

ИССЛЕДОВАНИЕ РАЗМЕРА ГЕНОМА ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА
POTENTILLA L. (ROSACEAE JUSS.)

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

Южно-Сибирский ботанический сад, Алтайский государственный университет, пр. Ленина 61, 656049, Барнаул, Россия

С помощью метода проточной цитофлуориметрии впервые получены результаты о содержании ДНК и размере генома 13 представителей рода *Potentilla* L. В результате анализа размера генома были выявлены закономерности отношения плоидности и размера генома видов. На основании полученных данных установлено, что между размером генома и количеством хромосом у видов рода *Potentilla* наблюдается линейная зависимость.

Ключевые слова: *Potentilla*, проточная цитометрия, размер генома, плоидность

STUDY OF GENOME SIZE REPRESENTATIVES
OF THE GENUS *POTENTILLA* L. (ROSACEAE JUSS.)

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

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

*Corresponding author. Email: alekseikechaikin@mail.ru

In our study, 15 representatives of the genus *Potentilla* L. were analyzed to obtain the relative DNA content and monoploid genome size in the seeds by flow cytometry method. For these *Potentilla* species, except *P. argentea* and *P. norvegica*, DNA content and genome size are revealed for the first time. As a result, the following data were obtaining: representatives of the older section *Desertae* are diploids with the large monoploid genome size. The genome of *P. asiatica* (Chrysanthae section) are decrease up to 0.35 pg, while the ploidy is increased to 4. Representatives of the *Multifidae* and *Supinae* section are presented with tetra- and hexaploid species with the 0.3 pg of the monoploid genome size. In section *Tanacetifoliae* are observed a further decrease of the genome size, representatives basically tetraploids. Thus, in the genome size evolution of a *Potentilla* genera are observed the increase of ploidy with significant reductions in monoploid genome size. This fact proves the general theory of genome evolution of angiosperms, directed towards its reduction. Linear regression analysis was showed a positive correlation between chromosome number and genome size of the representatives of the *Potentilla* genera. This suggests that between genome size and the number of chromosomes in *Potentilla* species are linear dependence. Pearson correlation analysis confirmed this result: the correlation coefficient is 0.97 at $P < 0.05$.

Key words: *Potentilla*, flow cytometry, genome size, ploidy

Citation:

Kechaykin, A.A., Skaptsov, M.V., Smirnov, S.V., Kutsev, M.G., Shmakov, A.I. (2016). Study of genome size representatives of the genus *Potentilla* L. (Rosaceae Juss.).

Biological Bulletin of Bogdan Chmelnytskyi Melitopol State Pedagogical University, 6 (3), 229–233.

Поступило в редакцию / Submitted: 10.11.2016

Принято к публикации / Accepted: 01.12.2016

crossref <http://dx.doi.org/10.15421/201690>

© Kechaykin, Skaptsov, Smirnov, Kutsev, Shmakov, 2016

Users are permitted to copy, use, distribute, transmit, and display the work publicly and to make and distribute derivative works, in any digital medium for any responsible purpose, subject to proper attribution of authorship.



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 3.0. License

ВВЕДЕНИЕ

К настоящему времени наиболее популярным и интересным в современной биологии становится исследование размера генома. Одним из методов изучения размера генома растений является метод проточной цитометрии, основанный на флуоресценции изолированных ядер, выделенных из клеток. Согласно основной теории эволюции генома покрытосеменных – уменьшению размера генома в процессе видообразования (Leitch et al., 1998; Soltis et al., 2003), с помощью метода проточной цитометрии можно выявить наиболее древние элементы в отдельных семействах и родах. Изучением содержания ДНК представителей семейства Rosaceae Juss. ученые занимаются не одно десятилетие (Dickson et al., 1992; Talent & Dickinson, 2005). Однако лишь совсем недавно стали появляться конкретные работы, посвященные исследованию размера генома рода *Potentilla* L. его отдельных таксонов (Dobeš et al., 2013; Dobeš et al., 2015). На данный момент из всех видов рода *Potentilla* размер генома выявлен лишь у 37 таксонов (Dobeš et al., 2015). В настоящей работе для 13 видов рода *Potentilla* содержание ДНК определено впервые.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Содержание ДНК исследуемых лапчаток (13 видов и 2 подвида) определяли с использованием метода проточной цитометрии с окраской изолированных ядер пропидий йодидом (PI). Семена раздавливали в ступке и затем измельчали при помощи лезвия в 1 мл охлажденного буфера Seed buffer (Matzk et al., 2000). Образцы фильтровали через нейлоновую мембрану с размером пор 50 мкм и центрифугировали при 0,2 g, 2 минуты. Осадок растворяли в 1 мл Seed buffer дополнительно содержащим PI (50 мкг/мл), РНаза (50 мкг/мл) и β-меркаптоэтанол (1 мкл/мл). 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 26 не менее чем 1000 детектируемых частиц. В качестве внешних стандартов использовали *Pisum sativum* L. cv 'Glorioza' (2C=9.38 пг) (Скапцов и др., 2014) и *Glycine max* (L.) Merr. cv 'Polanka' (2C=2.50 пг) (Doležel et al., 1994).

Результаты флуоресценции 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 флуоресценции (логарифмическая шкала). Измерения производили не менее 9 раз с периодичностью три измерения в сутки для каждого образца. Для дальнейшего анализа использовали результаты, 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), где 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). Содержание ДНК рассчитывали, исходя из формулы $2C = f \cdot M$, где f – индекс (разница между средними значениями пика образца и стандарта в линейной шкале); M – среднее значение пика образца. Полученные результаты обрабатывали при помощи программы Statistica 8.0 (StatSoft Inc.) и штатного программного обеспечения проточного цитометра CyView (Partec, GmbH).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Из семян (собранных на территории Алтайской горной страны), с помощью метода проточной цитометрии получены результаты об относительном содержании ДНК и размере моноплоидного генома 15 представителей рода *Potentilla* (табл. 1). Для данных лапчаток, кроме *P. argentea* и *P. norvegica*, содержание ДНК и размер генома выявлены впервые для науки. В результате анализа размера генома были выявлены некоторые закономерности отношения ploидности и размера генома видов *Potentilla gobica* и *P. desertorum*, относящиеся к секции *Desertae* и произрастающие в нагорных территориях Азии, являются диплоидами. Они не имеют гибридного происхождения и характеризуются высоким размером моноплоидного генома: 0.51 и 0.42 пг соответственно. У тетраплоида *P. asiatica* секции *Chrysanthae* наблюдается снижение размера моноплоидного генома до 0.35 пг. Представители секции *Supinae* характеризуются распределением размера моноплоидного генома в диапазоне 0.28–0.34 пг и являются в основном тетра- и гексаплоидами. Из включенных в анализ представителей секции *Multifidae* большинство имеют гибридное происхождение, представлены гекса- и тетраплоидами с распределением размера моноплоидного генома в диапазоне 0.28–0.30 пг (табл. 1). Виды из секции *Tanacetifoliae* и *Potentilla* имеют распределение моноплоидного генома в диапазоне 0.23–0.30 пг и представлены тетраплоидами.

На основании полученных результатов установлено, что между размером генома и количеством хромосом у видов лапчаток наблюдается линейная зависимость. Об этом свидетельствует и линейный регрессионный анализ между хромосомами и размером генома, проявивший положительную корреляцию, что наглядно показывает высокий уровень r^2 (0.95) (рис. 1). Анализ корреляций Пирсона подтвердил

данный результат: коэффициент корреляции равен 0.97 при $P < 0.05$. Данные по хромосомным числам подтверждены методами микроскопии.

Основной теорией эволюции генома покрытосеменных в современной ботанике, является предположение об уменьшении размера генома в процессе видообразования (Leitch et al., 1998; Soltis et al., 2003). Исследования, основанные на цитотипировании и анализе плоидности множества групп цветковых, в той или иной степени, подтверждают данную теорию (Jonston et al., 2005; Leitch et al., 2007; Шереметьев и др., 2011). Исходя из полученных нами данных, становится возможным предположить, что эволюция генома рода *Potentilla*, протекала в сторону снижения размера генома относительно основного хромосомного числа, что соответствует основной теории эволюции генома покрытосеменных – уменьшение размера в процессе видообразования. Такие виды как *P. gobica* и *P. desertorum*, выделенные в самостоятельную секцию *Desertae*, имеют наибольший размер моноплоидного генома. Это также поддерживает мнение Р.В. Камелина о том, что виды секции *Desertae* являются наиболее древними среди других травянистых групп рода *Potentilla* (Камелин, 1998).

Таблица 1. Примеры размера генома и отношения содержания ДНК к основному числу хромосом некоторых представителей рода *Potentilla*

№. Таксон	Секция	Плоидность (x)	2С, пг	1Сх, пг	Известное число хромосом (2n)
1. <i>P. Gobica</i>	Des.	2	1.03	0.51	–
2. <i>P. Desertorum</i>		2	0.84	0.42	14, 28
3. <i>P. Asiatica</i>	Chrys.	4	1.40	0.35	42
4. <i>P. Norvegica</i>		6	1.84	0.31	56, ≈ 63, ≈ 70
5. <i>P. norvegica ssp. ruthenica</i>	Sup.	6	1.77	0.29	–
6. <i>P. Intermedia</i>		4	1.37	0.34	35, 42, 56
7. <i>P. supina ssp. paradoxa</i>		6	1.83	0.31	35, 38-40, 42
8. <i>P. tobolensis</i>	Mult.	4	1.13	0.28	–
9. <i>P. agrimonioides</i>		6	1.70	0.28	42, 49-50
10. <i>P. jensejensis</i>	Pot.	4	1.20	0.30	–
11. <i>P. rigidula</i>		6	1.70	0.28	–
12. <i>P. turczaninowiana</i>	Aur.	6	1.85	0.31	–
13. <i>P. astragalifolia</i>	Tanac.	4	0.95	0.23	–
14. <i>P. tanacetifolia</i>		4	1.11	0.27	28
15. <i>P. argentea</i>	Pot.	4	1.20	0.30	≈ 28, 42

Прим.: 2С – относительное содержание ДНК; 1Сх – размер моноплоидного генома, отношение относительного содержания ДНК к основному хромосомному числу.

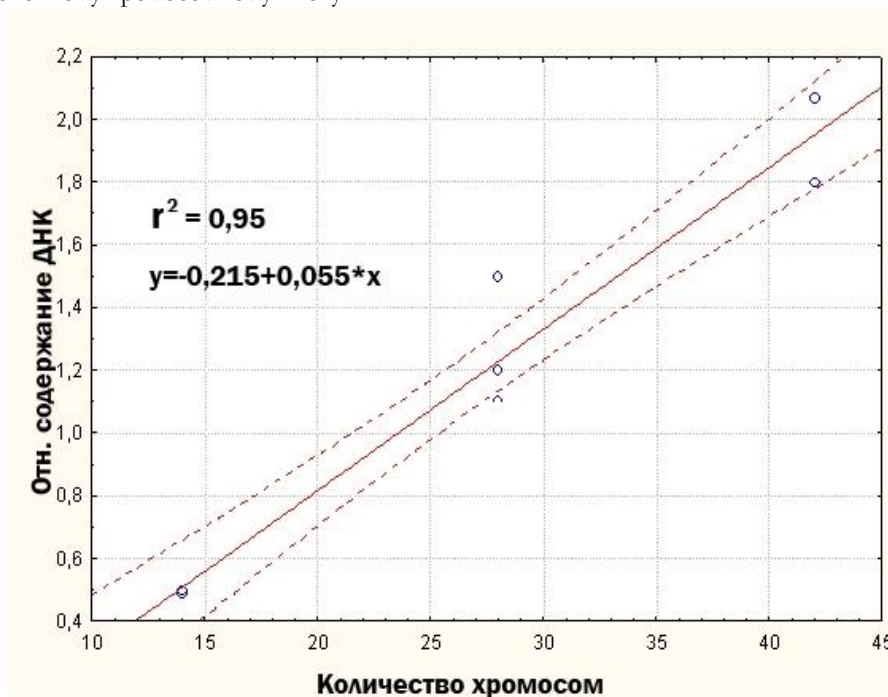


Рис. 1. Линейный регрессионный анализ между хромосомами и размером генома представителей рода *Potentilla*.

ВЫВОДЫ

В результате проведенных исследований получены следующие данные. Представители более древней секции *Desertae* являются диплоидами с крупным размером моноплоидного генома. В геноме *P. asiatica* секции *Chrysanthae* наблюдается снижение размера моноплоидного генома до 0.35 пг, тогда как плоидность увеличивается до 4. Секции *Multifidae* и *Supinae* представлены тетра- и гексаплоидами со средним размером моноплоидного генома 0.3 пг. В секции *Tanacetifoliae* наблюдается дальнейшее снижение размера генома, представители имеют плоидность 4. Таким образом, в процессе эволюции генома *Potentilla* происходило увеличение плоидности со значительным снижением размера моноплоидного генома. Данный факт подтверждает общую теорию эволюции генома покрытосеменных растений, направленную в сторону его уменьшения (Leitch et al., 1998; Soltis et al., 2003).

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при поддержке гранта Российского фонда фундаментальных исследований, проект № 14-04-00721.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

- Камелин Р.В. Материалы по истории флоры Азии (Алтайская горная страна). – Барнаул: Изд-во Алт. ун-та, 1998. – 240 с.
- 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(3). – С. 72–78. DOI: 10.14258/turczaninowia.17.3.8
- Шереметьев С.Н., Гомалей Ю.В., Слемнев Н.Н. Направления эволюции генома покрытосеменных // *Цитология*, 2011. – Т. 53(3). – С. 295–312.
- Dickson E.E., Arumuganathan K., Kresovich S., Doyle J.J. Nuclear DNA content variation within the Rosaceae // *American Journal of Botany*, 1992. – Vol. 79. – P. 1081–1086.
- Dobeš C., Lückl A., Hülber K., Paule J. Prospects and limits of the flow cytometric seed screen – insights from *Potentilla sensu lato* (*Potentilleae*, Rosaceae) // *New Phytologist*, 2013. – Vol. 198. – P. 605–616. DOI: 10.1111/nph.12149
- Dobeš C., Lückl A., Kausche L., Scheffknecht S., Prohaska D., Sykora C., Paule J. Parallel origins of apomixis in two diverged evolutionary lineages in tribe *Potentilleae* (Rosaceae) // *Botanical Journal of the Linnean Society*, 2015. – Vol. 177. – P. 214–229. DOI: 10.1111/boj.12239
- 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. – P. 351–357.
- Johnston J.S., Pepper A.E., Hall A.E., Chen Z.J., Hodnett G., Drabek J., Lopez R., Price H.J. Evolution of genome size in Brassicaceae // *Annals of Botany*, 2005. – Vol. 95. – P. 229–235. DOI: 10.1093/aob/mci016
- 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.
- Leitch I.J., Beaulieu J.M., Cheung K., Hanson L., Lysak M.A., Fay M.F. Punctuated genome size evolution in Liliaceae // *Journal of Evolutionary Biology*, 2007. – Vol. 20. – P. 2296–2308. DOI: 10.1111/j.1420-9101.2007.01416.x
- Leitch I.J., Chase M.W., Bennett M.D. Phylogenetic analysis of DNA C-values provides evidence for a small ancestral genome size in flowering plants // *Annals of Botany*, 1998. – Vol. 82 (Suppl. A). – P. 85–94.
- 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. (2000) An efficient screen for reproductive pathways using mature seeds of monocots and dicots // *The Plant Journal*, 2000. – Vol. 21. – P. 97–108.
- Soltis D.E., Soltis P.S., Bennett M.D., Leitch I.J. Evolution of genome size in the angiosperms // *American Journal of Botany*, 2003. – Vol. 90. – P. 1596–1603. DOI: 10.3732/ajb.90.11.1596
- Talent N., Dickinson T.A. Polyploidy in *Crataegus* and *Mespilus* (Rosaceae, Maloideae): evolutionary inferences from flow cytometry of nuclear DNA amounts // *Canadian Journal of Botany*, 2005. – Vol. 83. – P. 1268–1304. DOI: 10.1139/b05-088

REFERENCES

- Dickson, E.E., Arumuganathan, K., Kresovich, S., Doyle, J.J. (1992). Nuclear DNA content variation within the Rosaceae. *American Journal of Botany*, 79, 1081–1086.
- Dobeš, C., Lückl, A., Hülber, K., Paule, J. (2013). Prospects and limits of the flow cytometric seed screen – insights from *Potentilla* sensu lato (*Potentilleae*, Rosaceae). *New Phytologist*, 198, 605–616. DOI: 10.1111/nph.12149
- Dobeš, C., Lückl, A., Kausche, L., Scheffknecht, S., Prohaska, D., Sykora, C., Paule, J. (2015). Parallel origins of apomixis in two diverged evolutionary lineages in tribe *Potentilleae* (Rosaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 177, 214–229. DOI: 10.1111/boj.12239
- Doležel, J., Doleželová, M., Novak, F.J. (1994). Flow cytometric estimation of nuclear DNA amount in diploid bananas (*Musa acuminata* and *M. balbisiana*). *Biologia Plantarum*, 36, 351–357.
- Johnston, J.S., Pepper, A.E., Hall, A.E., Chen, Z.J., Hodnett, G., Drabek, J., Lopez, R., Price, H.J. (2005). Evolution of genome size in Brassicaceae. *Annals of Botany*, 95, 229–235. DOI: 10.1093/aob/mci016
- Kamelin, R.V. (1998). Materials on the history of Asian flora (Altai Mountain Country). Barnaul: Altai State University. (In Russian).
- 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.
- Leitch, I.J., Beaulieu, J.M., Cheung, K., Hanson, L., Lysak, M.A., Fay, M.F. (2007). Punctuated genome size evolution in Liliaceae. *Journal of Evolutionary Biology*, 20, 2296–2308. DOI: 10.1111/j.1420-9101.2007.01416.x
- Leitch, I.J., Chase, M.W., Bennett, M.D. (1998). Phylogenetic analysis of DNA C-values provides evidence for a small ancestral genome size in flowering plants. *Annals of Botany*, 82(Suppl. A), 85–94.
- Marie, D., Brown, S.C. (1993). A cytometric exercise in plant DNA histograms, with 2C values for 70 species. *Biology of the Cell*, 78, 41–51. DOI:10.1016/0248-4900(93)90113-S
- Matzk, F., Meister, A., Schubert, I. (2000). An efficient screen for reproductive pathways using mature seeds of monocots and dicots. *The Plant Journal*, 21(1), 97–108.
- Sheremetiev, S.N., Gamalei, Yu.V., Slemnev, N.N. (2011). Trends of angiosperm genome evolution. *Tsitologiya*, 53(3), 295–312. (In Russian).
- 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). DOI: 10.14258/turczaninowia.17.3.8
- Soltis, D.E., Soltis, P.S., Bennett, M.D., Leitch, I.J. (2003) Evolution of genome size in the angiosperms. *American Journal of Botany*, 90, 1596–1603. DOI: 10.3732/ajb.90.11.1596
- Talent, N., Dickinson, T.A. (2005). Polyploidy in *Crataegus* and *Mespilus* (Rosaceae, Maloideae): evolutionary inferences from flow cytometry of nuclear DNA amounts. *Canadian Journal of Botany*, 83, 1268–1304. DOI: 10.1139/b05-088