

ZASTOSOWANIE CYTOMETRII PRZEPŁYWOWEJ DO OZNACZANIA ZAWARTOŚCI DNA U ROŚLIN

ESTIMATION OF DNA CONTENT IN PLANTS USING FLOW CYTOMETRY

Elwira ŚLIWIŃSKA

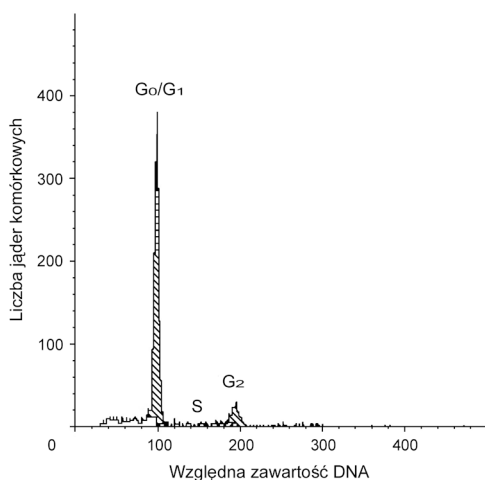
Zakład Biologii Molekularnej i Cytometrii, Katedra Genetyki i Hodowli Roślin,
Uniwersytet Techniczno-Przyrodniczy im. J.J. Śniadeckich w Bydgoszczy

Streszczenie: Cytometria przepływowa wykorzystywana jest w badaniach roślin do oznaczania ploidalności, aktywności cyklu komórkowego, poziomu endoreplikacji oraz wielkości genomu. Analizie można poddawać niemal każdy rodzaj materiału roślinnego, włączając ten pochodzący z kultur tkankowych. Przedstawiono protokoły przygotowywania prób i przeprowadzania analiz tkanek roślinnych, a także podano składy buforów do izolacji i wybarwiania jąder.

Summary: Flow cytometry is applied to plant research for the estimation of ploidy, cell cycle activity, endoreplication level and genome size. Almost all tissues and organs can be analyzed, including those originated from *in vitro* culture. Protocols for sample preparation and flow cytometric analyses of different plant tissues are described, and recipes are given for isolation/staining buffers.

WSTĘP

Cytometria przepływowa (FCM) jest szeroko stosowana przez cytogenetyków, botaników, systematyków, biotechnologów, hodowców roślin i producentów nasion do oznaczania zawartości DNA i badania cyklu komórkowego w różnych tkankach roślinnych [22, 25]. Stosując tę metodę określa się wielkość genomu i ploidalność roślin, poziom endoreplikacji oraz proporcję jąder będących w określonych fazach cyklu komórkowego. Do tego rodzaju analiz wykorzystuje się pomiar jednego parametru (fluorescencję pojedynczego fluorochromu), a dane gromadzone są w postaci histogramu (ryc. 1). Najczęściej stosowanymi barwnikami fluorochromowymi są indolo-4',6-dwuamidyno-2-fenyloidyna – DAPI (przyłączająca się do par A-T w DNA) oraz jodek propidyny – PI (interkalujący pomiędzy nici dwuniciowych struktur kwasów nukleinowych), jakkolwiek można też wykorzystywać inne barwniki łączące



RYCINA 1. Histogram zawartości DNA w jądrach liścia diploidalnej papryki (zaznaczono części histogramu odpowiadające określonym fazom cyklu komórkowego, z zawartością DNA: $2C - G_0/G_1$, pomiędzy $2C$ a $4C - S$ i $4C - G_2$)

material roślinny poddaje się izolacji protoplastów lub jąder. Ze względu na dłuższy czas i wyższe koszty izolacji protoplastów, najczęściej z tkanek roślinnych izoluje się jądra komórkowe [10] i ten sposób przygotowania prób został uwzględniony w przedstawionych poniżej protokołach. W przypadku wykorzystywania protoplastów należy pamiętać, że powinny być one świeżo wyizolowane (pojedyncze, całkowicie pozbawione ściany komórkowej), z nieuszkodzoną błoną komórkową.

Przedstawione tu protokoły zostały opracowane dla cytometrów typu Partec (Münster, Niemcy; www.partec.com), ale mogą być także stosowane przy pomiarach z użyciem innych jedno- lub wieloparametrycznych cytometrów, zarówno tych wyposażonych w laser, jak i tych z lampą rtęciową.

BADANIE MATERIAŁU ROŚLINNEGO ZA POMOCĄ CYTOMETRII PRZEPŁYWOWEJ

Ploidalność

Oznaczanie ploidalności jest to najczęściej wykorzystywana w badaniach roślinnych aplikacja cytometrii przepływowej. Kontrolę cytometryczną wykonuje się rutynowo w hodowli roślin poliploidalnych, np. buraka cukrowego [23]. W przypadku tego gatunku triploidalne ($3x$) heterozyjne odmiany powstają przez krzyżowanie diploidalnej ($2x$) linii matecznej z tetraploidalnym ($4x$) zapylaczem; w procesie hodowlanym oznacza się ploidalność komponentów do krzyżowania, próbnych mieszańców, a także partii wyprodukowanych nasion (ryc. 2). FCM jest także szeroko wykorzystywana do określania ploidalności materiału roślinnego rosnącego w kulturach *in vitro*

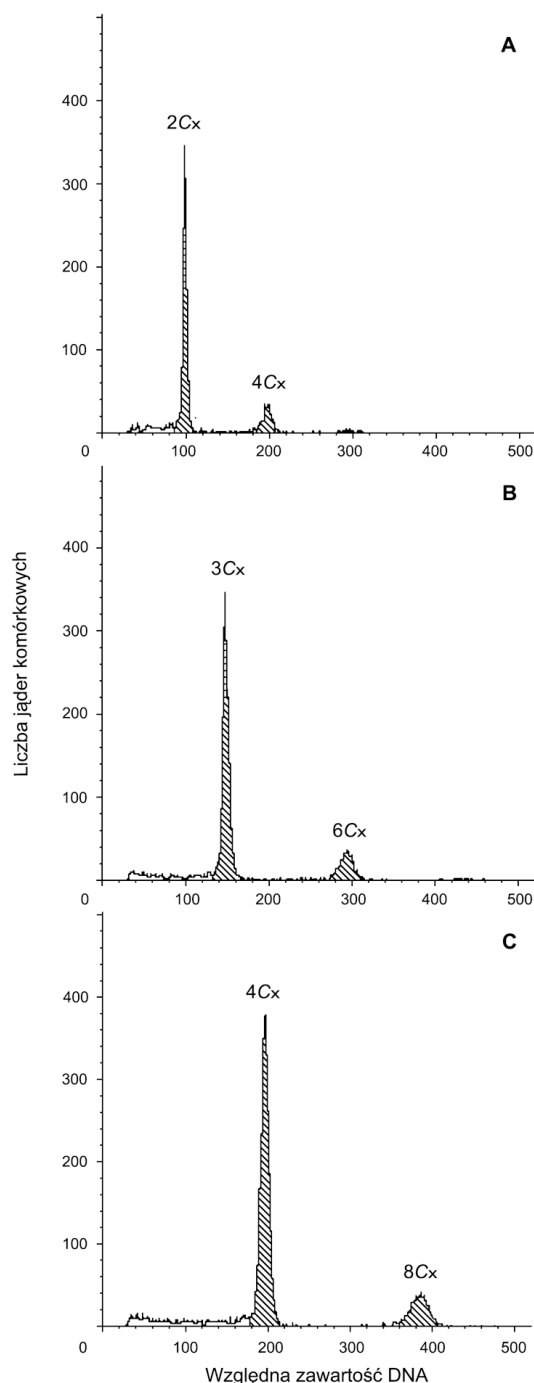
się z DNA, jak np. Hoechst 33258, bromek etydy (EB), mitamycynę (MI), czy oranż akrydyny (AO). Materiałem do badań mogą być dowolne części roślin zawierające jądra komórkowe, np. liść, liścień, hipokotyl, łodyga, płatek korony, pyłek, korzeń, zarodek, bielmo. Do określania ploidalności i wielkości genomu najczęściej używa się takich organów/tkanek, w których większość jąder jest w fazie G_0/G_1 cyklu komórkowego, np. młode liście, części suchych nasion. Analizie cytometrycznej mogą być poddawane tkanki świeże, zamrożone, utrwalone, a nawet wysuszone, jakkolwiek najszybsze i najbardziej wiarygodne są pomiary prowadzone z użyciem świeżych tkanek.

Ponieważ do przeprowadzenia pomiaru cytometr wymaga obecności w zawiesinie pojedynczych cząstek, przed analizą ma-

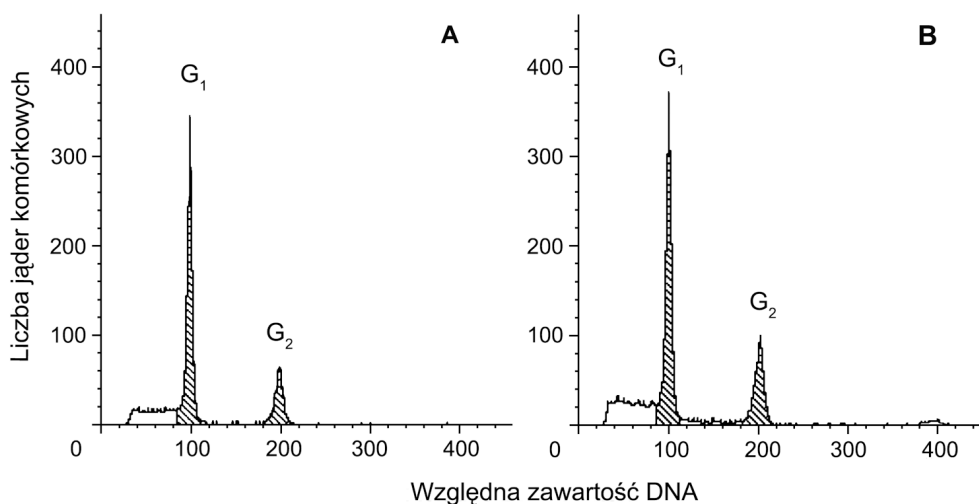
(roślinek, kalusa, zawieszin komórkowych, zarodków somatycznych), w którym wielkość genomu może ulec zmianie w wyniku wystąpienia zmienności somaklonalnej, oraz (di)-haploidów i mieszańców somatycznych [5, 25, 30]. Cytometria przepływowa jest alternatywą dla tradycyjnego liczenia chromosomów z zastosowaniem mikroskopu świetlnego oraz dla stosowania kryteriów pomocniczych (liczby chloroplastów w komórkach przysparkowych, długości szparek, średnicy pyłku, liczby porusów), jest jednak od tych metod szybsza i dokładniejsza [4]. Ma również tę dodatkową zaletę, że można przy jej stosowaniu zidentyfikować miksploidy.

Aktywność cyklu komórkowego

Komórki w aktywnie rosnących częściach roślin cyklicznie się dzielą. Po podziale mitotycznym (M), przechodzą pierwszą fazę wzrostu (G_1), następnie fazę syntezy DNA (S) i drugą fazę wzrostu (G_2). Diploidalne ($2x$) komórki w fazie G_1 zawierają w jądrze $2C$ DNA (x , C – patrz Definicje), w fazie G_2 – $4C$, a w fazie S – pośrednią między $2C$ i $4C$ [8]. Komórki nieaktywne mitotycznie znajdują się w fazie G_0 . Poszczególne fazy cyklu komórkowego mogą być wyznaczane za pomocą FCM (ryc. 1), co umożliwia określenie aktywności tego procesu w poszczególnych organach/tkankach roślinnych. Pomiary takie wykorzystuje się np. w nasiennictwie. Wyznaczenie proporcji między komórkami będącymi w różnych stadiach replikacji jądrowej dostarczą informacji o stanie fizjologicznym nasienia, przydatnych do określania fazy rozwo-



RYCINA 2. Histogramy zawartości DNA w jądrach korzeni zarodkowych nasion buraka cukrowego: A – diploidalnego, B – triploidalnego, C – tetraploidalnego (piki G_0/G_1 odpowiednio w kanałach 100, 150 i 200)

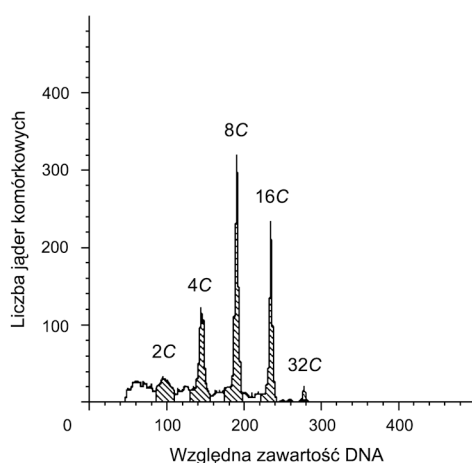


RYCINA 3. Histogramy zawartości DNA w jądrach korzeni zarodkowych nasion soczewicy: A – nietraktowanych (udział jąder w fazie G_2 wynosi 21%); B – poddanych matrikondycjonowaniu w wilgotnym wermikulicie (udział jąder w fazie G_2 wynosi 32%)

jowej, dojrzałości, zaawansowaniu kiełkowania [7, 24]. Współczynnik G_2/G_1 został uznany za marker kiełkowania, stosowany do śledzenia przebiegu procesów kondycjonowania nasion [14, 26, 27] (ryc. 3).

Poziom endoreplikacji (polisomatyczność)

Podczas różnicowania się tkanek roślinnych, w tym samym organie/tkance mogą



RYCINA 4. Polisomatyczność w parenchymie korzenia nasiennika diploidalnego buraka cukrowego – większość jąder (te z zawartością DNA powyżej 4C) przeszła proces endoreduplikacji

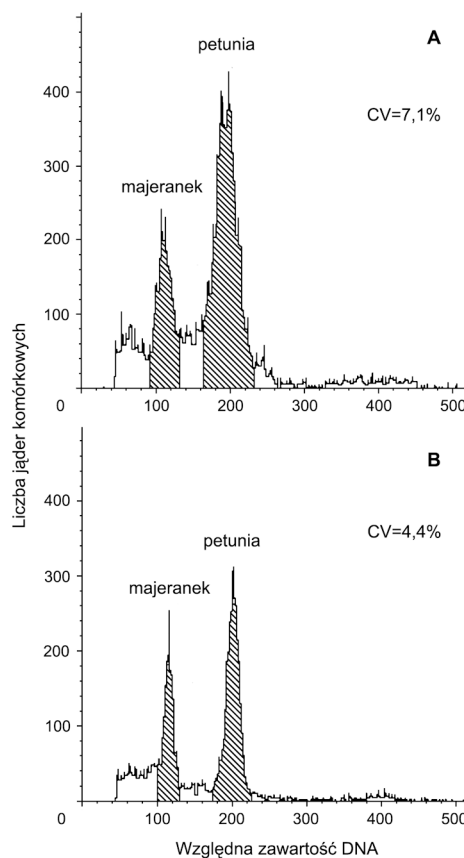
być obecne komórki o różnej zawartości DNA (często znacznie podwyższonej); zjawisko to nazywane jest polisomatycznością [21]. Polisomatyczność jest wynikiem zajścia w niektórych jądrach cykli endoreplikacyjnych, czyli amplifikacji DNA, po której nie zachodzi podział mitotyczny [19]. Choć zjawisko to występuje u ponad 90% gatunków roślin naczyniowych, jego znaczenie nie zostało jednoznacznie wyjaśnione. Przypuszcza się, że ma ono znaczenie funkcjonalne, a także że jest to strategia ewolucyjna roślin, zastępująca brak zwiększania się zawartości DNA w rozwoju filogenetycznym [9, 17]. Ze względu na związek poziomu endoreplikacji z wielkością komórek, występowanie tego procesu w roślinach może być pożądane przy tworzeniu wysokoplonujących odmian.

Oznaczenie proporcji między komórkami o różnej zawartości DNA w nasionach wielu gatunków, szczególnie w nasionach bielmowych (endoreplikacja występuje w dużym nasileniu w bielmie), dostarcza informacji o ich stadium rozwojowym [13]. Polisomatyczność organów roślinnych ma również znaczenie przy prowadzeniu kultur *in vitro*, gdyż może modyfikować ploidalność regenerantów [28, 30]. Cytometria przepływowa jest jedną z niewielu metod, które umożliwiają obserwację endoreplikacji (ryc. 4).

Wielkość genomu

W wieku biotechnologii, jak niekiedy określany jest wiek XXI, dla wielu dziedzin nauki ważne jest badanie genomów różnych organizmów, poczynając od mikroorganizmów a kończąc na człowieku, w tym określenie ich wielkości. Cytometria przepływowa zapewnia szybki i dokładny pomiar zawartości DNA i od lat jest najbardziej popularną metodą do tego celu stosowaną [1, 2, 16, <http://www.-rbgkew.org.uk/cval/home-page.html>]. Do tej pory za jej pomocą oznaczono wielkość genomów kilku tysięcy gatunków roślin, a ich liczba stale rośnie.

Oznaczając zawartość DNA przy użyciu barwników łączących się z kwasami nukleinowymi trzeba brać pod uwagę, że w cytozolu komórek niektórych gatunków obecne są inhibitory wybarwiania, np. związki fenolowe. Związki takie powodują, że pomiar cytometryczny może być obciążony dużym błędem (zaniżony) lub nawet niemożliwy do przeprowadzenia (ze względu na niską jakość histogramów). Aby temu przeciwdziałać, dodaje się do buforu izolacyjnego antyoksydanty, takie jak: poliwinylpiperolidyna (PVP 10), β -merkaptetanol, czy ditiotretitol (DTT), które redukują efekt działania inhibitorów, jednak nie zawsze całkowicie go znoszą [3, 20, 29; ryc. 5].



RYCINA 5. Analiza cytometryczna absolutnej zawartości DNA w jądrach majeranku (gatunku zawierającego w cytozolu inhibitory wybarwiania) z zastosowaniem buforu Partec z PI: A – bez PVP, B – z dodatkiem 1% PVP. Jako standardu wewnętrznego użyto petunii 'P × Pc6' (2C=2,85 pg; [16]). Uzyskano odpowiednie wartości 2C dla majeranku: 1,53 pg i 1,64 pg. Przy braku antyoksydantu w buforze izolacyjnym uzyskano zaniżoną zawartość DNA, a histogram był niskiej jakości (wysoki współczynnik wariancji – CV)

Protokół 1. Analiza ploidalności, aktywności cyklu komórkowego i poziomu endoreplikacji

Materiały i sprzęt laboratoryjny

materiał roślinny do analizy;
standard zewnętrzny (najczęściej diploidalna roślina analizowanego gatunku);
bufor do izolacji jąder (p. Aneks);
barwnik fluorescencyjny (najczęściej indolo-4',6-dwuamidyno-2-fenyloidyna, DAPI);
plastikowe płytki Petriego o średnicy 5,5 cm;
żyłutki;
2–3,5 ml probówki (zwykle standardowe dla określonego typu cytometru);
filtry nylonowe o średnicy oczek 30–50 μm ;
pipeta zmiennopojemnościowa 100–1000 μl i końcówki;
kulki kalibracyjne lub materiał roślinny o stabilnym genomie, np. liście grochu siewnego (*Pisum sativum* L.);
płyn okrywowy (dla cytometrów Partec destylowana woda z kroplą Tween 20 na 10 l wody);
cytometr przepływowy wyposażony w źródło światła emitujące promieniowanie UV (może być też użyty cytometr wyposażony w laser emitujący promieniowanie 488 nm; w takim wypadku zamiast DAPI do wybarwiania stosuje się PI, a do buforu należy dodać RNazę; p. Protokół 2);
program komputerowy do ewaluacji histogramów (np. Partec DPAC; nie jest konieczny do określania ploidalności);
do izolacji niektórych części roślin, np. korzenia zarodkowego z nasienia, przydatna może być igła preparacyjna i podświetlane szkło powiększające.

Przygotowanie próby

Do izolacji i wybarwiania jąder można zastosować procedurę jedno- lub dwustopniową. Rodzaj procedury wybierz doświadczalnie. Jeśli badany gatunek zawiera w cytozolu inhibitory wybarwiania uniemożliwiające uzyskanie dobrej jakości histogramów, do buforu izolacyjnego dodaj wybrany doświadczalnie antyoksydant (p. Protokół 2).

I. Procedura jedno-stopniowa

1. Określoną tkankę/organ roślinny (ok. 10 mg lub 0,5 cm^3) umieść na płytce Petriego i zalej 1 ml buforu izolującego jądra, z dodatkiem DAPI (2 $\mu\text{g/ml}$).
2. W celu uwolnienia jąder z komórek rozdrobnij materiał roślinny za pomocą żyłutki.
3. Przefiltruj otrzymaną zawiesinę jąder przez filtr o średnicy oczek 30–50 μm i inkubuj próbę przez wyznaczony eksperymentalnie czas w celu lepszego wnikięcia barwnika do jąder (najczęściej od 1 do 30 minut).

II. Procedura dwustopniowa

1. Określoną tkankę/organ roślinny umieść na płytce Petriego, zalej 0,5 ml buforu izolującego jądra *I* (bez DAPI) i rozdrobnij za pomocą żyłutki.
2. Przefiltruj otrzymaną zawiesinę jąder przez filtr o średnicy oczek 30–50 μm i inkubuj przez wyznaczony eksperymentalnie czas (najczęściej od 1 do 30 minut).
3. Dodaj 2 ml buforu wybarwiającego *II* (z DAPI; 2 $\mu\text{g/ml}$) i ponownie inkubuj przez wyznaczony eksperymentalnie czas w celu lepszego wnikięcia barwnika do jąder.

Przygotowanie cytometru

4. Włącz lampę rtęciową (ok. pół godziny przed rozpoczęciem pomiarów) lub laser emitujący promieniowanie 340–380 nm, następnie cytometr i komputer z nim połączony.

5. Wyreguluj cytometr używając kulek kalibracyjnych lub materiału roślinnego tak, aby CV pierwszego pików było poniżej 2%.

6. Przygotuj zawiesinę jąder standardu zewnętrznego, włóż ją do cytometru i podczas jej przepływu ustaw wzmocnienie światła w cytometrze na takim poziomie, aby jego pik G_0/G_1 pojawił się w około 1/5 długości osi x (np. w kanale 100 na skali 512-kanalowej lub w kanale 50 na skali 256-kanalowej). Jeśli jest to konieczne dla określonego doświadczenia, możesz przesunąć ten pik do innego kanału.

Przeprowadzenie pomiaru

7. Włóż próbę do cytometru i prowadź pomiar z szybkością nie większą niż 100 jąder/s (większa szybkość może spowodować wzrost CV; powszechnie akceptowane jest CV poniżej 5%) dla 500–3000 jąder przy określaniu ploidalności lub 5000–20 000 przy badaniu cyklu komórkowego lub endoreplikacji.

8. W celu określenia ploidalności wyznacz średnią pozycję (numer kanału) pików G_0/G_1 rośliny badanej i oblicz ploidalność według wzoru:

$$\text{ploidalność próbny} = \text{średnia pozycja pików } G_0/G_1 \text{ próbny} / \text{średnia pozycja pików } G_0/G_1 \text{ standardu zewnętrznego} \times \text{ploidalność standardu zewnętrznego}$$

9. Przy badaniu cyklu komórkowego lub endopoliploidyzacji zaznacz powierzchnię pików za pomocą programu komputerowego i odczytaj liczbę jąder z określoną zawartością DNA. Oblicz współczynnik G_2/G_1 (przy określaniu zmian aktywności cyklu komórkowego) lub proporcję/udział procentowy jąder o różnej ploidalności (przy oznaczaniu polisomatyczności). W celu określenia średniej ploidalności (μ , średniej wartości C) zastosuj wzór [15]:

$$\mu = \sum_{i=1}^n \frac{C_i \times N_i}{N}$$

gdzie:

n – liczba pików z określoną zawartością DNA w próbce,

C_i – wartość C dla kolejnych (n) pików próbki,

N_i – liczba jąder komórkowych w pikach n_i ,

N – liczba jąder komórkowych we wszystkich pikach próbki.

Protokół 2. Analiza bezwzględnej zawartości jądrowego DNA**Materiały i sprzęt laboratoryjny**

materiał roślinny do analizy;

standard wewnętrzny (najczęściej stosuje się erytrocyty kurze, leukocyty ludzkie lub gatunki roślinne o wyznaczonej uprzednio zawartości DNA [12];

bufor do izolacji jąder (p. Aneks);
barwnik fluorescencyjny (najczęściej jodek propidyny; PI);
rybonukleaza (RNaza) IIA;
plastikowe płytki Petriego o średnicy 5,5 cm;
żyłutki;
2–3,5 ml probówki (zwykle standardowe dla określonego typu cytometru);
filtry nylonowe o średnicy oczek 30–50 μm ;
pipeta zmiennopojemnościowa 100–1000 μl i końcówki;
kulki kalibracyjne lub materiał roślinny o stabilnym genomie, np. liście grochu siewnego (*Pisum sativum* L.);
płyn okrywowy (dla cytometrów Partec destylowana woda z kroplą Tween 20 na 10 l wody);
cytometr przepływowy wyposażony w źródło światła emitujące promieniowanie o długości fali 488 nm;
program komputerowy do ewaluacji histogramów (np. Partec DPAC);
do izolacji niektórych części roślin, np. korzenia zarodkowego z nasienia, przydatna może być igła preparacyjna i podświetlane szkło powiększające.

Przygotowanie próby

Można tu stosować procedurę jedno- lub dwustopniową (p. Protokół 1), przy czym zamiast DAPI dodaje się jako barwnika fluorochromowego jodku propidyny (PI), uzupełniając dodatkowo bufor o RNazę, aby zapobiec przyłączeniu barwnika do dwuniciowego RNA, co mogłoby zawyżyć wartość pomiaru. Przygotowanie próby do pomiaru zawartości DNA wymaga równoczesnej izolacji jąder badanej rośliny i standardu wewnętrznego, dobrania proporcji rozdrabnianych tkanek tak, aby piki G_0/G_1 rośliny badanej i standardu były mniej więcej tej samej wysokości. Wybierz taki standard wewnętrzny, w którym zawartość DNA nie różni się więcej niż 2–3 razy od zawartości DNA gatunku badanego, a jednocześnie ich piki się nie pokrywają. Jeśli obserwujesz, że niemożliwe jest otrzymanie wyraźnych pików lub że pik standardu wewnętrznego ulega przesunięciu po preparacji z tkanką badanego gatunku, w stosunku do pozycji, jaką ma po osobnej preparacji, wskazuje to na obecność inhibitorów wybarwiania. W takim wypadku albo wybierz do preparacji tkankę, w której inhibitory nie występują, albo dodaj do buforu izolacyjnego wybrany antyoksydant, w stężeniu wyznaczonym eksperymentalnie (najczęściej dodaje się 1% PVP; ryc. 5).

I. Procedura jednostopniowa

1. Określoną tkankę/organ rośliny badanej i standardu wewnętrznego umieść na płytce Petriego i zalej 1 ml buforu izolującego jądra z dodatkiem PI (50 $\mu\text{g/ml}$) i RNazy (50 $\mu\text{g/ml}$).
2. W celu uwolnienia jąder z komórek rozdrobnij materiał roślinny za pomocą żyłutki.
3. Przefiltruj otrzymaną zawiesinę jąder przez filtr o średnicy oczek 30–50 μm i inkubuj próbę przez wyznaczony eksperymentalnie czas w celu lepszego wnikięcia barwnika do jąder (najczęściej od 1 do 30 minut).

II. Procedura dwustopniowa

1. Określoną tkankę/organ rośliny badanej i standardu wewnętrznego umieścić na płytce Petriego i zalej 0,5 ml buforu izolującego jądra *I* (uzupełnionego o RNazę w stężeniu 50 µg/ml, ale bez PI) i rozdrobnij za pomocą żyletki.

2. Przefiltruj otrzymaną zawiesinę jąder przez filtr o średnicy oczek 30–50 µm i inkubuj przez wyznaczony eksperymentalnie czas (najczęściej od 1 do 30 minut)

3. Dodaj 2 ml buforu wybarwiającego *II* (z PI; 50 µg/ml) i ponownie inkubuj przez wyznaczony eksperymentalnie czas w celu lepszego wniknięcia barwnika do jąder.

Przygotowanie cytometru

4. Włącz laser emitujący promieniowanie 488 nm, następnie cytometr i komputer z nim połączony.

5. Wyreguluj cytometr używając kulek kalibracyjnych lub materiału roślinnego tak, aby CV pierwszego pikę było poniżej 2%.

6. Przygotuj zawiesinę jąder standardu wewnętrznego, włóż ją do cytometru i podczas jej przepływu ustaw wzmocnienie światła w cytometrze na takim poziomie, aby jego pik G_0/G_1 był w takim kanale, ażeby przy pomiarze z rośliną badaną na histogramie był widoczny również pik G_0/G_1 tej rośliny (ryc. 5).

Przeprowadzenie pomiaru

7. Włóż próbę do cytometru i prowadź pomiar z szybkością 20–50 jąder/s (większa szybkość może spowodować wzrost CV; powszechnie akceptowane jest CV poniżej 5%, jakkolwiek dla gatunków „trudnych” – zawierających inhibitory wybarwiania – dopuszcza się CV nieco wyższe) w 5000–20 000 jądrach.

8. Określ średnią pozycję (numer kanału) pikę G_0/G_1 rośliny badanej i standardu wewnętrznego i oblicz zawartość DNA według wzoru:

zawartość 2C DNA w próbce (pg) = średnia pozycja pikę próby/średnia pozycja pikę standardu wewnętrznego × zawartość 2C DNA standardu wewnętrznego (pg)

LITERATURA

- [1] ARUMUGANATHAN K, EARLE ED. Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant Molecular Biology Reporter* 1991; **9**: 208–218.
- [2] BENNETT MD, LEITCH IJ. Nuclear DNA amounts in angiosperms. *Annals of Botany* 1995; **76**: 113–176.
- [3] BHARATHAN G, LAMBERT GM, GALBRAITH DW. Nuclear DNA contents of monocotyledons and related taxa. *Amer J Bot* 1994; **81**: 381–386.
- [4] BROWN SC, DEVAUX P, MARIE D, BERGOUNIOUX C, PETIT PX. Cytométrie en flux: Application à l'analyse de la ploidie chez les végétaux. *Le Technoscopia de Biofutur* **47**: 2–16.
- [5] DOLEŽEL J. Flow cytometry, its application and potential for plant breeding. W: Current Topics in Plant Cytogenetics Related to Plant Improvement, T. Lelley [red.] 1998: 80–90. Universitätsverlag, Vienna.
- [6] DOLEŽEL J, BINAROVA P, LUCRETTI S. Analysis of nuclear DNA content in plant cells by flow cytometry. *Biologia Plantarum* 1989; **31**: 113–120.
- [7] FINCH-SAVAGE WE, BERGERVOET JHW, BINO RJ, CLAY HA, GROOT SPC. Nuclear replication activity during seed development, dormancy breakage and germination in three tree species: Norway maple (*Acer platanoides* L.), sycamore (*Acer pseudoplatanus* L.) and cherry (*Prunus avium* L.). *Annals of Botany* 1998; **81**: 519–526.

- [8] GALBRAITH DW. Analysis of higher plants by flow cytometry and cell sorting. *International Review of Cytology* 1989; **116**: 165–228.
- [9] GALBRAITH D W, HARKINS KR, KNAPP S. Systemic endopolyploidy in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* 1991; **96**: 985–989.
- [10] GALBRAITH DW, HARKINS KR, MADDOX JM, AYRES NM, SHARMA DP, FIROOZABADY E, Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissues. *Science* 1983; **220**: 1049–1051.
- [11] GREILHUBER J, DOLEŽEL J, LYSÁK M, BENNETT MD. The origin, evolution and proposed stabilization of the terms 'genome size' and 'C-value' to describe nuclear DNA contents. *Annals Botany* 2005; **95**: 255–260.
- [12] JOHNSTON JS, BENNETT MD, RAYBURN AL, GALBRAITH DW, PRICE HJ. Reference standards for determination of DNA content of plant nuclei. *Amer J Bot* 1999; **86**: 609–613.
- [13] KOWLES RV, YERK GL, SRIENC F, PHILLIPS RL. Maize endosperm tissue as an endoreduplication system. *Genetic Engineering* 1992; **14**: 65–88.
- [14] LANTERI S, SARACCO F, KRAAK HL, BINO RJ. The effects of priming on nuclear replication activity and germination of pepper (*Capsicum annuum*) and tomato (*Lycopersicon esculentum*) seeds. *Seed Sci Res* 1994; **4**: 81–87.
- [15] LEMONTEY C, MOUSSET-DÉCLAS C, MUNIER-JOLAIN N, BOUTIN JP. Maternal genotype influences pea seed size by controlling both mitotic activity during early embryogenesis and final endoreduplication level/cotyledon cell size in mature seed. *J Experiment Bot* 2000; **51**: 167–175.
- [16] MARIE D, BROWN SC. A cytometric exercise in plant DNA histograms, with 2C values for 70 species. *Biology of the Cell* 1993; **78**: 41–51.
- [17] NAGL W. DNA endoreduplication and polyteny understood as evolutionary strategies. *Nature* 1976; **261**: 614–615.
- [18] OTTO F. DAPI staining of fixed cells for high-resolution flow cytometry of nuclear DNA. W: *Methods in Cell Biology* Vol. 33, Darzynkiewicz Z., Crissman H.A. (red.), Academic Press, New York 1990: 105–110.
- [19] ROGALSKA S, MAŁUSZYŃSKA J, OLSZEWSKA MJ. Podstawy cytogenetyki roślin. Wydaw. Nauk. PWN, Warszawa 1999: 266 ss.
- [20] PRICE HJ, HODNETT G, JOHNSTON JS. Sunflower (*Helianthus annuus*) leaves contain compounds that reduce nuclear propidium iodide fluorescence. *Annals of Botany* 2000; **86**: 929–934.
- [21] SMULDERS MJM, RUS-KORTEKAAS W, GILISSEN LJW. Development of polysomaty during differentiation in diploid and tetraploid tomato (*Lycopersicon esculentum*) plants. *Plant Science* 1994; **97**: 53–60.
- [22] ŚLIWIŃSKA E. Cytometria przepływowa – nowa metoda analizy genomów. *Hodowla Roślin i Nasienictwo* 1993; **1**: 10–15.
- [23] ŚLIWIŃSKA E. Analiza cyklu komórkowego buraków cukrowych o różnym stopniu ploidalności za pomocą cytometrii przepływowej. *Biuletyn IHAR* 1997; **202**: 35–40.
- [24] ŚLIWIŃSKA E. Analysis of the cell cycle in sugarbeet seed during development, maturation and germination. W: *Seed Biology: Advances and Applications*. Black M., Bradford K.J., Vazquez-Ramos J. (red.), CAB International, Wallingford, UK 2000: 133–139.
- [25] ŚLIWIŃSKA E. Wykorzystanie cytometrii przepływowej w biotechnologii roślin. *Biotechnologia* 2002; **1**: 122–128.
- [26] ŚLIWIŃSKA E, BABIŃSKA L. Effect of presowing hydration treatment on DNA replication activity in the embryo of sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Electronic Journal of Polish Agricultural Universities, Agronomy* 1999; 2(2), www.ejpau.media.pl/series/volume2/issue2/agronomy/art.-04.html.
- [27] ŚLIWIŃSKA E, JENDRZEJCZAK E. Sugar-beet seed quality and DNA synthesis in the embryo in relation to hydration-dehydration cycles. *Seed Science and Technology* 2002; **30**: 597–608.
- [28] ŚLIWIŃSKA E, ŁUKASZEWSKA E. Polysomaty in growing *in vitro* sugar-beet (*Beta vulgaris* L.) seedlings of different ploidy level. *Plant Science* 2005; **168**: 1067–1074.
- [29] ŚLIWIŃSKA E, ZIELIŃSKA E, JĘDRZEJCZYK I. Are seeds suitable for flow cytometric estimation of plant genome? *Cytometry* 2005; **64A**: 72–79.
- [30] ŚLIWIŃSKA E, ZIMNY J, DROZDOWSKA L. Niestabilność poziomu ploidalności podczas regeneracji transformowanego i nietransformowanego tytoniu (*Nicotiana tabacum* L.). *Biotechnologia* 2003; **3**: 260–266.

ANEKS

Bufory używane do izolacji i wybarwiania jąder

Do przygotowania buforów użyj destylowanej dejonizowanej wody, a po przygotowaniu przefiltruj roztwór przez filtr o wielkości oczek 20–50 μm . Jeśli bufor ma być przechowywany, zautoklawuj go. Przed użyciem dodaj DAPI w stężeniu 2 $\mu\text{g/ml}$ lub PI i RNazę w stężeniach 50 $\mu\text{g/ml}$. Do izolacji jąder możesz też używać komercyjnych buforów firmy Partec (www.partec.com). Wskazane jest, aby do przygotowania próby używany był bufor lodowato zimny.

1. Procedura jednostopniowa

Bufor Partec

0,1 M Tris
2,5 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
85 mM NaCl
0,1% (v/v) Triton X-100
pH 7,0

Bufor może być przechowywany w lodówce do kilku miesięcy.

Bufor Galbraitha [10]

45 mM MgCl_2
20 mM MOPS
30 mM cytrynian sodu
0,1% (v/v) Triton X-100
pH 7,0

Bufor może być przechowywany do 6 miesięcy w -20°C .

Bufor LB01 [6]

15 mM Tris-Cl, pH 7,5
2 mM Na_2EDTA
0,5 mM spermina $\cdot$ 4HCl
80 mM KCl
20 mM NaCl
0,1% (v/v) Triton X-100
po przefiltrowaniu dodaj 15 mM β -merkaptoetanolu
pH 7,5

Bufor może być przechowywany do 6 miesięcy w -20°C .

Bufor Tris

100 mM NaCl
10 mM Na_2EDTA
0,1% (v/v) Triton X-100
10 mM Tris-Cl, pH 7,5
Używaj świeżo przygotowany.

Bufor cytrynianowy

10 mM Na_2EDTA
10 mM cytrynian sodu
pH 4,8
Używaj świeżo przygotowany.

II. Procedura dwustopniowa

Bufor Otto [18]

I

0,1 M kwas cytrynowy

0,5% (v/v) Tween 20

II

0,4 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$

Nie reguluj pH roztworów. Roztwór pierwszy przygotuj bezpośrednio przed użyciem; drugi może być przechowywany do 6 miesięcy w temperaturze pokojowej.

DEFINICJE

wg [11]

x – symbol liczby chromosomów genomu monoploidalnego i/lub podstawowej liczby chromosomów serii generatywnych poliploidów organizmów pokrewnych.

n – symbol zredukowanej mejotycznie (haplofazowej, gametycznej) liczby chromosomów organizmu.

$2n$ – symbol niezredukowanej (diplofazowej, zygotycznej) liczby chromosomów.

C – zawartość DNA w holoploidalnym genomie zawierającym n chromosomów; skrót dla wielkości genomu holoploidalnego.

Cx – zawartość DNA w monoploidalnym genomie z podstawową liczbą chromosomów x ; skrót dla wielkości genomu monoploidalnego.

Genom jądrowy – pojęcie określające komplet chromosomów wraz z jego DNA, charakterystyczny dla danego organizmu; w organizmie poliploidalnym (zakładając, że diploid jest generatywnym poliploidem o najniższym możliwym poziomie poliploidalności) termin ten może być również stosowany do określenia monoploidalnego zespołu chromosomów wraz z jego DNA.

Genom monoploidalny – pojedynczy zespół chromosomów danego organizmu wraz z jego DNA, zawierający x chromosomów.

Genom holoploidalny – cały zespół chromosomów (z liczbą chromosomów n) wraz z jego DNA, charakterystyczny dla danego organizmu (n lub $2n$), niezależnie od stopnia jego poliploidalności, aneuploidalności itp.

Elwira Śliwińska

Uniwersytet Techniczno-Przyrodniczy im. J.J. Śniadeckich

Al. Kaliskiego 7, 85-789 Bydgoszcz,

e-mail: elwira@utp.edu.pl