

УДК 576.08:58.087

Содержание ядерной ДНК в некоторых сортах растений, используемых в качестве внешних стандартов в проточной цитометрии

Nuclear DNA content in some plant kinds used as an external standard in flow cytometry

М.В. Скапцов, С.В. Смирнов, М.Г. Куцев

M.V. Skaptsov, S.V. Smirnov, M.G. Kutsev

Южно-Сибирский ботанический сад, Алтайский государственный университет, пр-т Ленина, 61, Барнаул, 656049, Россия. E-mail: mr.skaptsov@mail.ru, serg_sm_@mail.ru, m_kucev@mail.ru

South-Siberian Botanical Garden, Altai State University, Lenina str., 61, Barnaul, 656049, Russia

Ключевые слова: проточная цитометрия, внешний стандарт, боковое рассеивание, содержание ДНК, размер генома.

Key words: flow cytometry, external standard, side scatter, DNA content, genome size.

Аннотация. Целью исследований стало определение содержания ДНК и размера генома некоторых сортов культурных растений для использования их в последующем в качестве внешнего стандарта в проточной цитометрии растений. Основной задачей являлся поиск широко распространенных сортов культурных растений, позволяющих исследовать большинство растительных объектов с содержанием ДНК в диапазоне от 0,1 до 60 пг. Кроме того, в работе были проанализированы и сопоставлены данные из международных баз данных с фактическим содержанием ДНК отечественных сортов растений. Также приведены рекомендации для оптимизации методики проведения эксперимента и интерпретации данных. В результате работы установлено несколько сортов растений, наиболее удобных для использования в качестве внешнего стандарта. Сорта родов *Lepidium*, *Sinapis*, *Petroselinum*, *Pisum*, *Lathyrus* и *Vicia* отличаются высокими показателями изоляции ядер, большим количеством изолированных ядер, а также низким количеством разрушенных ядер, а соответственно, низким уровнем фоновой флюоресценции, что немаловажно для проведения эксперимента.

Summary. The aim of research was to determine DNA content and genome size of certain plant varieties for subsequent use as an external standard in flow cytometry of plants. The main challenge is to find widespread

kinds of cultivated plants, allowing exploring most of the plant objects with DNA content in the range from 0.1 to 60 pg. Furthermore, the data from international databases were analyzed and compared with the actual DNA content of the home (Russian) kinds of plants. Recommendations for the optimization of the experimental methods and data interpretation in flow cytometry are also provided. Several plant kinds are recognized as most suitable for the use as an external standard. Kinds of *Lepidium*, *Sinapis*, *Petroselinum*, *Pisum*, *Lathyrus*, and *Vicia* reveal good parameters of nuclei isolation, high amount of isolated nuclei, low amount of destroyed nuclei, and thus low background fluorescence, which is important for the experiment.

В современной ботанике проточная цитометрия растений значительно упрощает карิโอ-, цито-, эмбриологические исследования. Возможность выявления полиплоидии, гибридизации и, конечно же, размера генома делает ее перспективным инструментом исследования растительных организмов. Более того, в систематике растений и популяционных исследованиях размер генома растений стал такой же важной характеристикой, как морфологические, анатомические признаки или хромосомные составы. Мало что в настоящее время известно об

изменении размера генома в таксономических единицах под действием эволюционных сил. Данный процесс является одним из основных факторов в осуществлении макроэволюционных изменений, например, в происхождении голосеменных и цветковых растений (Jiao et al., 2011). На микроэволюционном уровне играют важную роль полиплоидия, аллополиплоидия и апомиксис. Данные явления сложно диагностируемы классическими методами, но легко доступны для метода проточной цитометрии растений. Детекция изменений размера генома одних и тех же или близких видов растений, произрастающих на разных территориях, позволяет судить о ходе эволюционных процессов, их типе, или прогнозировать последующие шаги эволюции (Salameh, 2014). Вместе с исследованием кариотипа или просто хромосомного числа можно выявлять сложные гибридогенные процессы с одновременным присутствием алло- и полиплоидии (Wolf et al., 2014). Особенно подобные исследования важны для групп растений, характеризующихся широкой вариабельностью хромосомного состава и способов опыления. Возможность выявления при помощи проточной цитометрии таких процессов, как редукция гамет, зиготические и партеногенетические пути развития зародыша, псевдогамия и независимое развитие эндосперма, выявление спорофитных и гаметофитных мутантов растений, факультативного или облигатного апомиксиса, позволяет решать фундаментальные проблемы эволюции растений как на уровне класса, так и на уровне вида (Matzk et al., 2000).

Использование в качестве внешних стандартов при цитометрии сортов культурный растений связано с относительной однородностью генома, возможностью круглогодичного выращивания из семян. Кроме того, при поддержке должной чистоты сорта практически исключены изменения генома, связанные с гибридогенными процессами, которые в природе встречаются значительно чаще.

Выбор размера генома стандарта является важным моментом в исследованиях. Желательно, чтобы размер генома стандарта не превышал и не был меньше размера генома исследуемого образца более чем в 2–3 раза. Особенно это важно для 256-канальных приборов с целью улучшения качества детекции без изменения порога детектируемого сигнала.

Сорта растений, используемые зарубежными учеными, являются в значительной степени ау-

тентичными и редко встречаются в свободном доступе в России. Как показывают исследования, сорта растений, выведенные селекционерами разных стран, несмотря на общее видовое происхождение, могут значительно отличаться друг от друга (Sammour, 2007). Данное явление связано с большой работой в области селекции, прошедшей в XX веке во всем мире. В связи с этим необходимо составление списка перспективных сортов растений, выведенных отечественными селекционерами для использования в качестве внешних стандартов.

Материалы и методы

Для исследования использовали виды и сорта растений с предполагаемым содержанием ДНК в диапазонах 1–2 пг, 2–5 пг, 5–10 пг, 10–20 пг и 20–30 пг (табл. 1). При выборе учитывали такие важные характеристики для стандарта, как высокая скорость роста, продуктивность биомассы, достаточное количество выделяемых ядер, а также распространенность сорта. Определяемый размер генома сверяли с данными электронной базы размеров генома растений Королевского ботанического сада Кью (Bennett, Leitch, 2012). Содержание ДНК исследуемых растений определяли с использованием метода проточной цитометрии с окраской изолированных ядер иодидом пропидия (PI). Использование метода окраски 4',6-диамидино-2-фенилиндолом (DAPI) было нецелесообразно, т. к. краситель в основном окрашивает АТ-обогащенные участки ДНК, тогда как процентное содержание АТ в ДНК различных групп растений и животных значительно различается, вследствие чего возможно появление неточности расчетов (Doležel et al., 2003). Молодые листья измельчали при помощи лезвия в 500 мкл охлажденного буфера Otto I с модификациями (0,1 М лимонной кислоты, 0,5 % Triton) и инкубировали 10 мин. при комнатной температуре (Otto, 1990). Образцы фильтровали через нейлоновую мембрану с размером пор 50 мкм и смешивали с раствором для окрашивания, состоящим из 1 мл буфера Tris-MgCl₂ (0,4 М Tris-основание, 4 mM MgC₁₂*6H₂O) с добавлением PI (50 мкг/мл), РНКазы (50 мкг/мл) и β-меркаптоэтанола (1 мкг/мл) (Doležel et al., 1998; Pfosser et al., 1995). Исследование каждого образца проводили в два этапа. На первом этапе подбирали параметры детекции флуоресценции и выявления положения пика стандарта на графике, и отмечали канал флуоресценции стандарта. На втором этапе раствор стандарта добавляли

Таблица 1

Используемые в исследовании образцы растений

№	Вид	Сорт	2С (содержание ДНК), пг ¹	1С (размер генома), Мбп ²
1	<i>Allium fistulosum</i> L.	Русский	25,05	12249
		Апрельский		
		Нежность		
2	<i>Allium cepa</i> L.	Есаул	33,50	16381
		Стригуновский		
		Одинцовец		
3	<i>Anethum graveolens</i> L.	Кибрай	2,40	1173
		Грибовский		
		Узоры		
4	<i>Bellis perennis</i> L.		2,30	1125
5	<i>Fragaria vesca</i> L.		0,49	239
6	<i>Lathyrus odoratus</i> L.	Жемчуг	15,55	7604
		Спенсер		
7	<i>Lepidium sativum</i> L.	Ажур	1,16	567
		Забава		
		Витаминный		
8	<i>Pisum sativum</i> L.	Адагумский	9,75	4768
		Глориоза		
9	<i>Petroselinum crispum</i> L.	Листовая	4,50	2200
		Универсал		
		Кучерявец		
10	<i>Sinapis alba</i> L.	Седерат	1,0	489
11	<i>Vicia faba</i> L.	Черные русские	26,65	13032
		Велена		
		Детский восторг		

Примеч.: 1 – 1 пг ДНК = 978 Мбп (Doležel et al., 2003); 2 – по данным Kew C-value database (Bennett, Leitch, 2012).

к исследуемому образцу и проводили уже полноценное исследование. Для дальнейшей интерпретации данных использовали пики с не менее чем 1000 детектируемых частиц.

В качестве внешнего стандарта использовали изолированные ядра лейкоцитов человека (мужского пола) с известным содержанием ДНК $2C = 7,0$ пг (Doležel et al., 1994, 1998; Tiersch et al., 1989).

Данные флюоресценции изолированных ядер детектировали при помощи проточного цитометра Partec CyFlow PA (Partec, GmbH) с лазерным источником излучения с длиной волны 532 нм. Сигналы записывались в логарифмическом представлении данных флюоресценции (логарифмическая шкала). Измерения производили не менее трех раз с периодичностью одно измерение в сутки для каждого образца. Для дальнейших расчетов использовали данные, не превышающие среднего значения содержания ДНК образца более чем на 3 % (Kubešová et al., 2010).

Для трансформации данных из логарифмического в линейное представление использовали формулу: $f = 10 X/64$ (Marie, Brown, 1993). Содержанием ДНК рассчитывали исходя из фор-

мулы $2C = f * M$, где f – индекс (разница между средними значениями пика образца и стандарта в линейной шкале); X – разница между средними значениями пиков (каналов) стандарта и образца в логарифмической шкале; 64 – частное между количеством каналов шкалы прибора на количество декад на полной логарифмической шкале (256/4 для Partec CyFlow PA); M – среднее значение пика образца. Полученные результаты обрабатывали при помощи ПО Statistica 8.0 (StatSoft Inc.) и штатного ПО проточного цитометра CyView (Partec, GmbH).

Результаты и обсуждение

Обычно для исследования ткань образца и стандарта измельчают вместе в одном буфере и окрашивают при помощи DAPI или PI (Doležel et al., 2007). Во время исследования большого количества образцов возможна неверная интерпретация при идентификации пика стандарта и пика образца на шкале прибора, что может вызвать ошибку при расчете. Проведение исследования в два этапа позволят провести ориентацию пика образца относительно пика стандарта и исключить возможность ошибки.

Использование буфера Tris-MgCl₂ связано с высоким риском кристаллизации перенасыщенного буфера Otto II и повреждения изолированных ядер в случае длительного эксперимента. В связи с неустойчивостью красителя PI, использование одного буфера в случае работы с большим количеством образцов нецелесообразно. В буфере Otto I 0,5 % Tween 20 был заменен на 0,5 % Triton X-100, данное решение связано с необходимостью повышения изолирующей способности буфера, особенно при работе с растительными тканями с прочной клеточной стенкой и вы-

соким содержанием полисахаридов. Внесенные изменения не отразились на количестве и качестве выделяемых ядер (рис. 2).

Из большинства исследуемых растений было получено достаточное для работы количество изолированных ядер. Исключением является *Fragaria vesca* (2C = 0,49 пг), у которой в связи со значительным содержанием полисахаридов в тканях наблюдалось устойчивое снижение уровня изоляции ядер. Данное явление затрудняет использование растений из р. *Fragaria* и близкого к нему *Potentilla* в качестве внешнего стан-

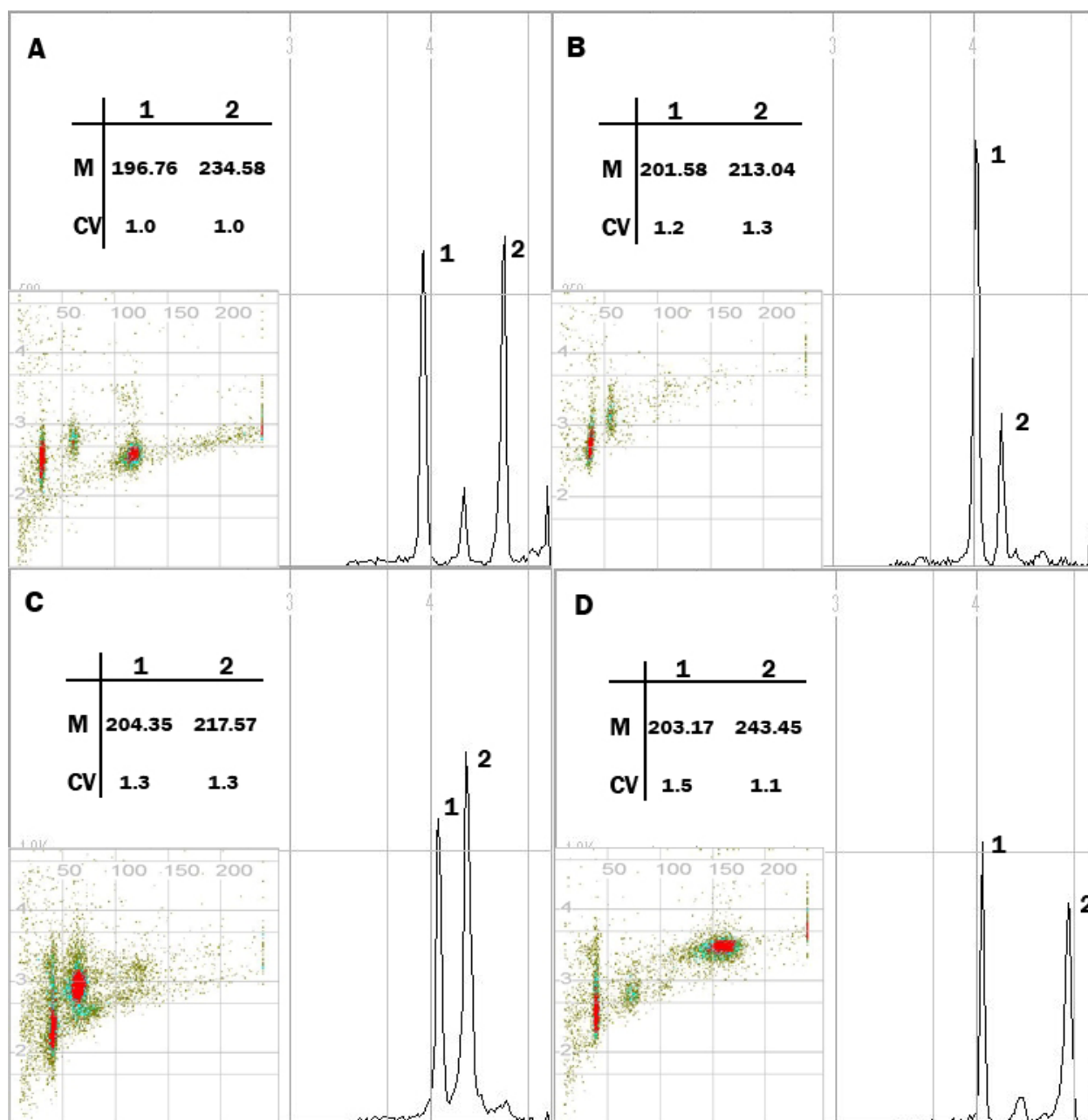


Рис. 1. Цитофлюорограммы и точечные графики бокового рассеивания некоторых исследованных растений. Логарифмическая шкала. Стандарт – изолированные ядра лейкоцитов человека (A, B – пик 2; C, D – пик 1). A – *Sinapis alba* седегат; B – *Petroselinum crispum* ‘Листовая’; C – *Lathyrus odoratus* ‘Жемчуг’; D – *Vicia faba* ‘Черные русские’.

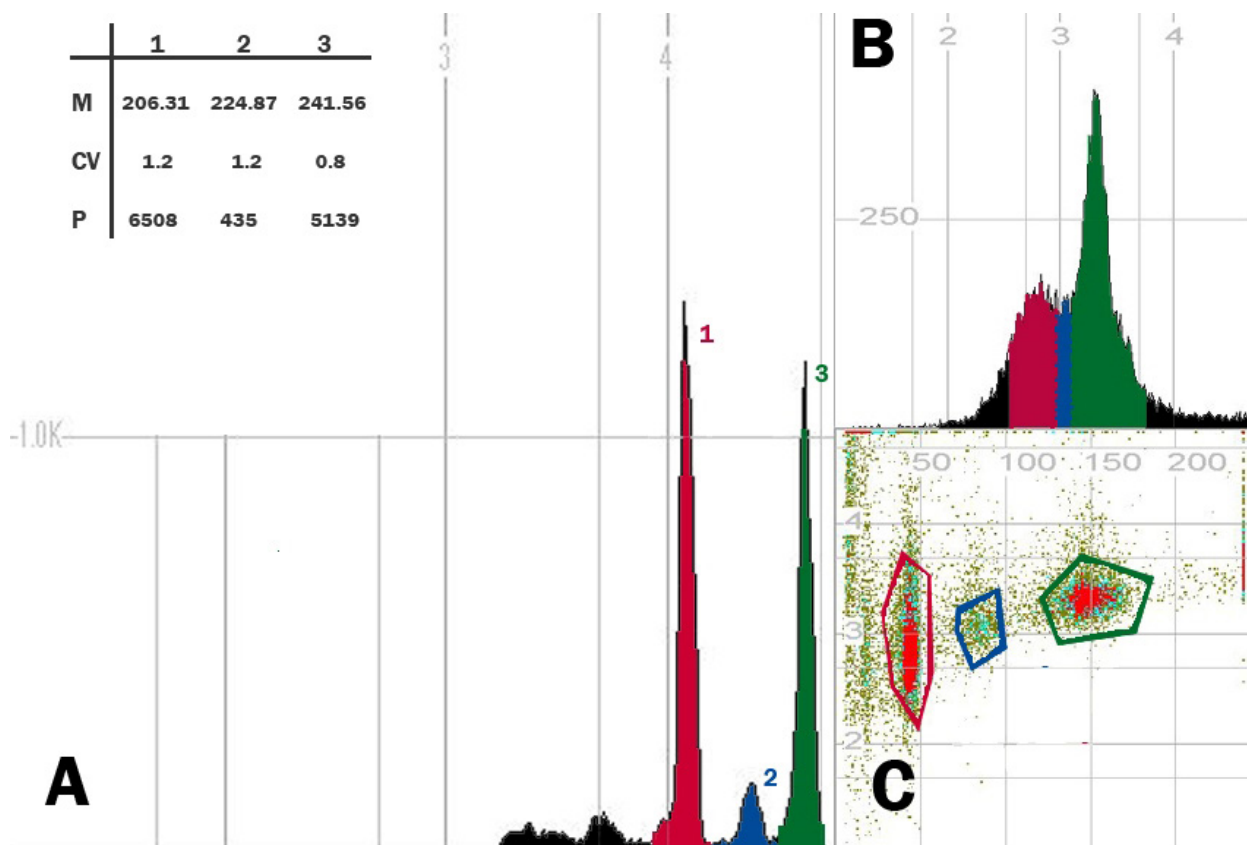


Рис. 2. Данные проточной цитометрии. Логарифмическая шкала. А: 1, 2 пики – *Sinapis alba*, 3 пик – *Pisum sativum*. Пик 1 соответствует основному состоянию клеточного ядра в фазе митоза G_0/G_1 . Пик 2 (пик-спутник) – часто встречающееся явление присутствия клеточных ядер, находящихся на стадии митоза G_2 с удвоенным количеством ДНК. Если пик 1 равен 2,24 пг, то пик 3 равен 7,95 пг; в обратном случае, если принимать пик 3 за стандарт (*Pisum* $2C = 8,0$ пг), то пик 1 равен 2,25 пг, что находится в пределах допустимых значений; В, С: показатель бокового рассеивания и положение популяций на точечном графике бокового рассеивания свидетельствуют о высоком качестве изолированных ядер по показателям их размера и зернистости.

дорта. Значительное количество исследователей использует для работы *Bellis perennis* с установленным содержанием ДНК $2C = 2,3$ пг и 3,45 пг (Bennett, Leitch, 2012; Kubešová et al., 2010). По нашим данным, для *B. perennis* характерны оба значения.

Из растений с наиболее стабильным геномом можно отметить *Lepidium sativum* (рис. 1А): содержание ДНК большинства сортов отличается друг от друга лишь на сотые доли (сорт ‘Ажур’ – 1,10 пг, ‘Забава’ – 1,06, ‘Витаминный’ – 1,09). *Petroselinum crispum* и седегатная форма *Sinapis alba* также оказались стабильными и не отличались высоким уровнем стандартного отклонения. За один эксперимент у *Petroselinum crispum* ‘Листовая’ выделялось не менее 4–6 тысяч изолированных ядер, а показатель бокового рассеивания показывал низкую зернистость ядер (рис. 1В).

Некоторые источники отмечают стабильность генома сортов р. *Pisum* (Greilhuber, Ebert, 1994). В нашем исследовании содержание ДНК

сорта ‘Глориоза’ составил $2C = 9,38$ пг, а сорта ‘Адагумский’ – $2C = 8,0$ пг. Кроме того, сорт ‘Глориоза’ отличается значительным показателем стандартного отклонения и неудобен для исследования. Также пластичными являются сорта р. *Lathyrus*, за исключением ‘Жемчуг’ (рис. 1С).

Для определения крупных геномов наиболее часто используют сорта *Vicia faba*, *Allium cepa* и *Allium fistulosum* (Doležel et al., 1992, 1998). В исследованиях более целесообразно использовать сорта *Vicia faba*, т. к. большой разницы между геномами *Vicia faba* и *Allium fistulosum* не выявлено, количество изолируемых ядер выше у *Vicia faba* (рис. 1D), а сорта *Allium fistulosum* оказались более вариабельными: показатели содержания ДНК составляли как 31,2, так и 32,25 пг. Использование сортов *Vicia faba* позволяет с высокой степенью точности исследовать образцы с содержанием ДНК от 10 до 40–45 пг. В случае предполагаемого содержания ДНК образца на уровне 60 пг и более, возможно использование сортов *Allium cepa*, характеризующихся высокой

Таблица 2

Относительное содержание ДНК

Вид	Сорт	2С (содержание ДНК), пг	1С (размер генома), Мбп
<i>Lepidium sativum</i> L.	Ажур	1,10 ± 0,02	538
<i>Sinapis alba</i> L.	Седегат	2,24 ± 0,04	1095
<i>Petroselinum crispum</i> L.	Листовая	4,69 ± 0,09	2293
<i>Pisum sativum</i> L.	Адагумский	8,00 ± 0,10	3917
<i>Lathyrus odoratus</i> L.	Жемчуг	11,10 ± 0,11	5428
<i>Vicia faba</i> L.	Черные русские	27,86 ± 0,39	13623

стабильностью генома, таких как ‘Есаул’ (2С = 40,18), ‘Стригуновский’ (2С = 40,25) или ‘Одинцовец’ (2С = 40,16 пг).

Среди наиболее подходящих растений для использования в качестве стандарта в проточной цитометрии можно отметить сорта таких видов, как *Lathyrus odoratus*, *Lepidium sativum*, *Pisum sativum*, *Petroselinum crispum*, *Sinapis alba*, *Vicia faba* (табл. 2). Сорта этих растений перекрывают значительный диапазон возможного содержания ДНК исследуемого материала, данные цитофлюорограммы и графиков бокового рассеивания подтверждают высокое качество и достаточное количество выделяемых ядер, что позволяет

использовать приведенные сорта как внешние стандарты проточной цитометрии (рис. 1).

Для анализа нужно использовать минимум два стандарта, особенно для групп растений, характеризующихся полиплоидией. Кроме того, тот факт, что геном растений может быть достаточно пластичен, подобная техника исследований позволяет «откалибровать» стандарты друг относительно друга и улучшить условия эксперимента (рис. 2).

Благодарности. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, грант НШ-1417.2014.4.

ЛИТЕРАТУРА

- Bennett M.D., Leitch I.J.** Plant DNA C-values database (release 6.0, Dec. 2012) [Electronic resource] // Royal botanical garden KEW [Official website]. URL: <http://www.kew.org/cvalues/> (accessed: 12 V 2014)
- Doležel J., Bartoš J., Voglmayr H., Greilhuber J.** Nuclear dna content and genome size of trout and human // Cytometry, 2003. – Vol. 51. – P. 127–128. DOI: 10.1002/cyto.a.10013
- Doležel J., Doleželova M., Novak F.J.** Flow cytometric estimation of nuclear DNA amount in diploid bananas (*Musa acuminata* and *M. balbisiana*) // Biologia Plantarum, 1994. – Vol. 36, No. 351 – P. 357. DOI: 10.1007/BF02920930
- Doležel J., Greilhuber J., Lucretti S., Meister A., Lysak M., Nardi L., Obermayer R.** Plant genome size estimation by flow cytometry: inter-laboratory comparison // Annals of Botany, 1998. – Vol. 82. – Suppl. A. – P. 17–26.
- Doležel J., Greilhuber J., Suda J.** Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry // Nature Protoc., 2007. – Vol. 2. – P. 2233–2244. DOI: 10.1038/nprot.2007.310
- Doležel J., Sgorbati S., Lucretti S.** Comparison of three DNA fluorochromes for flow cytometric estimation of nuclear DNA content in plants // Physiologia Plantarum, 1992. – Vol. 85. – P. 625–631. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1992.tb04764.x
- Greilhuber J., Ebert I.** Genome size variation in *Pisum sativum* // Genome, 1994. – Vol. 37, No. 4. – P. 646–655. DOI: 10.1139/g94-092
- Jiao Y., Wickett N., Ayyampalayam S., Chanderbali A., Landherr L., Ralph P., Tomsho L., Hu Y., Liang H., Soltis P., Soltis D., Clifton S., Schlarbaum S., Schuster S., Ma H., Leebens-Mack J., dePamphilis C.** Ancestral polyploidy in seed plants and angiosperms // Nature, 2011. – Vol. 473. – P. 97–100. DOI: 10.1038/nature09916
- Kubešová M., Moravcová L., Suda J., Jarošík V., Pyšek P.** Naturalized plants have smaller genomes than their non-invading relatives: a flow cytometric analysis of the Czech alien flora // Preslia, 2010. – Vol. 82. – P. 81–96.
- Marie D., Brown S.C.** A cytometric exercise in plant DNA histograms, with 2C values for 70 species // Biology of the Cell, 1993. – Vol. 78. – P. 41–51. DOI: 10.1016/0248-4900(93)90113-S
- Matzk F., Meister A., Schubert I.** An efficient screen for reproductive pathways using mature seeds of monocots and dicots // The Plant Journal, 2000. – Vol. 21, No. 1. – P. 97–108. DOI: 10.1046/j.1365-313x.2000.00647.x
- Otto F.** DAPI staining of fixed cells for high-resolution flowcytometry of nuclear DNA // Methods in cell biology / Ed. by H.A. Crissman, Z. Darzynkiewicz. – New York: Academic Press, 1990. – Vol. 33. – P. 105–110.

Pfossier M., Amon A., Lelley T., Heberle-Bors E. Evaluation of sensitivity of flow cytometry in detecting aneuploidy in wheat using disomic and ditelosomic wheat-rye addition lines // *Cytometry*, 1995. – Vol. 21, № 4. – P. 387–393. DOI: 10.1002/cyto.990210412

Salameh N.M. Flow cytometric analysis of nuclear DNA between okra landraces (*Abelmoschus esculentus* L.) // *American Journal of Agricultural and Biological Sciences*, 2014. – Vol. 9, № 2. – P. 245–250. DOI: 10.3844/ajabssp.2014.245.250

Sammour R.H. Genetic diversity and allele mining in soybean germplasm // *Soybean – genetics and novel techniques for yield enhancement* / Ed. by D. Krezhova. – Rijeka: InTech, 2007. – P. 1–21. DOI: 10.5772/727

Tiersch T.R., Chandler R.W., Wachtel S.S.M., Ellias S. Reference standards for flow cytometry and application in comparative studies of nuclear DNA content // *Cytometry*, 1989. – Vol. 10. – P. 706–710. DOI: 10.1002/cyto.990100606

Wolf D.E., Steets J.A., Houlston G.J., Takebayashi N. Genome size variation and evolution in allotetraploid *Arabidopsis kamchatica* and its parents, *A. lyrata* and *A. halleri* [Electronic resource] // *AoB PLANTS* [Official website]. URL: <http://aobpla.oxfordjournals.org/content/6/plu025> (26 V 2014) DOI: 10.1093/aobpla/plu025