

УДК 576.08:58.087

М.В. Скапцов
М.Г. Куцев

M.V. Skaptsov
M.G. Kutsev

ВОЗМОЖНОСТИ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ В СОВРЕМЕННОЙ НАУКЕ О РАСТЕНИЯХ

POSSIBILITY OF FLOW CYTOMETRY IN THE MODERN SCIENCE OF PLANTS

Целью исследований является анализ практических данных, полученных при помощи проточной цитометрии, и возможности приложения данного метода для исследования растений. Проведен анализ основных методов проточной цитометрии для изучения растительных геномов. Установлено, что значительное количество исследований возможно проводить на базе нескольких основных практических методов пробоподготовки и анализа. Выявлена возможность исследований геномов с целью изучения содержания ДНК, размера генома, как приложение к популяционным исследованиям, исследованиям эволюции геномов, гибридизации, полиплоидий. Немало важным приложением является применение данного метода в области селекции и биотехнологии растений с целью изучения явления соматональной изменчивости и гибридизации *in vitro*. Приведены основные примеры данных проточной цитометрии, визуализирующих миксоплоидию, гибридизацию, исследование размера генома и селекционных процессов.

Введение

В современном мире наука о растениях постоянно дополняется новыми методами исследования в области систематики, флористики, эволюции, селекции и биотехнологии растений. Новые методы с каждым годом дополняют диапазон признаков для построения наиболее естественной системы растительного разнообразия. К таким относятся анатомо-морфологические методы, кариологические, молекулярно-генетические и, менее распространенные в России методы проточной цитометрии растений. Процесс изменения размера генома в таксонах и эволюционных сил, действующих на этом этапе, является одним из основных факторов в осуществлении макроэволюционных изменений, например, в происхождении семенных и цветковых растений (Jiao et al., 2011). На микроэволюционном уровне играют важную роль полиплоидия, аллополиплоидия и апомиксис. Данные процессы сложно диагностируемы классическими методами, но могут быть детектированы методом проточной цитометрии растений. Детекция изменений в размере генома растений, произрастающих на разных территориях, одних и тех же, или близких видов позволяет судить о ходе эволюционных процессов, их типе или прогнозировать последующие шаги эволюции (Salameh, 2014). Совместно с исследованием кариотипа или просто хромосомного числа можно детектировать сложные гибридогенные процессы с одновременным присутствием алло- и полиплоидий (Wolf et al., 2014).

Материалы и методика

Для исследования возможно использовать образцы культур клеток и тканей растений, регенерантов, интактные мезофильные ткани и семена. Содержанием ДНК исследуемых растений определяли с использованием метода проточной цитометрии с окраской изолированных ядер пропидий йодидом (PI) и 4',6-диамидино-2-фенилиндолом (DAPI). Молодые листья измельчали при помощи лезвия в 500 мкл охлажденного буфера Otto I 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 Otto II буфера с PI (50 мкг/мл) или DAPI (4 мкг/мл), РНаса (50 мкг/мл) и β-меркаптоэтанол (1 мкг/мл) (Doležel et al., 1998). Для образцов, обладающих более прочной клеточной стенкой использовали 500 мкл буфера Tris-MgCl₂ (0.4 М Tris-основание, 4 mM MgCl₂·6H₂O, 0,5 % Triton X-100) и 1 мл Tris-MgCl₂ буфера без Triton X-100, с добавлением PI (DAPI), РНаса и β-меркаптоэтанол (Phosser et al., 1995). Для изоляции ядер из семян использовали Seed буфер с теми же флуоресцентными красителями и вспомогательными компонентами (Matzk et al., 2001). Исследование каждого образца проводили в два этапа. На первом этапе подбирали параметры детекции флуоресценции и выявляли положения пика стандарта на графике, отмечали канал флуоресценции стандарта. На втором этапе раствор стандарта добавляли к исследуемому образцу, и проводили уже полноценное исследование. Для дальнейшей интерпретации данных использовали пики с не менее чем 1000 детектируемых частиц.

В исследованиях по определению содержания ДНК качестве внешнего стандарта использовали изолированные ядра *Bellis perennis* L. с известным содержанием ДНК $2C = 3,45$ пг (Kubesova et al., 2010).

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 среднее значение содержания ДНК образца более чем на 3 % (Kubesova et al., 2010).

При расчете содержания ДНК для трансформации данных из логарифмического в линейное представление использовали формулу: $f = 10 X/64$ (Marie, Brown, 1993). Содержанием ДНК рассчитывали, исходя из формулы $2C = f \cdot M$, 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

Одним из самых распространенных случаев использования метода проточной цитометрии для исследования процессов растений является изучение гибридогенных процессов проявляющихся в виде полиплоидий и анеуплоидий. Например, при детекции анеуплоидий, выявление анеуплоидий затруднено и связано с необходимостью прямого подсчета хромосом. Пик соответствующий $2n = 32$ без подсчета числа хромосом может быть интерпретирован как $2n + 1$, $2n + 2$ или более (рис. 1А). На практике возможно выявление гибридов, но зачастую только при классической гибридизации, когда родителями являются ди- и тетраплоид, с появлением гибрида триплоида, или же ди- и гексаплоиды с появлением гибрида тетраплоида. Исследование полиплоидных групп наименее проблематичный вариант применения метода. Например, $2n = 16$ основное спорофитное число используется в качестве стандарта, исследуемые образцы располагаются либо наравне либо далее первого пика, составляя полиплоидный ряд (рис. 1В). Выявление миксо- и эндополиплоидий анеуплоидий зачастую сложно или практически невозможно классическим подсчетом хромосом. Миксоплоидия одно из сложно детектируемых классическими методами явлений. Присутствие трех или четырех пиков на графике является первым признаком миксоплоидной формы. Первый и второй пики соответствуют фазе митоза G_0/G_1 и однозначно отличаются по размеру генома и хромосомному составу. Первый и второй пики G_2 – пики-спутники, характеризуют группу клеток в состоянии митоза G_2 с удвоенным количеством ДНК (рис. 1С). Миксоплоидия – очень распространенное явление и, применяя методы проточной цитометрии становится возможным за короткое время проанализировать большое количество материала, т. к. за 1 минуту цитометр анализирует до 5–6 тысяч клеточных ядер (Кунах, 1995).

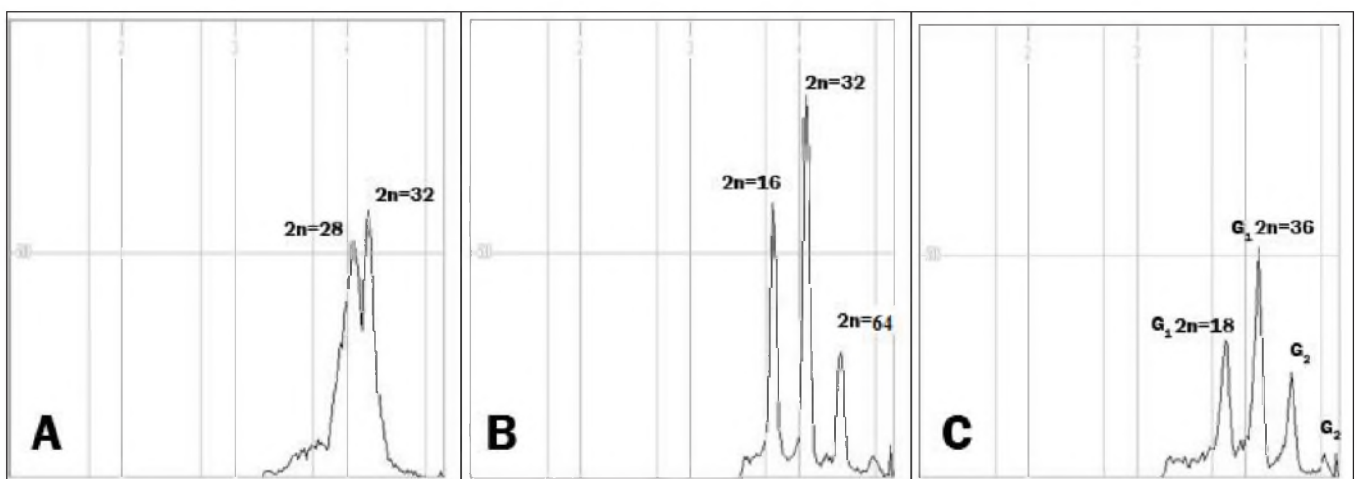


Рис. 1. Данные проточной цитометрии. Логарифмическая шкала. Условные обозначения: А – детекция анеуплоидии; В – полиплоидные группы; С – миксоплоидия

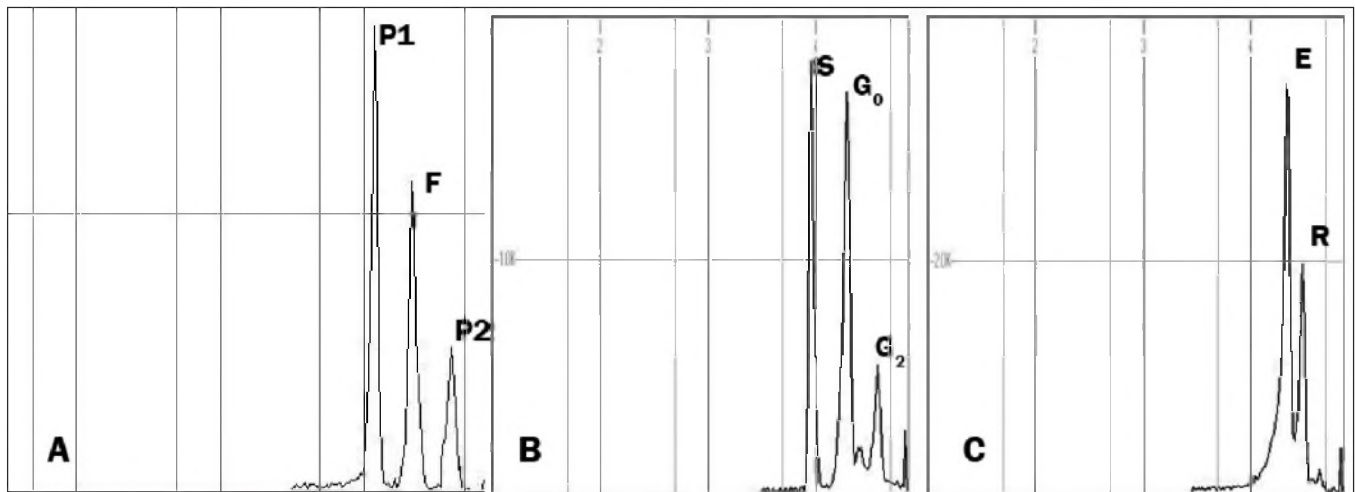


Рис. 2. Примеры цитофлюорограмм при исследовании различных явлений. Логарифмическая шкала. Условные обозначения: А – классический пример гибридизации (P1 (диплоид) и P2 (гексаплоид) родители, F – гибрид); В – расчет содержания ДНК и размера генома S – стандарт (*Bellis* 2C=3,45 пг), G₂ – пик соответствующий G₂ стадии митоза, G₀ – основной пик (S: M=205,67; CV=1,5; G₀:M=226,5; CV=1,1); С – пример детекции соматклональной изменчивости в культуре клеток и тканей *in vitro* (E – эксплант, R – регенерант)

Исследование популяций групп растений с распространенной изменчивостью или ярко выраженными гибридогенными процессами позволяет выделить популяции со значительными отличиями в геноме и может стать отправной точкой для популяционных исследований. Зачастую становятся проблематичными исследования на основе метода прямого подсчета хромосом связанных со сложностью в получении моносомных клеток или же небольшим размером хромосом. Многие группы растений внутри рода имеют линейную зависимость между размером генома и хромосомным числом, т. к. размеры хромосом приблизительно равны. В связи с этим становится возможным, используя в качестве внутривидового стандарта вид с известным количеством хромосом определить хромосомные числа и у других представителей рода (Скапцов, Белкин, 2013). Похожее применение в селекции растений при получении полиплоидов или гибридов, когда в качестве стандарта используются родительские формы (рис. 2А). Используя данный метод, возможно значительно уменьшить длительность кариологических исследований, т. к. зачастую для выявления изменений генома в ходе селекции, в том числе с применением биотехнологических методов, необходимо длительно выращивать предполагаемые сорта до появления возможности исследования хромосом. Выявив геномные различия на ранних стадиях, возможно отделить теоретически сформированные сорта и отсеять неперспективные образцы.

Интересным приложением является возможность исследования клеток семян для выявления апомиксиса, аллополиплоидий и прочих сложных микроэволюционных процессов (Matzk et al., 2000). Сложные в приготовлении кариологические препараты позволяют успешно исследовать только несколько клеток на образец, тогда как за один эксперимент, возможно проанализировать не менее 1000 ядер, т. е. весь спектр кариотипов составляющих ткани семени.

Очень интересное применение данный метод находит для анализа возможности сохранения редких видов растений при помощи биотехнологических методов. Такое явление как соматклональная изменчивость растений ставит под сомнение применимость данные методы ко многим видам. Но, зачастую, многие группы растений имеют стабильный геном и изменяются в культуре *in vitro* не так явно, но множество растений страдают от этого явления в большей степени (рис. 2С).

Одним из самых распространенных и важных способов применения проточной цитометрии является измерение размера генома и содержания ДНК. Полученные данные постоянно пополняют многие международные базы данных, таких как база данных размера генома растений Королевского ботанического сада Кью (Bennett, Leitch, 2012). Используя внутренние и внешние стандарты, возможно, получить признак, по ценности равный хромосомному числу, морфологическим или анатомическим признакам (рис. 2В). Так как зачастую при одинаковом хромосомном составе размер генома может значительно отличаться у разных таксонов внутри рода.

Заключение

Благодаря современным подходам в изучении растений, а в особенности в комбинировании данных подходов, становится возможным гораздо шире воспринимать систематические, флористические, популяционные и эволюционные процессы растительных организмов. Проточная цитометрия, основываясь на нескольких способах пробоподготовки и интерпретации данных, позволяет изучать широкий спектр процессов, происходящих повсеместно в растительном сообществе, и фактически является подспорьем микроскопии. Данный метод не является новым, но, будучи пластичным, постоянно открывает новые способы применения для изучения процессов, происходящих в растениях, таких как гибридизация, полиплоидия и партеногенетическая изменчивость. Пластичность метода позволяет интерпретировать данные, исходя из поставленных задач, незначительно изменив условия эксперимента, тем самым, снизив возможность ошибки.

Опубликовано при поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации в рамках базовой части государственного задания в сфере научной деятельности ФГБОУ ВПО «Алтайский государственный университет». Код проекта: 316. Также проекта НШ-1417.2014.4

ЛИТЕРАТУРА

- Кунах В.А.** Геномная изменчивость соматических клеток растений // Биополимеры и клетка, 1995. – Т. 11. – № 6. – С. 5–40.
- Сканцов М.В., Белкин Д.Л.** Цитофлюориметрические исследования некоторых представителей рода *Silene* L. Алтайской горной страны // Вестник Алтайского государственного аграрного университета, 2013. – Т. 104. – № 6. – С. 53–56.
- 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: 12.05.2014).
- Doležel J., Greilhuber J., Lucretti S., Meister A., Lysak M., Nardi L., Obermayer R.** Plant genome size estimation by flow cytometry: inter-laboratory comparison // Ann. Bot., 1998. – Vol. 82. – Suppl. A. – P. 17–26.
- 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., de Pamphilis C.** Ancestral polyploidy in seed plants and angiosperms // Nature, 2011. – Vol. 473. – № 97–100.
- Kubešová M., Moravcová L., Suda J., Jarošík V., Pyšek P.** Naturalized plants have smaller genomes than their non-invasive 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 // Biol Cell, 1993. – Vol. 78. – P. 41–51.
- Matzk F., Meister A., Brutovská R., Schubert I.** Reconstruction of reproductive diversity in *Hypericum perforatum* L. opens novel strategies to manage apomixes // The Plant Journal, 2001. – Vol. 26. – № 3. – P. 275–282.
- 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. – № 1. – P. 97–108.
- Otto F.** DAPI staining of fixed cells for high-resolution flowcytometry of nuclear DNA. In: Crissman H.A. and Darzynkiewicz Z. (eds), Methods in cell biology / New York: Academic Press, 1990. – Vol. 33. – P. 105–110.
- Pfossen 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.
- 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.
- 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> (26.05.2014).

SUMMARY

The purpose of research is to analyze the practical data obtained by flow cytometry and possible applications of this method for the study of plants. Analyzed of the main ways to use the method of flow cytometry for the study of plant genomes. It is found that a considerable amount of research is possible to carry out on the basis of a few basic practices for sample preparation and analysis. Revealed the possibility of genome research to study the DNA content, genome size, as an application to population studies, studies of the evolution of genomes, hybridization, polyploidy. Not a few important application is the use in the field of plant breeding and plant biotechnology in order to study the phenomenon of somaclonal variation and hybridization in vitro. The main examples of data flow cytometry imaging mixoploidy hybridization, the study of genome size and selection processes.