

**Использование плодов различного срока хранения в исследовании пloidности и содержания ДНК *Peucedanum vaginatum* Lebed. (Umbelliferae Juss.) методом проточной цитометрии**

**Use of fruits with different storage periods in the study of ploidy and DNA content of *Peucedanum vaginatum* Lebed. (Umbelliferae Juss.) by flow cytometry**

Дегтярева Г. В.<sup>1</sup>, Остроумова Т. А.<sup>1</sup>, Скапцов М. В.<sup>2</sup>

Degtjareva G. V.<sup>1</sup>, Ostroumova T. A.<sup>1</sup>, Skaptsov M. V.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> НОЦ-Ботанический сад Петра I, биологический факультет, Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, г. Москва, Россия. E-mail: degavi@mail.ru, ostroumovata@my.msu.ru

<sup>1</sup> Research and Educational Center – Botanical Garden of Peter I, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

<sup>2</sup> Южно-Сибирский ботанический сад, Алтайский государственный университет, г. Барнаул, Россия  
E-mail: mr.skaptsov@mail.ru

<sup>2</sup> South-Siberian Botanical Garden, Altai State University, Barnaul, Russia

**Реферат.** На примере *Peucedanum vaginatum* рассмотрены методические вопросы, связанные с возможностью использования плодов зонтичных разного срока хранения в проточной цитометрии для определения размера генома и уровней пloidности. Особенности строения плодов определяют конфигурацию сигнала флуоресценции, когда на гистограммах преобладающий пик соответствует триплоидному эндосперму, занимающему большую часть семени, а слабый – диплоидному маленькому зародышу. Семенная оболочка и срастающийся с ней окоплодник, будучи сухими и состоящими из мертвых клеток, в формировании сигнала не участвуют. С увеличением срока хранения падает число регистрируемых событий, исчезает пик зародыша и возрастают отклонения в значениях показателя размера генома до 27 %, поэтому информация о содержании ДНК должна рассматриваться только как ориентировочная и может быть использована для оценки уровня пloidности. Тем не менее, возможность использования гербарного материала со зрелыми плодами, срок хранения которого может превышать 100 лет, обеспечивает кариологические исследования широкой выборкой и масштабным географическим охватом.

**Ключевые слова.** Гербарий, размер генома, семена, содержание ядерной ДНК, Apiaceae, *Peucedanum*.

**Summary.** In this paper, using *Peucedanum vaginatum* as an example, we consider methodological issues related to the possibility of using Umbelliferae fruits of different storage periods to determine the genome size and ploidy levels by flow cytometry. The structural features of the fruits determine the configuration of the fluorescence signal, when the predominant peak in the histograms corresponds to the triploid endosperm, which occupies most of the seed, and the weak peak corresponds to the diploid small embryo. The seed coat and the pericarp fused with it, being dry and consisting of dead cells, do not participate in the formation of the signal. As the storage period increases, the number of registered events decreases, the embryo peak disappears, and deviations in the values of the genome size increase up to 27 %, therefore, information on the DNA content is only approximate and can be used to estimate the ploidy level. Nevertheless, the possibility of using herbarium material with mature fruits, the storage periods of which can exceed 100 years, provides karyological studies with a wide sample and large-scale geographic coverage.

**Key words.** Apiaceae, genome size, herbarium, nuclear DNA content, *Peucedanum*, seeds.

**Введение.** Использование метода проточной цитометрии для анализа пloidности, содержания ДНК и определения размера генома находит приложение в различных направлениях эволюционной биологии, таксономии, экологии, генетики, селекции и биотехнологии. В настоящее время это самый востребованный метод детекции размера генома у растений. Проточная цитометрия основана на регистрации сигнала флуоресценции отдельных ядер, окрашенных ДНК-специфичными красителями, и определении размера генома на основании сравнения интенсивности флуоресценции образца с известным стандартом (Doležel, Bartos, 2005; Doležel et al., 2007). В качестве материала для исследования

обычно используют живые листья растений, из которых возможно выделить ядра хорошего качества и получить гистограммы высокого разрешения. Помимо листьев можно использовать разные части растения, в том числе и семена (Sliwinska et al., 2005; Čertner et al., 2022; Скапцов, Куцев, 2014), которые дают результаты по значениям содержания ДНК, сопоставимые с листьями.

При изучении критических таксонов семейства зонтичные флоры Сибири два вида рода *Peucedanum* L.: *P. vaginatum* Ledeb. и *P. puberulum* (Turcz.) Schischk. были в фокусе нашего внимания. Мультидисциплинарный подход, задействованный при поиске различий между этими видами, опирался также и на данные, получаемые с помощью метода проточной цитометрии. При этом в качестве материала мы использовали, кроме свежесобранных семян, зрелые семена, взятые с гербарных образцов, срок хранения которых доходил до 100 лет. Семена, как и плоды, зонтичных сухие, и это определяет их хорошую сохранность на протяжении времени в гербарных фондах и специализированных карнологических коллекциях.

Не затрагивая таксономические вопросы, связанные с трудностями разграничения двух сибирских видов *Peucedanum*, в данной работе мы хотели бы уделить специальное внимание влиянию срока хранения на качество флуоресцентного сигнала при анализе плодов зонтичных методом проточной цитометрии. Обсудить, как особенности организации плодов зонтичных влияют на сигнал флуоресценции и его интерпретацию. Очерченный круг задач мы рассматриваем на примере *Peucedanum vaginatum*. Этот вид, помимо Сибири, распространяется в Монголии и Восточном Казахстане. Согласно литературным данным (Ростовцева, 1976; Daushkevich et al., 1995), у *P. vaginatum* наблюдается два цитотипа, диплоидный ( $2n = 18$ ) и тетрапloidный ( $2n = 36$ ). Информация о содержании ДНК для *P. vaginatum* отсутствует.

**Материалы и методы.** Размер генома *P. vaginatum* исследовали с помощью метода проточной цитометрии с окрашиванием изолированных ядер пропидий иодидом (PI). Исследования проводили на плодах, взятых с гербарных образцов, хранящихся в фондах ALTB и MW. Поскольку у *P. vaginatum*, как и у зонтичных в целом, околоплодник срастается с семенем, а сам плод относительно небольшого размера (до 5 мм), то мерикарпий целиком использовали в исследовании. Были изучены образцы *P. vaginatum* из 11 локалитетов, возраст образцов варьировал от 1 до 101 года (Бурятия: 2017 г., Гамова BR\_2551 (MW0164395); 2024 г., Остроумова и др. 133 (MW); Республика Алтай: 1984 г., Остроумова 61 (MW0117210); 1999 г., Куприянов и др. (ALTB); 2006 г., Дьяченко, Шалимов (ALTB); Хакасия: 2011 г., Шанцер, Степанова 11IK87a (MW0161435); 1993 г., Пименов, Васильева 48 (MW0117208); Тыва: 1977 г., Данилов, Короткова 1137 (MW0117213); Монголия: 1926 г., Павлов 957 (MW0186670); 2001 г., Камелин и др. 1834 (ALTB); 1924 г., Павлов 925 (MW0186671)). Всего было проведено 37 измерений. Образцы измельчали со стандартом безопасными лезвиями в буфере Трис- $MgCl_2$ , содержащем пропидий иодид (50 мкг/мл), РНКазу (10 мкг/мл) и тиосульфат натрия (12 mM) (Pfossner et al., 1995; Skaptsov et al., 2024). Ядерную суспензию фильтровали через нейлоновый фильтр с размером пор 30 мкм. Анализы проводились на цитометрах Cytoflex (Beckman Coulter, Бреа, Калифорния, США) и LongCye (Challenbio, Китай). Учитывая предполагаемые различия в пloidности, в качестве стандарта использовали *Solanum pseudocapsicum* L. ( $2C = 2,835$  пг) и *Pisum sativum* L. 'Амброзия' ( $2C = 9.09$  пг) (Doležel et al., 1998; Skaptsov et al., 2024). Качество сигнала оценивали по значению коэффициента вариации (CV, %).

**Результаты и обсуждение.** Все зонтичные имеют одинаковый план строения плода (Пименов, Остроумова, 2014). Это сухой синкарпный вислоплодник, при созревании обычно распадающийся на два мерикарпия. В мерикарпии развивается одно семя. Оболочка семени срастается с околоплодником, вследствие этого плод и семя функционируют как единое целое. Семена содержат обильный эндосперм и маленький зародыш. У подавляющего большинства зонтичных зародышевый мешок Polygonum-типа, зародыш диплоидный ( $2x$ ), эндосперм триплоидный ( $3x$ ) и оболочка семени диплоидная ( $2x$ ) (Ptáček et al., 2022).

Плоды (семена) зонтичных достаточно удобны для их изучения методом проточной цитометрии: 1) отсутствие твердых защитных покровов и относительно небольшой размер, что не создает трудности при измельчении для выделения ядер; 2) для достижения необходимого уровня сигнала достаточно одного мерикарпия, это важно для обеспечения точности сигнала в случае возможных отклонений в значениях, если семена разной пloidности; 3) на одном растении плодов (семян) обычно формируется достаточно много, поскольку цветки организованы в сложное соцветие – зонтик, что не наносит ущерб гербарному образцу и обеспечивает выборкой при проведении исследования. Также

следует добавить, что именно среди карпологических признаков удается найти надежные критерии для разграничения родов и видов (Пименов, Остроумова, 2014). Поэтому наличие плодов добавляет уверенности в надежности таксономического определения образца. Иногда бывает, что к моменту созревания плодов листья растения отмирают, а определение растения в вегетативном или цветущем состоянии затруднительно.

Интерпретация результатов, получаемых с помощью метода проточной цитометрии при использовании в качестве материала семян, более сложная, чем в случае листьев. У покрытосеменных разные структуры в составе семян формируются вследствие разных биологических процессов и отличаются по уровням пloidности (Haig, 2020). Также не исключен полиморфизм семенного потомства в случае гибридизации или апомиксиса, когда пloidность зародыша отличается от пloidности материнского растения. При интерпретации результата важно понимать не только пloidность различных структур семени (зародыш, запасающая ткань, семенная оболочка), но и их объем, что будет пропорционально интенсивности сигнала на гистограмме.

Коэффициент вариации у большинства изученных образцов находился в пределах 2,5–5 %, что говорит о хорошем качестве сигнала. На рисунке 1 приведены гистограммы размера генома плодов *P. vaginatum*, собранных в 2024 г. На гистограммах основной пик соответствует эндосперму, также наблюдается небольшой пик зародыша. По числу детектируемых событий разница между эндоспермом и зародышем составляет более 10 раз, соотношение между показателями пика эндосперма и пика зародыша – 1,5 раза. Наблюданное соотношение пиков зародыша и эндосперма согласуется с особенностями строения плодов как *P. vaginatum*, так и зонтичных в целом. Семенная оболочка и срастающийся с ней околоплодник, диплоидные по своей природе, состоят из мертвых клеток, в которых не удается обнаружить ядра методом проточной цитометрии.

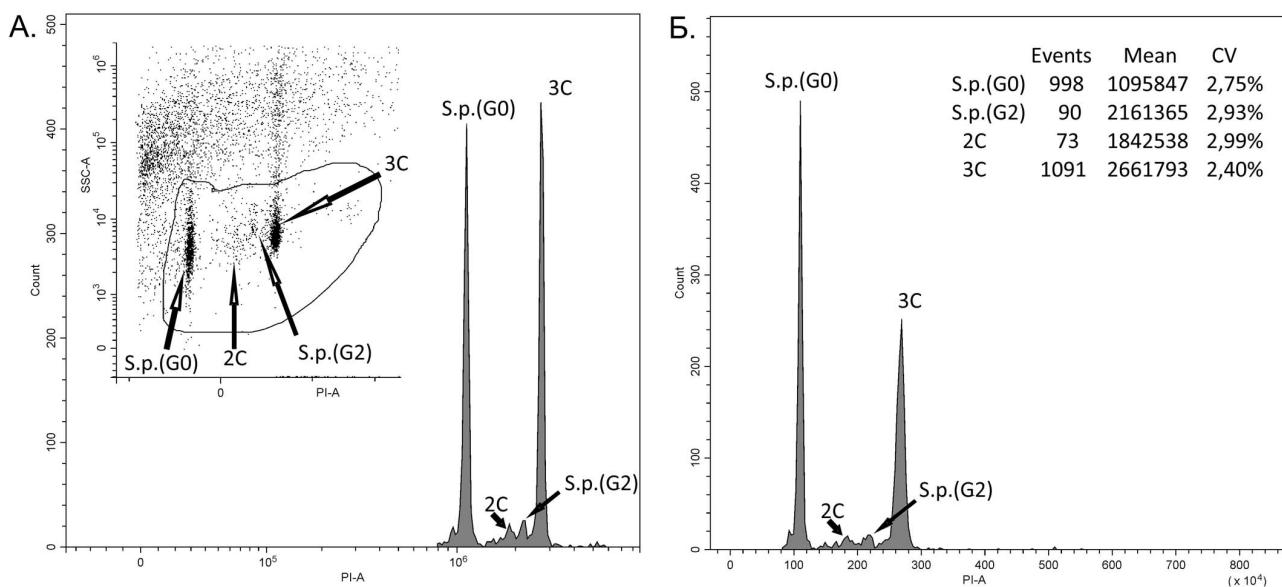


Рис. 1. Гистограммы размера генома свежесобранных плодов *P. vaginatum*. А – логарифмическое представление данных с двухпараметровой гистограммой SSC/PI; Б – линейное представление данных. S.p. – внутренний стандарт *Solanum pseudocapsicum* (отмечены пики в G0 и G2 стадии митоза); 2C – пик зародыша; 3C – пик эндосперма.

Зародыш является диплоидной структурой, и содержание ДНК было бы удобно рассчитывать именно через показатель 2C зародыша. Но из-за малых размеров зародыш сложно анализировать отдельно методом проточной цитометрии, так как его сложно измельчить во время пробоподготовки, чтобы выделить ядра, и требуется довольно большое число зародышей для получения надежного сигнала. Но на слабый сигнал зародыша можно опираться при верификации сигнала эндосперма, поскольку пик эндосперма можно ошибочно принять за пик зародыша. В случае слияния пика зародыша с шумами на однопараметровой гистограмме флуоресценции следует валидировать положение пика зародыша с применением двухпараметровых гистограмм бокового (SSC) или прямого (FSC) рассеива-

ния на флуоресценцию (рис. 1А). В других случаях можно использовать внешнюю стандартизацию для идентификации пиков, когда образец и стандарт измельчаются и исследуются по отдельности.

Поскольку большую часть семени зонтичных составляет триплоидный эндосперм, именно его сигнал преобладает на гистограмме. Учитывая это, при вычислении показателя 2С проводится оценка его ожидаемого значения через 3С пика эндосперма, так как сложно накопить достаточно событий для расчета содержания ДНК по пику зародыша. Особенно интересно, что даже у образцов семян, срок хранения которых достигал 101 год, обнаруживался сигнал, исходящий от эндосперма, при этом CV оставался в пределах 5 %. Возможно, процесс обезвоживания семян, происходящий естественным образом при их созревании, способствует сохранности ядер и ДНК.

По полученным значениям содержания ДНК у *P. vaginatum* можно выделить две основные группы (рис. 2А). В одну группу входят значения от 2,2 пг до 3,07 пг, в другую – от 4,56 пг до 6,04 пг, при этом разница в значениях между группами составляет примерно в 1,8 раз, и наблюдаемые почти кратные вариации между группами согласуются с двумя уровнями полипloidии (диплоиды и тетраплоиды), известными у этого вида по литературным данным.

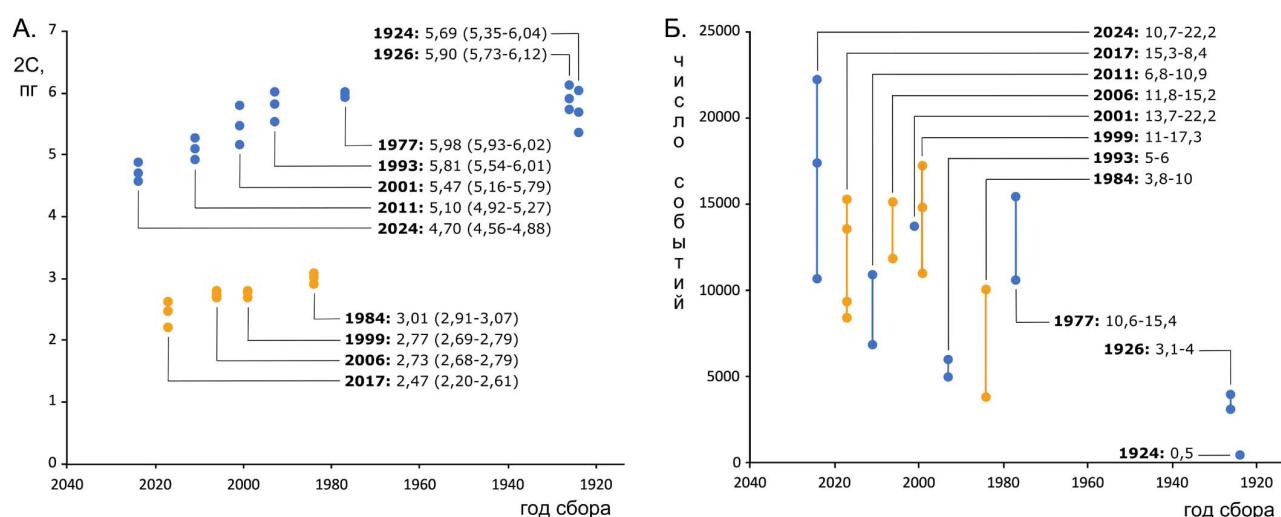


Рис. 2. Влияние срока хранения образца на показатели содержания ДНК (А, с указанием года сбора образца, среднего значения 2С и размаха значений 2С) и число регистрируемых событий (Б, с указанием года сбора и размаха числа событий в тысячах) на один мерикарпий.

Обращает на себя внимание сильный размах значений в пределах каждой группы. У образцов, близких по географическому происхождению, но разного срока хранения, можно наблюдать постепенное возрастание показателя размера генома (рис. 2А). Так, например, образцы *P. vaginatum*, собранные в Республике Алтай в разные годы, показали следующие значения содержания ДНК: 2006 г. – 2,73 пг, 1999 г. – 2,77 пг и 1984 г. – 3,01 пг. Подобное возрастание значений можно также наблюдать, если сравнивать данные по размеру генома, получаемые для живых и гербарных образцов, что может быть обусловлено постепенным разрушением белок-нуклеиновых комплексов, изменением конденсации и структуры хроматина, что оказывает влияние на связывание ДНК с красителем (Čertner et al., 2022; Skaptsov et al., 2024). Связь размаха значений 2С со сроком хранения не столь очевидна, что может быть обусловлено разной степенью зрелости семян, собранных в гербарий, и их изначальным качеством после сушки (рис. 2А). Поэтому у образцов с продолжительным сроком хранения можно определить только ориентировочный размер генома. Тем не менее, несмотря на возрастные изменения семян и небольшой размер генома, отличить диплоидов от тетраплоидов возможно, и гербарные сборы можно использовать для приблизительной оценки размера генома и установления полипloidии, не прибегая к прямому подсчету хромосом.

Другое изменение, наблюдаемое на гистограммах, которое связано с влиянием срока хранения, – это падение числа регистрируемых событий (рис. 2Б). Видимо, по этой причине только у свежесобранных семян удается обнаружить пик зародыша. По мере хранения семян сигнал зародыша из-за его малых размеров становится настолько слабым, что его уже невозможно отличить от шума. В случае

семян у образцов, собранных в 1924 году, для получения надежного сигнала эндосперма одного мерикарпия недостаточно и требуется 3 или 4.

Таким образом, возможность использования плодов зонтичных разного срока хранения в проточной цитометрии открывает большие перспективы в проведении кариологических исследований. Привлечение гербарного материала со зрелыми плодами, срок хранения которого может превышать 100 лет, обеспечивает исследование широкой выборкой и масштабным географическим охватом. Однако при использовании давних сборов следует учитывать, что данные о размере генома являются только ориентировочными, отклонение от истинного показателя может доходить до 27 %, а получаемые значения могут быть использованы для оценки уровня полидности и сопоставления с числами хромосом.

**Благодарности.** Выражаем глубокую благодарность сотрудникам гербариев ALTB и MW за помощь в нашей работе. Работа выполнена в рамках темы государственного задания МГУ «Зонтичные Старого Света: таксономия, молекулярная филогения, география, экология» № ЦИТИС 121031600196-8 и государственного задания АлтГУ № FZMW-2023-0008.

## ЛИТЕРАТУРА

- Пименов М. Г., Остроумова Т. А.** Карнологические признаки в систематике зонтичных // Мемориальный каденский сборник. – М.: МАКС Пресс, 2014. – С. 158–172.
- Ростовцева Т. С.** Числа хромосом ряда видов семейства Apiaceae на юге Сибири // Бот. журн., 1976. – Т. 61. – № 1. – С. 93–99.
- Скапцов М. В., Куцев М. Г.** Возможности проточной цитометрии в современной науке о растениях // Проблемы ботаники Южной Сибири и Монголии, 2014. – Т. 13. – С. 204–207.
- Скапцов М. В., Смирнов С. В., Куцев М. Г., Шмаков А. И.** Проблемы стандартизации в проточной цитометрии растений // Turczaninowia, 2016. – Т. 19. – № 3. – С. 120–122. <https://doi.org/10.14258/turczaninowia.19.3.9>
- Čertner M., Lučanová M., Sliwinska E., Kolář F., Loureiro J.** Plant material selection, collection, preservation, and storage for nuclear DNA content estimation // Cytometry Part A, 2022. – Vol. 101, № 9. – P. 737–748. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.24482>
- Daushkevich J. V., Alexeeva T. V., Pimenov M. G.** IOPB chromosome data 10 // Int. Org. Pl. Biosyst. Newsletter, 1995. – Vol. 25. – P. 7–8.
- Doležel J., Bartos J.** Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size // Ann. Bot., 2005. – Vol. 95, № 1. – P. 99–110. <https://doi.org/10.1093/aob/mci005>
- Doležel J., Greilhuber J., Lucretti S., Meister A., Lysák M., Nardi L., Obermayer R.** Plant genome size estimation by flow cytometry: inter-laboratory comparison // Ann. Bot., 1998. – Vol. 82. – P. 17–26. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aob.a010312>
- Doležel J., Greilhuber J., Suda J.** Flow cytometry with plants: an overview // Flow cytometry with plant cells. – Weinheim: Wiley-VCH, 2007. – P. 41–66. <https://doi.org/10.1002/9783527610921.ch3>
- Haig D.** Poles apart: monosporic, bisporic and tetrasporic embryo sacs revisited // Front. Ecol. Evol., 2020. – Vol. 8. <https://doi.org/10.3389/fevo.2020.516640>
- Pfosser M., Heberle-Bors E., Amon A., Lelley T.** Evaluation of sensitivity of flow cytometry in detecting aneuploidy in wheat using disomic and ditelosomic wheat-rye addition lines // Cytometry Part A, 1995. – Vol. 21, № 4. – P. 387–393. <https://doi.org/10.1002/cyto.990210412>
- Ptáček J., Sklenář P., Pinc J., Urfusová R., Calviño C. I., Urfus T.** A pentaploid endosperm and a Penaea-type embryo sac are likely synapomorphies of Azorella (Apiaceae, Azorellioideae) // Pl. Syst. Evol., 2022. – Vol. 308. – P. 1–10. <https://doi.org/10.1007/s00606-022-01833-z>
- Skaptsov M. V., Kutsev M. G., Smirnov S. V., Vaganov A. V., Uvarova O. V., Shmakov A. I.** Standards in plant flow cytometry: an overview, polymorphism and linearity issues // Turczaninowia, 2024. – Vol. 27, № 2. – P. 86–104. <https://doi.org/10.14258/turczaninowia.27.2.10>
- Sliwinska E., Zielinska E., Jedrzejczyk I.** Are seeds suitable for flow cytometric estimation of plant genome size? // Cytometry Part A, 2005. – Vol. 64. – P. 72–79.