О. В. Комина, мнс, к. б. н.,

М. С. Воронкова, нс, к. б. н.

ФГБНУ ЦСБС СО РАН, г. Новосибирск

kuznetsova_olga8@mail.ru, bmc_87@mail.ru

УДК 575.113:582.675.1

DOI 10.31676/2073-4948-2018-55-120-123

ИЗУЧЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ЯДЕРНОЙ ДНК ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА *PAEONIA* L. МЕТОДОМ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ

Резюме. Впервые методом проточной цитометрии исследовано относительное содержание ДНК у *Paeonia anomala* L. и *Paeonia hybrida* Pall. и использованы почки возобновления *Рео-ния* как альтернативный вариант органов растений, свободных от ингибиторов окрашивания. Значения относительного содержания ДНК у изученных видов рода *Paeonia* не показали статистически значимых различий, несмотря на значительные морфологические отличия.

Ключевые слова: *Paeonia* L., проточная цитометрия, размер генома, содержание ядерной ДНК.

Summary. For the first time, the relative DNA content of *Paeonia anomala* L. and *Paeonia hybrida* Pall. was studied by flow cytometry and *Paeonia* regeneration buds were used as an alternative variant of plant organs free of stain inhibitors. The values of the relative DNA content in the studied species of the *Paeonia* genus did not show statistically significant differences, despite considerable morphological differences.

Keywords: *Paeonia* L., flow cytometry, genome size, nuclear DNA content.

Введение

Семейство *Paeoniaceae* Rudolphi монотипно, включает в себя только один Срод – *Paeonia* L. [1]. Близкородственные виды *P. anomala* L. и *P. hybrida* Pall. сочетают в себе значительные потенциальные возможности ценных лекарственных и декоративных растений. До настоящего времени ведутся споры об определении и разграничении *P. hybrida* и *P. anomala*. Многочисленные переопределения видов очень затрудняют работу с ними [2].

Метод проточной цитометрии является одним из эффективных современных методов оценки размера генома, результаты которого успешно применяются для оценки генетического разнообразия растительных организмов. Исследования в области оценки относительного содержания ДНК у видов *Paeonia* проводились ранее методом микроденситометрии с окрашиванием по Фельгену [3, 4]. В настоящее время точность многих результатов исследований размера генома, опровергается при повторном анализе [5]. Основными причинами являются неиспользование международных внутренних стандартов, неточности в реакции Фельгена при

использовании метода микроденситометрии, а также наличие вторичных метаболитов в растительном материале, мешающих окрашиванию, которые не были учтены [4].

Цель работы – сравнительное изучение содержания ядерной ДНК у близкородственных видов *P. anomala* и *P. hybrida* методом проточной цитометрии.

Материалы и методы

В работе использовали листья и почки возобновления растений *P. anomala* и *P. hybrida*, произрастающих на интродукционном участке Центрального сибирского ботанического сада СО РАН, коллекции живых растений в открытом и закрытом грунте (УНУ № USU 440534). Все растения привезены из естественных мест произрастания (Кемеровская обл., Республика Алтай, Алтайский край). Для каждого вида было исследовано по 10 растений из каждой популяций. Все анализы были проведены в трех повторностях.

В качестве внутреннего стандарта применяли листья *Pisum sativum* cv. Stirad (содержание ядерной ДНК 2С = 9,09 пг) [6], выращенного из семян, полученных из лаборатории молекулярной цитогенетики и цитометрии Института экспериментальной ботаники Академии наук Чехии. Анализ проводили на приборе CyFlow Space (Германия, Sysmex Partec) с лазерным источником излучения 532 нм. Окрашивание изолированных ядер проводили йодидом пропидия. Листья или почки возобновления измельчали лезвием вместе с соответствующим количеством внутреннего стандарта в 500 мкл охлажденного буфера (Nuclei Extraction Buffer) по протоколу производителя с добавлением 10 мкл β-меркаптоэтанола (Испания, Германия; PanReac AppliChem,) в пластиковых чашках Петри. Инкубирование образцов проводили при комнатной температуре в течение 2 мин. Образцы фильтровали через одноразовый фильтр Cell Trics Partec 50 мкм (Германия, Sysmex Partec) и добавляли 2 мл раствора для окрашивания, содержащего Staining Buffer (Германия, Sysmex Partec), йодид пропидия (50 мкг/мл) и RNase A (50 мкг/мл). Окрашивание проводили при комнатной температуре в защищенном от света месте в течение 20 минут. Подготовленные образцы хранили в холодильнике не более 2 часов. Относительное содержание ядерной ДНК (2С) рассчитывали исходя из линейной зависимости между флуоресцентными сигналами от окрашенных ядер исследованных образцов и внутреннего стандарта.

Результаты и обсуждение

Известно, что присутствие вторичных метаболитов (фенолы, танины, кофеин) в цитозоле клеток ингибирует окрашивание йодидом пропидия. Добавление в буфер таких антиоксидантов, как поливинилпирролидон, β-меркаптоэтанол, улучшает качество гистограмм, но не всегда гарантирует правильное измерение содержания ДНК, и может произойти

стехиометрическая ошибка в проточной цитометрической оценке содержания ДНК. Использование растительного органа или части, свободной от ингибиторов, является лучшей альтернативой для оценки размера генома. Например, для березы использовались молодые ветви; также есть данные о том, что листья могут быть заменены семенами для оценки размера генома [7].

В литературе широко освещены лекарственные свойства *P. anomala* и *P. hybrida*, а также отмечено, что надземная часть содержит сапонины, кумарины, дубильные вещества, флавоноиды [8]. Так, в эксперименте с листьями наблюдалось плохое качество гистограмм, даже при добавлении антиоксидантов в экстрагирующий буфер. Семена пионов имеют маленький зародыш (1,30 x 0,60 мм), не позволяющий набрать достаточное количество ядер для анализа. В связи с этим при поиске органов растений, свободных от ингибиторов, был найден альтернативный вариант листовому и семенному материалу – это почки возобновления *Paeonia*.

Наши результаты, полученные с помощью проточной цитометрии, значительно отличаются от ранее представленных в литературе [4], проведенных методом микроденситометрии с окрашиванием по Фельгену (табл.). По литературным данным, относительное содержание ДНК *P. anomala* и *P. hybrida* отличается в 1,1 раза. Исследования, проведенные нами на почках возобновления данных растений, показали, что значения содержания ДНК у изученных видов рода *Paeonia* не показывают статистически значимых различий (*P. anomala* – $2C = 25,45 \pm 0,022$ пг; *P. hybrida* – $2C = 25,46 \pm 0,025$ пг), хотя имеются значительные морфологические отличия. *P. hybrida* имеет более компактный габитус, меньшую ширину долей (5, 10, 15 мм) рассеченных листовых пластинок, чем *P. anomala*. Корневые клубни *P. hybrid* овальные, скученно расположены на каудексе. Подземная часть *P. anomala* представлена каудексом, переходящим в веретеновидно-цилиндрический сильно утолщенный корень, с возрастом растения (g1) плохо различимый среди придаточных и боковых корней. *P. hybrida* хорошо размножается корневыми клубнями [2] в отличие от *P. anomala*, который данным способом не размножается.

Таблица.

Содержание ядерной ДНК в почках возобновления *Paeonia*

Вид	<i>P. anomala</i>	<i>P. hybrida</i>
Содержание ядерной ДНК $2C \pm SD^*$ (пг)	25,45 $\pm$ 0,022	25,46 $\pm$ 0,025
Содержание ядерной ДНК 1C (пг)	12,72	12,73
Размер генома** 1C (Мбп)	12445,05	12449,94
Содержание ядерной ДНК 1C (пг)***	19,05	17,38

Примечание: *SD – стандартное отклонение (Std. Dev.); **1 пг ДНК = 978 Мбп [9]; ***по литературным данным [4].

Выводы

Впервые для исследования содержания ядерной ДНК использованы почки возобновления *Рaeonia*, как альтернативный вариант органов растений, свободных от ингибиторов. Значения относительного содержания ДНК у изученных видов рода *Рaeonia* не показали статистически значимых различий, несмотря на имеющуюся значительную морфологическую разность.

Список используемой литературы

1. **Hong D. Y.** Peonies of the world. Pt. 2: Polymorphism and diversity. – London: Kew Publ., 2011. – 112 p.
2. **Верещагина И. В.** Дикорастущие пионы Алтая. – Барнаул: Изд-во АГУ, 2003. – 230 с.
3. **Пунина У. О., Александрова Т. В.** Объем хромосом и относительное количество ДНК у кавказских представителей рода *Рaeonia* (*Рaeoniaceae*) // Бот. Журнал, 1992. – №1. – С. 16-23.
4. **Bennett M., Bhandoland P., Leitch I.** Nuclear DNA Amounts in Angiosperms and their Modern Uses – 807 New Estimates // Annals of Botany, 2000. – Vol. 86 – № 4. – P. 859-909.
5. **Smarda P., Bures P.** Understanding intraspecific variation in genome size in plants. – Praha: Preslia, 2010. – № 82. – P. 41-61.
6. **Doležel J., Greilhuber J., Lucretti S., Meister A., Lysák M. A., Nardi L., Obermayer R.** Plant Genome Size Estimation by Flow Cytometry: Inter-laboratory Comparison // Annals of Botany, 1998. – Vol. 82 – № 1. – P. 17-26.
7. **Sliwinska E., Zielinska E., Jedrzejczyk I.** Are seeds suitable for flow cytometric estimation of plant genome size? // Cytometry, 2005. – Vol. 64 – № 2. – P. 72-79.
8. Растительные ресурсы России: Дикорастущие цветковые растения, их компонентный состав и биологическая активность. – СПб; М.: Товарищество научных изданий КМК, 2008. – Т. 1. – 421 с.
9. **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.

O. V. Komina, M. S. Voronkova

Central Siberian botanical garden, Siberian branch, RAS, Novosibirsk, Russia

STUDYING OF THE NUCLEAR DNA CONTENT IN REPRESENTATIVES OF THE GENUS *PAEONIA* L. BY FLOW CYTOMETRY