

S. SGORBATI (*)

LA CITOMETRIA IN BIOSISTEMATICA

Riassunto — L'analisi d'immagine e la citometria sia statica che di flusso, grazie anche alla disponibilità di fluorocromi che si legano a diversi componenti cellulari, hanno recentemente portato un notevole contributo allo sviluppo dell'indagine citologica in campo biomedico. Si auspica che tali tipi d'indagine, da pochi anni utilizzati anche in campo vegetale per determinare in modo rapido e preciso contenuto di DNA, composizione in basi, analisi del cariotipo, morfologia e fisiologia cellulare etc., possano portare un valido contributo alla soluzione di problemi tassonomici e filogenetici.

Abstract — *Cytometry in biosystematics.* The availability of numerous fluorochromes which bound to different cellular components has contributed to the development of image analysis, static and flow cytometry, especially in biomedical science. We believe that the possibility to determine, with accuracy and rapidity, DNA content, base composition, flow caryotype, cellular morphology and physiology etc. could add a significant insight to the solution of many problems in taxonomy and phylogenesis studies.

Key words — Base composition / biosystematics / cytometry / DNA content / flow caryotype / fluorochromes.

Da molti anni ormai l'indagine biochimica e biomolecolare, sia sotto forma di analisi del DNA, degli enzimi o di alcune proteine di riserva (nei vegetali), costituisce un valido strumento in campo biosistemático per la risoluzione di numerosi problemi tassonomici e filogenetici.

Gli aspetti operativi di tali tipi di indagine, così come la cautela necessaria all'interpretazione dei dati raccolti, sono stati ampiamente illustrati nel corso dei vari interventi che hanno caratterizzato il simposio.

La presente relazione ha lo scopo di sottolineare come il notevole sviluppo avvenuto in anni recenti delle tecniche di citologia quan-

(*) Dipartimento di Biologia, sez. Botanica Generale, Università di Milano.

titativa (citometria), sia sotto forma di analisi d'immagine che di microfluorimetria statica e di flusso, potrebbe fornire un valido contributo alla risoluzione dei problemi di cui si occupa la biosistemica.

Parallelamente alla costruzione di strumentazioni d'analisi sempre più sofisticate, lo sviluppo della citochimica, avvenuto prevalentemente in ambiente biomedico, ha messo a disposizione del ricercatore un numero crescente di sostanze, spesso fluorescenti, in grado di legarsi più o meno specificamente ai diversi componenti cellulari.

A differenza dell'analisi biochimica però, quella citometrica permette di ottenere dati segregati, cioè cellula per cellula, di uno o più parametri cellulari; questi possono essere di tipo morfologico o citologico (strutturali), fisiologico (funzionali), direttamente misurabili (intrinseci) oppure resi misurabili grazie all'uso di sonde fluorescenti in grado di legarsi alle diverse categorie di molecole presenti nella cellula (estrinseci).

L'analisi automatica (citometria di flusso) permette inoltre di effettuare in pochi minuti un'analisi multiparametrica (fino a tre-quattro parametri) su un grandissimo campione (decine di migliaia di cellule); questo tipo di analisi richiede però che il materiale sia sotto forma di sospensione monodispersa. La fig. 1 illustra sinteticamente i principali parametri che possono essere misurati con la citometria di flusso; molti di questi possono pure essere rilevati con la microfluorimetria convenzionale (statica), anche se ovviamente su campioni molto più limitati.

In questa sede verranno riportati alcuni esempi (o possibilità) di impiego delle tecniche citometriche in campo biosistemico vegetale, sottolineando in modo particolare le grandi potenzialità della citometria di flusso anche in questo settore di ricerca.

CONTENUTO DI DNA NELLE PIANTE

Lo studio delle variazioni del contenuto di DNA nelle piante conserva una notevole importanza negli studi citotassonomici ed evolutivisti (OHRI e KHOSHOO, 1986).

La determinazione della quantità di DNA espressa come valore «c» per un certo livello di ploidia (SWIFT, 1950) può essere in certi casi un parametro fondamentale per individuare popolazioni di piante che presentano diversi livelli di ploidia con scarsa differenziazione morfologica. La citometria di flusso permette in questo caso un'ana-

FIG. 1 - Parametri cellulari misurabili mediante citometria di flusso.

Parametri strutturali	Parametri funzionali
	<i>Intrinseci</i>
Dimensioni cellulari	stato redox
Forma della cellula	
Granularità citoplasmatica	
Contenuto di pigmenti	
	<i>Estrinseci</i>
Contenuto di DNA	Integrità di membrana
Rapporto in basi del DNA	Permeabilità di membrana
Struttura della cromatina	Fluidità e microviscosità di membrana
Contenuto di RNA	Potenziali di membrana
Proteine totali	Attività enzimatiche
Proteine basiche	Recettori di superficie ed intracellulari
Carboidrati di membrana	Endocitosi
	Sintesi di DNA
	Calcio legato e libero
	pH Intracellulare

lisi molto rapida del contenuto di DNA dei nuclei estratti dalle foglie o da altri organi vegetali di varietà colturali o popolazioni naturali (GALBRAITH et al., 1983; SGORBATI et al., 1986; DE LAAT et al., 1987) (Fig. 2). Il fatto di poter utilizzare le foglie, cioè organi facilmente accessibili durante il periodo vegetativo ed in cui le cellule sono per lo più arrestate in G1 (con quantità 2c di DNA), consente di confrontare i valori del contenuto di DNA ottenuti da più individui (al limite da uno solo) appartenenti a numerose popolazioni (con la citometria di flusso si possono analizzare molte decine di campioni al giorno). Mediante l'impiego di un opportuno standard mescolato al campione, è possibile trasformare facilmente le unità relative di fluorescenza in valori assoluti di DNA (per es. picogrammi). Misure così rapide e precise di determinazione dei livelli di ploidia potrebbero essere di grande vantaggio per studiare l'origine e la distribuzione di certi gruppi di piante (KEELER et al., 1986; SGORBATI et al., 1989).

CONTENUTO DI BASI

Alcuni fluorocromi che si legano specificamente al DNA (DAPI,

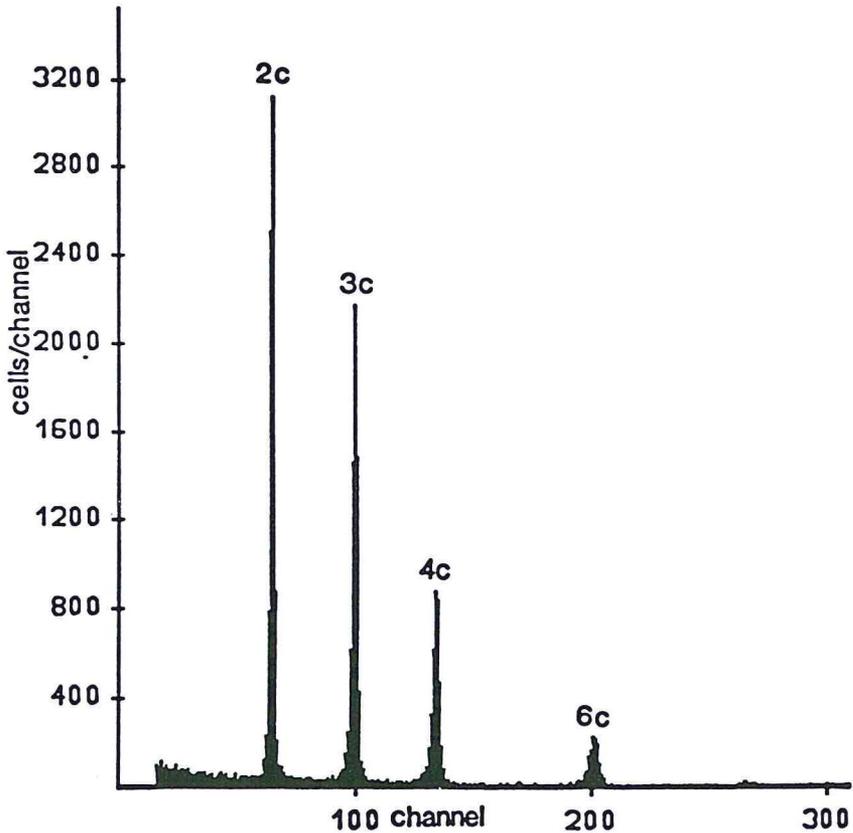


Fig. 2 - Istogrammi di flusso del DNA di nuclei estratti da una miscela di foglie di pianticelle di barbabietola da zucchero diploidi e triploidi. In ascissa sono riportate le unità relative di fluorescenza del DNA colorato con DAPI; in ordinata la frequenza delle cellule (in questo caso nuclei) per ciascun canale di fluorescenza. Sono riportati i valori «c» per ciascuna popolazione di nuclei (riportato da Ref. 5).

Hoechst, mitramicina e cromomicina, quinacrina etc.) possono fluorescere con diversa intensità a seconda che siano legati nel DNA alle coppie di basi A-T o C-G; le molecole della sostanza fluorogena saranno quindi più concentrate nelle regioni più ricche della coppia di basi verso la quale il fluorocromo mostra maggior affinità; ovvero la resa quantica della fluorescenza sarà maggiore a seconda della coppia cui il fluorocromo è legato (LATT, 1979; LIN et al., 1977). Determinazioni del contenuto di basi in nuclei in toto, in porzioni eu ed eterocromatiche di nuclei interfascici oppure in cromosomi metafascici di diverse piante sono state effettuate da alcuni Autori (LEEMAN e RUSH, 1982; 1983). Anche in questo caso la citometria di flus-

so, effettuata su nuclei o cromosomi estratti in sospensione, potrebbe affiancare o sostituire vantaggiosamente l'analisi biochimica, soprattutto quando si abbia a che fare con piccole quantità del materiale vegetale di partenza (anche poche decine di mg sono sufficienti).

BANDEGGIO CROMOSOMICO

La prima applicazione pratica di una colorazione differenziale dei cromosomi è stata sviluppata da Caspersson negli anni '60 (CASPERSSON et al., 1968). Il bandeggio con i fluorocromi DAPI e cromomicina è stato successivamente applicato ai cromosomi umani (SCHWEIZER, 1981) ed in alcuni casi a quelli di piante (LEEMAN e RUSH, 1983).

L'attuale disponibilità di strumenti analizzatori di immagine, applicati a microscopi di alta risoluzione, come il microscopio confocale a laser, consentirebbe di investigare con grande dettaglio il cariotipo vegetale, così come si è fatto per quello umano.

CARIOTIPO DI FLUSSO

L'estrazione in sospensione e l'analisi di flusso dei cromosomi metafasici è stata sinora effettuata solo per alcune piante (*Haplopappus gracilis* $2n = 4$ (DE LAAT e BLAAS, 1984) e *Petunia hybrida* $2n = 12$ (CONIA et al., 1987), ma ha aperto la strada all'analisi, anche in campo vegetale, del cariotipo di flusso mediante colorazione singola o doppia dei cromosomi (GRAY e LANGLOIS, 1986).

Il «cariogramma di flusso» permette di analizzare le caratteristiche cromosomiche in grandissimi campioni, per la classificazione delle specie, la rilevazione di cariotipi aberranti, la presenza di extracromosomi o per l'utilizzazione di sonde fluorescenti di DNA per l'ibridazione «in situ» dei singoli cromosomi separati mediante «sorting».

ANALISI DI ORGANULI CELLULARI

Recentemente è stato possibile riconoscere mediante citometria di flusso un certo numero di subpopolazioni di cloroplasti di talune specie vegetali, distinguibili mediante i segnali di «light scattering»

(dimensioni) e fluorescenza della clorofilla (ASHCROFT et al., 1986). Si può ipotizzare che per certi gruppi di vegetali questo tipo di analisi possa fornire utili indicazioni, almeno per le categorie di basso livello gerarchico.

CONCLUSIONI

Le applicazioni delle moderne tecniche di analisi citometrica a problemi di biosistemica sono state finora piuttosto scarse e limitate per lo più alla determinazione dei livelli di ploidia posseduti da alcune varietà colturali o popolazioni naturali. È però prevedibile in futuro una maggior diffusione delle tecniche di analisi automatica anche nella biosistemica delle piante, come sta già avvenendo in altri settori della biologia vegetale, tenendo conto delle grandi potenzialità dell'analisi citometrica in continuo aumento grazie al rapido progresso strumentale.

BIBLIOGRAFIA

- ASHCROFT R.G., PRESTON C., CLELAND R.E., CRITCHLEY C. (1986) - Flow cytometry of isolated chloroplasts and thylakoids. *Photobiochem. Photobiophys.*, **13**: 1-14.
- CASPERSSON T., FARBER S., FOLEY G.E., KUDYNOWSKI J., MODEST E.J., SIMONSSON E., WAGH U., ZECH L. (1968) - Chemical differentiation along metaphase chromosomes. *Exp. Cell Res.*, **49**: 219-222.
- CONIA J., BERGOUNIOUX C., PERENNES C., MULLER P., BROWN S., GADAL P. (1987) - Flow cytometric analysis and sorting of plant chromosomes from *Petunia hybrida* protoplasts. *Cytometry*, **8**: 500-508.
- DE LAAT A.M.M., BLAAS J. (1984) - Flow-cytometric characterization and sorting of plant chromosomes. *Theor. Appl. Genet.*, **67**: 463-467.
- DE LAAT A.M.M., GOHDE W., VOGELZANG M.J.D.C. (1987) - Determination of ploidy of single plants and plant populations by flow cytometry. *Plant Breeding*, **99**: 303-307.
- GALBRAITH D.W., HARKINS K.R., MADDOX J.M., AYRES N.M., SHARMA D.P., FIROOZABADY E. (1983) - Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissues. *Science*, **220**: 1049-1051.
- GRAY J.W., LANGLOIS R.G. (1986) - Chromosome classification and purification using flow cytometry and sorting. *Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem.*, **15**: 195-235.
- KEELER K.H., KWANKIN B., BARNES P.W., GALBRAITH D.W. (1986) - Detection of polyploid polymorphism in big bluestem (*Andropogon gerardii*). *Am. J. Bot.*, **73**: 686.
- LATT S.A. (1979) - Fluorescent probes of DNA microstructure and synthesis. In: *Flow Cytometry and Sorting*, M.R. Melamed, P.F. Mullaney, M.L. Mendelsohn eds., Wiley, New York, 263-284.

- LEEMAN U., RUSH F. (1982) - Cytofluorometric determination of DNA base content in plant nuclei and chromosomes by the fluorochromes DAPI and chromomycin A3. *Exp. Cell Res.*, **140**: 275-282.
- LEEMAN U., RUSH F. (1983) - Cytofluorometric DNA base determination for the investigation of heterochromatin and heterochromatin amplification. *Exp. Cell Res.*, **147**: 419-429.
- LIN M.S., COMINGS D.E., ALFI O.S. (1977) - Optical studies of the interaction of 4',6-diamidino-2-phenylindole with DNA and metaphase chromosomes. *Chromosoma*, **60**: 15-25.
- OHRI D., KHOSHOO T.N. (1986) - Plant DNA: contents and systematics. In: DNA Systematics, S.K. Dutta ed., CRC Press Florida, Vol. 2, Plants, 1-19.
- SCHWEIZER D. (1981) - Counterstain-enhanced chromosome banding. *Human Genetics*, **57**: 1-14.
- SGORBATI S., LEVI M., SPARVOLI E., TREZZI F., 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. *Physiol. Plant*, **68**: 471-476.
- SGORBATI S., MASCI S.M., SOLER V., MARCHI P. (1989) - Rapid cytofluorimetric determination of leaf nuclear DNA content in the polyploid series of *Ranunculus* (agg. *auricomus*) *marsicus* Guss. & Ten. (*Ranunculaceae*). Plant Systematics and Evolution (in stampa).
- SWIFT H. (1950) - The constancy of desoxyribose nucleic acid in plant nuclei. *Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A.*, **36**: 643-654.

(ms. pres. il 29 settembre 1989; ult. bozze il 15 dicembre 1989)

