НАУЧНЫЙ ЖУРНАЛ
РАСТИТЕЛЬНЫЙ МИР АЗИАТСКОЙ РОССИИ

Растительный мир Азиатской России, 2019, № 1(33), с. 48–52 **http://www.izdatgeo.ru**

УДК 575.174.015.3:575.853; 576.316.2 DOI:10.21782/RMAR1995-2449-2019-1(48-52)

ХРОМОСОМНЫЙ ПОЛИМОРФИЗМ КОПЕЕЧНИКА ЗАБЫТОГО (*HEDYSARUM NEGLECTUM, FABACEAE*) ПО ЛОКАЛИЗАЦИИ 45S И 5S рДНК

О.Ю. Юркевич[1], Т.Е. Саматадзе[1], С.А. Зощук[1], С.И. Ромашкина[2], И.Ю. Селютина[3], А.В. Амосова[1], О.В. Муравенко[1]

[1]*Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН,*
119991, Москва, ул. Вавилова, 32, e-mail: olikys@gmail.com
[2]*Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений,*
117216, Москва, ул. Грина, 7, e-mail: Romashkin69@inbox.ru
[3]*Центральный сибирский ботанический сад СО РАН,*
630090, Новосибирск, ул. Золотодолинская, 101, e-mail: selyutina.inessa@mail.ru

Изучен межпопуляционный хромосомный полиморфизм лекарственного растения *Hedysarum neglectum* (*Fabaceae*) с использованием молекулярно-цитогенетических маркеров. Установлена высокая вариабельность характера распределения кластеров генов рибосомных РНК на хромосомах у растений *H. neglectum* из различных мест произрастания.

Ключевые слова: *Hedysarum, хромосомный полиморфизм, FISH-анализ, 45S и 5S рДНК.*

CHROMOSOMAL POLYMORPHISM ON LOCALIZATION OF 45S AND 5S rDNA IN *HEDYSARUM NEGLECTUM* (*FABACEAE*)

O.Yu. Yurkevich[1], T.E. Samatadze[1], S.A. Zoshchuk[1], S.I. Romashkina[2], I.Yu. Selyutina[3], A.V. Amosova[1], O.V. Muravenko[1]

[1]*Engelhardt Institute of Molecular Biology, RAS,*
119991, Moscow, Vavilov str., 32, e-mail: olikys@gmail.com
[2]*All-Russian Institute of Medicinal and Aromatic Plants,*
117216, Moscow, Green str., 7, e-mail: Romashkin69@inbox.ru
[3]*Central Siberian Botanical Garden, SB RAS,*
630090, Novosibirsk, Zolotodolinskaya str., 101, e-mail: selyutina.inessa@mail.ru

Inter-population chromosomal polymorphism in medicinal plant *Hedysarum neglectum* (*Fabaceae* family) was studied with the use of molecular cytogenetic markers. Our findings indicated the high variability of distribution patterns of clusters ribosomal RNA genes in chromosomes of *H. neglectum* plants collected from different habitats.

Key words: *Hedysarum, chromosome polymorphism, FISH-analysis, 45S and 5S rDNA.*

ВВЕДЕНИЕ

Род *Hedysarum* L. из семейства бобовые (*Fabaceae*) включает несколько известных лекарственных видов, у которых выявлено более 150 соединений, в том числе различные аминокислоты, углеводы, алкалоиды, стерины, флавоноиды, изофлавоны, ксантоны, дубильные вещества, эфирные масла (Неретина, 2004; Кукушкина и др., 2011; Федорова и др., 2011). Эти соединения обусловливают иммуномодулирующие, противовирусные, противоопухолевые, антиоксидантные, антибактериальные, антивозрастные, противодиабетические и антигипертензивные свойства копеечников (Dong et al., 2013; Huang et al., 2013). Многофункциональность биологически активных соединений копеечников открывает перспективы для разработки новых эффективных лекарственных препаратов. Это требует глубокого и разностороннего изучения генетических особенностей лекарственных видов копеечников, в том числе копеечника забытого *Hedysarum neglectum* Ledeb. (секция *Hedysarum*), который обладает спектром целебных свойств и используется в медицине.

По современным оценкам род *Hedysarum* насчитывает от 100 до 200 видов (Федченко, 1948; Choi, Ohashi, 1998), распространенных как в Старом, так и в Новом Свете. Копеечник забытый обитает в различных сообществах в лесном и высокогорном поясах Алтая, юга Красноярского

© **О.Ю. Юркевич, Т.Е. Саматадзе, С.А. Зощук, С.И. Ромашкина, И.Ю. Селютина, А.В. Амосова, О.В. Муравенко, 2019**

края, Восточного Саяна, реже в восточной части Казахстана, Киргизии и Монголии (Курбатский, 1994). Исследования кариотипов у видов рода *Hedysarum* немногочисленны и проводились с использованием методов монохромного окрашивания (Arslan et al., 2012; Zvyagina et al., 2016; Kumar et al., 2018) или С-бендинга (Issolah et al., 2006). С использованием молекулярно-цитогенетических маркеров изучен только алжирский вид копеечника *H. perrauderianum* Coss. and Durieu (Benhizia et al., 2013). Для *H. neglectum* структура кариотипа и его внутривидовой генетический полиморфизм практически не исследованы.

Целью настоящей работы стало изучение межпопуляционного хромосомного полиморфизма генов рДНК в кариотипах лекарственного растения *H. neglectum* с использованием молекулярно-цитогенетических маркеров методом FISH (fluorescence *in situ* hybridization – выявлением определенных последовательностей ДНК на хромосомах путем гибридизации *in situ* с ДНК-зондом, меченным флуоресцентным красителем).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Материалом для исследования послужили образцы *H. neglectum* из трех местонахождений: 1) К4/4-99, Республика Алтай, хр. Сальджар, горы Кайры-Ялбак (экспедиция ВИЛАР), 2) К692-02, из коллекции отдела агробиологии и селекции ВИЛАР (фармакопейный участок Ботанического сада ВИЛАР), 3) Республика Алтай, Улаганский район, правый берег р. Кубадру, лиственнично-кедровый лес (обр. AUK_2004).

Приготовление хромосомных препаратов. Семена копеечников, как и всех растений семейства *Fabaceae*, обладают твердосемянностью, поэтому для проращивания они подвергались скарификации. Семена обрабатывали наждачной бумагой и заливали кипящей водой на 5 мин. Затем обрабатывали антисептическим агентом и проращивали в чашках Петри 3–7 сут при температуре 22 °С. У проростков отрезали кончики корешков 1.0–1.5 см, оставляли при температуре от 0 до 4 °С на 12–16 ч. Корни фиксировали в фиксаторе Карнуа 3:1 (этанол:ледяная уксусная кислота) в течение суток. Окраску корешков производили 1%-м раствором ацетокармина, после чего готовили давленые препараты.

Флуоресцентная гибридизация *in situ* (FISH). Анализ хромосомного полиморфизма у растений *H. neglectum* методом FISH проводили, используя пробы 45S (pTa71) и 5S (pTa794) рибосомных РНК-генов (Gerlach, Bedbrook, 1979; Gerlach, Dyer, 1980). Пробы рРНК-генов метили с помощью флуорохромных наборов для мечения SpectrumAqua и SpectrumRed (Abbott Molecular, Wiesbaden, Германия). Процедуру FISH осуществляли по ранее описанной методике (Yurkevich et al., 2017). Для флуоресцентного окрашивания хромосом в среду для заключения препаратов Vectashield mounting medium (Vector laboratories, Peterborough, Великобритания) добавляли 0.125 мкг/мл 4.6-диамидино-2-фенилиндола (DAPI, Serva).

Хромосомный анализ. На флуоресцентном микроскопе Olympus BX61 (Olympus, Tokyo, Япония) отобранные хромосомные пластинки фотографировали с помощью черно-белой ПЗС-камеры Cool Snap (Roper Scientific Inc., США). Полученные изображения обрабатывали, используя программу Adobe Photoshop 10.0 software (Adobe, Birmingham, США). Для каждого образца анализировали не меньше 10 растений и 10 метафазных пластинок для каждого растения.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Кариотип у всех изученных образцов *H. neglectum* состоит из семи пар метацентрических и субметацентрических хромосом среднего размера (4–7 мкм). Число хромосом в кариотипе совпадает с таковым, выявленным для этого вида методом монохромного окрашивания хромосом (Курбатский, Малахова, 1992). Для секции *Hedysarum* (syn. = *Gamotion*, *Obscura*), к которой принадлежит *H. neglectum*, характерно основное число хромосом $n = 7$, что отличает ее от других секций рода, для которых определено основное число хромосом $n = 8$ (Курбатский, 1994; Choi, Ohashi, 2003; Arslan et al., 2012). На основании различий по числу хромосом ($n = 7$ и $n = 8$) ранее было предложено рассматривать данную секцию в качестве отдельного рода (Thulin, 1985).

Нами впервые исследована структура кариотипа *H. neglectum* с использованием метода FISH с зондами 45S и 5S рДНК. Установлено, что в кариотипе этого вида имеются две пары спутничных хромосом (хромосомы 5 и 6) с крупными сайтами гибридизации 45S рДНК и минорные полиморфные сайты 45S рДНК на пяти хромосомах. При этом число минорных сайтов варьирует в кариотипах образцов *H. neglectum* из различных мест произрастания. Локус 5S рДНК расположен проксимально в коротком плече на третьей паре хромосом.

Высокий полимофизм распределения множественных минорных сайтов в кариотипах трех изученных образцов *H. neglectum* представлен на рис. 1. У образцов *H. neglectum* AUK_2004 и

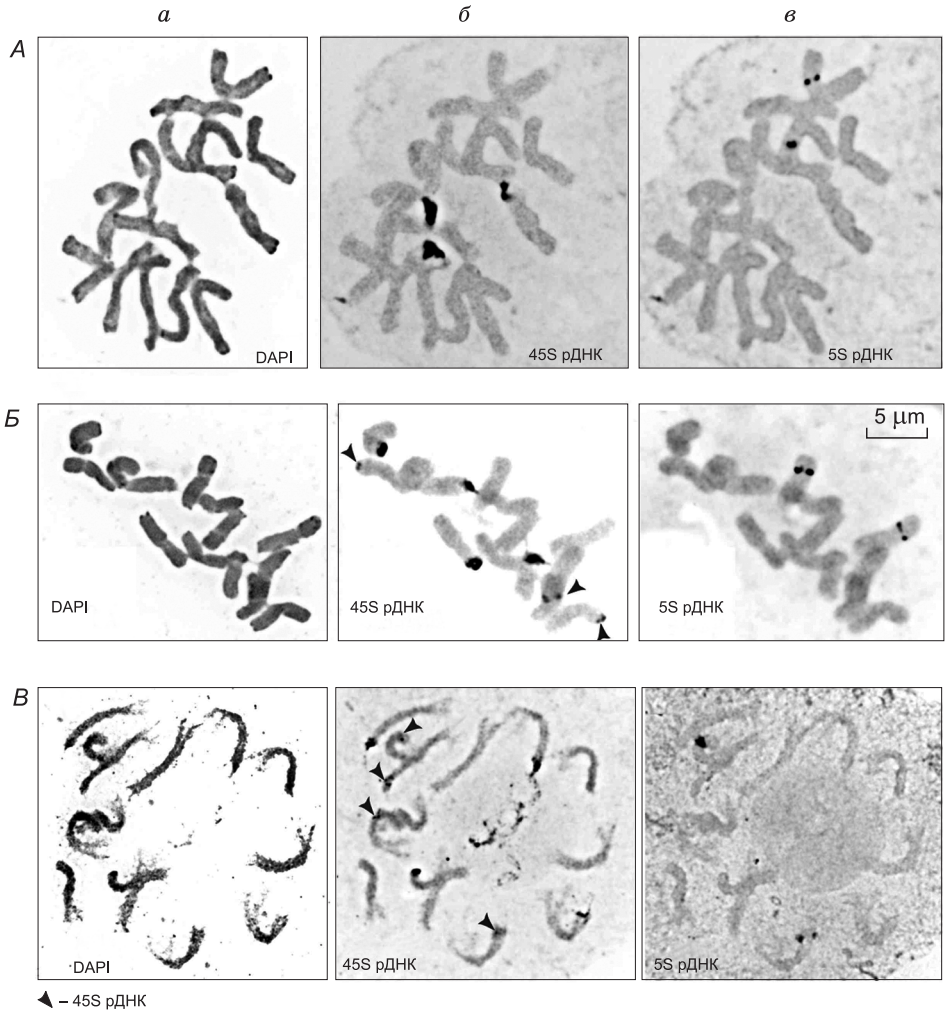

Рис. 1. Метафазные пластинки *H. neglectum* (2*n* = 14).

Хромосомы окрашены по DAPI – инвертированное изображение (*а*); FISH с пробами 45S рДНК (*б*); 5S рДНК (*в*). *А* – *H. neglectum* (К692-02); *Б* – *H. neglectum* (К4/4-99); *В* – *H. neglectum* (AUK_2004).

К692-02 обнаружены полиморфные минорные сигналы гибридизации 45S рДНК, они локализованы субтеломерно в коротких плечах хромосом 2 и 3, несущих сайт 5S рДНК. У образца К4/4-99 на спутничных хромосомах полиморфные минорные сайты 45S рДНК локализованы в медианном районе короткого плеча хромосомы 5 и в прицентромерном районе хромосомы 6. Кроме того, у этого образца дополнительные полиморфные минорные локусы 45S рДНК расположены дистально в коротких плечах хромосом 1 и 2.

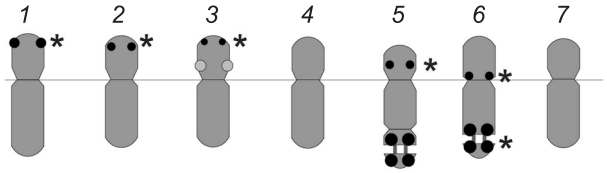

Рис. 2. Идиограммы хромосом *H. neglectum* (2*n* = 14).

На 1–3, 5 и 6 хромосомах черным цветом показана локализация 45S рДНК; серым цветом отмечена локализация 5S рДНК на плече хромосомы 3, звездочкой – полиморфные сайты 45S рДНК.

В результате проведенного исследования составлены обобщенные идиограммы хромосом с распределением сайтов гибридизации рДНК для всех изученных образцов, которые представлены на рис. 2.

Известно, что виды из секции *Hedysarum* сформировались в экстремальных условиях и отличаются резко выраженной морфологической дифференциацией в связи с адаптацией к различным условиям обитания (Федченко, 1948; Choi, Ohashi, 2003). Кроме того, виды этой секции отличаются от представителей других секций рода характерными особенностями карполого-анатомического строения плодов (Миронов, 2000) и наличием ксантона мангиферина в листьях (Choi, 1994; Кукушкина и др., 2011). Копеечник забытый растет в горных районах, где условия среды очень сильно меняются не только в зависимости от высоты над уровнем моря, но и от экспозиции и крутизны

склона. По результатам анализа межпопуляционной изменчивости у близкородственных видов *Hedysarum theinum* Krasnob. и *H. neglectum* по электрофоретическим спектрам полипептидов семян наибольшая изменчивость выявлена между популяциями последнего (Агафонова М.А., Агафонова О.В., 2002). При ранее проведенном исследовании с использованием молекулярных маркеров установлен высокий уровень внутривидового генетического разнообразия у других видов копеечников (Marghali et al., 2005; Bushman et al., 2007; Zvyagina et al., 2016), при этом, однако, полиморфизм *H. neglectum* изучен не был.

Полиморфизм по распределению минорных кластеров генов 45S рРНК обнаружен в кариотипах всех видовых образцов *H. neglectum*, происходящих из различных эколого-географических мест произрастания. Вместе с тем у другого вида копеечника, *H. perrauderianum* Coss. et Durieu, не найдено изменения числа кластеров генов рРНК в кариотипах изученных видовых образцов, собранных из разных мест обитания, локализованных на территории Алжира (Benhizia et al., 2013).

Варьирование числа локусов 45S рДНК также отмечено в кариотипах других растений, например, у дикорастущего *Phaseolus vulgaris* из разных географических мест (Pedrosa-Harand et al., 2006). Также показано, что разнообразные сорта озимого и ярового рапса, специально адаптированные к определенным климатическим зонам, различаются по числу сайтов рДНК в кариотипе (Amosova et al., 2014). В то же время обнаруженное у различных видов *Anacyclus* распределение вариаций числа сайтов рДНК и их хромосомное расположение не различаются по видам и географическим районам и объясняются их межвидовой гибридизацией по границам районов обитания (Rosato et al., 2017). Подобная мобильность рДНК - достаточно распространенное явление в геноме растений. Высокая скорость рекомбинации в терминальной области хромосом и активность мобильных элементов способствуют изменению количества сайтов рДНК в этом районе (Schubert, Wobus, 1985; Raskina et al., 2004; Roa, Guerra, 2012). Таким образом, хромосомный полиморфизм по распределению сайтов гибридизации 45S рДНК в кариотипах растений *H. neglectum* из разных популяций может быть связан как с рекомбинационной изменчивостью, так и с адаптационными механизмами геномов растений.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

С помощью молекулярно-цитогенетических методов нами изучено 30 образцов вида *H. neglectum* из трех местонахождений. Обнаружено, что кариотип этого вида характеризуется двумя спутничными хромосомами, на которых локализованы основные сайты 45S рДНК, и одной парой хромосом с сайтами 5S рДНК. Кроме того, в кариотипах у образцов из различных местонахождений обнаружены минорные сайты 45S рДНК. Таким образом, нами установлена высокая вариабельность рисунка распределения рибосомных РНК-генов на хромосомах у растений *H. neglectum* из различных мест произрастания.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований в рамках проекта № 18-04-01091 и поддержана Программой фундаментальных исследований государственных академий наук на 2013–2020 годы в рамках темы № 01201363824.

ЛИТЕРАТУРА

Агафонова М.А., Агафонова О.В. Полиморфизм полипептидов семян у близкородственных видов *Hedysarum theinum* Krasnob. и *H. neglectum* Ledeb. (*Fabaceae*) // Turczaninowia. 2002. Т. 85, № 2. С. 72–78.

Кукушкина Т.А., Высочина Г.И., Карнаухова Н.А., Селютина И.Ю. Содержание мангиферина и суммы ксантонов в растениях некоторых дикорастущих и интродуцированных видов *Hedysarum* (*Fabaceae*) // Раст. ресурсы. 2011. Вып. 1. С. 99–105.

Курбатский В.И. *Hedysarum* L. – Копеечник // Флора Сибири: *Fabaceae* (*Leguminosae*). Новосибирск, 1994. Т. 9. С. 153–166.

Курбатский В.И., Малахова Л.А. Числа хромосом для некоторых видов *Hedysarum* L. с территории Сибири // Систематические заметки по материалам Гербария им. П.Н. Крылова Том. гос. ун-та. 1992. № 89. С. 3–5.

Миронов Е.М. Сравнительное карполого-анатомическое исследование рода *Hedysarum* L. и трибы *Hedysareae* DC. (*Leguminosae*): автореф. дис. … канд. биол. наук / Е.М. Миронов. М., 2000. 16 с.

Неретина О.В. Химический состав экстрактивных веществ копеечника щетинистого *H. setigerum* Turcz. ex Fisch et Meyer: автореф. дис. … канд. хим. наук / О.В. Неретина. Иркутск, 2004. 18 с.

Федорова Ю.С., Сухих А.С., Кузнецов П.В. Ключевые биологически активные вещества фитопрепаратов на основе растений рода Копеечник // Сорбционные и хроматографические процессы. 2011. Т. 11, вып. 5. С. 708–713.

Федченко Б.А. Род копеечник – *Hedysarum* L. // Флора СССР. М.; Л., 1948. Т. 13. С. 259–319.

Amosova A.V., Zemtsova L.V., Grushetskaya Z.E., Samatadze T.E., Mozgova G.V., Pilyuk Y.E., Volovik V.T., Melnikova N.V., Zelenin A.V.,

Lemesh V.A., Muravenko O.V. Intraspecific chromosomal and genetic polymorphism in *Brassica napus* L. detected by cytogenetic and molecular markers // J. Genet. 2014. V. 93. P. 133–143.

Arslan E., Ertugrul K., Tugay O., Dural H. Karyological studies of the genus *Onobrychis* Mill. and the related genera *Hedysarum* L. and *Sartoria* Boiss. and Heldr. (Fabaceae, Hedysareae) from Turkey // Caryologia. 2012. V. 65, No. 1. P. 11–17.

Benhizia H., Benhizia Y., Ghernoub L., Siljak-Yakovlev S., Khalfallah N. Meiotic behaviour and karyotype features of endangered endemic fodder species *Hedysarum perrauderianum* (Fabaceae) in some populations from Algeria // Caryologia. 2013. V. 66. P. 195–204.

Bushman B.S., Larson S.R., Peel M., Pfrender M.E. Population structure and genetic diversity in North American *Hedysarum boreale* Nutt. // Crop Science. 2007. V. 47. P. 1281–1288.

Choi B.H. Foliar flavonoids of the genus *Hedysarum* and related genera (tribe *Hedysareae–Leguminosae*) // Kor. J. Plant Tax. 1994. V. 24. P. 259–264.

Choi B.H., Ohashi H. Proposal to conserve the name *Hedysarum* (*Leguminosae*: *Papilionoideae*) with a conserved type // Taxon. 1998. V. 47. P. 877.

Choi B.H., Ohashi H. Generic criteria and an infrageneric system for *Hedysarum* and related genera (*Papilionoideae–Leguminosae*) //Taxon. 2003. V. 52. P. 567–576.

Dong Y., Tang D., Zhang N., Li Y., Zhang C., Li L., Li M. Phytochemicals and biological studies of plants in genus *Hedysarum* // Chem. Cent. J. 2013. V. 7 (1). P. 124. DOI: 10.1186/1752-153X-7-124.

Gerlach W.L., Bedbrook J.R. Cloning and characterization of ribosomal RNA genes from wheat and barley // Nucl. Acids Res. 1979. V. 7. P. 1869–1885.

Gerlach W.L., Dyer T.A. Sequence organization of the repeating units in the nucleus of wheat which contain 5S rRNA genes // Nucl. Acids Res. 1980. No. 8. P. 4851–4855.

Huang G.C., Lee C.J., Wang K.T., Weng B.C., Chien T.Y., Tseng S., Wang C.C. Immunomodulatory effects of *Hedysarum polybotrys* extract in mice macrophages, splenocytes and leucopenia // Molecules. 2013. V. 18. P. 14862–14875.

Issolah R., Benhizia H., Khalfallah N. Karyotype variation within some natural populations of Sulla (*Hedysarum coronarium* L., *Fabaceae*) in Algeria // Genet. Res. Crop Evol. 2006. V. 53. P. 1653.

Kumar P., Kumar R., Singhal V.K., Singh H., Singh Kholia B. Chromosome count, meiotic abnormalities and pollen sterility in Lahaul sweetvetch (*Hedysarum astragaloides* Benth. ex Baker, *Fabaceae*), an endemic and threatened species from India // Acta Bot. Croat. 2018. V. 77. P. 203–208.

Marghali S., Panaud O., Lamy F., Ghariani S., Sarr A., Marrakchi M., Trifi-Farah N. Exploration of intra- and inter-population genetic diversity in *Hedysarum coronarium* L. // Genet. Res. Crop Evol. 2005. V. 52, Issue 3. P. 277–284.

Pedrosa-Harand A., de Almeida C.C., Mosiolek M., Blair M.W., Schweizer D., Guerra M. Extensive ribosomal DNA amplification during Andean common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) evolution // Theor. Appl. Genet. 2006. V. 112. P. 924–933.

Raskina O., Belyayev A., Nevo E. Quantum speciation in *Aegilops*: Molecular cytogenetic evidence from rDNA cluster variability in natural populations // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 2004. V. 101. P. 14818–14823.

Roa F., Guerra M. Distribution of 45S rDNA sites in chromosomes of plants: Structural and evolutionary implications // BMC Evol. Biol. 2012. V. 12. P. 225. DOI: 10.1186/1471-2148-12-225.

Rosato M., Álvarez I., Feliner G.N., Rosselló J.A. High and uneven levels of 45S rDNA site-number variation across wild populations of a diploid plant genus (*Anacyclus*, *Asteraceae*) // PLOSOne. 2017. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187131.

Schubert I., Wobus U. *In situ* hybridization confirms jumping nucleolus organizing regions in *Allium* // Chromosoma. 1985. V. 92. P. 143–148.

Thulin M. Revision of Taverniera (*Leguminosae–Papilionoideae*) // Symb. Bot. Upsal. 1985. V. 25. P. 44–94.

Yurkevich O.Y., Kirov I.V., Bolsheva N.L., Rachinskaya O.A., Grushetskaya Z.E., Zoschuk S.A., Samatadze T.E., Bogdanova M.V., Lemesh V.A., Amosova A.V., Muravenko O.V. Integration of physical, genetic, and cytogenetic mapping data for Cellulose synthase (CesA) genes in flax (*Linum usitatissimum* L.) // Front. Plant Sci. 2017. No. 8. P. 1467.

Zvyagina N.S., Dorogina O.V., Krasnikov A.A. Genetic differentiation and karyotype variation in *Hedysarum chaiyrakanicum*, an endemic species of Tuva Republic, Russia // Indian J. Exp. Biol. 2016. V. 54. P. 338–344.

Поступила в редакцию 02.12.2018 г.,
после доработки – 18.01.2019 г.,
принята к публикации 05.02.2019 г.