



Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Химия. Биология. Экология. 2025. Т. 25, вып. 4. С. 437–446

Izvestiya of Saratov University. Chemistry. Biology. Ecology, 2025, vol. 25, iss. 4, pp. 437–446

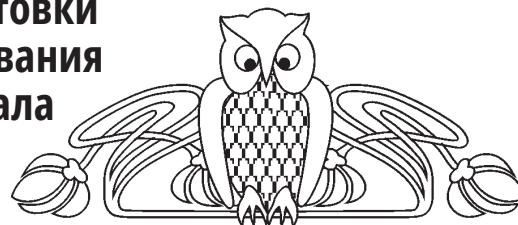
<https://ichbe.sgu.ru>

<https://doi.org/10.18500/1816-9775-2025-25-4-437-446>, EDN: VXQVZG

Научная статья

УДК 576.08

Оптимизация методики пробоподготовки и выявление возможности использования разных типов растительного материала двух видов *Colchicum* (Colchicaceae) в проточной цитометрии



А. С. Пархоменко¹✉, К. С. Павленко¹, В. С. Епифанов¹, С. Ф. Ефименко¹,
Л. В. Гребенюк¹, М. В. Скапцов²

¹Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, Россия, 410012, г. Саратов, ул. Астраханская, д. 83

²Алтайский государственный университет, Россия, 656049, г. Барнаул, пр. Ленина, д. 61

Пархоменко Алёна Сергеевна, кандидат биологических наук, доцент кафедры генетики, parkhomenko_as@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-9948-7298>

Павленко Кристина Сергеевна, магистр кафедры генетики, kris.pavlenko0412@yandex.ru, <https://orcid.org/0009-0004-8728-8277>

Епифанов Владимир Сергеевич, аспирант кафедры генетики, epifanov.v2015@yandex.ru, <https://orcid.org/0009-0007-5229-8151>

Ефименко Савелий Федорович, магистр кафедры генетики, savchik.efimenko@mail.ru, <https://orcid.org/0009-0007-7828-9499>

Гребенюк Людмила Владимировна, кандидат геолого-минералогических наук, ведущий биолог отдела биологии и экологии растений УНЦ «Ботанический сад», grebenuk2@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0003-0812-8861>

Скапцов Михаил Викторович, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник УПБП «Южно-Сибирский ботанический сад», mr.skaptsov@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-4884-0768>

Аннотация. В статье представлены результаты апробирования и оптимизации методики пробоподготовки образцов для анализа на проточном цитометре двух, ранее не изученных в данном аспекте, видов – *Colchicum bulbocodium* subsp. *versicolor* и *C. laetum*. Показано, что в качестве буфера для выделения интактных ядер из исходного растительного материала оптимальен буфер LB01 с добавлением тиосульфата натрия, а в качестве внутренних стандартов – *Petroselinum crispum* и *Secale cereale*. Впервые установлено содержание ДНК в живых образцах *C. bulbocodium* subsp. *versicolor* ($2C=8.049$ пг) и *C. laetum* ($2C=5.412$ пг) из естественных местообитаний на территории РФ. Показано, что в качестве материала для исследования размера генома методом проточной цитометрии двух видов рода *Colchicum* можно использовать и семена при условии учёта их особенности – количество событий, соответствующих зародышу гораздо меньше, чем клеток эндосперма. Гербарные образцы *Colchicum* мало пригодны в качестве материала для анализа содержания ДНК, так как данный параметр сильно завышен в сравнении с живым материалом. Полученные данные дополняют и расширяют представления о содержании уровня ДНК у представителей рода *Colchicum*.

Ключевые слова: *Colchicum*, проточная цитометрия, семена, гербарный материал, проростки, содержание ДНК

Для цитирования: Пархоменко А. С., Павленко К. С., Епифанов В. С., Ефименко С. Ф., Гребенюк Л. В., Скапцов М. В. Оптимизация методики пробоподготовки и выявление возможности использования разных типов растительного материала двух видов *Colchicum* (Colchicaceae) в проточной цитометрии // Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Химия. Биология. Экология. 2025. Т. 25, вып. 4. С. 437–446. <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2025-25-4-437-446>, EDN: VXQVZG

Статья опубликована на условиях лицензии Creative Commons Attribution 4.0 International (CC-BY 4.0)

Article

Optimization of sample preparation technique and the possibility of using different types of plant material of two species of the genus *Colchicum* (Colchicaceae) in flow cytometry

A. S. Parkhomenko¹, K. S. Pavlenko¹✉, V. S. Epifanov¹, S. F. Efimenko¹, L. V. Grebenyuk¹, M. V. Skaptsov²

¹Saratov State University, 83 Astrakhanskaya St., Saratov 410012, Russia

²Altai State University, South-Siberian Botanical Garden, 61 Lenina Pr., Barnaul 656049, Russia

Alena S. Parkhomenko, parkhomenko_as@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-9948-7298>

Kristina S. Pavlenko, kris.pavlenko0412@yandex.ru, <https://orcid.org/0009-0004-8728-8277>

Vladimir S. Epifanov, epifanov.v2015@yandex.ru, <https://orcid.org/0009-0007-5229-8151>

Savely F. Efimenko, savchik.efimenko@mail.ru, <https://orcid.org/0009-0007-7828-9499>

Lyudmila V. Grebenyuk, grebenuk2@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0003-0812-8861>

Mikhail V. Skaptsov, mr.skaptsov@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-4884-0768>

Abstract. The article presents the results of testing and optimization of the sample preparation technique for flow cytometric analysis of two species that have not been previously studied in this aspect: *Colchicum bulbocodium* subsp. *versicolor* and *C. laetum*. We are using optimal LB01 buffer with added sodium thiosulfate, as internal standards we take *Petroselinum crispum* and *Secale cereale*. For the first time, the DNA content in living samples of *C. bulbocodium* subsp. *versicolor* ($2C = 8.049$ pg) and *C. laetum* ($2C = 5.412$ pg) from natural habitats in the territory of the Russian Federation was determined. We have proven that not only living material (sprouts), but also seeds can be used as material for studying the genome size by flow cytometry of two species of the genus *Colchicum*. The main thing is to take into account their feature – the number of events corresponding to the embryo is much less than the number of endosperm cells. We do not recommend using herbarium samples of *Colchicum* as material for DNA content analysis, as their values were much overestimated in comparison with sprouts. The data we obtained complement and expand our understanding of the DNA level within the genus *Colchicum*.

Keywords: *Colchicum*, plant flow cytometry, seeds, herbarium, seedlings, DNA content

For citation: Parkhomenko A. S., Pavlenko K. S., Epifanov V. S., Efimenko S. F., Grebenyuk L. V., Skaptsov M. V. Optimization of sample preparation technique and the possibility of using different types of plant material of two species of the genus *Colchicum* (Colchicaceae) in flow cytometry. *Izvestiya of Saratov University. Chemistry. Biology. Ecology*, 2025, vol. 25, iss. 4, pp. 437–446 (in Russian). <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2025-25-4-437-446>, EDN: VXQVZG

This is an open access article distributed under the terms of Creative Commons Attribution 4.0 International License (CC-BY 4.0)

Введение

Род *Colchicum* sensu lato включает около 160 видов, а sensu stricto около 80 [1]. Такое неоднозначное представление об объёме рода указывает на большое число нерешённых вопросов в отношении его таксономической структуры. Например, комплекс близких родов *Colchicum*, *Merendera*, *Bulbocodium*, *Androcymbium* некоторыми авторами объединяются в один род *Colchicum* s.l. [1]. Основанием для подобного понимания объёма рода служат результаты молекулярно-генетических исследований последнего времени [2].

Числа хромосом у видов *Colchicum* варьируют в диапазоне 14–216, причём кариотипическая изменчивость наблюдается зачастую даже на внутривидовом уровне [3]. Знание уровня полидности и количественная оценка внутривидового цитотипического разнообразия необходимы для лучшего понимания систематики и эволюции растений. По K. Persson (2007) [4] эволюция кариотипа рода происходила на основе чисел $x = 7$ и $x = 9$, остальные варианты основных чисел произошли за счет перестроек, анеуплоидного сброса, полипloidии и гибридизации [5].

Несмотря на важность знаний о числах хромосом у видов этого рода, их подсчет остается чрезвычайно сложным, что связано, в первую очередь, с невысокой семенной продуктив-

ностью, крайне низкой всхожестью семян, а также охранным статусом видов *Colchicum* на территории России [6]. Все это не позволяет в достаточном количестве получить качественный исходный материал для кариологических исследований.

Облегчить установление полидности позволяет проточная цитометрия, которая является точным методом определения содержания ДНК в образце. У 13 видов рода *Colchicum* определены значения $2C$ [7–10]. Однако виды, произрастающие на территории России, ранее в этом отношении не исследовались. Поэтому исследование отечественных образцов было бы хорошим дополнением общей картины размера генома в целом для рода *Colchicum*.

В проточной цитометрии обычно в качестве материала для исследования используют свежую листовую пластинку [7–10]. К сожалению, не всегда удается сохранить собранный материал из природных популяций в состоянии, пригодном для дальнейшего анализа, так как популяции рода *Colchicum* на территории России географически достаточно далеко удалены друг от друга. Сложность также заключается в произрастании растений данного рода на участках, удаленных от асфальтовых дорог, а период активного прироста вегетативной массы совпадает со временем весенней распутицы, поэтому было необходимо рассмотреть возможность проведения цитометрического анализа



на разных типах растительного материала образцов рода *Colchicum* (проростках, семенах, гербарии), а также оптимизировать методику пробоподготовки.

Материалы и методы

Исследование проводилось на двух видах рода *Colchicum* – *C. laetum* (окр. х. Белоглинский Калачёвского р-на Волгоградской обл. и окр. с. Кетченеры Кетченеровского р-на Р. Калмыкия) и *C. bulbocodium* subsp. *versicolor* (окр. п. Лиманский Ровенского р-на Саратовской обл. и окр. ст. Нехаевской Нехаевского р-на Волгоградской обл.). Материал для исследования собирали из естественных местообитаний в полевой сезон 2024 г.

Семена *Colchicum* характеризуются глубоким физиологическим покоем, обусловленным действием механизма торможения прорастания [11]. Зародыши в таких семенах весьма ограниченно способны к росту. После освобождения от покровов они или не растут совсем, или трогаются в рост медленно, и в большинстве случаев их рост носит ненормальный характер: иногда растет гипокотиль и на нем возникают опухолевидные образования, но корень большей частью не способен к росту. Поэтому после длительной стратификации, промывки и прорашивания семян в анализ мы использовали весь проросток (если его удалось получить), а также набухшие семена (заложенные на проращивание, напитавшиеся водой, но еще не проросшие). Также в анализе участвовали сухие семена (не подвергавшиеся никакому воздействию) и гербаризированные листовые пластиинки. Для минимального травмирования взрослого растения в популяции с одного экземпляра отбирали только одну листовую пластиинку.

Содержание ДНК определяли с помощью проточной цитометрии путем окрашивания ядер йодидом пропидия. Данные о флуоресценции изолированных ядер регистрировали с помощью проточного цитометра Cytoflex (Beckman Coulter, Inc.) с источником лазерного излучения 488 нм и фильтром 610 нм. Визуализацию и обработку гистограмм выполняли в программном обеспечении CytExpert (Beckman Coulter, Inc.). Измерения проводили в трех повторностях. Для расчета были использованы пики с числом ядер не менее 1000 и CV не более 5% [12]. Содержание ДНК исследованных образцов (2С, пг) рассчитывали по формуле: 2С, пг = (среднее значение пика образца / сред-

нее значение пика стандарта) × 2С стандарта, пг. Статистические данные рассчитывали в программе XLStat (Ad-dinsoft).

Исследование было проведено на базе Южно-Сибирского ботанического сада АлтГУ (г. Барнаул).

Результаты и их обсуждение

Ранее для выделения ядер при исследованиях размера генома рода *Colchicum* использовался буфер Гэлбрейта в двух модификациях: в первом варианте – со снижением концентрации Triton X-100 до 0.5% [10]; во втором – с добавлением 1% PVP [10]. Образцы *Colchicum* богаты фенольными соединениями, такими как антоциановые соединения, катехины, флавоны, фенолкарбоновые кислоты и дубильные вещества [13]. Учитывая это, требуется подбор наиболее оптимального буфера для обеспечения качества гистограмм (снижение уровня шумов и коэффициента вариации пиков, повышение количества выделяемых ядер) при анализе содержания ДНК.

С учетом литературных данных и наших экспериментальных сравнений был использован буфер LB01 [14] следующего состава: 15 mM Tris-HCl, 2 mM Trilon B ($\text{Na}_2\text{EDTA} \times 2\text{H}_2\text{O}$), 0,5 mM спермина тетрагидрохлорид, 80 mM KCl, 20 mM NaCl, 0,1% Triton X-100 с добавлением 50 мкг/мл йодида пропидия, 50 мкг/мл РНКазы, 12 mM тиосульфата натрия [12]. Данный буфер содержит соли и буферный агент для поддержания pH и осмотического давления, ингибиторы ДНКаз, детергент для лизиса эндоплазматической мембранны. Дополнительные компоненты включают РНКазу для расщепления РНК, собственно интеркалирующий краситель и восстановитель для ингибиования полифенолов (образует водородные связи с полифенолами), что снижает количество шумов и повышает общее качество гистограмм.

Большинство ядер, выделенных из образцов *Colchicum laetum* и *C. bulbocodium* subsp. *Versicolor*, находились на стадии G_0/G_1 клеточного цикла. Ядра на стадии G_2 либо не были обнаружены, либо присутствовали с низкой частотой. Пики флуоресценции имели четкие, узкие основания, небольшие коэффициенты вариаций (CV), достаточное количество событий (более 1000 на каждый пик) и были пространственно разнесены на гистограмме, что свидетельствует о корректном выборе методики выделения и окрашивания.



Согласно литературным данным, количество ДНК в пределах рода *Colchicum* сильно варьирует [10]. Например, *C. autumnale* L. 2C = 5.89 пг, *C. alpinum* Dammann ex. Springer 2C = 8.06 пг, *C. lusitanum* Brot. 2C=10.7 пг, *C. multiflorum* Brot. 2C=16.5 пг, *C. corsicum* B. 2C = 21.3 пг [10]. Опираясь на эти данные и предварительные измерения по подбору стандарта, в качестве внутреннего стандарта нами

были выбраны *Petroselinum crispum* (2C = 4.5 пг) [15] и *Secale cereale* (2C = 16.19 пг) [16].

Содержание ДНК у *C. bulbocodium* subsp. *versicolor* при использовании проростков в качестве исходного материала составило 8.049 пг (рис. 1, а, таблица). Проросток использовался весь целиком (с колеоптилем и гипокотилем, что позволяет накопить больше событий).

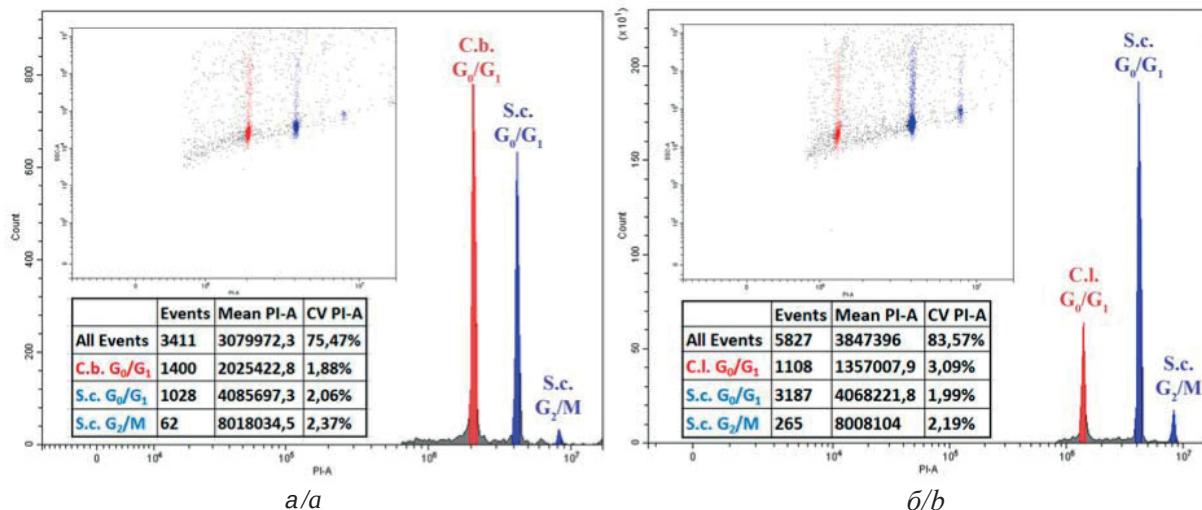


Рис. 1. Примеры гистограмм проростков *Colchicum bulbocodium* subsp. *versicolor* (а) и *C. leatum* (б) совместно с *Secale cereale* в качестве внутреннего стандарта. Здесь и далее красным цветом обозначены пики, соответствующие образцам; синим – пики стандарта. G_0/G_1 и G_2/M – стадии клеточного цикла. По оси абсцисс – интенсивность флуоресценции (PI-A), по оси ординат – количество событий (Count) (цвет онлайн)

Fig. 1. Examples of histograms of live specimens of *C. bulbocodium* subsp. *versicolor* (a) and *Colchicum leatum* (b) together with *Secale cereale* as an internal standard. Here and further, the peaks, corresponding to the samples, are indicated in red; the peaks of the standard are indicated in blue (colour online)

По литературным данным *C. bulbocodium* subsp. *versicolor* является диплоидом с основным числом хромосом $x = 11$, $2n = 2x = 22$ [5]. Прямой подсчет хромосом на исследованных образцах нами не проводился. Однако, основываясь на данных других исследователей по количеству хромосом и на полученных нами результатах по размеру генома, можно примерно рассчитать содержание ДНК в одной хромосоме *C. bulbocodium* subsp. *versicolor*, которое составляет 0.366 пг.

Среднее содержание ДНК в проростках *C. leatum* составило 5.412 пг (см. рис. 1, б, таблица). Известно, что у данного вида основное число хромосом равно $x = 7$, а растения являются гексаплоидами ($2n = 6x = 42$) [5]. Следовательно, содержание ДНК в одной хромосоме у него равно 0.129 пг.

Содержание ДНК в проростках *C. bulbocodium* subsp. *versicolor* в 1.5 раза больше, чем в

образцах *C. leatum*. Размер моноплоидного (1Cx) генома *C. bulbocodium* subsp. *versicolor* в 4.5 раза больше *C. leatum* (см. таблицу). Ранее уже отмечался крупный размер хромосом *C. bulbocodium* subsp. *versicolor* в сравнении с другими видами этого рода [17]. Данные по отношению 2C к размеру хромосом можно использовать для скрининга полидности популяций этих видов методом проточной цитометрии. Однако, для более точного анализа взаимосвязи рассчитанного содержания ДНК к полидности необходим прямой подсчет хромосом.

Использование семян для исследования содержания ДНК видов рода *Colchicum* является перспективным направлением. Однако наши экспериментальные данные показывают, что у семян с развитым эндоспермом пик зародыша может быть не виден на гистограмме или уступать по высоте пику эндосперма (рис. 2). Подобная картина разности высоты

Содержание ДНК в образцах *Colchicum bulbocodium* subs. *versicolor* и *C. laetum*
Table. DNA content in *Colchicum bulbocodium* subs. *versicolor* and *C. laetum* samples

Вид материала / Type of material	2C, пг / 2C, pg	SD, пг / SD, pg	CV, %	1Cx, пг / 1Cx, pg	Уровень плоидности* / Ploidy level*
<i>Colchicum bulbocodium</i> subs. <i>versicolor</i>					
Проросток / The sprout	8.049	—	1.920	4.025	2
Набухшие семена** / Swollen seeds **	Эмбрион / Embryo	8.054	0.116	1.440	4.027
	Эндосперм / Endosperm	11.738	0.155	1.320	3.913
Гербарий / Herbarium	11.329	—	5.610	5.665	2
<i>Colchicum laetum</i>					
Проросток / The sprout	5.412	—	2.660	0.902	6
Набухшие семена ** / Swollen seeds **	Эмбрион / Embryo	5.457	0.021	0.380	0.910
	Эндосперм / Endosperm	8.086	0.095	1.170	0.898
Сухие семена / Dry seeds	Эмбрион / Embryo	5.578	—	2.990	0.930
	Эндосперм / Endosperm	9.124	0.102	1.120	1.014
Гербарий / Herbarium	6.586	—	6.650	1.098	6

Примечание. 2C – содержание ядерной ДНК; SD – стандартное отклонение; CV – коэффициент вариации; 1Cx – размер голоплоидного генома; * – при основном числе хромосом $x = 11$ [5]; ** – семена, заложенные на проращивание, набухшие, но ещё не проросшие. Прочерк означает отсутствие данных.

Note. 2C – the content of nuclear DNA; SD – the standard deviation; CV – the coefficient of variation; 1Cx – the size of the holoploid genome; * – when the main number of chromosomes is $x = 11$ [5]; ** – seeds laid for germination, swollen, but not sprouted. A dash indicates that there is no data.

пиков характерна для зонтичных, у которых также количество ядер эндосперма преобладает над количеством ядер зародыша [12]. Чтобы не допустить неоднозначную интерпретацию результатов, каждое семя исследовалось по отдельности, а чтобы исключить возможность

ошибки, положение пика зародыша валидировали путем сравнения с проростками и исследованием эндосперма без зародыша. Наличие ядер зародыша верифицировали на двухпараметровых гистограммах флуоресценции к боковому рассеиванию (см. рис. 2).

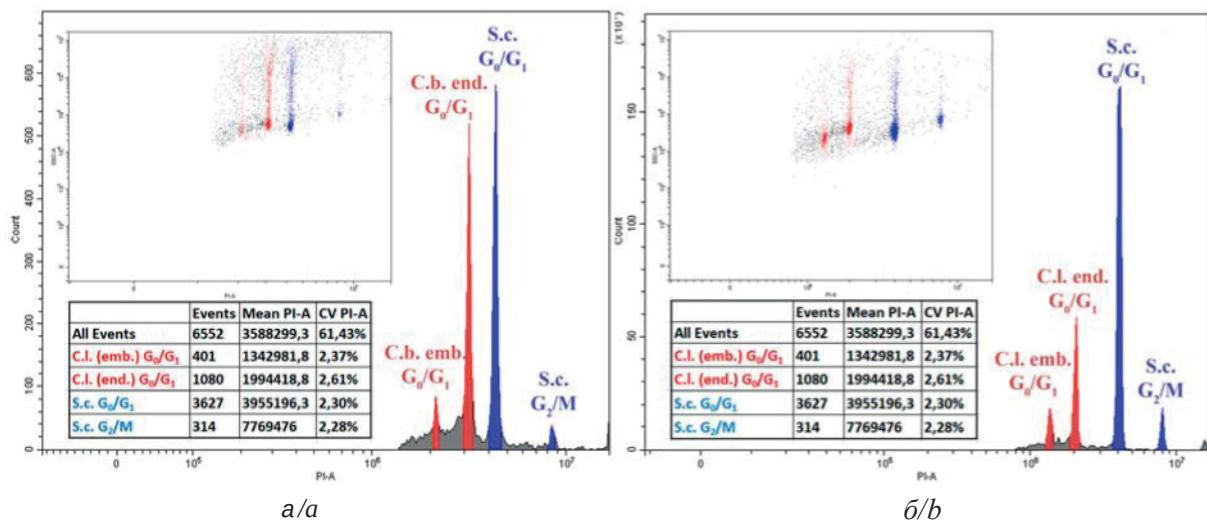


Рис. 2. Примеры гистограмм семян *Colchicum bulbocodium* subsp. *versicolor* (а) и *C. leatum* (б) совместно с *Secale cereale* в качестве внутреннего стандарта. Emb. – зародыш; end. – эндосперм (цвет онлайн)

Fig. 2. Examples of histograms of seeds of *Colchicum bulbocodium* subsp. *versicolor* (a) and *C. leatum* (b) together with *Secale cereale* as an internal standard. Emb. – embryo; end. – endosperm (colour online)

Значения содержания ДНК, соответствующие зародышам (и в сухих, и в набухших семенах), были фактически идентичны значениям, полученным на проростках (см. таблицу), а незначительные отличия укладывались в ошибку среднего и могли быть связаны с внутривидовой изменчивостью образцов. В сухих семенах *C. laetum* размер генома эндосперма был на 11% больше, чем в набухших. Подобное различие может быть связано с тем, что эндосперм является источником запасающих веществ и РНК для развивающегося зародыши, и в процессе онтогенеза в его клетках происходят изменения, затрагивающие ДНК [18]. Также нельзя исключать различия в структуре хроматина и белок-нуклеиновых комплексов. Поэтому важно ещё раз подчеркнуть необходимость использования живой листовой пластиинки или проростка при первичном анализе.

Основываясь на полученных значениях размера генома для зародыши и эндосперма и опираясь на представленную в литературе пloidность обоих видов, мы установили предположительную пloidность эндосперма (см. таблицу). В семенах *C. bulbocodium* subsp. *versicolor* при диплоидном зародыше эндосперм был триплоидным, а в семенах *C. laetum* при гексаплоидном зародыше содержание ДНК в эндосперме соответствовало нонаплоиду (см. таблицу). Соотношение содержания ДНК зародыши к эндосперму обоих видов рода *Colchicum* составляло 1.5 (2C/3C), что характерно для видов со стандартным половым размножением [19].

В целом для исследования содержания ДНК методом проточной цитометрии двух описанных видов рода *Colchicum* их семена могут быть использованы в качестве анализируемого материала.

Несмотря на то, что в проточной цитометрии обычно применяется свежая ткань, все больше исследований показывают, что для получения данных о пloidности можно использовать высушенные образцы [15, 20, 21]. Однако в своей работе J. Viruel с соавторами (2019), на примере нескольких видов рода *Dioscorea* [22], показали, что хотя с помощью проточной цитометрии можно оценить уровень пloidности гербарных образцов, собранных до пятнадцати лет назад, вероятность успеха невелика (5.9%). Процент успеха может зна-

чительно различаться в зависимости от вида [21]. Так, у представителей рода *Selaginella* успешно анализировали как пloidность, так и содержание ДНК с использованием образцов возрастом более 50 лет [23]. В случае использования высушенных образцов стоит провести предварительные исследования по влиянию высушивания на изменения в содержании ДНК. В целом содержание ДНК высушенных образцов выше, чем в живом материале, и снижается при хранении [12, 24, 25].

В нашем исследовании для некоторых гербарных образцов *Colchicum* потребовалось проанализировать в четыре раза больше растительного материала (т. е. примерно 3 см² ткани листовой пластиинки) по сравнению с проростками, чтобы получить достаточное количество ядер для анализа. Из 60 гербарных образцов *Colchicum* на 20 визуализировались только пики внутреннего стандарта и не визуализировались пики самих образцов. На остальных – гистограммы имели довольно высокий уровень шума (рис. 3). Скорее всего, это связано с начавшимися процессами разрушения ядер и хроматина при хранении материала. В своей работе P. Tomaszewska с соавторами (2021) на примере нескольких видов рода *Urochloa* отмечают негативное влияние вторичных метаболитов, усложняющих проведение цитометрического анализа гербарных образцов и приводящих к неточному измерению содержания ДНК. Гербарные образцы на гистограммах имели довольно высокий уровень шума и давали высокие значения CV (до 10%) [26].

Содержание ДНК в гербарных образцах *C. bulbocodium* subsp. *versicolor* в сравнении с живым материалом было завышено и составляло 11.329 пг, что по значению даже ближе к триплоидному эндосперму, чем диплоидному зародыши (см. таблицу). В гербарных образцах *C. laetum* содержание ДНК тоже было завышенным в сравнении с проростком, но меньше, чем в случае с предыдущим описанным видом, и составляло 6.586 пг (см. таблицу).

Суммарно *C. bulbocodium* subsp. *versicolor* показал отклонение в размере генома гербария от живого материала больше на 29%, а *C. laetum* – на 18%. Если в исследуемых образах много гетерохроматина, то при сушке белки-гистоны будут разрушаться. Во время проведения

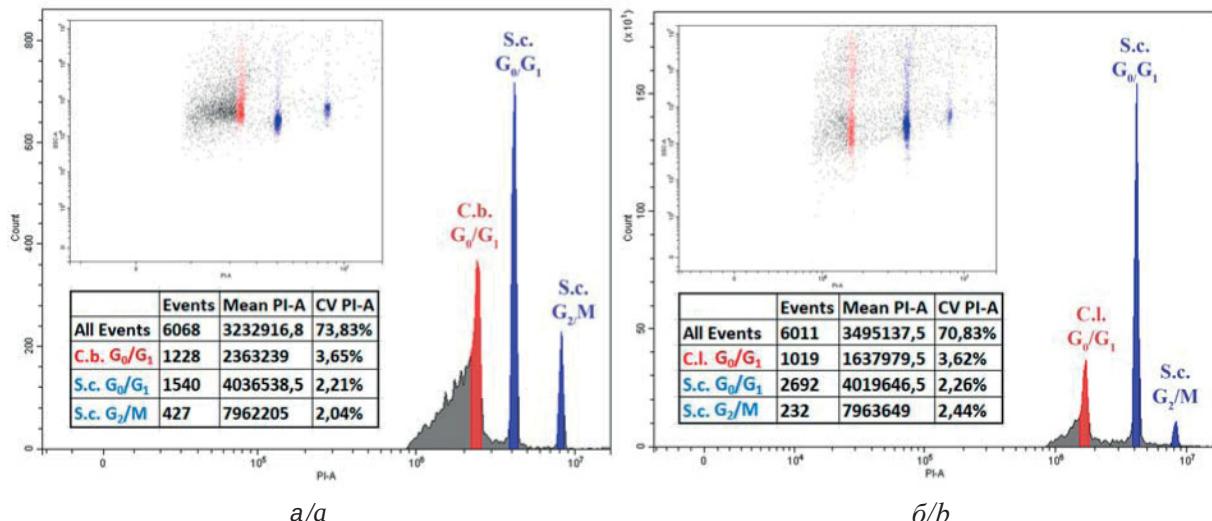


Рис. 3. Примеры гистограмм гербарных образцов *Colchicum bulbocodium* subsp. *versicolor* (а) и *C. leatum* (б) совместно с *Secale cereale* в качестве внутреннего стандарта (цвет онлайн)

Fig. 3. Examples of histograms of herbarium specimens of *Colchicum bulbocodium* subsp. *versicolor* (a) and *C. leatum* (b) together with *Secale cereale* as an internal standard (colour online)

процедуры выделения и окраски интактных ядер место белков занимает флуоресцентный краситель (в данном случае пропидий йодид). В таком случае общая флуоресценция увеличивается, и после расчетов получается завышенный результат [27, 28]. Используемые нами гербарные образцы хранились в течение двух-трех лет. Завышенные значения содержания ДНК, возможно, связаны и с различием в пloidности, однако из-за высоких отклонений 2С высушенных образцов доказать или опровергнуть это предположение может только прямой подсчет хромосом.

Исходя из полученных результатов, использовать гербарный материал *Colchicum* можно только для скрининга ориентировочной пloidности.

Заключение

В результате апробирования и оптимизации методики пробоподготовки образцов *C. bulbocodium* subsp. *versicolor* и *C. leatum* в качестве буфера, позволяющего выделить достаточное количество неповрежденных ядер из исходного растительного материала, оптимальен буфер LB01 с добавлением тиосульфата натрия, а в качестве внутреннего стандарта – *P. crispum* и *S. cereale*.

Методом проточной цитометрии впервые установлено содержание ДНК *C. bulbocodium*

subsp. *versicolor* и *C. laetum* из естественных местообитаний на территории РФ. Содержание ДНК *C. bulbocodium* subsp. *versicolor* в 1,5 раза больше *C. laetum*.

Показано, что в качестве материала для исследования размера генома методом проточной цитометрии двух видов рода *Colchicum* можно использовать и семена при условии учёта их особенности – количество событий, соответствующих зародышу гораздо меньше, чем клеток эндосперма.

Гербарные образцы *Colchicum* мало пригодны в качестве материала для анализа содержания ДНК, так как данный параметр сильно завышен в сравнении с живым материалом.

Полученные нами данные дополняют и расширяют представления о содержании уровня ДНК у представителей рода *Colchicum*.

Список литературы

1. Оганезова Г. Г. Проблемы рода *Colchicum* L. *Colchicum* sensu lato или *Colchicum* sensu stricto в свете категорий прерывности и непрерывности. Ереван : НАН РА, Институт ботаники им. А. Тахтаджяна, 2019. 176 с.
2. Vinnersten A., Manning J. A new classification of Colchicaceae // Taxon. 2007. Vol. 56, № 1. P. 171–178.
3. Агапова Н. Д. Числа хромосом цветковых растений флоры СССР: Семейства Asteraceae – Меняущиеся / под ред. А. Л. Тахтаджяна. Л. : Наука. Ленингр. отд-ние, 1990. 509 с.



4. Persson K. Nomenclature synopsis of the genus *Colchicum* (Colchicaceae) with some new species and combinations // Bot. Jahrb. Syst. 2007. Vol. 127, № 2. P. 166–242.
5. Оганезова Г. Г. Особенности географии и направлений эволюции гистерантных и синантных видов рода *Colchicum* s. str. (Colchicaceae) // Takhtajania. 2011. № 1. С. 87–97.
6. Kashin A. S., Parkhomenko A. S., Kulikova L. V., Petrova N. A., Shilova I. V., Lavrentiev M. V., Shushunov V. A. Potential Range of *Bulbocodium versicolor* (Ker-Gawl.) Spreng (Colchicaceae, Liliopsida) in Russia // Povolzhskiy Journal of Ecology. 2020. № 2. P. 241–247. <https://doi.org/10.35885/1684-7318-2020-2-241-247>
7. Veselý P., Bureš P., Šmarda P., Pavlicek T. Genome size and DNA base composition of geophytes: The mirror of phenology and ecology? // Annals of Botany. 2012. Vol. 109, № 1. P. 65–75. <https://doi.org/10.1093/aob/mcr267>
8. Šmarda P., Bureš P., Horová L., Leitch I. J., Mucina L., Pacini E., Tichý L., Grulich V., Rotreklová O. Ecological and evolutionary significance of genomic GC content diversity in monocots // Proceedings of the National Academy of Sciences. 2014. Vol. 111, № 39. P. 4096–4102. <https://doi.org/10.1073/pnas.1321152111>
9. Bou Dagher-Kharrat M., Abdel-Samad N., Douaihy B., Bourge M., Fridlender A., Siljak-Yakovlev S., Brown S. C. Nuclear DNA C-values for biodiversity screening: Case of the Lebanese flora // Plant Biosystems. 2013. Vol. 147, № 4. P. 1228–1237. <https://doi.org/10.1080/11263504.2013.861530>
10. Fridlender A., Brown S., Verlaque R., Crosnier M. T., Pech N. Cytometric determination of genome size in *Colchicum* species (Liliales, Colchicaceae) of the western Mediterranean area // Plant Cell Reports. 2002. Vol. 21, № 4. P. 347–352. <https://doi.org/10.1007/s00299-002-0522-4>
11. Николаева М. Г., Разумова М. В., Гладкова В. Н. Справочник по проращиванию покоящихся семян. Л. : Наука. Ленингр. отд-ние, 1985. 506 с.
12. 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>
13. Грибок Н. А., Власова Т. М., Мамюшина М. В., Курченко В. П. Содержание вторичных метаболитов у представителей рода *Colchicum* L., интродуцированных в условиях Беларуси // Тр. Белорус. гос. ун-та. Сер.: Физиол., биохим. и молекуляр. основы функционирования биосистем. 2010. Т. 4, ч. 2 : Инновац. биотехнологии XXI в. С. 129–137.
14. Doležel J., Sgorbati S., Lacretti S. Comparison of three DNA fluorochromes for flow cytometric estimation of nuclear DNA content in plants // Physiol. Plant. 1992. № 85. P. 625–631.
15. Obermayer R., Leitch I. J., Hanson L., Bennett M. D. Nuclear DNA C-values in 30 species double the familial representation in pteridophytes // Ann. Bot. 2002. Vol. 90, № 2. P. 209–217. <https://doi.org/10.1093/aob/mcf167>
16. Doležel J., Greilhuber J., Lacretti S., Meister A., Lysák M., Nardi L. Plant genome size estimation by flow cytometry: Inter-laboratory comparison // Ann. Bot. 1998. Vol. 82. P. 17–26. <https://doi.org/10.1006/anbo.1998.0730>
17. Levan A. *Bulbocodium* to the c-mitotic action of colchicine // Cyto-genetic laboratory of the Swedish seed association. 1947. Vol. 33, № 4. P. 552–566. <https://doi.org/10.1111/j.1601-5223.1947.tb02821.x>
18. Кунах В. А. Пластичность генома соматических клеток и адаптивность растений // Молекулярная и прикладная генетика. 2011. № 12. С. 7–12.
19. Matzka F., Meister A., Schubert I. An efficient screen for reproductive pathways using mature seeds of monocots and dicots // Plant J. 2000. Vol. 21, № 1. P. 97–108. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2000.00647.x>
20. Servick S., Visger C. J., Gitzendanner M. A., Soltis P. S., Soltis D. E. Population genetic, geographic structure, and multiple origins of autoploidy in *Galax Urceolata* // Am. J. Bot. 2015. № 102. P. 973–982. <https://doi.org/10.3732/ajb.1400554>
21. Suda J., Trávníček P. Reliable DNA ploidy determination in dehydrated tissues of vascular plants by DAPI flow cytometry: new prospects for plant research // Cytometry A. 2006. Vol. 4. P. 273–80. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.20253>
22. Viruel J., Conejero M., Hidalgo O., Pokorný L., Powell R. F., Forest F., Kantar M. B., Soto Gomez M., Graham S. W., Gravendeel B., Wilkin P., Leitch I. J. A Target Capture-Based Method to Estimate Ploidy From Herbarium Specimens // Frontiers in Plant Science. 2019. Vol. 10. URL: https://www.frontiersin.org/journals/plant-science/articles/10.3389/fpls.2019.00937/full?field=&id=467104&journalName=Frontiers_in_Plant_Science (дата обращения: 15.05.2025).
23. 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., Sinitina T. A., Friesen N., Zhang X., Shmakov A. I. The cytotypes variability of the complex *Selaginella sanguinolenta* s. l // Turczaninowia. 2020. № 23. P. 5–14. <https://doi.org/10.14258/turczaninowia.23.2.1>
24. Bainard J. D., Husband B. C., Baldwin S. J., Fazekas A. J., Gregory T. R., Newmaster S. G., Kron P. The effects of rapid desiccation on estimates of plant genome size // Chromosome Res. 2011. № 19. P. 825–842. <https://doi.org/10.1007/s10577-011-9232-5>
25. Wang G., Yang Y. The effects of fresh and rapid desiccated tissue on estimates of Ophiopogoneae genome size // Plant Divers. 2016. № 38. P. 190–193. <https://doi.org/10.1016/j.pld.2016.08.001>

26. Tomaszewska P., Pellny T. K., Hernández L. M., Mitchell R. A. C., Castiblanco V., de Vega J. J., Schwarzacher T., Heslop-Harrison P. Flow Cytometry-Based Determination of Ploidy from Dried Leaf Specimens in Genomically Complex Collections of the Tropical Forage Grass *Urochloa* s. l. // *Genes*. 2021. № 12. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34201593/> (дата обращения: 15.05.2025).
27. Staats M., Cuenga A., Richardson J. E., Vrielink-van Ginkel R., Petersen G., Seberg O., Bakker T. F. DNA Damage in Plant Herbarium Tissue // *PLoS ONE*. 2011. Vol. 12, № 6. P. 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028448>
28. Darzynkiewicz Z., Traganos F., Kapuscinski J., Staiano-Coico L., Melamed M. R. Accessibility of DNA *in situ* to various fluorochromes: Relationship to chromatin changes during erythroid differentiation of Friend leukemia cells // *Cytometry A*. 1984. Vol. 5, № 4. P. 355–363. <https://doi.org/10.1002/cyto.990050411>
- References**
1. Oganezova G. G. *Problemy roda Colchicum L. Colchicum sensu lato ili Colchicum sensu stricto v svete kategoriy preryvnosti i nepreryvnosti* [Problems of the genus *Colchicum* L. *Colchicum* sensu lato or *Colchicum* sensu stricto in light of the categories of discontinuity and continuity]. Yerevan, NAS RA, Institute of Botany named after A. Takhtajan Publ., 2019. 176 p. (in Russian).
 2. Vinnersten A., Manning J. A new classification of Colchicaceae. *Taxon*, 2007, vol. 56, no. 1, pp. 171–178.
 3. Agapova N. D. *Chisla khromosom tsvetkovykh rasteniy flory SSSR: Semejstva Asteraceae – Menyanthaceae*. Pod red. A. L. Takhtadzhyan [Takhtadzhyan A. L., ed. Chromosome numbers of flowering plants of the flora of the USSR: Asteraceae – Menyanthaceae families]. Leningrad, Nauka, Leningradskoe otdelenie, 1990. 509 p. (in Russian).
 4. Persson K. Nomenclature synopsis of the genus *Colchicum* (Colchicaceae) with some new species and combinations. *Bot. Jahrb. Syst.*, 2007, vol. 127, no. 2, pp. 166–242.
 5. Oganezova G. G. Peculiarities of Geography and the Evolution trends of Hysteran and Synant Species of Genus *Colchicum* s. str. (Colchicaceae). *Takhtajania*, 2011, no. 1, pp. 87–97 (in Russian).
 6. Kashin A. S., Parkhomenko A. S., Kulikova L. V., Petrova N. A., Shilova I. V., Lavrentiev M. V., Shushunov V. A. Potential Range of *Bulbocodium versicolor* (Ker-Gawl.) Spreng (Colchicaceae, Liliopsida) in Russia. *Povolzhskiy Journal of Ecology*, 2020, no. 2, pp. 241–247. <https://doi.org/10.35885/1684-7318-2020-2-241-247>
 7. Veselý P., Bureš P., Šmarda P., Pavlicek T. Genome size and DNA base composition of geophytes: The mirror of phenology and ecology? *Annals of Botany*, 2012, vol. 109, no. 1, pp. 65–75. <https://doi.org/10.1093/aob/mcr267>
 8. Šmarda P., Bureš P., Horová L., Leitch I. J., Mucina L., Pacini E., Tichý L., Grulich V., Rotreklová O. Ecological and evolutionary significance of genomic GC content diversity in monocots. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2014, vol. 111, no. 39, pp. 4096–4102. <https://doi.org/10.1073/pnas.1321152111>
 9. Bou Dagher-Kharrat M., Abdel-Samad N., Douaihy B., Bourge M., Fridlender A., Siljak-Yakovlev S., Brown S. C. Nuclear DNA C-values for biodiversity screening: Case of the Lebanese flora. *Plant Biosystems*, 2013, vol. 147, no. 4, pp. 1228–1237. <https://doi.org/10.1080/11263504.2013.861530>
 10. Fridlender A., Brown S., Verlaque R., Crosnier M. T., Pech N. Cytometric determination of genome size in *Colchicum* species (Liliales, Colchicaceae) of the western Mediterranean area. *Plant Cell Reports*, 2002, vol. 21, no. 4, pp. 347–352. <https://doi.org/10.1007/s00299-002-0522-4>
 11. Nikolaeva M. G., Razumova M. V., Gladkova V. N. *Spravochnik po prorashchivaniyu pokoyashchikh semyan* [Handbook on germination of dormant seeds]. Leningrad, Nauka, Leningradskoe otdelenie, 1985. 506 p. (in Russian).
 12. 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, no. 2, pp. 86–104. <https://doi.org/10.14258/turczaninowia.27.2.10>
 13. Gribok N. A., Vlasova T. M., Matyushina M. V., Kurchenko V. P. Secondary metabolites content of *Colchicum* L. Genus representatives introduced in the conditions of Belarus. *Proceedings of the Belarusian State University Series of Physiological, Biochemical and Molecular Biology Sciences*, 2010, vol. 4, pt. 2: Innovative Biotechnologies of the XXI century, pp. 129–137 (in Russian).
 14. Doležel J., Sgorbati S., Lacretti S. Comparison of three DNA fluorochromes for flow cytometric estimation of nuclear DNA content in plants. *Physiol. Plant*, 1992, no. 85, pp. 625–631.
 15. Obermayer R., Leitch I. J., Hanson L., Bennett M. D. Nuclear DNA C-values in 30 species double the familial representation in pteridophytes. *Ann. Bot.*, 2002, vol. 90, no. 2, pp. 209–217. <https://doi.org/10.1093/aob/mcf167>
 16. Doležel J., Greilhuber J., Lucretti S., Meister A., Lysák M., Nardi L. Plant genome size estimation by flow cytometry: Inter-laboratory comparison. *Ann. Bot.*, 1998, vol. 82, pp. 17–26. <https://doi.org/10.1006/anbo.1998.0730>
 17. Levan A. *Bulbocodium* to the c-mitotic action of colchicine. *Cyto-genetic Laboratory of the Swedish Seed Association*, 1947, vol. 33, no. 4, pp. 552–566. <https://doi.org/10.1111/j.1601-5223.1947.tb02821.x>
 18. Kunakh V. A. Plasticity of the genome of somatic cells and adaptivity of plants. *Molecular and Applied Genetics*, 2011, no. 12, pp. 7–12 (in Russian).



19. Matzk F., Meister A., Schubert I. An efficient screen for reproductive pathways using mature seeds of monocots and dicots. *Plant J.*, 2000, vol. 21, no.1, pp. 97–108. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2000.00647.x>
20. Servick S., Visger C. J., Gitzendanner M. A., Soltis P. S., Soltis D. E. Population genetic population, geographic structure, and multiple origins of autoploidy in *Galax Urceolata*. *Am. J. Bot.*, 2015, no. 102, pp. 973–982. <https://doi.org/10.3732/ajb.1400554>
21. Suda J., Trávníček P. Reliable DNA ploidy determination in dehydrated tissues of vascular plants by DAPI flow cytometry new prospects for plant research. *Cytometry A*, 2006, vol. 4, pp. 273–80. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.20253>
22. Viruel J., Conejero M., Hidalgo O., Pokorný L., Powell R. F., Forest F., Kantar M. B., Soto Gomez M., Graham S. W., Gravendeel B., Wilkin P., Leitch I. J. A Target Capture-Based Method to Estimate Ploidy From Herbarium Specimens. *Frontiers in Plant Science*, 2019, vol. 10. Available at: <https://www.frontiersin.org/journals/plant-science/articles/10.3389/fpls.2022.869423/full> (accessed May 15, 2025). <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00937>
23. 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., Sinitina T. A., Friesen N., Zhang X., Shmakov A. I. The cytotypes variability of the complex *Selaginella sanguinolenta* s. l. *Turczaninowia*, 2020, no. 23, pp. 5–14. <https://doi.org/10.14258/turczaninowia.23.2.1>
24. Bainard J. D., Husband B. C., Baldwin S. J., Fazekas A. J., Gregory T. R., Newmaster S. G., Kron P. P. The effects of rapid desiccation on estimates of plant genome size. *Chromosome Res.*, 2011, no. 19, pp. 825–842. <https://doi.org/10.1007/s10577-011-9232-5>
25. Wang G., Yang Y. The effects of fresh and rapid desiccated tissue on estimates of Ophiopogoneae genome size. *Plant Divers.*, 2016, no. 38, pp. 190–193. <https://doi.org/10.1016/j.pld.2016.08.001>.
26. Tomaszewska P., Pellny T. K., Hernández L. M., Mitchell R. A. C., Castiblanco V., de Vega J. J., Schwarzbacher T., Heslop-Harrison P. Flow Cytometry-Based Determination of Ploidy from Dried Leaf Specimens in Genomically Complex Collections of the Tropical Forage Grass *Urochloa* s. l. *Genes*, 2021, no. 12. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34201593/> (accessed May 15, 2025).
27. Staats M., Cuenca A., Richardson J. E., Vrielink-van Ginkel R., Petersen G., Seberg O., Bakker T. F. DNA Damage in Plant Herbarium Tissue. *PLoS ONE*, 2011, vol. 12, no. 6, pp. 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028448>
28. Darzynkiewicz Z., Traganos F., Kapuscinski J., Staiano-Coico L., Melamed M. R. Accessibility of DNA *in situ* to various fluorochromes: Relationship to chromatin changes during erythroid differentiation of Friend leukemia cells. *Cytometry A*, 1984, vol. 5, no. 4, pp. 355–363. <https://doi.org/10.1002/cyto.990050411>

Поступила в редакцию 15.08.2025; одобрена после рецензирования 03.09.2025; принята к публикации 05.09.2025
The article was submitted 15.08.2025; approved after reviewing 03.09.2025; accepted for publication 05.09.2025