

УДК 576.08:58.087+582.951.6(235.222)

П.А. Косачёв, М.С. Иванова, М.В. Скапцов

P.A. Kosachev, M.S. Ivanova, M.V. Skaptsov

СОДЕРЖАНИЕ ДНК И УРОВНИ ПЛОИДНОСТИ МЫТНИКОВ АЛТАЯ

THE DNA CONTENT AND PLOIDY LEVEL OF *PEDICULARIS* L. ALTAI

В работе методом проточной цитометрии исследовано 13 проб из 10 видов в отношении содержания ДНК и уровней ploидности. Виды рода *Pedicularis* на Алтае имеют значения $2C$ в пределах 4,29–13,20 пг. Наименьшее содержание ДНК обнаружено у *P. amoena* (4,29 пг). Наибольшее – *P. myriophylla* (13,20 пг). Большинство представителей имели набор хромосом $2n = 2x = 16$. В двух случаях установлено, что имеется и второй уровень ploидности. Так, *P. altaica* имеет $2n = 4x = 32$; а *P. myriophylla* имеет 2 цитотипа – $2n = 2x$ и $2n = 4x$.

Размер генома является одним из важных критериев в эволюции организмов и имеет видоспецифичный характер, что может помочь объяснить взаимоотношения между видами (Gregory, 2001). Как показали Bennett и Leitch (2012), размер генома до сих пор не выявлен у 97,5 % покрытосеменных видов растений. В эволюции растений размер генома может как увеличиваться, так и уменьшаться (Bennetzen, Kellogg, 1997). К увеличению размера генома приводит, как правило, полиploидия. В гомопloидных растениях (т.е. видов с тем же числом хромосом), увеличение размера генома возможно за счет вставки транспозонов, эволюции и увеличения числа повторов саттелитов (изменение количества и пропорций минисаттелитов и микросаттелитов (Lim et al., 2006). Уменьшение размера генома связано с механизмами делеций (Bennetzen et al., 2005; Castro et al., 2012).

В крупном семействе Orobanchaceae Vent. (cons.) размер генома практически еще не изучен. Поэтому в настоящее время любая информация по размеру генома и уровням ploидности из этой группы растений будет иметь важное научное значение.

Материалы и методы

Для решения наших задач в таксономии мытников мы использовали измерение содержания ДНК в клетке и исследование уровней ploидности методом проточной цитометрии. В течение прошлого десятилетия этот метод стал очень мощной технологией, которая используется в широком диапазоне научных дисциплин от цитологии до генетики, а также в иммунологии, молекулярной биологии и экологии (особенно в изучении водных экосистем).

Методом проточной цитометрии можно получать самые разные данные: определять содержание в клетке ДНК и РНК, суммарное количество белков и количество специфических белков, узнаваемых моноклональными антителами, исследовать клеточный метаболизм (например, измерять внутриклеточный pH), изучать транспорт ионов кальция и кинетику ферментативных реакций (Ormerod, 1990).

Содержание ДНК исследуемых растений определяли с использованием метода проточной цитометрии с окраской изолированных ядер пропидий иодидом (PI). 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 Tris-MgCl₂ буфера (0,4 М Tris-основание, 4 mM MgCl₂·xH₂O) с PI (50 мкг/мл), РНаза (50 мкг/мл) и β-меркаптоэтанол (1 мкг/мл) (Pfosser et al., 1995; Doležel et al., 1998). 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 к исследуемому образцу и проводили уже полноценное исследование. Для дальнейшей интерпретации данных использовали пики с не менее чем 1000 детектируемых частиц.

Важным этапом в данном исследовании является выбор оптимального стандарта. В качестве стандарта использовали *Pisum sativum* ‘Adagumskiy’ ($2C = 8,0$) (Скапцов и др., 2014).

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 дальнейшего анализа использовали данные, не превышающие среднего значения содержания ДНК образца более чем на 3 % (Kubesova et al., 2010).

Для трансформации данных из логарифмического в линейное представление использовали формулу: $f = 10 X/64$ (Marie, Brown, 1993). Содержание ДНК рассчитывали исходя из формулы $2C = f * M$, 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).

Для изучения использовали пробы мытников, высушенные при помощи силика-геля. Все пробы были отобраны в 2014 г. в Республике Алтай, гербарный материал отдан на хранение в Гербарий Алтайского государственного университета (ALTU).

Всего исследовано 13 проб из 10 видов (табл. 1).

Таблица 1

Исследованные пробы мытников (*Pedicularis* L.)

Вид, число проб	Местонахождение	Коллекторы
<i>P. abrotanifolia</i> Bieb. ex Stev. 1 проба	Кош-Агачский р-н, Южно-Чуйский хр., верх. дол. р. Елангаш, петрофитная степь, 13.08.2014.	Косачев П.А., Иванова М.С.
<i>P. altaica</i> Steph. ex Bunge 2 пробы	Кош-Агачский р-н, лев. бер. р. Чуя в окр. с. Ортолык, 15.08.2014.	Косачев П.А., Иванова М.С.
<i>P. amoena</i> Adams ex Stev. 1 проба	Улаганский р-н, Курайский хр., выше ртутного завода, 11.08.2014.	Косачев П.А., Иванова М.С., Смирнов С.В.
<i>P. brachyostachys</i> Bunge 1 проба	Улаганский р-н, Айгулакский хр., окр. оз. Чойбекколь, 10.08.2014.	Косачев П.А., Иванова М.С.
<i>P. compacta</i> Steph. 1 проба	Шебалинский р-н, Семинский хр., окр. Семинского пер., 08.08.2014.	Косачев П.А., Иванова М.С., Смирнов С.В.
<i>P. lasiostachys</i> Bunge 1 проба	Улаганский р-н, Курайский хр., выше ртутного завода, 11.08.2014.	Косачев П.А., Иванова М.С., Смирнов С.В.
<i>P. myriophylla</i> Pall. 2 пробы	Кош-Агачский р-н, Южно-Чуйский хр., верх. дол. р. Елангаш, петрофитная степь, 13.08.2014.	Косачев П.А., Иванова М.С., Смирнов С.В.
	Кош-Агачский р-н, лев. бер. р. Чуя в окр. с. Ортолык, 15.08.2014.	
<i>P. resupinata</i> L. 1 проба	Онгудайский р-н, пер. Чике-Таман, заросли кустарников, 09.08.2014.	Косачев П.А.
<i>P. tristis</i> L. 1 проба	Улаганский р-н, Айгулакский хр., окр. оз. Чойбекколь, 10.08.2014.	Косачев П.А., Иванова М.С.
<i>P. uliginosa</i> Bunge 2 проба	Улаганский р-н, Айгулакский хр., окр. оз. Чойбекколь, 10.08.2014.	Косачев П.А., Иванова М.С.
	Кош-Агачский р-н, Южно-Чуйский хр., верх. дол. р. Елангаш, петрофитная степь, 13.08.2014	

Результаты исследования и обсуждение

В результате выполнения исследования в области изучения генома алтайских представителей рода *Pedicularis* были установлены следующие значения относительного содержания ДНК (табл. 2; рис. 1–4).

Таблица 2

Содержание ДНК и уровни плоидности мытников (стандарт *Pisum sativum* ‘Adagumskiy’)

Таксон	Содержание ДНК, pg	CV	Уровни плоидности
<i>P. abrotanifolia</i>	5,09	1,9	$2n = 2x$
<i>P. achilleifolia</i>	4,41	1,8	$2n = 2x$
<i>P. altaica</i>	11,53	1,5	$2n = 4x$
	10,52	1,2	
<i>P. amoena</i>	4,29	2,1	$2n = 2x$
<i>P. brachystachys</i>	4,64	1,8	$2n = 2x$
<i>P. compacta</i>	6,07	1,5	$2n = 2x$
<i>P. lasiostachys</i>	4,85	1,6	$2n = 2x$
<i>P. myriophylla</i>	13,20	2,2	$2n = 4x$
	4,64	1,9	$2n = 2x$
<i>P. resupinata</i>	5,05	1,8	$2n = 2x$
	4,85		
<i>P. tristis</i>	4,79	2,0	$2n = 2x$
<i>P. uliginosa</i>	4,81	1,8	$2n = 2x$
	5,67		

Большинство видов рода *Pedicularis* Алтайской горной страны имеют значения $2C$ в пределах 4,29–13,20 пг. Наименьшее содержание ДНК обнаружено у *P. amoena* (4,29 пг), наибольшее – *P. myriophylla* (13,20 пг).

Проведен анализ 13 популяций 10 видов *Pedicularis*, собранных на территории Алтая.

Цитофлюорограммы G_1 пиков мытников представлены на рис. 1–4.

В результате была установлена прямая зависимость размера генома от количества хромосом. Данные исследования позволяют в последующем устанавливать количество хромосом у представителей рода *Pedicularis*, не прибегая к прямому подсчету, основываясь на выводах о прямой зависимости хромосомного состава от размера генома.

Большинство представители имеют набор хромосом $2n = 2x = 16$.

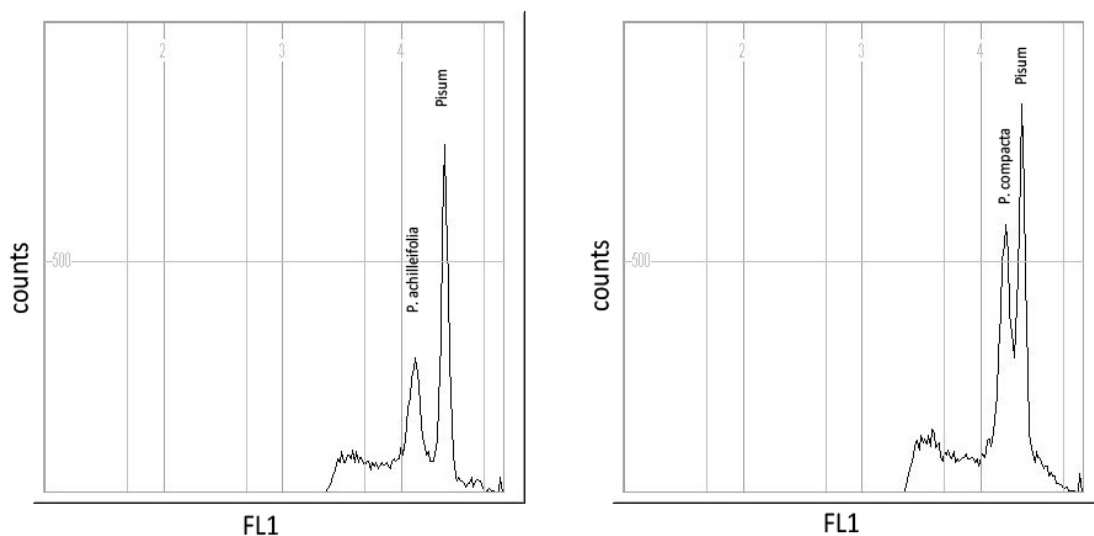


Рис. 1. Цитофлюорограммы G_1 пиков *Pedicularis altaica* и *P. brachystachys* со стандартом *Pisum sativum* ‘Adagumskiy’; $M1 = 205,17$; $M2 = 215,33$ и $M1 = 208,40$; $M2 = 223,52$ соответственно, где M – значение пика.

Здесь и далее (рис. 2–4): Counts – количество клеток, FL1 – интенсивность флюоресценции.

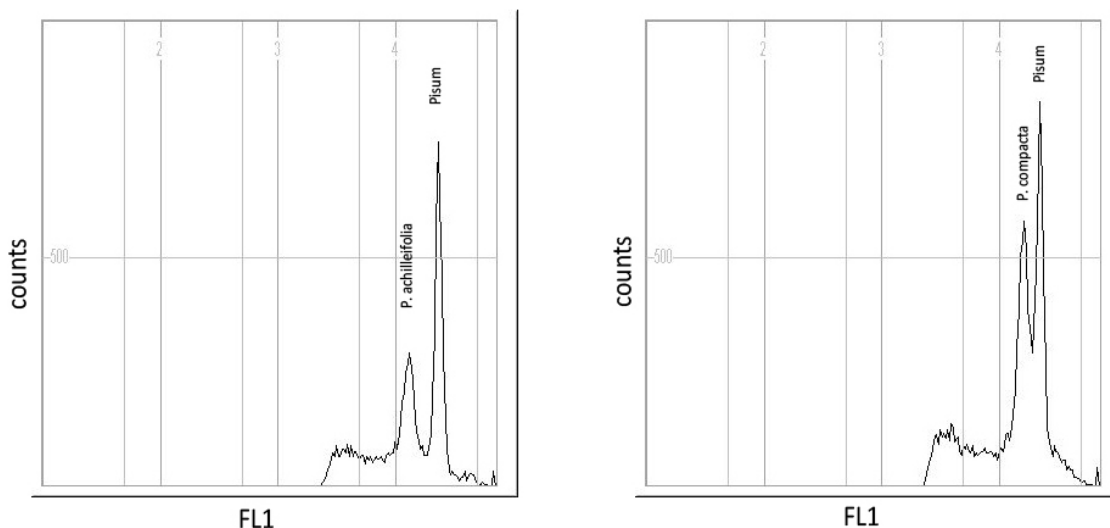


Рис. 2. Цитофлюорограммы G₁ пиков *Pedicularis achilleifolia* и *P. compacta* со стандартом *Pisum sativum* 'Adagumskiy'; M1 = 208,06; M2 = 224,58 и M1 = 214,88, M2 = 222,51 соответственно, где M – значение пика.

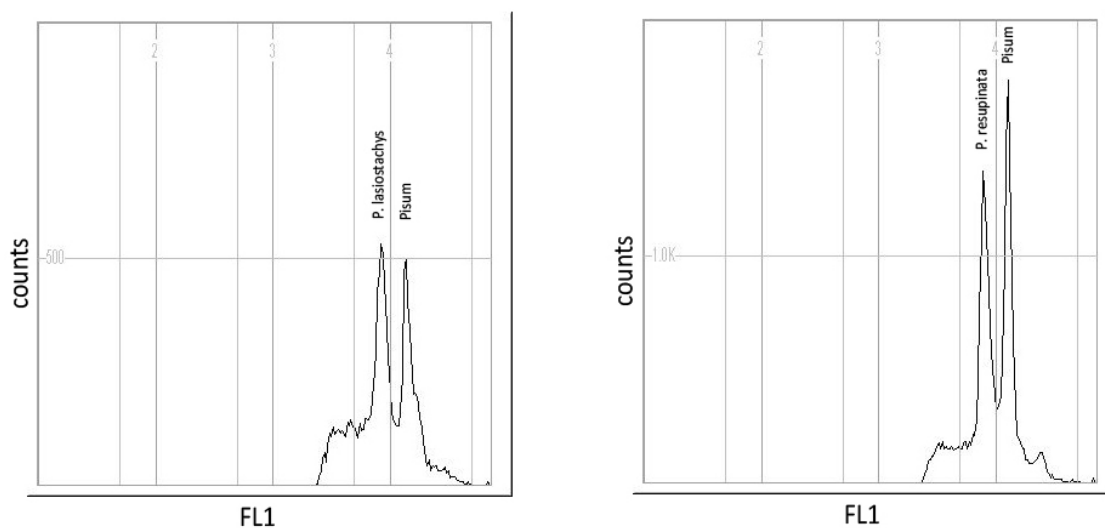


Рис. 3. Цитофлюорограммы G₁ пиков *Pedicularis lasiostachys* и *P. resupinata* со стандартом *Pisum sativum* 'Adagumskiy'; M1 = 195,8; M2 = 209,69 и M1 = 194,4; M2 = 207,17 соответственно, где M – значение пика.

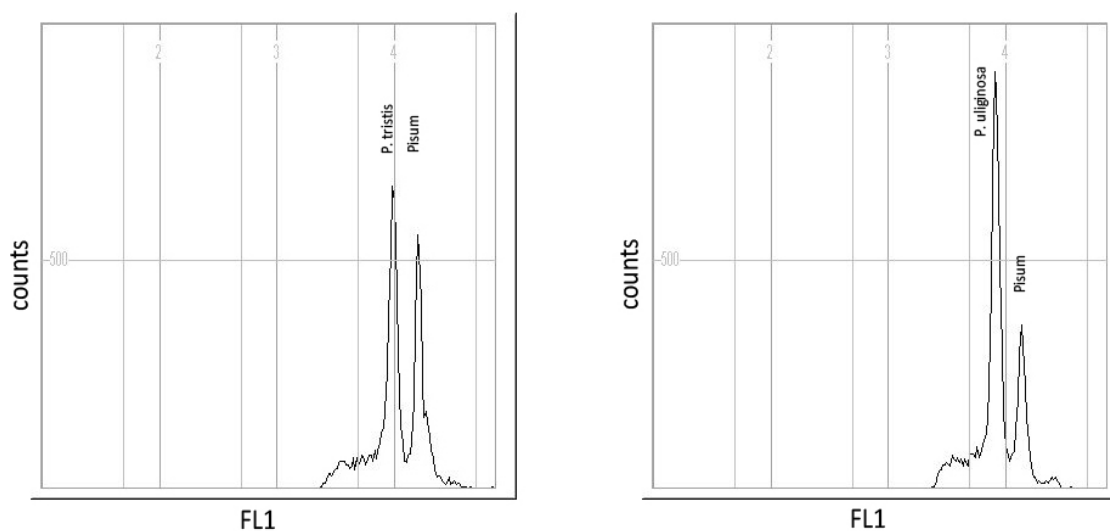


Рис. 4. Цитофлюорограммы G₁ пиков *Pedicularis tristis* и *P. uliginosa* со стандартом *Pisum sativum* 'Adagumskiy'; M1 = 199,73; M2 = 214,03 и M1 = 195,03; M2 = 209,13 соответственно, где M – значение пика.

В двух случаях установлено, что имеется и второй уровень пloidности. Так, *P. altaica* имеет $2n = 4x = 32$, а *P. myriophylla* имеет 2 цитотипа – $2n = 2x$ и $2n = 4x$. Причем, растения, произрастающие на большей высоте над уровнем мирового океана (примерно 2400 м н.у.м.), имеют $2n = 2x$.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 14-04-31536 мол_a.

ЛИТЕРАТУРА

Сканцов 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. – Vol. 17, iss. 3. – С. 72–78.

Bennett M.D., Leitch I.J. Plant DNA C-values database (release 6.0, Dec. 2012). [Электронный ресурс]: База данных содержит сведения о значении C_1 ДНК растений. – Kew, 2012. – Режим доступа: <http://data.kew.org/cvalues/> – Заглав. с экрана. – Яз. англ.

Bennetzen J.L., Kellogg E.A. Do plants have a one-way ticket to genomic obesity? // *Plant Cell*, 1997. – Vol. 9. – P. 1509–1514.

Bennetzen J.L., Ma J.X., Devos K. Mechanisms of recent genome size variation in flowering plants // *Annals of Botany*, 2005. – Vol. 95. – P. 127–132.

Castro M., Castro S., Loureiro J. Genome size variation and incidence of polyploidy in Scrophulariaceae sensu lato from the Iberian Peninsula // *AoB Plants*, 2012: pls037; doi:10.1093/aobpla/pls037

Gregory T.R. Coincidence, coevolution, or causation? DNA content, cell size, and the C-value enigma // *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 2001. – Vol. 76. – P. 65–101.

Dolezel J., Greilhuber J., Lucretti S., Meister A., Lysak M.A., Nardi L., Obermayer R. Plant genome size estimation by flow cytometry: Inter-laboratory comparison // *Annals Botany*, 1998. – 82 (Suppl. A). – P. 17–26.

Lim K.Y., Kovarik A., Matyasek R., Chase M.W., Knapp S., McCarthy E., Clarkson J.J., Leitch A.R. Comparative genomics and repetitive sequence divergence in the species of diploid *Nicotiana* section *Alatae* // *Plant Journal*, 2006. – Vol. 48. – P. 907–919.

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 // *Biol Cell.*, 1993. – 78(1–2). – P. 41–51.

Pfossor 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, No. 4. – P. 387–393. DOI: 10.1002/cyto.990210412.

Ormerod M.G. Analysis of DNA. General method // *Flow Cytometry. A Practical Approach* / M.G. Ormerod [ed.]. Oxford: University Press, 1990. – P. 69–87.

Otto F.J. DAPI staining of fixed cells for high-resolution flow cytometry of nuclear DNA. In: Darzynkiewickz Z., Crissman H.A., eds. // *Methods in cell biology*, 1990. – Vol. 33. – P. 105–110.

SUMMARY

In the work by flow cytometry investigated 24 samples from 10 species in relation to DNA content and ploidy. Species of the genus *Pedicularis* Altai mountain country have values 2C within 4,29–13,20 pg. The lowest DNA content was detected in *P. amoena* (4,29 pg) emissions. The highest – *P. myriophylla* (13,20 pg) emissions. Most of the representatives had a set of chromosomes $2n = 2x = 16$. In two cases it is established that there is a second level of ploidy. Thus, *P. altaica* has $2n = 4x = 32$; *P. myriophylla* has 2 cytotype – $2n = 2x$ and $2n = 4x$.