

Первые данные о содержании ДНК некоторых представителей рода *Trapa* L. из Приморья

The first data report about DNA content of some representatives of the genus *Trapa* L. from Primorye territory

Скапцов М. В.¹, Смирнов С. В.¹, Куцев М. Г.¹, Пшенникова Л. М.², Шмаков А. И.¹

Skaptsov M. V.¹, Smirnov S. V.¹, Kutsev M. G.¹, Pshennikova L. M.², Shmakov A. I.¹

¹ Южно-Сибирский ботанический сад, Алтайский государственный университет, г. Барнаул, Россия.
E-mail: mr.skaptsov@mail.ru

¹ Altai State University, South-Siberian Botanical Garden, Barnaul, Russia. E-mail: mr.skaptsov@mail.ru

² Ботанический сад-институт ДВО РАН, г. Владивосток, Россия. E-mail: pshennikova1@yandex.ru

² Botanical Garden-Institute FEB RAS, Vladivostok, Russia. E-mail: pshennikova1@yandex.ru

Реферат. В работе представлены результаты измерения содержания ДНК (2С) методом проточной цитометрии для 6 видов рода *Trapa* L. Исследованы *Trapa manshurica* Fler. (2С = 1,03 пг), *T. hankensis* Pshenn. (2С = 1,47 пг), *T. incisa* Siebold & Zucc. (2С = 0,83 пг), *T. maximowiczii* Korsh. (2С = 0,94 пг), *T. pseudoincisa* Nakai (2С = 2,18 пг). Для *T. japonica* Fler. выявлено два цитотипа 1,12 и 2,07 пг. Тем самым, проточная цитометрия растений является быстрым и эффективным способом исследования представителей рода *Trapa* для поиска вариаций в количестве хромосом и уровней пloidности.

Ключевые слова. Проточная цитометрия, размер генома, содержание ДНК, *Trapa*.

Summary. The article presents the results of measuring the DNA content by flow cytometry for 6 species of the genus *Trapa* L.: *Trapa manshurica* Fler. (2C = 1.03 pg), *T. hankensis* Pshenn. (2C = 1.47 pg), *T. incisa* Siebold & Zucc. (2C = 0.83 pg), *T. maximowiczii* Korsh. (2C = 0.94 pg), *T. pseudoincisa* Nakai (2C = 2.18 pg). For *T. japonica* Fler. two cytotypes 1.12 and 2.07 pg. were identified. Thus, plant flow cytometry is a fast and efficient way to study representatives of the genus *Trapa* to look for variations in chromosome numbers and ploidy levels.

Keywords. DNA content, flow cytometry, genome size, *Trapa*.

Род *Trapa* L. насчитывает около 50 видов, которые распространены в умеренно-теплых, субтропических и тропических регионах Евразии и Африки, тогда как для территории бывшего СССР приводится 25 видов рода (Васильев, 1949). Всего на данный момент известно более 100 различных таксономических единиц рода (The Plant List, <http://www.theplantlist.org/>).

Представители отличаются большим разнообразием вариаций и форм, в целом схожи морфологически, поэтому подходы к систематике рода неоднозначны: зачастую выделяется только один вид – *T. natans* s. l. (Цвелёв, 1993). Виды рода отличаются, на первый взгляд, единообразием в морфологии, однако при детальном исследовании морфологических признаков генеративных органов различия становятся более явными (Васильев, 1960). Выявлено, что некоторые виды различаются и с применением молекулярно-генетических методов. Так, например, виды *T. natans* и *T. bispinosa* хорошо различаются генетически, хотя авторы их считают полиморфизмом одного и того же вида (Takano, Kadono, 2005). Некоторая нестабильность морфологических признаков возможно обусловлена гибридизацией, так, на основе генетических данных, предполагается, что группа *T. japonica* может иметь гибридное происхождение между *T. incisa* и видами группы *T. natans* s. l. (Takano, Kadono, 2005).

Цитогенетические исследования представителей рода не столь многочисленны, что видимо связано со сложностями в прямом подсчете хромосом и необходимости использования в исследованиях

меристемы листьев. Но уже на их основе можно говорить о вариациях в ploидности и количестве хромосом. Так количество хромосом было исследовано для следующих видов: *Trapa natans* L. ($2n = 36, 40, 44, 46, 48, 90$); *T. natans* var. *pumila* Nakano ($2n = 96$); *T. natans* var. *japonica* Nakai ($2n = 48$); *T. japonica* Fler. ($2n = 44, 80, 84, 92, 96$); *T. pseudoincisa* Nakai ($2n = 44, 76, 48$); *T. maximowiczii* Korsh. ($2n = 48$); *T. incisa* Siebold & Zucc. ($2n = 48, 88, 90, 92$), *T. conocarpa* (Aresch.) Flerow ($2n = 48$), *T. media* (Glück) V. N. Vassil. ($2n = 48$), *T. muzzanensis* Jäggli ($2n = 48$), (Palmgren, 1943; Trela-Sawicka, 1965; Пробатова, Соколовская, 1995; Oginuma et al., 1996; Huang et al., 1996; Пробатова и др., 2000; Пробатова и др., 2006). Практически нет данных по размерам генома. Так известно содержание ДНК только для *T. natans* ($2n = 2x = 48$), $2C = 1,00$ пг (Šmarda et al., 2019). Нами поставлена цель оценить разнообразие в содержании ДНК видов рода *Trapa* по материалам из Приморья с известными и не исследованными хромосомными числами.

Содержания ДНК ($2C$, пг) исследовали с помощью метода проточной цитометрии с окрашиванием иодидом пропидия. Для анализа использовали живой материал: черешки листьев с воздушными полостями и незрелые орехи. Образцы измельчали в разработанном нами буфере следующего состава: 50 mM Hepes, 10 mM метабисульфит натрия, 10 mM $MgCl_2$, 0,5 % поливинилпирролидон, 0,2 % БСА, 0,3 % Tween20, 0,2 % Triton X-100, 50 мкг/мл РНКазы, 1 мкл/мл β -меркаптоэтола, 50 мкг/мл иодида пропидия (Skaptsov et al., 2020). Образцы фильтровали через нейлонный фильтр с размером пор 50 мкм. Данные флюоресценции детектировали с использованием проточного цитометра Partec CyFlow PA (Partec, GmbH). В качестве внешнего стандарта использовали *Ficus benjamina*, $2C = 0,90$ пг, который калибровали относительно *Raphanus sativus* L. сорт Саха $2C = 1,11$ пг (Doležel et al., 1992).

Полученные в результате данные сопоставимы с ранее исследованным с использованием цитометрии диплоидным образцом *T. natans* ($2n = 2x = 48$, $2C = 1,00$ пг) (Šmarda et al., 2019). Несколько меньшие значения $2C$ выявлены для *T. incisa* – $0,83 \pm 0,04$ пг и *T. maximowiczii* – $0,94 \pm 0,03$ пг – это предположительно диплоиды с количеством хромосом 48. Для *T. japonica* выявлены два значения $2C$ – $1,12 \pm 0,06$ пг и $2,07 \pm 0,05$ пг, предположительно диплоид и тетраплоид. Для *T. pseudoincisa* выявлено только одно значение $2C$ равное $2,18 \pm 0,09$ пг – ожидаемо тетраплоид (табл.).

Таблица

Исследованные образцы видов рода *Trapa* L.

Вид	Происхождение материала	$2C \pm SD$, пг
<i>T. hankensis</i>	Ботанический сад-институт ДВО РАН, г. Владивосток (в интродукции), собрана в устье реки Комиссаровка Ханкайского района около села Троицкое	$1,47 \pm 0,09$
<i>T. japonica</i>	Приморский край, Хасанский р-он, оз. Лотос	$1,12 \pm 0,06$
		$2,07 \pm 0,05$
<i>T. incisa</i>	Ботанический сад-институт ДВО РАН, г. Владивосток (в интродукции), собрана в Спасском районе Приморского края	$0,83 \pm 0,04$
<i>T. manshurica</i>	Ботанический сад-институт ДВО РАН, г. Владивосток (в интродукции), собрана в Ханкайском районе	$1,03 \pm 0,04$
<i>T. maximowiczii</i>	Приморский край, Хасанский р-он, у впадения р. Тесная в Бухту Экспедиции	$0,94 \pm 0,03$
<i>T. pseudoincisa</i>	Приморский край, Хасанский р-он, окр. пос. Краскино, водоемы у обочины дороги	$2,18 \pm 0,09$

Для ранее не исследованных кариологическими методами видов *T. manshurica* и *T. hankensis* выявлены значения $2C$ равные $1,03 \pm 0,04$ пг и $1,47 \pm 0,09$ пг соответственно. Если образцы *T. manshurica* по содержанию ДНК сопоставимо с другими видами рода ожидаемо являются диплоидами, то исследованные образцы *T. hankensis* могут быть как тетраплоиды, так и триплоиды. Так, например, для *T. pseudoincisa* известно количество хромосом равное 76 (Huang et al., 1996).

Полученные результаты подтверждают перспективу использования метода проточной цитометрии в поисковых и популяционно-генетических исследованиях для разделения изучаемых образцов по уровню ploидности или полиморфизмам содержания ДНК, однако малый размер генома при большом количестве хромосом представляет сложности в разделении образцов с отличиями в несколько

хромосом. Так, например среднее содержание ДНК на одну хромосому *T. natans* равно 0,020 пг, а *T. incisa* – 0,017 пг, что сопоставимо с принятой ошибкой метода (3-5%). Тем самым разделение образцов с количеством хромосом 44–48 или 90, 92, 96 представляется сложной задачей и требует валидации прямым подсчетом хромосом. Однако малый размер хромосом зачастую может являться причиной ошибок и при прямом подсчете из-за наложения малых хромосом друг на друга (Oginuma et al., 1996), так, оценивая цитогенетические работы, более вероятно, что основными числами хромосом являются: $2n = 2x = 48$ и $2n = 4x = 96$.

Благодарности. Работа выполнена при поддержке государственного задания Министерства науки и высшего образования РФ (тема № FZMW-2020-0003).

ЛИТЕРАТУРА

- Васильев В. Н.** *Hydrocaryaceae* // Флора СССР. Т. 15. – М.–Л.: Изд-во Академии наук СССР, 1949. – С. 637–662.
- Васильев В. Н.** Водяной орех и перспективы его культуры в СССР. – М.–Л.: Изд-во АН СССР, 1960. – 97 с.
- Пробатова Н. С., Рудыка Э. Г., Баркалов В. Ю., Нестерова И. А., Кудрин С. Г., Чубарь Е. А.** Числа хромосом сосудистых растений из заповедников Приморского края и Приамурья // Ботанический журнал, 2006. – Т. 91. – № 7. – С. 1117–1134.
- Пробатова Н. С., Соколовская А. П.** Числа хромосом некоторых видов сосудистых растений Российского Дальнего Востока // Ботанический журнал, 1995. – Т. 80. – № 3. – С. 85–88.
- Пробатова Н. С., Соколовская А. П., Рудыка Э. Г., Шаталова С. А.** Числа хромосом видов растений из бассейна реки Раздольная (Суйфун) в Приморском крае // Ботанический журнал, 2000. – Т. 85. – № 12. – С. 102–107.
- Цвелёв Н. Н.** О роде *Trapa* L. (*Trapaceae*) в Восточной Европе и Северной Азии // Новости сист. высш. раст., 1993. – Т. 29. – С. 99–107.
- Doležal J, Sgorbati S, Lucretti S.** Comparison of three DNA fluorochromes for flow cytometric estimation of nuclear DNA content in plants // Physiologia Plantarum, 1992. – Vol. 85. – Pp. 625–631. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1992.tb04764.x
- Huang T., Ding B. Y., Hu R. Y., Zheng C. Z.** A cytotaxonomical study on *Trapa* in China // Life Sci. Res. Applic., 1996. – Pp. 235–239.
- Kovarik A., Pires J. C., Leitch A. R., Lim K. Y., Sherwood A. M., Matyasek R., Rocca J., Soltis D. E., Soltis P. S.** Rapid Concerted Evolution of Nuclear Ribosomal DNA in Two *Tragopogon* Allopolyploids of Recent and Recurrent Origin // Genetics, 2005. – Vol. 169, No 2. – P. 931–944. DOI: 10.1534/genetics.104.032839
- Oginuma K., Takano A., Kadono Y.** Karyomorphology of some *Trapaceae* in Japan // Acta Phytotax. Geobot., 1996. – Vol. 47. – Pp. 47–52.
- Palmgren O.** Chromosome numbers in angiospermous plants // Bot. Notiser., 1943. – I. 2. – Pp. 348–352.
- Skaptsov M. V., Vaganov A. V., Kechaykin A. A., Kutsev M. G., Smirnov S. V., Dorofeev V. I., Borodina-Grabovskaya A. E., Seregin A. P., Sinitsina T. A., Friesen N. V., Zhang X.-C., Shmakov A. I.** The cytotypes variability of the complex *Selaginella sanguinolenta* s. l. // Turezaninowia, 2020. – Vol. 23. – N. 2. – P. 5–14. DOI: 10.14258/turezaninowia.23.2.1
- Šmarda P., Knápek O., Březinová A., Horová L., Grulich V., Danihelka J., Veselý P., Šmerda J., Rotreklová O., Bureš P.** Genome sizes and genomic guanine+cytosine (GC) contents of the Czech vascular flora with new estimates for 1700 species // Preslia, 2019. – Vol. 91. – P. 117–142. DOI: 10.23855/preslia.2019.117
- Takano A., Kadono Y.** Allozyme variations and classification of *Trapa* (*Trapaceae*) in Japan // Aquatic Botany, 2005. – Vol. 83. – N. 2. – P. 108–118. DOI: 10.1016/j.aquabot.2005.05.008
- Trela-Sawicka Z.** Cytological investigations in the genus *Trapa* L. // Acta Biol. Cracov. Ser. Bot., 1965. – Vol. 9. – Pp. 59–63.
- The Plant List*. 2013. Version 1.1. URL: <http://www.theplantlist.org/> (accessed 01 May 2020).