

УДК 58.086:576.08

Проблемы стандартизации в проточной цитометрии растений

М. В. Скапцов, С. В. Смирнов, М. Г. Куцев, А. И. Шмаков

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

Ключевые слова: проточная цитометрия, размер генома, ДНК, пропидий иодид, *Ficus*, *Schefflera*, *Zamioculcas*, *Euryops*.

Аннотация. В сообщении обсуждаются проблемы, возникающие при установлении стандартов в исследованиях по проточной цитометрии. Авторами предлагается к использованию ряд новых видов оранжерейных растений в качестве стандартов. Приводятся данные об относительном содержании их ДНК. Установлено, что для *Ficus benjamina* 2C = 1,07 пг, *Euryops chrysanthemoides* 2C = 2,70 пг, *Schefflera octophylla* 2C = 4,65 пг, × *Fatshedera lizei* 2C = 6,34 пг, *Davallia mariesii* 2C = 15,37 пг, *Zamioculcas zamiifolia* 2C = 48,35 пг.

Problems of a standardization in plant flow cytometry

M. V. Skaptsov, S. V. Smirnov, M. G. Kutsev, A. I. Shmakov

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

Key words: flow cytometry, genome size, DNA, propidium iodide, *Ficus*, *Schefflera*, *Zamioculcas*, *Euryops*.

Summary. In this article problems of standardization in flow cytometry researches are discussed. Authors propose some new species of greenhouse plants to use as standards. Data of the relative nuclear DNA content of the species is presented. Nuclear genome sizes have been reported: *Ficus benjamina* 2C = 1.07 pg, *Euryops chrysanthemoides* 2C = 2.70 pg, *Schefflera octophylla* 2C = 4.65 pg, × *Fatshedera lizei* 2C = 6.34 pg, *Davallia mariesii* 2C = 15.37 pg, *Zamioculcas zamiifolia* 2C = 48.35 pg.

Проблема стандартизации в проточной цитометрии растений особенно остро стояла в 90-х годах XX века. Ранее самыми распространенными стандартами являлись ядра эритроцитов кур (*Gallus domesticus*) и форели (*Oncorhynchus mykiss*) с размерами 2C = 2,5 пг и 2C = 3,74–6,60 пг соответственно (Pedersen, 1971; Ojima, Yamamoto, 1990; Animal genome ..., 2016), а также ядра лейкоцитов человека, 2C = 7,0 пг (Tiersch et al., 1989). Использование подобных стандартов позволяет работать только с красителем пропидий иодидом (PI), но не с 4',6-диамидино-2-фенилиндолом (DAPI), который используется в некоторых методах исследования генома. Од-

нако у этого метода окрашивания ядер есть особенность – зависимость от GC-состава ДНК, что зачастую вносит значительные погрешности, особенно при исследовании растений с крупным геномом. В связи с этими недостатками в исследовательских лабораториях мира рассчитывали содержание ДНК для нескольких «удобных» по тем или иным характеристикам растений относительно вышеуказанных стандартов *Gallus domesticus*, *Oncorhynchus mykiss* или *Homo sapiens*, которые в дальнейшем и использовали в качестве стандартов (Johnston et al., 1999; Doležel, Bartoš, 2005; Skaptsov et al., 2014). В настоящее время многие исследователи используют стан-

дарты, приведенные в работах Doležel et al. (1992, 1994, 1998), которые являются самыми распространенными в литературе, что в какой-то степени позволяет синхронизировать результаты, получаемые различными исследовательскими группами. Так, самыми распространенными из них являются *Glycine max* (2С = 2,50 пг), *Pisum sativum* (2С = 9,09 пг), *Zea mays* (2С = 5,43 пг), *Allium cepa* (2С = 34,89 пг). Тем не менее, приверженность к той или иной группе стандартов не позволяет получать абсолютные значения содержания ДНК. Кроме того, произошли корректировки размера генома человека, используемого в качестве стандарта. В результате полногеномного секвенирования был уточнен размер генома человека, и теперь точное содержание ДНК человека зафиксировали на уровне 6,294 миллиардов пар азотистых оснований или 6,43 пг; ранее использовался стандарт 2С = 7,0 пг (Initial sequencing..., 2001). В работе Doležel et al. (2003) авторы рассуждают о новых сведениях по размеру генома человека, но, тем не менее, разработанные ранее системы стандартов растений используются до настоящего времени без корректировки. В свою очередь, все это влечет за собой проблему пересчета значений размеров генома видов растений, исследованных ранее, до корректировки стандарта человека. В этой связи наиболее значимыми являются данные о соотношении содержания ДНК между видами той или иной группы растений, а не их абсолютные значения.

Для объективных расчетов относительно содержания ДНК многие исследователи дополнительно используют в качестве стандартов культурные сорта растений, например, *Vicia faba* сорта 'Innovac', *Secale cereale* 'Dankovske',

Hordeum vulgare 'Sultan' и многие другие. Это связано с относительной однородностью генома этих сортов, а также с возможностью круглогодичного выращивания свежего материала из семян. Кроме того, при поддержке должной чистоты линий в сортах практически исключены изменения генома, связанные с гибридогенными процессами. В некоторых случаях культурные сорта, размножаемые семенами, не всегда могут быть доступны для исследований в связи с коротким сроком вегетации/хранения семян или недоступностью сорта для исследователя. Столкнувшись с подобными проблемами, мы считаем целесообразным использовать, помимо быстро прорастающих однолетних видов, также оранжерейные и/или комнатные многолетние виды растений со стабильным геномом. Для этого мы подобрали неприхотливые широко распространенные комнатные и оранжерейные многолетние растения, из листьев которых легко выделялись интактные ядра. При этом мы учитывали, что рекомендуемые стандарты между собой должны быть отличающимися в разы по размеру генома, чтобы их можно было использовать для широкого спектра определяемых растений (табл. 1). В качестве внутреннего стандарта были использованы *Pisum sativum* сорт 'Ctirad' (2С = 9,09 пг), *Vicia faba* 'Innovac' (2С = 26,90 пг), *Glycine max* 'Polanka' (2С = 2,50 пг) и *Belvis perennis* (2С = 3,45 пг) (Doležel, Bartoš, 2005; Kubešová et al., 2010).

Изучаемые виды отличаются стабильностью генома; их можно использовать для исследования растений с широким диапазоном относительно содержания ДНК. Однако мы не рекомендуем использовать вариегатные и пестроокрашенные сортоформы и спорты исследуемых образцов.

Таблица 1

Относительное содержание ДНК и размер генома исследованных видов растений

Вид	2С (содержание ДНК), пг	1С (размер генома), Мбп	Стандарт
<i>Ficus benamina</i> L. дикий тип	1,07	523,23	<i>B. perennis</i> , <i>G. max</i>
'Barok'	1,06		
'Natasja'	1,08		
<i>Euryops chrysanthemoides</i> (DC.) B. Nord.	2,70	1320,30	<i>P. sativum</i>
<i>Schefflera octophylla</i> Harms	4,65	2273,85	<i>P. sativum</i>
× <i>Fatschedera lizei</i>	6,34	3100,26	<i>P. sativum</i>
<i>Davallia mariesii</i> H. J. Veitch	15,37	7515,93	<i>P. sativum</i> , <i>V. faba</i>
<i>Zamioculcas zamiifolia</i> (Lodd.) Engl.	48,35	23643,15	<i>V. faba</i>

Примечание: 1 пг ДНК = 978 Мбп (Doležel et al., 2003)

В то же время у *Ficus benjamina* было исследовано две сортоформы 'Barok' (имеет деформированные скрученные листья) и 'Natasja' (густо и мелкооблиственная форма) с нормальными и равномерно окрашенными зелеными листьями, а также дикий тип. Для всех трех образцов получены одинаковые значения по содержанию ДНК. На наш взгляд, использование сортоформ имеет некоторые преимущества. Обычно они получены однократно в процессе случайного или направленного мутагенеза и размножаются исключительно вегетативно. Поэтому исследователи всего мира будут иметь абсолютно одинаковый сравнительный стандарт, к тому же легко размножаемый вегетативно и произрастающий в

комнатных условиях. Особо с этой целью стоит отметить межродовой гибрид \times *Fatshedera lizei*, полученный однократно в 1912 г. во Франции и представленный во всем мире одним клоном (мы не берем во внимание вариетатную и пестролистную сортоформы, полученные позже). Также интересен и практичен в культивировании *Zamioculcas zamiifolia* (некарликовая форма), который относится к монотипному роду, а высокое содержание его ДНК позволяет исследовать виды растений с размером генома более 100 пг.

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

REFERENCES / ЛИТЕРАТУРА

- Animal genome size database* (2016) URL: http://www.genomesize.com/result_species.php?id=906 (Accessed 02.09.2016).
- Doležel, J., Bartoš, J.** (2005) Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. *Ann. Bot.* 95(1): 99–110. DOI: 10.1093/aob/mci005
- Doležel, J., Bartoš, J., Voglmayr, H., Greilhuber, J.** (2003) Nuclear DNA content and genome size of trout and human. *Cytometry Part A* 51(2): 127–128. DOI: 10.1002/cyto.a.10013
- Doležel, J., Doleželová, M., Novak, F. J.** (1994) Flow cytometric estimation of nuclear DNA amount in diploid bananas (*Musa acuminata* and *M. balbisiana*). *Biol. Plant.* 36: 351 – 357. DOI: 10.1007/BF02920930
- Doležel, J., Greilhuber, J., Lucretti, S., Meister, A., Lysak, M., Nardi, L., Obermayer, R.** (1998) Plant genome size estimation by flow cytometry: inter-laboratory comparison. *Ann. Bot.* 82: 17–26.
- Doležel, J., Sgorbati, S., Lucretti, S.** (1992) Comparison of three DNA fluorochromes for flow cytometric estimation of nuclear DNA content in plants. *Physiol. Plant.* 85: 625–631. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1992.tb04764.x
- Johnston, J. S., Bennett, M. D., Rayburn, A. L., Galbraith, D. W., Price, H. J.** (1999) Reference standards for determination of DNA content of plant nuclei. *Am. J. Bot.* 86(5): 609–613.
- Kubešová, M., Moravcová, L., Suda, J., Jarošík, V., Pyšek, P.** (2010) Naturalized plants have smaller genomes than their non-invading relatives: a flow cytometric analysis of the Czech alien flora. *Preslia* 82: 81–96.
- Initial sequencing and analysis of the human genome. International Human Genome Sequencing Consortium* (2001) *Nature* 409: 860–921. DOI: 10.1038/35057062
- Ojima, Y., Yamamoto, K.** (1990) Cellular DNA contents of fishes determined by flow cytometry. *La Kromosomo* 57: 1871–1888.
- Pedersen, R. A.** (1971) DNA content, ribosomal gene multiplicity, and cell size in fish. *J. Exp. Zoology* 177: 65–79. DOI: 10.1002/jez.1401770108
- Skaptsov, M. V., Smirnov, S. V., Kutsev, M. G.** (2014) Nuclear DNA content in some plant kinds used as an external standard in flow cytometry. *Turczaninowia* 17(3): 72–78 [In Russian]. (**Скапцов М. В., Смирнов С. В., Куцев М. Г.** Содержание ядерной ДНК в некоторых сортах растений, используемых в качестве внешних стандартов в проточной цитометрии // *Turczaninowia*, 2014. Т. 17, вып. 3. С. 72–78). DOI: 10.14258/turczaninowia.17.3.8
- Tiersch, T. R., Chandler, R. W., Wachtel, S. S. M., Ellias, S.** (1989) Reference standards for flow cytometry and application in comparative studies of nuclear DNA content. *Cytometry* 10: 706–710. DOI: 10.1002/cyto.990100606