



Wykorzystanie cytometrii przepływowej w biotechnologii roślin

Elwira Śliwińska

Katedra Genetyki i Hodowli Roślin, Akademia Techniczno-Rolnicza, Bydgoszcz

Flow cytometry applied in plant biotechnology

Summary

Flow cytometry (FCM) is a rapid and exact method for estimating the nuclear DNA content. Thus, it can be used for ploidy screening of different plant materials cultured *in vitro* (plantlets, callus, cell suspensions and somatic embryos) as well as haploids and somatic hybrids. In addition, it can be applied as a tool to analyse the events of genetic transformation. The application of FCM in biotechnology will be discussed.

Key words:

genome size, endopolyploidization, somatic variation, transformation, chromosome sorting.

1. Cytometria przepływowa

Cytometria przepływowa (FCM – *flow cytometry*) jest szybką i dokładną metodą, pozwalającą na analizę zawartości jądrowego DNA w dużych populacjach komórek. Pierwotnie stosowana była w badaniach biomedycznych i w diagnostyce klinicznej, a od początku lat osiemdziesiątych wykorzystywana jest także w cytologii i cytogenetyce roślin (1,2). FCM opiera się na pomiarze intensywności promieniowania fluorescencyjnego wyizolowanych i wybarwionych barwnikiem fluorochromowym (wiążącym DNA) jąder komórkowych, umieszczonych w strumieniu cieczy. Istniejąca liniowa zależność między intensywnością fluorescencji emitowanej przez wybarwione DNA a jego ilością w jądrze

Adres do korespondencji

Elwira Śliwińska,
Katedra Genetyki
i Hodowli Roślin,
Akademia
Techniczno-Rolnicza,
ul. Kaliskiego 7,
85-796 Bydgoszcz,
e-mail:
elwira@atr.bydgoszcz.pl

komórkowym umożliwia wykorzystanie FCM w badaniach wielkości genomu, cyklu komórkowego oraz stopnia ploidalności. Cytometr przepływowy może być dodatkowo wyposażony w odpowiedni system segregujący przepływające komórki (3,4).

2. Kultury *in vitro*

Stwierdzono, że zmienność somaklonalna, występująca często w kulturach *in vitro*, może być związana z wielkością genomu roślin. Zmienność ta wynika bądź ze zmian liczby pojedynczych chromosomów (5,6) bądź poziomu ploidalności (7). Potwierdzono to w badaniach przeprowadzonych przy użyciu cytometrii przepływowej, w których materiał stanowiły zarówno rośliny z kultur *in vitro* jak i kalus lub zawiesiny komórkowe. Tak na przykład Rival i in. (8) oznaczyli zawartość DNA w roślinach palmy oleistej, pochodzących z nasion i z kultur *in vitro*. Stwierdzili, że zarówno rośliny otrzymane z nasion jak i te z kultur *in vitro*, miały podobną zawartość DNA (ok. 3,7 pg). Natomiast komórki kalusa wykazywały zmniejszoną zawartość DNA (ok. 3,3 pg). Jedną z przyczyn obserwowanego zjawiska mogła być zróżnicowana kondensacja chromatyny w kalusie i roślinach. W trzech różnych typach kalusa (granularnym, luźnym i szybko rosnącym) poziom DNA był zbliżony, a jedynie kalus szybko rosnący został zidentyfikowany jako źródło roślin zmienionych fenotypowo. W związku z tym stwierdzono, że u palmy zmienność somaklonalna ma raczej pochodzenie epigeniczne.

Ciekawe obserwacje przeprowadzono oceniając ploidalność roślin ogórka, zregenerowanych *in vitro* (9). Kalus otrzymany z niedojrzałych zarodków był miksploidalny i zawierał w poszczególnych komórkach od 2C do 32C DNA (15% 2C, 45% 4C, 35% 8C i 5% 16C lub więcej; C – ilość DNA w haploidalnym genomie). Rośliny zregenerowane z niego poprzez somatyczną embriogenezę miały różną ploidalność: 57% stanowiły diploidy, 18% tetraploidy, 4% oktoploidy, 4% miksploidy 2x/4x i 17% – 4x/8x. Spośród nich jedynie diploidy i tetraploidy nie wykazywały morfologicznych anomalii. Pozostałe regeneranty miały defekty i nie rozwinęły się w normalne rośliny. Wynikami tymi potwierdzono, że istnieje związek między stopniem ploidalności a totipotencją *in vitro*.

W kalusie otrzymanym z hipokotylu buraka cukrowego stwierdzono, że udział komórek o różnej zawartości DNA (od 2C do 16C), odpowiadał ploidalności obserwowanej w tkance wyjściowej (10). Większość roślin zregenerowanych w tym doświadczeniu była diploidalna, jakkolwiek zaobserwowano także obecność roślin tetraploidalnych. Podobne zależności stwierdzili Gilissen i in. (11), regenerując rośliny tytoniu z cienkiej warstwy komórek epidermy łodygi, pobranych z górnych międzywęźli roślin będących w fazie wegetatywnej. Badając cykl komórkowy w eksplantatach autorzy stwierdzili różny stosunek komórek 2C do komórek 4C w zależności od badanej tkanki. Pomimo że po dwóch dniach kultury pojawiła się w eksplantatach niewielka liczba komórek 8C, zregenerowane rośliny w większości były diploidalne (85%). Pojawiły się także tetraploidy (7%) i miksploidy 2x/4x (8%).

Wyniki pomiarów cytometrycznych wykonanych u wielu gatunków roślin wskazują na to, że nawet jeśli w wyjściowym materiale występują komórki o zmienionej zawartości DNA, zachodzi naturalna selekcja w kierunku indukowania somatycznej embriogenezy głównie z komórek diploidalnych. Niemniej jednak, jak przypuszcza się na podstawie przedstawionych przykładów, kontrola cytologiczna roślin produkowanych w kulturach *in vitro* jest wysoce pożądana.

W kulturach *in vitro* regeneracja roślin często odbywa się poprzez fazę kalusa. Zdarza się, że kalus jest długo przechowywany, co nie pozostaje bez wpływu na jego zdolność do embriogenezy. Kevers i in. (12), badając organogenny i nieorganogenny kalus buraka cukrowego stwierdzili, że podczas gdy w pierwszym zawartość DNA była typowa dla diploidów, to komórki tego drugiego miały 3,3-3,6 razy więcej DNA niż diploidy, przy czym niektóre z nich były aneuploidalne. Autorzy tłumaczyli to zjawisko mutacjami i pęknięciami chromosomów, powstałymi w efekcie różnego rodzaju stresów, jakim poddawany jest kalus w warunkach *in vitro*. Przypuszczali również, że aneuploidalność i zmiany chromosomów powodują stopniową utratę zdolności regeneracji w kalusie organogennym, który przekształca się w nieorganogenny. W końcowym efekcie powstają w nim komórki o cechach podobnych do rakowych.

Cytometria przepływowa pozwala także na liczenie komórek. Ta opcja może być szczególnie istotna dla badań wykorzystujących zawiesiny komórkowe. Nicolson i in. (13) porównali liczenie komórek tytoniu za pomocą mikroskopu i cytometrii przepływowej. Stwierdzili, że stosując tę drugą metodę, pomiar jest nie tylko szybszy (pochłania ok. 1/4 czasu w porównaniu z liczeniem za pomocą mikroskopu), ale także dokładniejszy.

Innym zjawiskiem, które może być badane za pomocą cytometrii przepływowej jest apoptoza, czyli programowana śmierć komórki. Apoptoza odgrywa ważną rolę w prawidłowym rozwoju organizmu, pozwala na utrzymanie homeostazy i odpowiada za odporność na stropy środowiskowe. Badając za pomocą cytometru reakcję zawiesiny komórek tytoniu na wysoką temperaturę, Chen i in. (14) stwierdzili, że jony magnezu, wapnia i cynku są ważnymi regulatorami apoptozy. Znalazło to potwierdzenie w badaniach nad dynamiką jąder w komórkach korzenia *Arabidopsis*, transformowanego genem białka zielonej fluorescencji (Śliwińska i Galbraith, nie opublikowane).

3. Produkcja haploidów

Cytometria przepływowa jest przydatna w selekcjonowaniu haploidów. Stanowi ona w tym przypadku alternatywę dla bezpośredniego liczenia chromosomów lub stosowania kryteriów pomocniczych, przy czym jej przewaga polega na tym, że dodatkowo pozwala wykryć obecność chimer i komórek o wysokim poziomie poliploidalności. W tabeli 1 podano przykłady gatunków roślin, dla których przy otrzymaniu haploidów zastosowano FCM.

Tabela 1

Gatunki roślin, u których zastosowano cytometrię przepływową przy produkcji haploidów

Gatunek	Wyjściowa komórka/tkanka	Literatura
burak	załążek	(15-17)
rzepak	pyłek	(18,19)
kukurydza	pylnik	(20)
żyto	pylnik	(21)
pszenica	pyłek	(22)
ziemniak	pylnik	(23,24)
papryka	pylnik	(25)
cykoria	pyłek	(26)
gerbera	załążek	(27,28)
kiwi	komórka jajowa (partenogeneza)	(29)
tymotka	pylnik	(30)

Przy produkcji dihaploidów podwojenie liczby chromosomów indukuje się najczęściej w zregenerowanych roślinach, ale jest to możliwe również już w fazie kalusa. Zgodnie z obserwacjami Beaumonta i Widholma (31) otrzymany z pylników haploidalny kalus kukurydzy nie zmienił ploidalności przez pierwsze 97 dni kultury, ale potem zaczęły pojawiać się w nim komórki diploidalne oraz o wyższej ploidalności. W 466. dniu kultury około 50% komórek kalusa miało zawartość DNA większą niż 1C, co świadczy o tym, że nastąpiła w nim spontaniczna poliploidyzacja. Jednocześnie badano skuteczność działania pronamidu, herbicydu blokującego polimeryzację mikrotubul. Stwierdzono, że traktowanie kalusa przez 2 dni 10 μ M roztworem tego preparatu już po trzech dniach powodowało podwojenie zawartości DNA w około 20-30% komórek. Po 466. dniach kultury wszystkie komórki kalusa traktowanego pronamidem miały 2C DNA.

4. Mieszaniec somatyczne

Dzięki biotechnologii konwencjonalne techniki krzyżowania zostały wzbogacone o nowe możliwości otrzymywania mieszańców między gatunkami, które dzieli bariera niekrzyżowalności. Jest to możliwe głównie dzięki fuzji protoplastów i regeneracji roślin w kulturach *in vitro*. Rośliny uzyskane w ten sposób z reguły wykazują cechy morfologiczne pośrednie między formami wyjściowymi, ale często ocena tych cech jest możliwa dopiero w późniejszych fazach rozwoju. Cytometria przepływowa umożliwia rozpoznanie mieszańców już we wczesnych etapach kultury.

Z wielu doświadczeń wynika, że oprócz pożądaných form mieszańcowych, wśród roślin zregenerowanych po fuzji często pojawiają się autopoliploidy i miksploidy.

Potwierdzono to w badaniach przeprowadzonych przez Dounaya i in (32). Autorzy ci wykonali elektrofuzję protoplastów oberżyny (*Solanum melongena*) i dzikiego gatunku *Solanum aethiopicum*. W analizie zawartości DNA wykazano, że spośród 35 roślin zregenerowanych po fuzji 32 były tetraploidalne, jedna heksaploidalna i dwie miksoploidalne. Schoenmakers i in. (33), wykazali, że w wyniku przeprowadzenia niesymetrycznej fuzji protoplastów diploidalnego pomidora i monohaploidalnego ziemniaka, oprócz pożądaných allotriploidów powstały rośliny tetra-, heksa- i oktoploidalne, co może świadczyć o fuzji wielokrotnej lub wystąpieniu poliploidyacji po fuzji. Podobnie, po elektrofuzji protoplastów diploidalnego *S. tuberosum* i *S. pureja*, zregenerowane rośliny różniły się stopniem ploidalności – otrzymano heksaploidy, oktoploidy i miksoploidy, a także aneuploidy (34).

Cytometria przepływowa umożliwia nie tylko identyfikację somatycznych mieszańców, ale również ich sortowanie już na etapie produktów fuzji. Dokonano tego na przykład po przeprowadzeniu fuzji protoplastów tytoniu i ziemniaka (35). W populacji wysortowanych komórek aż 90% stanowiły szybko dzielące się komórki mieszańca.

5. Manipulacje genetyczne

Odcinki DNA, które są przenoszone do genomu roślinnego w procesie transformacji genetycznej są zbyt małe, aby mogły zostać wykryte za pomocą cytometrii przepływowej. Jednakże selekcja transformantów przy użyciu tej metody jest możliwa, jeśli do rośliny zostanie wprowadzony markerowy gen warunkujący produkcję białka zielonej fluorescencji (GFP – *green fluorescent protein*), które pod wpływem światła emituje promieniowanie bioluminescencyjne, wykrywalne przez cytometr przepływowy (36).

FCM okazała się także przydatna do optymalizacji warunków transformacji protoplastów, głównie w jej pierwszych etapach (37). W tym celu plazmidowe DNA zostało wybarwione barwnikiem fluorochromowym (bromkiem etydyny) i tak przygotowany plazmid użyto do transfekcji protoplastów petunii. Protoplasty były następnie analizowane za pomocą cytometru przepływowego. Dzięki wybarwieniu egzogenego DNA, transformowane protoplasty były łatwo wykrywalne, można je było także wysortować. Możliwa była obserwacja efektywności procesu transfekcji, prowadzonego w różnych warunkach.

Analiza ważnych ekonomicznie roślin uprawnych na poziomie molekularnym jest z reguły utrudniona ze względu na znaczne rozmiary ich genomów. Jedną z najważniejszych metod, umożliwiających taką analizę jest sortowanie chromosomów, które następnie są przechowywane w bibliotekach chromosomów i mogą być wykorzystywane do molekularnej analizy genomów. Etapem wstępnym do sortowania jest synchronizacja cyklu komórkowego przy użyciu inhibitora syntezy DNA. Dzięki zastosowaniu inhibitorów polimeryzacji mikrotubul wywołuje się następnie zablo-

kowanie cyklu komórkowego w metafazie (indeks mitotyczny powyżej 50%). Po przygotowaniu zawiesiny chromosomów poddaje się je sortowaniu. Cytometria przepływowa pozwala na rozsortowanie tych chromosomów określonego kariotypu, które różnią się wielkością (38).

Z przedstawionego przeglądu literatury wynika, że cytometria przepływowa jest metodą bardzo przydatną w różnych badaniach i procesach biotechnologicznych. Może ona nie tylko ułatwić ich przeprowadzenie, ale także usprawnić i przyspieszyć selekcję produktów otrzymanych w laboratoriach biotechnologów. Pozwala zatem obniżyć koszty tych wysokonakładowych prac i zwiększyć ich efektywność.

Literatura

1. Melamed M. R., Mullaney P. F., Mendelsohn M. L., (1979), *Flow cytometry and sorting*, John Wiley, New York.
2. Śliwińska E., (1993), *Hodowla Roślin i Nasiennictwo*, 1, 10-15.
3. Doležel J., (1991), *Phytochemical Analysis*, 2, 143-154.
4. Galbraith D. W., (1989), *Int. Rev. Cytol.*, 116, 165-228.
5. Karp A., Wu Q. S., Steele S. H., Jones M. G. K., (1987), *Theor. Appl. Genet.*, 74, 140-146.
6. Orton T. J., (1980), *Theor. Appl. Genet.*, 89, 287-292.
7. Lee M., Phillips R. L., (1988), *Plant Mol. Biol.*, 39, 413-437.
8. Rival A., Beule T., Barre P., Hamon S., Duval Y., Noirot M., (1997), *Plant Cell Rep.*, 16, 884-887.
9. Kubaláková M., Doležel J., Lebeda A., (1996), *Biol. Plant.*, 38, 475-480.
10. Jacq B., Tétu T., Sangwan R. S., de Laat A., Sangwan-Norreel B. S., (1992), *Plant Cell Rep.*, 11, 329-333.
11. Gilissen L. J. W., van Staveren M. J., Hakkert J. C., Smulders J. M., Verhoeven H. A., Creemers-Moleenaar J., (1994), *Plant Sci.*, 103, 81-91.
12. Kevers C., Greimers R., Franck T., Bisbis B., Dommès J., Gaspar T., (1999), *Biol. Plant.*, 42, 321-332.
13. Nicolso F. T., Val J., van der Keur M., van Iren F., Kijne J. W., (1994), *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 39, 251-259.
14. Chen H., Yan C., Jiang X., Dai Y.-R., (1999), *Cell. Mol. Life Sci.*, 55, 303-309.
15. Hansen A. L., Plevier C., Pedersen H. C., Keimer B., Andersen S. B., (1994), *Plant Breeding*, 112, 89-95.
16. Svirshchetskaya A. M., Doležel J., (2000), *J. Sugar Beet Res.*, 37, 117-133.
17. Svirshchetskaya A. M., Doležel J., (2001), *J. Appl. Genet.*, 42, 21-32.
18. Deslauriers C., Powell A. D., Fuchs K., Pauls K. P., (1991), *Bioch Bioph. Acta*, 1091, 165-172.
19. Foisset N., Delourme R., Lucas M. O., Reinard M., (1997), *Plant Cell Rep.*, 16, 464-468.
20. Martin B., Widholm J. M., (1996), *Plant Cell Rep.*, 15, 781-785.
21. Rakoczy-Trojanowska M., Śmiech M., Malepszy S., (1997), *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 48, 15-21.
22. Löschenberger F., Pfosser M., Heberle-Bors E., (1995), *J. Genet. and Breed.*, 49, 37-44.
23. Rokka V. M., Valkonen J. P. T., Pehu E., (1995), *Plant Sci.*, 112, 85-95.
24. Rokka V. M., Ishimaru V.-M., Pehu E., (1998), *Plant Cell Rep.*, 18, 89-93.
25. Mityko J., Andrasfalvy A., Csillery G., Fari m., (1995), *Plant Breeding*, 114, 78-80.
26. Theiler-Hedtrich R., Hunter C. S., (1995), *Plant Breeding*, 114, 18-23.
27. Honkanen J., Aapola A., de Wit J. C., Esendam H. F., Seppanen P., Tormala T., Stravers L. J. M., (1991), *Acta Hort.*, 300, 341-346.
28. Tosca A., Pandolfi R., Citterio S., Fasoli A., Sgorbati S., (1995), *Plant Cell Rep.*, 14, 455-458.
29. Chalak L., Legave J. M., (1996), *Plant Cell Rep.*, 16, 97-100.

30. Abdullah A. A., Pedersen S., Andersen S. B., (1994), *Plant Breeding*, 112, 342-345.
31. Beaumont V. H., Widholm J. M., (1993), *Plant Cell Rep.*, 12, 648-651.
32. Daunay M. C., Chaput M. H., Sihachakr D., Allot M., Vedel F., Ducreux G., (1993), *Theor. Appl. Genet.*, 85, 841-850.
33. Schoenmakers H. C. H., Wolters A. M. A., Nobel E. M., de Klein C. M. J., Koornneef M., (1993), *Theor. Appl. Genet.*, 87, 328-336.
34. Puite K. J., Roest S., Pijnacker L. P., (1986), *Plant Cell Rep.*, 5, 262-265.
35. Bromova M., Knopf U. C., (1991), *Plant Sci.*, 74, 127-133.
36. Grebenok R. J., Lambert G. M., Galbraith D. W., (1997), *Plant J.*, 12, 685-696.
37. Tagu D., Bergounioux C., Perennes C., Brown S., Muller P., Gadal P., (1987), *Plant Sci.*, 51, 215-223.
38. Doležel J., Macas J., Lucretti S., (1999), *Current Protocols in Cytometry*, Eds. Robinson J. P., Darzynkiewicz Z., Dean P. N., Dressler L. G., Orfao A., Rabinovitch P. S., Stewart C. C., Tanke H. J., Wheelless L. L., 5.3.1-5.3.33, John Wiley and Sons, Inc., New York.