro de fluxo de forma a obter um sinal de amplitude máximo e coeficientes de variação mínimos (Doležel 1991).

As determinações do conteúdo em ADN nuclear por citometria de fluxo são obtidas por comparação com um

**Tabela 1.** Corantes fluorescentes mais utilizados em citometria de fluxo para estimar o conteúdo em ADN nuclear.

Fluorocromo	Modo de Ligação Primário	Comprimento de Onda	
		Excitação	Emissão
Iodeto de Propídio	Intercalação	525 (Azul-verde)	605 (Vermelho)
Brometo de Etídio	Intercalação	535 (Azul-verde)	602 (Vermelho)
DAPI	Regiões ricas em A-T	345 (UV)	460 (Azul)
Hoechst 33258	Regiões ricas em A-T	360 (UV)	460 (Azul)
Coromicina A3	Regiões ricas em G-C	445 (Violeta-Azul)	570 (Verde)
Mitramicina	Regiões ricas em G-C	445 (Violeta-Azul)	575 (Verde)

padrão de referência. Os padrões de referência podem ser preparados externamente ou internamente. Os padrões externos são preparados separadamente da amostra em estudo e são verificados antes e depois de cada amostra. Este procedimento é moroso e susceptível a erros provocados por variações relacionadas com o aparelho e com a coloração. Este erro pode ser minimizado pela utilização do padrão internamente, i.e., preparação conjunta da amostra e do padrão. Os CRBCs e os leucócitos humanos são frequentemente usados como padrões de referência em análises por citometria de fluxo do conteúdo em ADN nuclear e nível de ploidia em células humanas. O conteúdo em ADN nuclear destes padrões está supostamente bem estabelecido (7,0 pg para *Homo sapiens*, Rasch 1985, e 2,5 pg para *Gallus domesticus*, Tiersch *et al.* 1989) e por essa razão são muitas vezes utilizados em estimativas do conteúdo de ADN nuclear em plantas superiores. No entanto, quando se utilizam estes padrões, tem de se ter em consideração que nestas espécies, tal como acontece noutras espécies que possuem cromossomas sexuais heteromórficos, os valores diferem entre machos e fêmeas. Jakobsen (1983) verificou que estas diferenças podem influenciar significativamente os resultados. Quando se utiliza CRBC como padrão de referência tem de se ter igualmente em consideração que as várias variedades de galinha possuem diferenças no conteúdo em ADN (Nakamura *et al.* 1990). Por estas razões, o uso de padrões de referência vegetais tem sido cada vez mais apoiado. Price *et al.* (1980) sugeriram que por questões técnicas os padrões vegetais são mais adequados para estimar o conteúdo em ADN em plantas. Johnston *et al.* (1999) consideraram que a escolha do padrão de referência a usar é um passo crítico para estas estimativas e recomendam que o padrão vegetal a usar tenha um conteúdo em ADN próximo, mas não sobreposto, aos picos 2C e 4C da planta a analisar. Desta forma, tem de estar disponível um conjunto de plantas padrão que possa cobrir a gama de variação existente no tamanho do genoma das plantas. No nosso laboratório são usados os padrões vegetais sugeridos por Doležel *et al.* (1992). Estes autores calibraram o tamanho do genoma de cultivares seleccionados de *Raphanus sativus* (2C = 1,11 pg), *Lycopersicon esculentum* (2C = 1,96 pg), *Glycine max* (2C = 2,50 pg), *Zea mays* (2C = 5,72 pg), *Pisum sativum* (2C = 9,09 pg), *Vicia faba* (2C = 26,90 pg), *Secale cereale* (2C = 16,19 pg) e *Allium cepa* (2C = 34,89 pg). Estas espécies são rotineiramente utilizadas como padrões internos de referência. Outras espécies vegetais que são frequentemente usadas incluem *Petunia hybrida* (2C = 2,85 pg; Marie e Brown 1993) e *Hordeum vulgare* (2C = 11,12 pg; O'Brien *et al.* 1996).

Johnston *et al.* (1999) testaram e sugeriram um conjunto de padrões de referências a usar em estimativas do conteúdo em ADN nuclear em plantas, mas, infelizmente, entre a comunidade científica, ainda não se chegou a um consenso sobre que padrões de ADN usar quando se analisam núcleos de células vegetais. Este facto torna a comparação dos dados obtidos em diferentes laboratórios bastante difícil, senão impossível (Doležel 1997a). Recentemente, na Kew Plant Genome Size Discussion Meeting, este assunto foi

discutido, tendo ficado decidida a realização de um estudo inter-laboratorial a nível mundial para comparar os diferentes padrões vegetais (Doležel, comunicação pessoal)

## Aplicações

### Análises de Ploidias

A análise da intensidade de fluorescência relativa de núcleos isolados de folhas jovens produz um histograma com um pico dominante que corresponde aos núcleos que se encontram na fase G<sub>1</sub> do ciclo celular e um pico menor que corresponde aos núcleos na fase G<sub>2</sub>. Para estimar o nível de ploidia, a posição do pico G<sub>1</sub> de um histograma é comparado com o pico de uma planta padrão com uma ploidia conhecida (Doležel 1997a).

A análise por citometria de fluxo do conteúdo em ADN nuclear em células em interfase é uma excelente alternativa aos métodos microscópicos clássicos de contagem de cromossomas. Comparativamente a citometria de fluxo apresenta as seguintes vantagens: é mais conveniente (a preparação da amostra é fácil), rápida (processamento de dezenas de amostras num único dia de trabalho), não necessita de células em divisão, é uma metodologia não destrutiva (uma amostra pode ser preparada, p.e., a partir de 50 mg de tecido foliar) e é capaz de detectar mixoploidias. Por estas razões, a citometria de fluxo é uma metodologia utilizada em diferentes áreas que vão desde a investigação básica até ao melhoramento de plantas e indústria (Doležel 1997a).

Abordam-se de seguida algumas aplicações específicas dentro da análise de ploidias:

**Detecção de plantas haplóides e de linhas dihaplóides:** em algumas espécies (e.g. cereais) pode-se obter um elevado número de plântulas a partir da antera, do micrósporo ou de culturas do ovário. A determinação da ploidia nestas plântulas é importante dado que as plântulas haplóides têm de ser tratadas com agentes poliploidizantes para produzir plântulas homocigóticas diplóides, enquanto que as plântulas dihaplóides não necessitam deste tratamento. A citometria de fluxo é a única metodologia que consegue analisar um número bastante elevado de plântulas num relativamente curto espaço de tempo, o que permite a rentabilização de todo o processo (Svirshchevskaya e Doležel 2001, Gemes-Juhász *et al.* 2002).

**Detecção de novos níveis de ploidia:** em algumas plantas, as cultivares utilizadas a nível comercial são triploides e o seu melhoramento envolve estratégias de cruzamento diferentes de forma a obter o nível de ploidia desejado. A citometria de fluxo é rotineiramente utilizada para verificar o nível de ploidia das plantas mãe e dos progenitores. Noutras plantas como a banana (*Musa acuminata*, van Duren *et al.* 1996) e a pereira (*Pyrus pyrifolia*, Kadota e Niimi 2002), as cultivares tetraploides são mais rentáveis do que os diplóides. Estas cultivares são usualmente produzidas após o tratamento com um agente poliploidizante e através

da citometria de fluxo as plântulas de interesse podem rapidamente ser seleccionadas.

**Detecção de híbridos inter-específicos:** os cruzamentos inter-específicos são muitas vezes utilizados para transferir características de interesse de uma espécie para outra. Quando as espécies parentais diferem o suficiente no conteúdo em ADN nuclear a citometria de fluxo consegue detectar híbridos inter-específicos de acordo com os valores de ADN intermédios (Keller *et al.* 1996, Hirsch *et al.* 2001).

**Controlo da estabilidade do nível de ploidia:** devido à sua eficiência a citometria de fluxo é a ferramenta ideal para uma análise rápida da conformidade de lotes de sementes (de Laat *et al.* 1987). As culturas *in vitro* são usualmente caracterizadas por uma frequência baixa de células mitóticas. Muitas das células diferenciam-se, não se dividem, e por essas razões o nível de ploidia não pode ser estimado pelos métodos convencionais. A citometria de fluxo é uma poderosa ferramenta para estimar a estabilidade da ploidia do tecido caloso, de embriões somáticos, cultura de células, etc., e verificar os efeitos da idade e das condições da cultura nessa mesma estabilidade (Brutovská *et al.* 1998, Winklemann *et al.* 1998, Endemann *et al.* 2002).

**Detecção de aneuploidia:** a detecção de aneuploidia, por citometria de fluxo, é por vezes muito complicada e nestas situações a resolução dos histogramas de fluorescência é um factor bastante importante. Todavia, Pfosser *et al.* (1995) e Roux *et al.* (2003) mostraram que a citometria de fluxo é, em algumas situações, suficientemente sensível para detectar a presença ou ausência de um único cromossoma. Contudo em todas estas situações a aneuploidia foi experimentalmente programada. Em estudos em que a ocorrência de aneuploidia pode ou não verificar-se é muito difícil a sua detecção, sendo, nestas situações, necessário acompanhar o estudo de citometria de fluxo com estudos convencionais de contagem microscópica de cromossomas.

**Taxonomia:** uma área que tem beneficiado grandemente com a utilização da citometria de fluxo na análise da ploidia é a taxonomia. Uma vez que a contagem cromossomática é laboriosa, apenas pode ser analisado um número limitado de plantas, de tal forma que populações similares fenotipicamente, mas que diferem no nível de ploidia podem passar despercebidas (Misset e Gourret 1996, Lysák e Doležel 1998). Assim a citometria de fluxo apresenta um potencial enorme no estudo da estrutura e dinâmica de populações vegetais que apresentem indivíduos com sistemas genéticos anómalos (e.g. agamospermia). Estas populações poderão ser caracterizadas por várias microespécies que diferem no nível de ploidia (Renno *et al.* 1995).

### Estimativa do tamanho do genoma

O conhecimento do tamanho do genoma tem recebido cada vez mais atenção nos últimos anos sendo muito importante em diversas áreas de investigação. Este conhecimento tem sido bastante útil em estudos de relações filogenéticas (Zoldos *et al.* 1998, Lysák *et al.* 1999, Torrell e

Valles 2001, Moscone *et al.* 2003, Suda *et al.* 2003), na análise de possíveis correlações entre o tamanho do genoma e características fisiológicas e agronómicas (e.g. Biradar *et al.* (1994a) verificaram em milho, uma correlação negativa entre os parâmetros de crescimento e a quantidade de ADN nuclear), e na análise do efeito de factores ambientais no tamanho do genoma. Os investigadores da Biologia Molecular interessados no mapeamento de genomas necessitam de conhecer a sua complexidade, e até ao momento o tamanho do genoma nuclear continua desconhecido para aproximadamente 99 % das espécies Angiospérmicas (Bennett e Leitch 2003). Estes autores compilaram até ao momento a informação do conteúdo em ADN nuclear de mais de 3493 espécies Angiospérmicas. Devido à sua precisão, rapidez e conveniência, a citometria de fluxo é tida como a metodologia ideal para a realização desta tarefa.

A estimativa do tamanho do genoma nuclear por citometria de fluxo em unidades absolutas (pg de ADN ou Mpb) pode ser conseguida pela medição simultânea da amostra e do padrão de referência (com um tamanho do genoma conhecido). O tamanho do genoma da amostra é de seguida calculado pelo rácio das posições dos picos  $G_1$  da amostra/padrão multiplicado pelo conteúdo em ADN da planta de referência. Um aspecto que tem de se ter em consideração no cálculo do conteúdo 2C de ADN é um conhecimento prévio do nível de ploidia da nossa amostra, uma vez que a poliploidia é um fenómeno frequente em plantas superiores.

A precisão e a reprodutibilidade da análise são aspectos críticos neste tipo de estudos, principalmente em estudos de variações intra-específicas do tamanho do genoma. O número de trabalhos em que se verificou este tipo de variações tem aumentado continuamente, no entanto, a maioria dos resultados obtidos não foi confirmado independentemente. Este aspecto suscitou questões relacionadas com a frequência e magnitude deste tipo de variações (Greilhuber 1998). Uma vez que existem variações técnicas e/ou variações biológicas, que podem levar a diferenças quantitativas na ligação e/ou fluorescência dos fluorocromos utilizados (Johnston *et al.* 1996, Greilhuber 1998), diferenças artefactuais podem ocorrer e diferenças reais podem passar indetectáveis. Idealmente, o corante fluorescente deveria ter acesso a todos os locais de ligação ao ADN, mas por vezes isso não é totalmente conseguido. Alguns tratamentos físicos e químicos (e.g. aquecimento, adição de cationes bivalentes, modificação do pH e variação da concentração de NaCl) modificam a condensação da cromatina, provocando variações de fluorescência (Darzynkiewicz *et al.* 1984).

Alguns trabalhos recentes mostraram que as interações núcleo-citosol são uma fonte de erro estequiométrico na determinação, por citometria de fluxo, do conteúdo em ADN nuclear em plantas. A presença de compostos extra nucleares que reduzem a fluorescência do IP foi detectada em algumas espécies de plantas, nomeadamente em girassol, *Helianthus annuus* L. (Price *et al.* 2000) e na planta do café, *Coffea liberica* var. *dewevrei* (Noirot *et al.* 2000, Noirot *et*

al. 2002, Noirot *et al.* 2003). Price *et al.* (2000) referiram que estes tipos de inibidores que diminuem a fluorescência dos fluorocromos de ADN são comuns nas plantas. Assim, deveria ser efectuado um teste de detecção destes inibidores em todos os estudos de citometria de fluxo em plantas. Estes investigadores não identificaram a natureza química destes inibidores mas apontaram para o provável envolvimento dos metabolitos secundários produzidos pelas plantas. Noirot *et al.* (2000), em estudos efectuados com a planta do café, verificaram o efeito do citosol na acessibilidade dos corantes ao ADN, e que os compostos presentes no citosol podem alterar as estimativas do conteúdo em ADN nuclear até cerca de 20 %.

Estes autores sugeriram os compostos fenólicos e a cafeína como possíveis fontes dos erros estequiométricos verificados. Suportando esta hipótese foi recentemente verificado por estes autores (Noirot *et al.* 2003) que a cafeína e o ácido cloragénico (um precursor de polifenóis) modificam a acessibilidade do IP ao ADN de petúnia (padrão interno usado nas várias experiências). O DAPI poderia, porventura nalguns estudos, ser usado em substituição do IP, mas Noirot *et al.* (2002) demonstraram que este corante também é afectado por estes compostos. Estes autores referiram que devem surgir erros estequiométricos sempre que o conteúdo em compostos fenólicos variar e uma vez que estes compostos são bastante comuns nas plantas, especialmente nas plantas lenhosas, estes erros são esperados em muitas situações.

### Outras aplicações

#### Estudos do ciclo celular

Uma vez que o conteúdo em ADN nuclear reflecte a posição da célula no ciclo celular, a citometria de fluxo pode ser utilizada na análise do ciclo celular.

Galbraith *et al.* (1983) e Sgorbati *et al.* (1986) entre outros, utilizaram esta técnica para estudar as diferenças de proporção de cada fase do ciclo celular, consoante os órgãos, partes dos órgãos e idade das plantas. Sandoval *et al.* (2003) efectuaram um estudo ao nível do ciclo celular em tecidos *in vitro* de coqueiro de forma a controlar a sua regeneração.

Neste tipo de estudos é necessário ter conta alguns aspectos. Haag *et al.* (1987) mostraram que a quantidade de ruído de fundo encontrado em alguns histogramas, poderá levar a erros na estimativa da proporção de células que se encontrava na fase S. No caso de estar presente, este ruído deverá ser eliminado antes das análises dos histogramas de ADN. Outra possível fonte de erro seria a formação de agregados nucleares. Com efeito, a formação de dupletos (e.g. dois núcleos G<sub>1</sub>) poderá levar a um aumento artificial na frequência de células na fase G<sub>2</sub> mas, a maior parte dos programas computacionais de análise dos dados apresenta a possibilidade de criar regiões que permitem a eliminar este tipo de células da análise do ciclo celular (Price e

Johnston 1996).

#### Determinação do sexo numa fase prévia do crescimento

Algumas espécies vegetais economicamente importantes são dióicas e a identificação do sexo numa fase inicial de crescimento tem uma aplicação vasta na sua produção e melhoramento. Doležel e Göhde (1995) demonstraram que a análise por citometria de fluxo de elevada resolução de núcleos isolados de folhas jovens poderá ser usada para discriminar entre plantas masculinas e femininas de *Melandrium album*. Nesta espécie, devido ao heteromorfismo existente nos cromossomas sexuais, as plantas masculinas têm uma quantidade de ADN ligeiramente superior em relação às plantas femininas. Infelizmente, este heteromorfismo nem sempre ocorre em espécies dióicas.

#### Análises de genotoxicidade

Uma possível aplicação da citometria de fluxo, que até agora foi muito pouco explorada, é a análise do efeito do ambiente e de compostos genotóxicos na quantidade de ADN nuclear. Biradar *et al.* (1994b) verificaram alterações no ADN nuclear de milho, induzidas por um fungicida (*Triticonazole*). Por outro lado, mutagenes físicos (e.g. irradiação) são tidos como indutores de aberrações cromossomáticas que por sua vez provocam alterações no conteúdo em ADN.

Por exemplo, a irradiação tem sido frequentemente utilizada para proteger os vegetais da degradação durante um tempo de conservação prolongado. Selvan e Thomas (1995) verificaram, por citometria de fluxo, a presença de alterações no conteúdo em ADN de células do tecido meristemático de bolbos de cebola que foram irradiados para inibir a formação de rebentos. Se estes resultados forem confirmados com mais estudos, a citometria de fluxo pode vir a ser usada como um método rápido e fiável de detecção deste tipo de alterações, no controlo de vegetais irradiados.

#### Análise e separação de cromossomas

A análise e mapeamento do genoma da maior parte das cultivares é dificultada pelo elevado tamanho do seu genoma. Esta complexidade pode ser reduzida pela purificação de cromossomas isolados por citometria de fluxo e seriação (Doležel *et al.* 1994). O modo de funcionamento da seriação celular e o modo de preparação dos cromossomas não serão aqui focados (para uma revisão ver Doležel *et al.* 1994). Os cromossomas que são dificilmente descritos por cariotipagem podem desta forma ser seriados em números elevados, de forma a serem utilizados em subsequentes análises moleculares. As aplicações associadas incluem a localização de sequências de ADN, o isolamento de sondas complexas, a construção de bibliotecas de ADN específicas para cada cromossoma e o isolamento de marcadores moleculares específicos para os cromossomas.

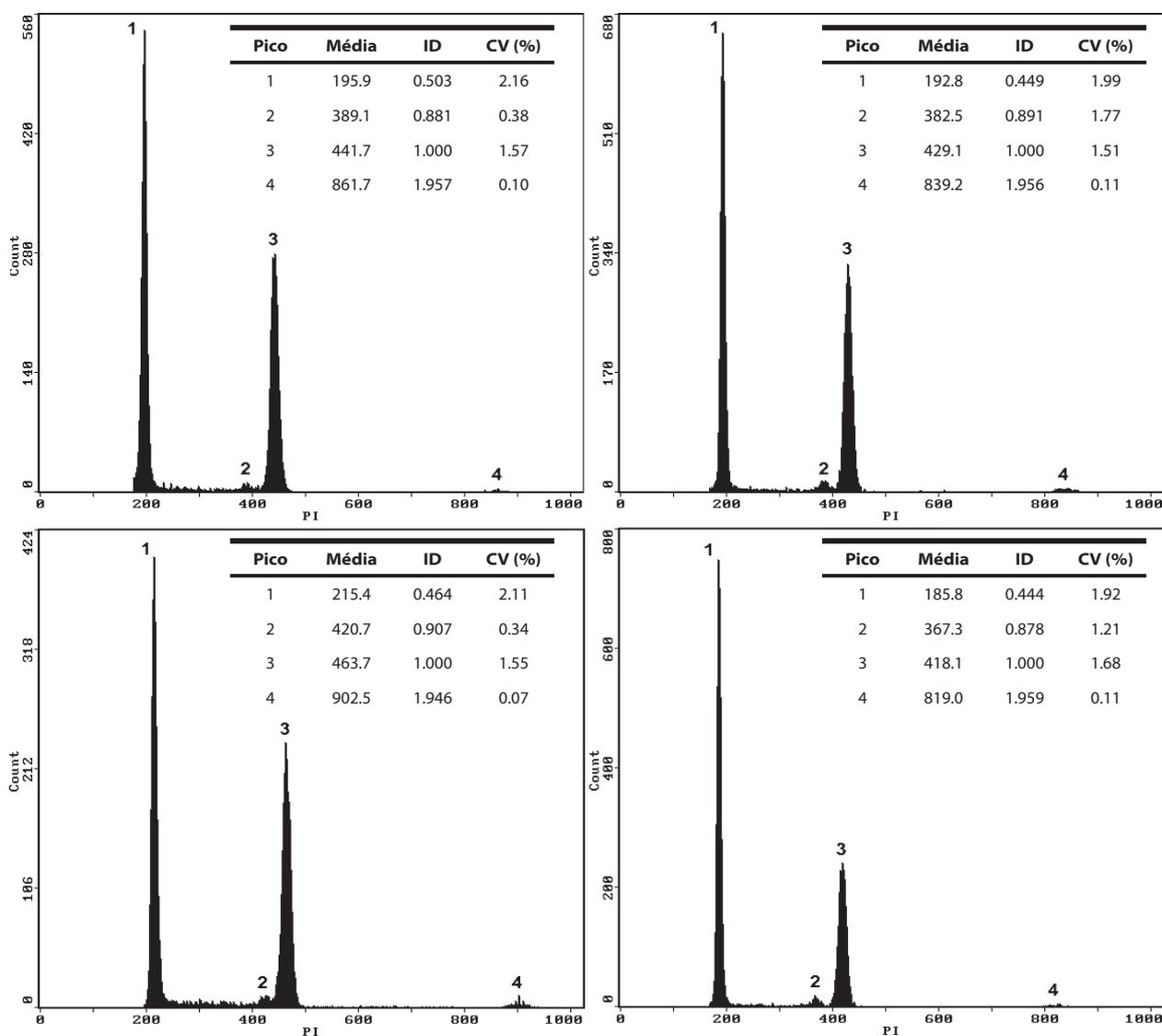
### A citometria de fluxo na UA

A citometria de fluxo sofreu um grande desenvolvimento em Portugal no início da década de 90, graças aos trabalhos desenvolvidos em carcinomas pelo Prof. Filipe Sansonetty do IPATIMUP (Carneiro et al. 1992). Este investigador tem sido, desde então, o principal dinamizador e divulgador desta técnica em Portugal, desenvolvendo actualmente diversos estudos em carcinomas (Castro et al. 2001), em leveduras (Ludovico et al. 2001) e noutros organismos (Lage et al. 2001).

A citometria de fluxo foi implantada no Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro, mais concretamente no Laboratório de Biotecnologia e Citómica Vegetal, há aproximadamente ano e meio, após a aquisição de um citómetro de fluxo Coulter EPICS-XL (Coulter Electronics, Hialeah, Florida, USA). O citómetro de fluxo está equipado

com um laser de árgon arrefecido com ar, com 15 mW e a operar a 488 nm e apresenta, para além dos sensores de dispersão frontal e lateral, quatro sensores de fluorescência. Este aparelho não está equipado com mais nenhum sistema de iluminação (e.g. UV) e por essa razão, os estudos envolvendo fluorocromos implicam que estes sejam excitados dentro do comprimento de onda de luz, disponível (e.g. IP, BE e SYBR® Green).

Após um período necessário de aprendizagem de toda a instrumentação, seguiu-se um período de aprendizagem das metodologias de preparação e análise de núcleos vegetais. Para isso muito contribuiu o apoio inicialmente prestado pelo Prof. Filipe Sansonetty (Universidade do Minho) e pelo Prof. Jaroslav Doležel do Laboratório de Citogenética Molecular e Citometria do Instituto de Botânica Experimental localizado em Olomouc, República Checa. Presentemente o citómetro de fluxo tem uma utilização



**Figura 4** – Histogramas de fluorescência obtidos após análise simultânea de núcleos isolados de *Pisum sativum* cv. Ctirad (2C = 9,09 pg DNA, como padrão de referência interno) e *Ulmus minor* Mill.: a) folhas do genótipo G14, b) folhas do genótipo G14 obtidas por conversão de embriões secundários, c) folhas do genótipo G14 obtidas por conversão de embriões primários, d) folhas do genótipo G12. Em todos os histogramas são visíveis quatro picos: 1 – núcleos na fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> de *U. minor*; 2 – núcleos na fase G<sub>2</sub>/M de *U. minor*; 3 – núcleos na fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> de *P. sativum*; 4 – núcleos na fase G<sub>2</sub>/M de *P. sativum*. DI = índice de ADN (rácio entre o canal médio da amostra e da planta padrão), CV = coeficiente de variação.

diária, não estando, no entanto, a sua aplicação restrita a estudos do genoma vegetal.

### Trabalhos em curso

O grupo de Biotecnologia e Citômica Vegetal do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro tem experiência consolidada em micropropagação (essencialmente por embriogénese somática) de plantas lenhosas como sobreiro (Pinto et al. 2002a), eucalipto (Pinto et al. 2002b), oliveira (Santos et al. 2003) e ulmeiro (Conde et al. 2004) – frequentemente consideradas recalcitrantes - para além de outras espécies (Santos e Caldeira 1998). Nesta linha de investigação estão a ser desenvolvidos estudos de estabilidade, ao nível da ploidia, de plantas derivadas de micropropagação. Tal como foi referido anteriormente as plantas lenhosas apresentam alguns problemas associados com isolamento dos núcleos, nomeadamente pela provável interferência de compostos do metabolismo secundário. Para o efeito estão a ser desenvolvidas metodologias que tentam minimizar a acção destes compostos e assim permitir a progressão dos ensaios.

Em sobreiro (*Quercus suber* L.) a citometria de fluxo está a ser usada para avaliar se a embriogénese somática (Pinto et al. 2002a) induz alterações ao nível de ploidia (Loureiro et al. 2003c). Para o efeito analisaram-se por citometria de fluxo, embriões somáticos morfológicamente normais (com dois cotilédones), embriões somáticos anormais (com um, três ou mais cotilédones) e folhas da árvore mãe. A citometria de fluxo, utilizando uma coloração com IP, foi assim utilizada para estimar o nível de ploidia e o conteúdo em ADN nuclear dos embriões somáticos e da árvore mãe. Até ao momento não foram detectadas diferenças significativas entre os embriões, e entre eles e a árvore mãe, indicando que as culturas de embriões são estáveis. A estimativa do conteúdo 2C em ADN nuclear para esta espécie é bastante similar ao valor previamente obtido por (Zoldos et al. 1998) (2C = 1,91 pg ADN).

Em eucalipto (*Eucalyptus globulus* Labill.) procedeu-se a um estudo semelhante tendo-se comparado embriões somáticos (Pinto et al. 2002b) com embriões zigóticos da mesma família (a partir dos quais foram obtidos os embriões somáticos) (Pinto et al. 2003). Os valores obtidos foram ainda comparados com os valores obtidos para a árvore mãe. Os resultados revelaram diferenças não significativas entre os embriões somáticos e a árvore mãe, mas ambos os valores são significativamente diferentes dos valores obtidos para os embriões zigóticos. Todavia, e tendo em conta que o eucalipto é uma planta lenhosa, as diferenças entre a árvore mãe e os embriões zigóticos sugerem que alguns aspectos têm de ser analisados com bastante cuidado, dado que o IP pode estar a ser influenciado por compostos secundários (e.g. antocianinas e taninos) presentes nos embriões somáticos e nas folhas maduras.

Em ulmeiro (*Ulmus minor* Mill.), a citometria de fluxo foi utilizada para verificar a estabilidade genética de plantas derivadas de embriões somáticos e de plantas micropro-

pagadas (Conde et al. 2003, Loureiro et al. 2003b). No que respeita à estabilidade genética das plantas derivadas de embriões verificaram-se diferenças significativas entre as plantas derivadas de embriões somáticos obtidos por embriogénese secundária e as plantas derivadas de embriões somáticos obtidos por embriogénese primária. As primeiras revelaram igualmente diferenças significativas em comparação com as estimativas obtidas para a planta mãe. Esta situação pode ser um caso de aneuploidia, e de forma a comprovar esta hipótese estão em curso estudos de cariotipagem. No que diz respeito à estabilidade genética das plantas micropropagadas, não foram encontradas diferenças significativas entre os vários genótipos comparados. Este resultado revela estabilidade das culturas in vitro (Figura 4). Foi ainda efectuada a primeira estimativa do tamanho do genoma de *Ulmus minor* Mill. (2C = 4,02 pg de ADN) (Loureiro et al. 2003b).

Em oliveira (*Olea europea* ssp. *maderensis*) foram comparados vários tipos de tecido caloso (embriogénico, organogénico e não diferenciado) entre si e com folhas da árvore mãe e folhas de plântulas micropropagadas (Santos et al. 2003). Até ao momento não foram detectadas diferenças significativas entre os vários tipos de tecidos analisados. Estes resultados indicam que as metodologias de micropropagação utilizadas garantem a estabilidade genética das culturas. Foi ainda efectuada a primeira estimativa utilizando a citometria de fluxo do tamanho do genoma de oliveira (2C = 3,19 pg de ADN).

Na área da toxicologia o grupo tem incidido a sua linha de acção no âmbito da toxicidade salina e metais (e.g. Santos et al. 2001, Santos et al. 2002). Nesta linha verificou-se, p.e., que plantas de girassol (*Helianthus annuus* L.) expostas a cádmio (5, 50 e 500  $\mu$ M) evidenciaram um ligeiro decréscimo no número de núcleos presentes na fase G<sub>2</sub> do ciclo celular, corroborando outros dados morfológicos e fisiológicos obtidos. No que respeita à quantidade de ADN nuclear, as plantas expostas a cádmio apresentaram valores similares aos valores obtidos para a planta controlo sugerindo que este tipo de exposição genotóxica não afectou as características do genoma analisadas pelo citómetro de fluxo (Loureiro et al. 2003a).

Foi igualmente realizado um estudo, em cooperação com a Prof. Fernanda Leal e a Prof. Olinda Carnide do Departamento de Genética e Biotecnologia, da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, de detecção do nível de ploidia de plântulas de videira (*Vitis vinifera* L.) obtidas a partir de grãos de pólen.

Neste momento foram iniciados dois trabalhos na área da taxonomia. Um dos trabalhos será efectuada em cooperação com o Prof. Paulo Silveira do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro e consistirá na determinação do nível de ploidia de algumas espécies pertencentes ao género *Festuca* L. O outro estudo será efectuada em cooperação com o Prof. Eduardo Dias do Departamento de Ciências Agrárias da Universidade dos Açores e consistirá na determinação do conteúdo em ADN de alguns endemismos

do Arquipélago dos Açores. Pretende-se assim, aumentar o conhecimento que se tem do genoma nuclear destas espécies e ainda estabelecer relações ao nível do conteúdo em ADN nuclear entre as espécies endémicas e espécies continentais filogeneticamente próximas.

Para além dos estudos efectuados em plantas, e de forma a expandir as áreas de utilização da citometria de fluxo, foram iniciados estudos de viabilidade em leveduras (Rocha et al. 2003) e estudos de viabilidade de espermatozóides de ratinhos expostos a diferentes metais pesados (Oliveira et al. 2003), perspectivando-se a curto prazo o alargamento a ensaios no âmbito da citotoxicidade animal.

### Trabalhos futuros

Num futuro próximo, pretendemos otimizar as metodologias utilizadas para isolar e analisar núcleos de células vegetais por citometria de fluxo. Para isso pretendemos testar o efeito de vários compostos citosólicos, comuns na grande maioria das plantas lenhosas, na acessibilidade do IP ao ADN. Pretende-se também verificar de que forma é que se pode minimizar o efeito destes compostos e assim garantir estimativas mais rigorosas do tamanho do genoma nas plantas. É igualmente do nosso interesse efectuar um estudo comparativo de todos os tampões de lise desenvolvidos para isolar núcleos de células vegetais, quer em termos de eficiência de isolamento (e.g. baixos CVs, boa quantidade de eventos e baixo ruído) quer em termos de parâmetros citométricos (dispersão frontal e lateral da luz e fluorescência). Esta tentativa de standardização das metodologias utilizadas será efectuada em cooperação com o Laboratório de Citogenética Molecular e Citometria do Instituto de Botânica Experimental da República Checa.

No futuro pretendemos igualmente desenvolver novos estudos na área da taxonomia. Para tal temos já em perspectiva o esclarecimento do nível de ploidia de algumas espécies pertencentes ao género *Polygala* L.

É nosso objectivo ainda enveredar pelo campo da citómica funcional em plantas, e para o efeito pretendemos verificar a possibilidade de efectuar alguns estudos funcionais, já utilizados em células animais (e.g. viabilidade, potencial mitocondrial, potencial transmembranar, actividade das peroxidases), em células vegetais. Um dos problemas que iremos enfrentar será a presença da parede celular que interfere na entrada de algumas moléculas (e.g. marcadores fluorescentes) nas células vegetais e que são essenciais para o desenvolvimento destes estudos. Todavia a utilização de protoplastos poderá resolver este problema, apesar de subsistirem algumas dúvidas quanto ao sucesso da sua utilização.

### Considerações finais

A citometria de fluxo tornou-se uma ferramenta poderosa para o estudo de genomas vegetais e apresenta aplicações que vão desde a investigação básica até à indústria. É de

esperar que o número de aplicações práticas aumente e que a citometria de fluxo seja rotineiramente utilizada em estudos de melhoramento vegetal e taxonomia. Todavia como ferramenta analítica que é, a citometria de fluxo apresenta também algumas limitações que urge ultrapassar (Doležel 1991). As técnicas de coloração do ADN por fluorescência quantitativa que estão disponíveis para o estudo de células vegetais são basicamente aquelas que foram desenvolvidas para células animais. Todavia, os corantes actualmente disponíveis não atravessam a membrana plasmática sendo, por isso, urgente o desenvolvimento de novos corantes que permitam efectuar a coloração vital do ADN. Este avanço permitiria determinar o conteúdo em ADN em células vegetais vivas e possibilitaria a separação destas células consoante o seu conteúdo em ADN.

Apesar de hoje em dia, a maior parte dos trabalhos de estimativa do tamanho do genoma já serem realizados utilizando corantes intercalares, ainda existem alguns estudos em que se utilizam corantes específicos para determinados pares de bases. Tal como foi já referido esta metodologia introduz possíveis erros, relacionados com as diferenças na composição em bases entre o padrão e a amostra. Outra limitação que também foi abordada é o facto de não existir um consenso na comunidade científica acerca dos padrões de referência a utilizar. Por esta razão os dados obtidos em laboratórios diferentes são por vezes complicados de comparar.

A recente problemática da influência dos compostos citosólicos (e.g. compostos fenólicos, alcalóides, etc.) na acessibilidade do IP ao ADN é preocupante, uma vez que, diminui a confiança existente em algumas estimativas já publicadas mas em que não é clara uma preocupação com este aspecto.

O nosso grupo está a desenvolver um esforço enorme de forma a tentar otimizar as metodologias utilizadas na análise do conteúdo em ADN nuclear em plantas, e assim eliminar algumas das limitações que esta técnica apresenta e que estão inerentes ao facto de ter sido originalmente desenvolvida para o estudo de células sanguíneas.

### Agradecimentos

A aquisição do citómetro de fluxo foi suportada pela FCT (Projecto POCTI/AGR/C/11142/98). O João Loureiro está a ser apoiado pela bolsa FCT/SFRH/BD/9003/2002. Os autores agradecem ao Prof. Jaroslav Doležel do Laboratório de Citogenética Molecular e Citometria do Instituto de Botânica Experimental da República Checa pela sua importante assistência na citometria de fluxo. Os autores agradecem igualmente ao Prof. Filipe Sansonetty (Universidade do Minho).

### Referências

Arumuganathan, K. e Earle, E. 1991. Estimation of nuclear DNA content of plants by flow cytometry. *Plant Molecular Biology Reporter* 9 (3): 229-233.

- Bennett, M. e Leitch, I. J. 2003. Plant DNA C-values database (release 2.0, Jan. 2003) <http://www.rbgekew.org.uk/cval/homepage.html>.
- Biradar, D. P.; Bullock, D. G. e Rayburn, A. L. 1994a. Nuclear-DNA amount, growth, and yield parameters in maize. *Theoretical and Applied Genetics* 88 (5): 557-560.
- Biradar, D. P.; Pedersen, W. L. e Rayburn, A. L. 1994b. Nuclear-DNA analysis of maize seedlings treated with the triazole fungicide, Triticonazole. *Pesticide Science* 41 (4): 291-295.
- Brutovská, R.; Cellárová, E. e Doležel, J. 1998. Cytogenetic variability of in vitro regenerated *Hypericum perforatum* L. plants and their seed progenies. *Plant Science* 133: 221-229.
- Carneiro, F.; Moutinhorebeiro, M.; David, L.; Seixas, M.; Sansonetty, F.; Soares, P.; Serrano, A. e Sobrinho-Simões, M. 1992. Signet ring cell-carcinoma of the stomach - a morphometric, ultrastructural, and DNA cytometric study. *Ultrastructural Pathology* 16 (6): 603-614.
- Castro, P.; Sansonetty, F.; Soares, P.; Dias, A. e Sobrinho-Simões, M. 2001. Fetal adenomas and minimally invasive follicular carcinomas of the thyroid frequently display a triploid or near triploid DNA pattern. *Virchows Archiv* 438 (4): 336-342.
- Conde, P.; Loureiro, J. e Santos, C. 2004. Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaves of *Ulmus minor* Mill. *Plant Cell Reports* (in press).
- Côrte-Real, M.; Sansonetty, F.; Ludovico, P.; Prudêncio, C.; Rodrigues, F.; Fortuna, M.; Sousa, M.; Silva, M. e Leão, C. 2002. Contributos da citologia analítica para estudos de biologia de leveduras. *Boletim de Biotecnologia* 71: 19-33.
- Coulter (1998). Coulter EPICS-XL Flow Cytometer Documentation - Reference.
- Crissman, H. A.; Oka, M. S. e Steinkamp, J. A. 1976. Rapid staining methods for analysis of Deoxyribonucleic-acid and protein in mammalian-cells. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 24 (1): 64-71.
- Darzynkiewicz, Z. e Traganos, F. 1988. Unstainable DNA in cell-nuclei - comparison of 10 different fluorochromes. *Analytical and Quantitative Cytology and Histology* 10 (6): 462-466.
- Darzynkiewicz, Z.; Traganos, F.; Kapuscinski, J.; Staiano-Coico, L. e Melamed, M. 1984. Accessibility of DNA in situ to various fluorochromes: Relationship to chromatin changes during erythroid differentiation of Friend leukemia cells. *Cytometry* 5: 355-363.
- de Laat, A.; Göhde, W. e Vogelzang, M. 1987. Determination of ploidy of single plants and plant population by flow cytometry. *Plant Breeding* 99: 303-307.
- Doležel, J. 1991. Flow cytometric analysis of nuclear DNA content in higher plants. *Phytochemical Analysis* 2: 143-154.
- 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.
- Doležel, J.; Binarová, P. e Lucretti, S. 1989. Analysis of nuclear DNA content in plant cells by flow cytometry. *Biologia Plantarum* 31 (2): 113-120.
- Doležel, J. e Göhde, W. 1995. Sex determination in dioecious plants *Melandrium album* and *M. rubrum* using high-resolution flow cytometry. *Cytometry* 19: 103-106.
- Doležel, J.; Lucretti, S. e Schubert, I. 1994. Plant chromosome analysis and sorting by flow cytometry. *Critical Reviews in Plant Sciences* 13 (3): 275-309.
- Doležel, J.; Sgorbati, S. e Lucretti, S. 1992. Comparison of three DNA fluorochromes for flow cytometric estimation of nuclear DNA content in plants. *Physiologia Plantarum* 85: 625-631.
- Endemann, M.; Hristoforoglu, K.; Stauber, T. e Wilhelm, E. 2002. Assessment of age-related polyploidy in *Quercus robur* L. somatic embryos and regenerated plants using DNA flow cytometry. *Biologia Plantarum* 44 (3): 339-345.
- Fulwyler, M. 1979. Standards for flow cytometry. *Flow Cytometry and Sorting*, Eds. Melamed, M., Mullaney, P. e Mendelsohn, M. John Wiley and Sons Inc., New York, pp. 351-358.
- Galbraith, D.; Lambert, G.; Macas, J. e Doležel, J. 2002. Analysis of nuclear DNA content and ploidy in higher plants. *Current Protocols in cytometry*, Eds Robinson, J., Azmi, A. e Tutois, S. John Wiley & Sons, Inc., New York.
- Galbraith, D. W.; Harkins, K. R.; Maddox, J. M.; Ayres, N. M.; Sharma, D. P. e Firoozabady, E. 1983. Rapid flow cytometric analysis of the cell-cycle in intact plant-tissues. *Science* 220 (4601): 1049-1051.
- Gemes-Juhasz, A.; Balogh, P.; Ferenczy, A. e 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 Reports* 21 (2): 105-111.
- Greilhuber, J. 1998. Intraspecific variation in genome size: A critical reassessment. *Annals of Botany* 82: 27-35.
- Haag, D.; Feichter, G.; Goertler, K. e Kaufmann, M. 1987. Influence of systematic-errors on the evaluation of the S-phase portions from dna distributions of solid tumors as shown for 328 breast carcinomas. *Cytometry* 8 (4): 377-385.
- Heller, F. O. 1973. DNA-measurement of *Vicia faba* L. with pulse cytophotometry. *Berichte Der Deutschen Botanischen Gesellschaft* 86 (5-9): 437-441.
- Hirsch, A. M.; Testolin, R.; Brown, S.; Chat, J.; Fortune, F. D.; Bureau, J. M. e De Nay, D. 2001. Embryo rescue from interspecific crosses in the genus *Actinidia* (kiwifruit). *Plant Cell Reports* 20 (6): 508-516.
- Howard, A. e 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.
- Jakobsen, A. 1983. The use of trout erythrocytes and human-lymphocytes for standardization in flow-cytometry. *Cytometry* 4 (2): 161-165.
- Johnston, J.; Bennett, M.; Rayburn, A.; Galbraith, D. e Price, H. 1999. Reference standards for determination of DNA content of plant nuclei. *American Journal of Botany* 86 (5): 609-613.
- Johnston, J. S.; Jensen, A.; Czeschin, D. G. e Price, H. J. 1996. Environmentally induced nuclear 2C DNA content instability in *Helianthus annuus* (Asteraceae). *American Journal of Botany* 83 (9): 1113-1120.
- Kadota, M. e Niimi, Y. 2002. In vitro induction of tetraploid plants from a diploid Japanese pear cultivar (*Pyrus pyrifolia* N. cv. Hosui). *Plant Cell Reports* 21 (3): 282-286.
- Keller, E. R. J.; Schubert, I.; Fuchs, J. e Meister, A. 1996. 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* 92 (3-4): 417-424.
- Lage, O. M.; Sansonetty, F.; O'Connor, J. E. e Parente, A. M. 2001. Flow cytometric analysis of chronic and acute toxicity of copper (II) on the marine dinoflagellate *Amphidinium carterae*. *Cytometry* 44 (3): 226-235.
- Lepecq, J. B. e Paoletti, C. 1967. A fluorescent complex between ethidium bromide and nucleic acids - physical-chemical characterization. *Journal of Molecular Biology* 27 (1): 87-&.
- Loureiro, J.; Ferreira, R.; Costa, A. e Santos, C. 2003a. The use of flow cytometry to evaluate cell cycle and nuclear changes of plant cells exposed to heavy metals (cadmium): an easy and reliable technique for toxicological studies. 5º Congresso Ibérico e 2º Iberoamericano de Contaminação e Toxicologia Ambiental., Porto.
- Loureiro, J.; Pinto, G.; Lopes, T.; Costa, A. e Santos, C. 2003b. Assessment of genetic stability of *Ulmus minor* Mill. somatic embryo derived plants: ploidy level analysis using flow cytometry. BIOTEC' 2003, Instalações Ex-IPIMAR.
- Loureiro, J.; Pinto, G.; Lopes, T.; Costa, A. e Santos, C. 2003c. Nuclear DNA content estimation and ploidy analysis of *Quercus suber* L. somatic embryos by flow cytometry - a tool to analyse genetic stability. BIOTEC' 2003, Instalações Ex-IPIMAR.
- Ludovico, P.; Sansonetty, F. e Côrte-Real, M. 2001. Assessment of mitochondrial membrane potential in yeast cell populations by flow cytometry. *Microbiology-Sgm* 147: 3335-3343.
- Lysák, M. e Doležel, J. 1998. Estimation of nuclear DNA content in *Sesleria* (Poaceae). *Caryologia* 52 (2): 123-132.
- Lysák, M.; Doleželová, M.; Horry, J.; Swennen, R. e Doležel, J. 1999. Flow cytometric analysis of nuclear DNA content in *Musa*. *Theoretical and Applied Genetics* 98: 1344-1350.
- Marie, D. e Brown, S. 1993. A cytometric exercise in plant DNA histograms, with 2C values for 70 species. *Biology of the Cell* 78: 41-51.
- Misset, M. T. e Gourret, J. P. 1996. Flow cytometric analysis of the different ploidy levels observed in the genus *Ulex* L. Faboideae-Genisteae in Brittany (France). *Botanica Acta* 109 (1): 72-79.
- Moscone, E. A.; Baranyi, M.; Ebert, I.; Greilhuber, J.; Ehrendorfer, F. e Hunziker, A. T. 2003. Analysis of nuclear DNA content in *Capsicum* (Solanaceae) by flow cytometry and Feulgen densitometry. *Annals of Botany* 92 (1): 21-29.
- Nakamura, D.; Tiersch, T. R.; Douglass, M. e Chandler, R. W. 1990. Rapid identification of sex in birds by flow cytometry. *Cytogenetics and Cell Genetics* 53 (4): 201-205.
- Noirot, M.; Barre, P.; Louarn, J.; Duperray, C. e 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 (2): 309-316.
- Noirot, M.; Barre, P.; Louarn, J.; Duperray, C. e Hamon, S. 2002. Consequences of stoichiometric error on nuclear DNA content evaluation in *Coffea liberica* var. dewevrei using DAPI and propidium iodide. *Ann Bot* 89 (4): 385-389.
- Noirot, M.; Barre, P.; Duperray, C.; Louarn, J. e Hamon, S. 2003. Effects of caffeine and chlorogenic acid on propidium iodide accessibility to DNA: Consequences on genome size evaluation in coffee tree. *Annals of Botany* 92 (2): 259-264.
- O'Brien, I. E. W.; Smith, D. R.; Gardner, R. C. e Murray, B. G. 1996. Flow cytometric determination of genome size in *Pinus*. *Plant Science* 115 (1): 91-99.
- Oliveira, H.; Loureiro, J.; Santos, C. e Pereira, M. 2003. Flow cytometry as a tool to evaluate male fertility: an application to heavy metal toxicity. BIOTEC' 2003,

Instalações Ex-IPIMAR.

Pfossier, M. 1989. Improved method for critical comparison of cell-cycle data of asynchronously dividing and synchronized cell-cultures of *Nicotiana tabacum*. *Journal of Plant Physiology* 134 (6): 741-745.

Pfossier, M.; Amon, A.; Lelley, T. e Heberle-Bors, E. 1995. Evaluation of sensitivity of flow cytometry in detecting aneuploidy in wheat using disomic and ditelosomic wheat-rye addition lines. *Cytometry* 21: 387-393.

Pijnacker, L. P.; Ramulu, K. S.; Dijkhuis, P. e Ferwerda, M. A. 1989. Flow cytometric and karyological analysis of polysomy and polyploidization during callus formation from leaf segments of various potato genotypes. *Theoretical and Applied Genetics* 77 (1): 102-110.

Pinto, G.; Valentim, H.; Costa, A.; Castro, S. e Santos, C. 2002a. Somatic embryogenesis in leaf callus from a mature *Quercus suber* L. tree. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 38 (6): 569-572.

Pinto, G.; Santos, C.; Neves, L. e Araújo, C. 2002b. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Eucalyptus globulus* Labill. *Plant Cell Reports* 21 (3): 208-213.

Pinto, G.; Loureiro, J.; Lopes, T.; Neves, L. e Santos, C. 2003. Analysis of genetic stability of *Eucalyptus globulus* Labill. somatic embryos by flow cytometry. *Theoretical and Applied Genetics* (submitted)

Portugal, J. e Waring, M. J. 1988. Assignment of DNA-binding sites for 4',6-Diamidino-2-Phenylindole and Bisbenzimidazole (Hoechst-33258) - a Comparative footprinting study. *Biochimica Et Biophysica Acta* 949 (2): 158-168.

Price, H. e Johnston, J. 1996. Analysis of plant DNA content by Feulgen microspectrophotometry and flow cytometry. *Methods of Genome Analysis in Plants*, Eds. Jauhar, P. CRC Press, Boca Raton, New York, London, Tokyo, pp. 115-131.

Price, H. J.; Bachmann, K.; Chambers, K. L. e Riggs, J. 1980. Detection of intraspecific variation in nuclear-DNA content in *Microseris douglasii*. *Botanical Gazette* 141 (2): 195-198.

Price, H. J.; Hodnett, G. e Johnston, J. S. 2000. Sunflower (*Helianthus annuus*) leaves contain compounds that reduce nuclear propidium iodide fluorescence. *Annals of Botany* 86 (5): 929-934.

Rasch, E. 1985. DNA "standards" and the range of accurate DNA estimates by Feulgen absorption microspectrophotometry. *Advances in Microscopy*, Eds. Cowden, R. e Harrison, F. Alan R. Liss, Inc., New York, pp. 137-166.

Renno, J. F.; Schmelzer, G. H. e deJong, J. H. 1995. Variation and geographical distribution of ploidy levels in *Pennisetum section Brevivalva* (Poaceae) in Burkina Faso, Benin and southern Niger. *Plant Systematics and Evolution* 198 (1-2): 89-100.

Rocha, R.; Silva, R.; Loureiro, J.; Santos, C. e Santos, M. 2003. The effect of genetic code ambiguity on *Saccharomyces cerevisiae* resistance to heavy metals. 5º Congresso Ibérico e 2º Iberoamericano de Contaminação e Toxicologia Ambiental., Porto.

Roux, N.; Toloza, A.; Radecki, Z.; Zapata-Arias, F. e Doležel, J. 2003. Rapid detection of aneuploidy in *Musa* using flow cytometry. *Plant Cell Reports* 21: 483-490.

Sandoval, A.; Hoher, V. e Verdeil, J. L. 2003. Flow cytometric analysis of the cell cycle in different coconut palm (*Cocos nucifera* L.) tissues cultured in vitro. *Plant Cell Reports* 22 (1): 25-31.

Santos, C. e Caldeira, G. 1998. Callus formation and plant regeneration from protoplasts of sunflower calli and hypocotyls. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 67 (1): 31-36.

Santos, C.; Campos, A.; Azevedo, H. e Caldeira, G. 2001. In situ and in vitro senescence induced by KCl stress: nutritional imbalance, lipid peroxidation and antioxidant metabolism. *Journal of Experimental Botany* 52 (355): 351-360.

Santos, C.; Falcão, I. P.; Pinto, G. C.; Oliveira, H. e Loureiro, J. 2002. Nutrient responses and glutamate and proline metabolism in sunflower plants and calli under Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> stress. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science-Zeitschrift Fur Pflanzenernahrung Und Bodenkunde* 165 (3): 366-372.

Santos, C.; Brito, G.; Pinto, G. e Fonseca, H. 2003. In vitro plantlet regeneration of *Olea europaea* ssp. *maderensis*. *Scientia Horticulturae* 97 (1): 83-87.

Selvan, E. e Thomas, P. 1995. Application of flow cytometric DNA measurements in the detection of irradiated onions. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 67 (3): 293-297.

Sgorbati, S.; Levi, M.; Sparvoli, E.; Trezzi, F. e Lucchini, G. 1986. Cytometry and flow cytometry of 4',6-Diamidino-2-Phenylindole (DAPI)-stained suspensions of nuclei released from fresh and fixed tissues of plants. *Physiologia Plantarum* 68 (3): 471-476.

Suda, J.; Kyncl, T. e Freiova, R. 2003. Nuclear DNA amounts in Macaronesian angiosperms. *Annals of Botany* 92 (1): 153-164.

Svirshchevskaya, A. e Doležel, J. 2001. Karyological characterization of sugar beet gynogenetic lines cultured in vitro. *Journal of Applied Genetics* 42 (1): 21-32.

Tiersch, T. R.; Chandler, R. W.; Wachtel, S. S. e Elias, S. 1989. Reference-standards for flow-cytometry and application in comparative studies of nuclear-DNA content. *Cytometry* 10 (6): 706-710.

Torrell, M. e Valles, J. 2001. Genome size in 21 *Artemisia* L. species (Asteraceae, Anthemideae): Systematic, evolutionary, and ecological implications. *Genome* 44 (2): 231-238.

Valet, G. 2002. Predictive medicine by cytomics: potential and challenges. *Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents* 16 (2): 164-167.

van Duren, M.; Morpurgo, R.; Doležel, J. e Afza, R. 1996. Induction and verification of autotetraploids in diploid banana (*Musa acuminata*) by in vitro techniques. *Euphytica* 88 (1): 25-34.

Van Dyke, M. W. e Dervan, P. B. 1983. Chromomycin, mithramycin, and olivomycin binding-sites on heterogeneous Deoxyribonucleic-acid - footprinting with (Methidiumpropyl-Edta)Iron(II). *Biochemistry* 22 (10): 2373-2377.

Winklemann, T.; Sangwan, R. S. e Schwenkel, H. G. 1998. Flow cytometric analyses in embryogenic and non-embryogenic callus lines of *Cyclamen persicum* Mill: relation between ploidy level and competence for somatic embryogenesis. *Plant Cell Reports* 17 (5): 400-404.

Yanpaisan, W.; King, N. e Doran, P. 1999. Flow cytometry of plant cells with applications in large-scale bioprocessing. *Biotechnology Advances* 17: 3-27.

Zoldos, V.; Pape, D.; Brown, S.; Panaud, O. e Siljak-Yakovlev, S. 1998. Genome size and base composition of seven *Quercus* species: inter- and intra-population variation. *Genome* 41: 162-168.