

Uso de la citometría de flujo y agua ultrapura arium® para revelar los secretos reproductivos de las plantas

Dr. Diego H. Hojsgaard*, Instituto Albrecht-von-Haller de Ciencias Vegetales, Departamento de Botánica Sistemática, Universidad de Göttingen (Alemania).

Dr. Elmar Herbig, Sartorius AG (Göttingen; Alemania)

Introducción

En la actualidad, entender el modo en que la biodiversidad se distribuye en la naturaleza y el impacto de las actividades humanas sobre ella se ha convertido en un aspecto fundamental para la conservación de la biosfera. Para el análisis de la biodiversidad resulta esencial comprender la dinámica de la variabilidad genética y distribución geográfica de las poblaciones naturales. Las angiospermas (o plantas con flores) cuentan con diferentes modos de transmisión de los factores hereditarios o genes, y patrones de información genética entre sus individuos. Los principales mecanismos de generación y explotación de la variación genética se basan en las diversas estrategias de reproducción empleadas por las plantas, que van desde la polinización cruzada impuesta hasta la reproducción asexual por semillas (apomixis) (ej. [1]). A diferencia de las especies con reproducción sexual, las plantas apomícticas son facultativas, i.e. son capaces de producir semillas de origen sexual y asexual mediante la formación de gametófitos (o gametofitos) femeninos no reducidos [2].

Hasta hace unas décadas, el uso de técnicas prolongadas y tediosas de cortes seriados representaba el único modo de conocer con certeza dichos procesos reproductivos vegetales, y por entonces se establecieron la mayoría de los diferentes patrones de desarrollo reproductivo conocidos en la actualidad [3,4]. No obstante, en la actualidad la llegada de nuevas tecnologías nos

ha permitido elucidar con mayor sencillez y presteza los principales síndromes reproductivos de las plantas (reproducción sexual frente a asexual; véase Figura 1) a través del uso de metodologías especiales como la citometría de flujo (CF).

A pesar de que la primera patente sobre un prototipo data de 1953, el primer dispositivo de citometría de flujo basado en la fluorescencia fue desarrollado en 1968 por Wolfgang Göhde, de la Universidad de Münster (Alemania), y fue comercializado por Partec (Münster, Alemania) en 1968-69, a través de Phywe AG (Göttingen, Alemania) [5, 6].

Desarrollo de los métodos de citometría de flujo

La citometría de flujo se desarrolló inicialmente para aplicaciones médicas, pero posteriormente demostró su utilidad en diferentes campos de la biología, en aplicaciones como el conteo y la clasificación celular, la detección de biomarcadores, etc. [6]. Aunque el primer artículo científico sobre análisis de núcleos vegetales mediante citometría de flujo se publicó en 1973 [7], la irrupción de la CF en el análisis del ADN de las plantas se produjo a finales de los ochenta, periodo en el que los investigadores comenzaron a aplicar esta tecnología de manera habitual en plantas. Básicamente, los botánicos emplean la citometría de flujo para medir el contenido de ADN

*E-mail: Diego.Hojsgaard@biologie.uni-goettingen.de

en núcleos de células vegetales. Para obtener una descripción detallada de los principios y aplicaciones del análisis celular mediante citometría de flujo en plantas, consúltese la ref. [8].

La Figura 2a muestra de manera esquemática cómo el citómetro de flujo alinea las partículas coloreadas o marcadas (con tamaños que van desde los 0,2 hasta los 150 μm , [6]) a través de equipos de detección electrónica, suspendiéndolas en una corriente de fluido dirigido hidrodinámicamente. En investigación vegetal, los núcleos (es decir, las partículas) se colorean con un marcador fluorescente (como DAPI [4',6-diamino-2-fenilindol]) o yoduro de propidio). A continuación, los diferentes núcleos en suspensión se exponen a un haz de luz (normalmente láser o UV), y la dispersión generada de la luz es percibida por detectores que analizan la intensidad de la fluorescencia de cada partícula individual e informan sobre el contenido de ADN del núcleo. Datos sobre miles de núcleos intactos proporcionan información sobre el contenido de ADN de las células en los respectivos tejidos (véanse los picos en la Figura 1). Cada segundo es posible analizar de manera simultánea las características físicas o químicas de cientos de partículas, razón por la cual la calidad y la pureza de las soluciones empleadas para la preparación y el examen de las muestras resulta crucial.

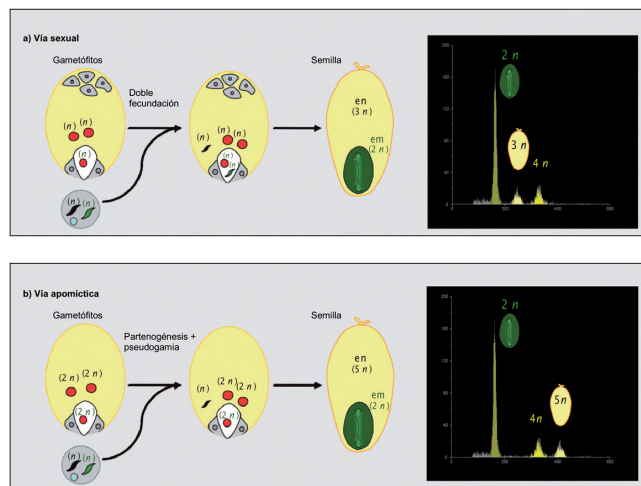


Figura 1. Representación esquemática de las vías reproductivas en especies apomíticas facultativas. La estructura del saco embrionario y la ploidía de las células determinan los índices relativos en contenido de ADN entre el embrión y el endospermo. En la vía sexual (a), la doble fecundación lleva a la formación de un embrión diploide (2C) y un endospermo triploide (3C), cuyas células se distinguen por la posición relativa de los picos en los histogramas de citometría de flujo. En la vía asexual (b), la fecundación solo se produce en la célula central del saco embrionario no reducido, formándose un endospermo pseudo-gámico pentaploide (5C), mientras el embrión diploide (2C) se forma por partenogénesis a partir de la ovocélula, dando como resultado una configuración diferente de los picos en el histograma. em: embrión; en: endospermo (esquema procedente de [9, información complementaria]).

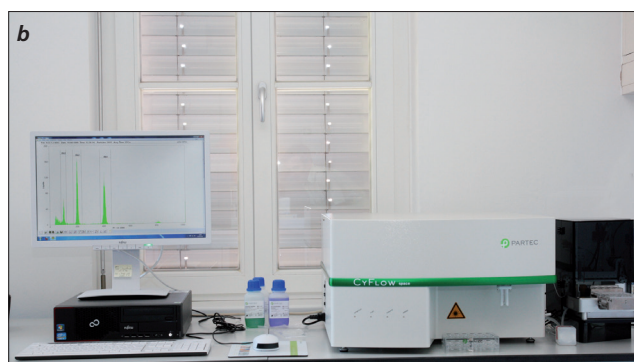
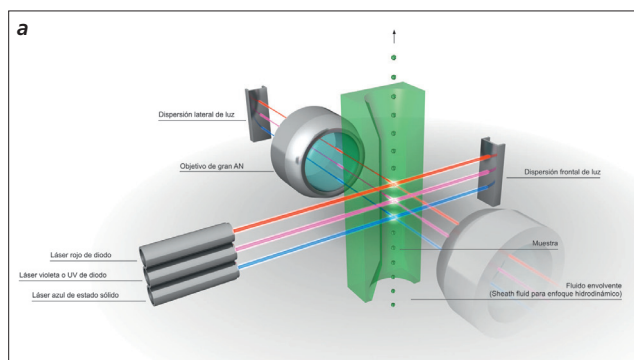


Figura 2. a) Representación esquemática de una configuración típica de la tecnología de citometría de flujo (cortesía de M. Steinberg). La información sobre los diferentes núcleos vegetales es recabada por distintos detectores: uno alineado con el haz luminoso (dispersión frontal) y varios perpendiculares a él (dispersiones laterales). b) Dispositivo CyFlow (Partec, Münster, Alemania) ubicado en el Departamento de Botánica Sistemática del Instituto Albrecht-von-Haller de Ciencias Vegetales, Universidad Georg-August de Göttingen.

Cuando se usa un sistema de suministro de agua de baja calidad o inadecuada, la presencia de partículas contaminantes externas a la muestra puede presentar también fluorescencia y crear «ruido», interfiriendo en los resultados y provocando imprecisiones en la evaluación. El uso de agua ultrapura de gran calidad resulta, por tanto, obligatorio.

Sistemas de agua para la producción de agua ultrapura de calidad ASTM clase I

Sartorius (Göttingen, Alemania) ofrece una serie de sistemas que producen agua ultrapura de calidad ASTM tipo 1. En el presente estudio, y con el fin de evaluar los efectos del uso de agua ultrapura ($\text{ArUP}_{\text{H}_2\text{O}}$) producida por el sistema arium® pro VF sobre la calidad de los resultados obtenidos en los análisis de citometría de flujo, examinamos las vías reproductivas empleadas por una angiosperma apomítica facultativa para producir semillas. Lo hacemos utilizando $\text{ArUP}_{\text{H}_2\text{O}}$ para examinar las muestras y comparar los resultados con los obtenidos mediante el uso de la solución estándar de

fluido envolvente (0,04% de azida sódica, 0,01% de detergente).

Descripción del sistema de agua ultrapura arium® pro VF



Figura 3. Sistema de agua ultrapura arium® pro VF (fotografía cortesía de Sartorius).

El sistema arium® pro VF (Figura 3) ha sido diseñado para producir agua ultrapura a partir de agua potable pretratada, y elimina cualquier contaminante presente aún en ella. La producción de agua ultrapura requiere una recirculación continua y un caudal de agua constante, que se consiguen a través de un sistema de bombeo con presión controlada. La conductividad del agua se mide en el punto de entrada de la fuente de alimentación y en el puerto situado en el punto de salida del agua producida.

El sistema arium® pro VF usado en las pruebas descritas en este artículo (modelo precedente y con el mismo diseño técnico que el actual sistema arium® pro VF, mostrado en la Figura 3) utiliza dos cartuchos distintos. Estos están rellenos de un adsorbente especial de carbón activo y resinas de intercambio iónico en soporte mixto, proporcionando agua ultrapura con un bajo contenido en carbón orgánico total (COT). Por otra parte, la unidad dispone de una lámpara UV integrada con efectos oxidantes y bactericidas a longitudes de onda de 185 nm y 254 nm, respectivamente.

Además, el sistema de agua ultrapura arium® cuenta con un módulo ultrafiltrante integrado que se usa como filtro de flujo cruzado. La membrana ultrafiltrante que utiliza retiene los coloides, los microorganismos, las endotoxinas, el ARN y el ADN. Un filtro final de 0,2 µm instalado en la salida del agua elimina las partículas y las bacterias durante la dispensación del agua ultrapura producida. El proceso empleado por la unidad para producir agua ultrapura aparece en la Figura 4 (diagrama de flujo del arium® pro VF).

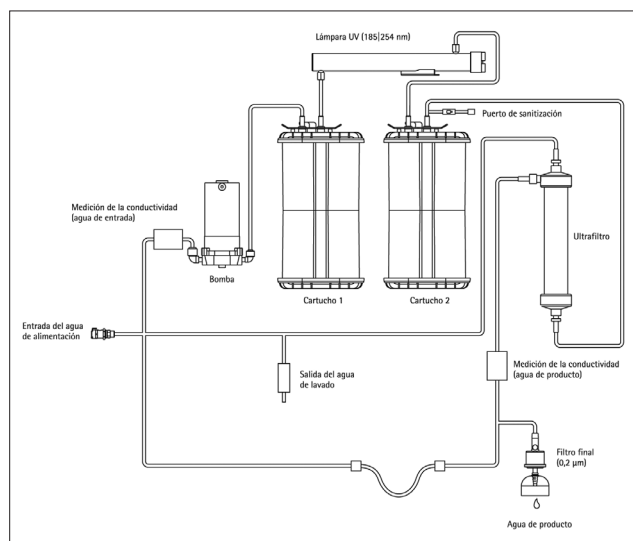


Figura 4. Diagrama de flujo esquemático del sistema de agua ultrapura arium® pro VF (para una mayor claridad, se han omitido las válvulas y sus controladores).

Material y métodos

Se recogieron muestras de semillas procedentes de plantas hexaploides de *Ranunculus carpaticola* en condiciones de polinización abierta. Las semillas individuales se seccionaron en una placa de Petri con 300 µl de buffer de extracción (CyStain UV Precise P, Partec GmbH) e incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente, tras lo cual se procedió a la filtración de los núcleos (filtros de 30 µm, CellTric®, Partec GmbH) en un tubo plástico de 5 ml. A continuación, se añadieron 1,2 ml de buffer de tinción (CyStain UV Precise P, Partec GmbH) y, tras 60 s, las muestras se analizaron en un citómetro de flujo (CyFlow Space, Partec GmbH, Münster, Alemania; véase Figura 2b), utilizando el canal de fluorescencia azul. Los parámetros de ajuste se adecuaron empleando genotipos diploides (2x) o tetraploides (4x) conocidos de *Ranunculus* sp. Se cuantificó la fluorescencia relativa de al menos 2.000 núcleos individuales por muestra y se representó en un histograma. Las posiciones relativas de los picos se usaron para determinar los niveles de ploidía de los tejidos embrionarios y endospermáticos. Las vías reproductivas seguidas durante la formación de cada una de las semillas se reconstruyeron según [10].

Para el flujo de las muestras se emplearon dos fluidos distintos: A) fluido envolvente para sistemas de flujo (Partec GmbH), y B) agua ultrapura del sistema arium® pro VF. Se realizaron análisis estadísticos para comparar las pruebas mediante una hoja de cálculo Excel (Microsoft Corp., Redmond, WA, USA).

Resultados

Se reconstruyó la vía reproductiva de un total de 61 semillas individuales. Treinta de ellas se analizaron usando fluido en-

volvente, y en 31 se utilizó ArUP_{H2O} (conductividad: 0,055 µS/cm o 18,2 MΩ x cm de resistividad compensada a 25 °C), siguiendo el procedimiento estándar recomendado. Se analizaron en promedio 2.329 núcleos por muestra, lo cual representa el 73% del total de partículas contadas por muestra; el 27% restante estaba formado tanto por núcleos en fase G₂ del ciclo celular como por señales espurias. Las posiciones medias del pico del embrión y el endospermo en cada una de las semillas analizadas se calcularon basándose en el número medio de núcleos reunidos en cada pico. Las posiciones relativas de los núcleos en el eje x del histograma se basan en su ploidía relativa según el tejido de origen (véase Figura 1). Así, un núcleo tetraploide (4n) tendrá aproximadamente el doble de ADN que uno diploide (2n), emitiendo una señal fluorescente dos veces más intensa y situándose, por tanto, al doble de distancia relativa en el eje x (Figura 5). Tras determinar el índice entre picos (Tabla 1), se estableció el origen reproductivo de cada semilla y la proporción de sexualidad y apomixis. Se emplearon distintos parámetros estadísticos para comparar los tratamientos en cada prueba y vía reproductiva (Tabla 2). Se obtuvieron los valores absolutos del coeficiente de variación (CV%) para cada muestra individual, los rangos por prueba y vía reproductiva, además de los valores de asimetría para cada pico (tanto del tejido embrionario como endospermático) en todas las muestras apomícticas y sexuales (Tabla 2). Se calculó el coeficiente de correlación de Pearson para los valores medios de los picos de embriones y endospermos por muestra y tratamiento (Tabla 2).

Tabla 1. Clasificación reproductiva de las semillas de R. carpaticola según la relación entre los picos del embrión y del endospermo.

Tratamiento	Índice entre picos (rango)	Tipo de semilla	Porcentaje
A	2.67-3.67	Apo	63,3
	1.44-1.96	Sex	36,7
B	2.47-3.85	Apo	71
	1.42-2.06	Sex	29

Apo: semillas de origen apomíctico; Sex: semillas de origen sexual.

Tabla 2. Análisis estadístico de los histogramas de citometría de flujo en 61 semillas de R. carpaticola.

Tipo de semilla	Tratamiento	Tejido	Media	DE	Asimetría	Rango CV%	r (p<0,05)
Apo	A	Em	112.75	24.00	2.07	3,74-8,13	0,82
		En	339.16	46.08	0.77	2,8-10,02	
	B	Em	110.00	18.78	1.58	3,74-10,34	0,76
		En	345.78	58.93	-0.07	3,32-11,92	
Sex	A	Em	190.04	43.00	-0.61	4,04-7,48	0,85
		En	297.64	69.07	0.72	3,93-8,22	
	B	Em	170.78	46.97	0.07	3,91-9,69	0,86
		En	299.46	86.94	0.41	4,13-9,23	

Apo: semillas de origen apomíctico; Sex: semillas de origen sexual; Em: embrión; En: endospermo; Media: valor medio del pico; DE: desviación estándar; r: coeficiente de correlación de Pearson.

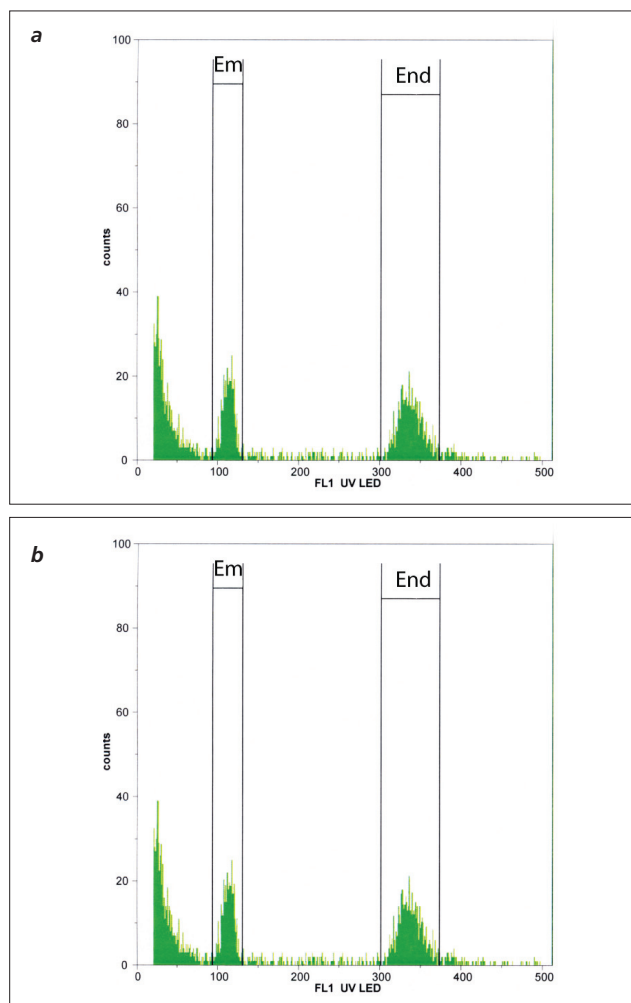


Figura 5. Histogramas de flujo de semillas hexaploides de R. carpaticola. El eje x representa la fluorescencia relativa de cada partícula medida; el eje y, por su parte, representa el número de partículas analizadas. a) Histograma de una semilla de origen apomíctico con una tasa de picos Em:En de 3,15. b) Histograma de una semilla de origen sexual con un índice entre picos Em:En de 1,48.

Discusión

Los citotipos hexaploides de *Ranunculus carpaticola* son plantas apomíticas facultativas que utilizan diversas estrategias reproductivas para generar nuevos individuos en poblaciones naturales [11]. La clasificación de semillas mediante citometría de flujo es una técnica útil, de fácil aplicación y rápida para la evaluación de estrategias reproductivas en espermatófitos. Los dos tratamientos independientes empleados en este estudio (fluido envolvente frente a ArUP_{H₂O}) no muestran diferencias significativas en la calidad del pico, su posición ni en los rangos para los índices entre picos.

El coeficiente de variación es una medición normalizada que se utiliza para cuantificar el grado de dispersión o agrupación de un conjunto de eventos observados en comparación con una distribución de probabilidad o de frecuencia estándar (un modelo estadístico asumido). Los valores absolutos del CV o desviación estándar relativa (DER o %DER) se corresponden con la expresión porcentual de los valores de CV. En este caso, aunque los valores de CV% fueron ligeramente superiores cuando se utilizó ArUP_{H₂O}, la diferencia con el tratamiento con fluido envolvente se mostró siempre inferior a los valores mínimos de CV%, lo que apunta a un nivel similar de dispersión en los conteos entre tratamientos. Además, a pesar de que los picos campaniformes tienden a tener colas más largas en el lado derecho (asimetría positiva), los valores están próximos a cero, lo cual indica que los picos tienen una forma aproximadamente simétrica alrededor de la media. Por otra parte, la elevada correlación observada entre los valores de los picos de embriones y endospermos indica que el uso de ArUP_{H₂O} no afecta la intensidad relativa media de la fluorescencia medida en la evaluación de las poblaciones de núcleos, evitando así correlaciones distorsionadas y manteniendo la dispersión de los valores dentro de los índices esperados entre los picos de los embriones y endospermos.

Las proporciones entre semillas sexuales y asexuales fueron, sin embargo, similares en ambos tratamientos, tal y como se espera cuando se utilizan muestras seleccionadas aleatoriamente. Estos resultados indican que la determinación de los orígenes reproductivos no está sesgada por un cambio no proporcional de las posiciones de los picos entre los tratamientos.

En general, las pocas diferencias aparecidas en los resultados obtenidos prueban que el sistema arium® constituye una alternativa que permite el ahorro de tiempo y dinero en el análisis de ploidías relativas en material vegetal. La elevada calidad del agua arium® libre de partículas demostró ser efectiva, proporcionando resultados reproducibles en la clasificación reproductiva de semillas mediante citometría de flujo. Sin embargo, aditivos como antibióticos y detergentes tienen efectos positivos a corto y largo plazo sobre la fiabilidad del funcionamiento del sistema de citometría de flujo, ya que evitan la formación de biopelículas y mejoran la humectación de las superficies internas de contenedores, tubos, válvulas y celdas de flujo; por

ello, el proveedor recomienda su adición a los fluidos envolventes de elaboración propia (M. Steinberg, com. pers.; Partec).

En resumen, el ArUP_{H₂O} puede utilizarse satisfactoriamente en citometría de flujo de células vegetales. A medida que la tecnología de citometría de flujo adquiere importancia en otras aplicaciones, como la detección de tumores celulares, la estimación cuantitativa y diferenciación morfológica de células, el análisis del ciclo celular, las estimaciones del contenido en ADN o ARN, las mediciones de apoptosis, etc., la idoneidad del ArUP_{H₂O} está abriendo nuevas puertas al agua ultrapura arium® en un gran número de aplicaciones que utilizan la emergente tecnología de la citometría de flujo.

Referencias

1. Johri BM. 1984. *Embryology of angiosperms*. Berlín, G: Springer-Verlag.
2. Nogler GA. 1984. Gametophytic apomixis. En: Johri BM ed. *Embryology of angiosperms*. Berlín, G: Springer-Verlag, pp.: 475-518.
3. Battaglia E. 1951. The male and female gametophytes of angiosperms - an interpretation. *Phytomorphology* 1: 87-116.
4. Asker SE, Jerling L. 1992. *Apomixis in plants*. Boca Raton, Estados Unidos: CRC Press.
5. Dittrich W, Göhde W. 1968. Patente DE 1815352, Automatisches Meß- und Zählgerät für die Teilchen einer Dispersion.
6. http://es.wikipedia.org/wiki/Citometría_de_flujo
7. Heller FO. 1973. *DNS-Bestimmung an Keimwurzeln von Vicia faba L. mit Hilfe der Impulscytophotometrie*. *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft* 86: 437-441.
8. Dole J. 1991. Flow cytometric analysis of nuclear DNA content in higher plants. *Phytochemical analysis* 2: 143-154.
9. Hojsgaard DH, Martínez EJ, Quarin CL. 2013. Competition between meiotic and apomictic pathways during ovule and seed development results in clonality. *New Phytologist* 197: 336-347.10. Matzk F, Meister A, Schubert I. 2000. An efficient screen for the reproductive pathways using mature seeds of monocots and dicots. *Plant Journal* 21: 97-108.
11. Paun O., Hörandl E. 2006. Evolution of Hypervariable Microsatellites in Apomictic Polyploid Lineages of *Ranunculus carpaticola*: Directional Bias at Dinucleotide Loci. *Genetics* 174: 387-398.

Agradecimientos

Nos gustaría dar las gracias a Matthias Steinberg (Partec GmbH [Münster, Alemania]), por sus útiles discusiones y sugerencias y por proporcionarnos la imagen de la configuración del citómetro de flujo. Agradecemos también a la Prof. Elvira Hörandl y a la Dra. Simone Klatt, del Departamento de Botánica Sistemática de la Universidad Georg-August de Göttingen, su lectura crítica del manuscrito.

www.sartorius.com