

УДК 575.174.015.3:575.853;576.316.2

DOI: 10.14258/pbssm.2021104

Молекулярно-цитогенетическое исследование южносибирских популяций видов *Hedysarum gmelinii* Ledeb. and *H. setigerum* Turcz. (Fabaceae)

Molecular cytogenetics of *Hedysarum gmelinii* Ledeb. and *H. setigerum* Turcz. (Fabaceae) from populations of Southern Siberia

Юркевич О. Ю.¹, Саматадзе Т. Е.¹, Селютина И. Ю.², Зошук С. А.¹
Амосова А. В.¹, Муравенко О. В.¹

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

¹Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН, г. Москва, Россия. E-mail: olikys@gmail.com

¹Engelhardt Institute of Molecular Biology, RAS, Moscow, Russia

²Центральный сибирский ботанический сад СО РАН, г. Новосибирск, Россия. E-mail: selyutina.inessa@mail.ru

²Central Siberian Botanical Garden, SB RAS, Novosibirsk, Russia

Реферат. Впервые с использованием молекулярно-цитогенетических маркеров проведено сравнительное исследование кариотипов близкородственных видов *Hedysarum gmelinii* и *H. setigerum* из секции *Multicaulia* рода *Hedysarum* L. (Fabaceae), произрастающих в Южной Сибири. Уточнено число хромосом в кариотипах *H. gmelinii* и *H. setigerum* – $2n = 4x = 32$. У некоторых образцов обнаружены добавочные В-хромосомы. По данным FISH, обнаружено высокое морфологическое сходство хромосом и рисунков распределения рибосомных РНК генов в кариотипах *H. gmelinii* и *H. setigerum*, что подтверждает их близкое родство.

Ключевые слова. Хромосомный полиморфизм, FISH анализ, *Hedysarum*, 45S рДНК, 5S рДНК.

Summary. For the first time, a comparative karyotype analysis of closely related species *Hedysarum gmelinii* and *H. setigerum* (*Hedysarum* section *Multicaulia*) grown in Southern Siberia, has been performed by molecular cytogenetic markers. Chromosome numbers in karyotypes of these species were specified – $2n = 4x = 32$. In some accessions, additional B chromosomes were revealed. FISH analyses indicated high similarities in chromosome morphology and also patterns of chromosomal distributions of 45S and 5S rDNA clusters in karyotypes of *H. gmelinii* and *H. setigerum*, which confirms the close relationship between their genomes.

Key words. FISH analysis, *Hedysarum*, chromosomal polymorphism, 45S rDNA, 5S rDNA.

Молекулярно-генетический анализ различных последовательностей пластидной и ядерной ДНК подтверждает наличие двух основных линий в роде *Hedysarum* L.: *Hedysarum* и *Multicaulia*, что коррелирует с основным числом хромосом в кариотипах видов соответствующих секций $x = 7$ и $x = 8$ (Duan et al., 2015; Liu et al., 2017). Секция *Multicaulia* образует самую крупную кладу рода *Hedysarum*, которая распространена в основном в Центральной Азии (Мальшев, 2012). Одним из представителей секции *Multicaulia* является *Hedysarum gmelinii* Ledeb. (копеечник Гмелина) – кормовое растение с обширным восточноевропейско-сибирским ареалом (Курбатский, 1994). Близкий к нему вид *H. setigerum* Turcz. (копеечник щетинистый) произрастает в горно-степном, высокогорном и степном районах Южной Сибири и имеет ареал, перекрывающийся с *H. gmelinii* (Федченко, 1948; Мальшев, 2012). Таксономический статус *H. setigerum* до сих пор не прояснен. Систематики рассматривают *H. setigerum* как самостоятельный вид (Федченко, 1948; Мальшев, 2012) или как подвид *H. gmelinii* (Курбатский, 1994). Высокий полиморфизм морфологических признаков затрудняет идентификацию этих двух видов. В то же время структура кариотипа является одним из важных значимых признаков вида, позволяющих уточнять систематическое положение, выявлять филогенетические связи и устанавливать пути эволюции видов. Однако числа хромосом у видов *H. setigerum* и *H. gmelinii* по данным разных авторов сильно

варьируют. При изучении кариотипов этих видов с помощью монокромного окрашивания определены хромосомные числа $2n = 14, 28, 32, 56$ (Курбатский, 1994; Курбатский, Малахова, 2003; Черкасова, 2009). Данный метод выявляет лишь общие кариотипические различия, и такого подхода к изучению геномов *H. setigerum* и *H. gmelinii* явно недостаточно.

Ареал горно-степного вида *H. gmelinii* состоит из двух частей: меньшая часть охватывает юго-восток Европейской части России, большая располагается в Сибири, частично захватывая север Казахстана и Монголии (Курбатский, 1994). В последнее время появились данные о распространении вида на территории Центрального и Северо-Западного Китая, здесь *H. gmelinii* обитает в каменистых степях на высоте от 800 до 1800 м над ур. м. (Liu et al., 2010). Восточносибирско-южносибирский вид *H. setigerum* встречается в горах в Горном Алтае, Красноярском крае, Республике Хакасия, Туве, Иркутской обл., Бурятии, Республике Саха (Якутия) (Федченко, 1948; Малышев, 2012).

Сбор материала для данного исследования проводился в природных популяциях на территории Южной Сибири. Приготовление хромосомных препаратов и процедуру FISH (Fluorescence *In situ* Hybridization) осуществляли по ранее описанной методике (Yurkevich et al., 2017). FISH-анализ хромосом проводился с использованием классических цитогенетических маркеров 45S и 5S рДНК. Отобранные хромосомные пластинки фотографировали с помощью эпифлуоресцентного микроскопа Olympus VX61 (Olympus, Токуо, Япония), сопряженного с черно-белой ПЗС-камерой (Snap, Roper Scientific, США).

Нами впервые исследована хромосомная организация кариотипов двух видов: *H. gmelinii* и *H. setigerum* из секции *Multicaulia* с использованием молекулярных маркеров. По результатам сравнительного исследования видов *H. gmelinii* и *H. setigerum* обнаружено высокое морфологическое сходство хромосом и рисунков распределения основных кластеров 45S и 5S рибосомных генов в их кариотипах. Кариотипы *H. gmelinii* и *H. setigerum* представлены двумя сходными наборами хромосом, которые свидетельствуют в пользу их тетраплоидной природы: $2n = 4x = 32$ (рис. 1). Размеры хромосом около 2–5 мкм. В кариотипах обоих видов сигналы 45S рДНК локализованы на двух парах спутничных хромосом. Крупные сайты 5S рДНК обнаружены в дистальных областях двух пар хромосом. В некоторых метафазных клетках образцов *H. gmelinii* и *H. setigerum* на спутничных хромосомах наблюдались поли-

морфные минорные сайты 5S рДНК, ко-локализованные с сайтами 45S рДНК. Ранее показано, что виды секции *Multicaulia* имеют основное число хромосом $x = 8$ (Choi, Ohashi, 2003; Arslan et al., 2012). Изученные нами кариотипы образцов *H. gmelinii* и *H. setigerum* из различных географических мест произрастания подтверждают эти данные.

Впервые в кариотипах видов *H. gmelinii* ($2n = 32$) и *H. setigerum* ($2n = 32$) нами обнаружены добавочные хромосомы. Они представлены маленькими субметацентриками длиной около 1 мкм со сходным рисунком C/DAPI бэндинга. По всей длине добавочных хромосом локализованы сайты 45S рДНК. Количество таких хромосом в клетках инди-

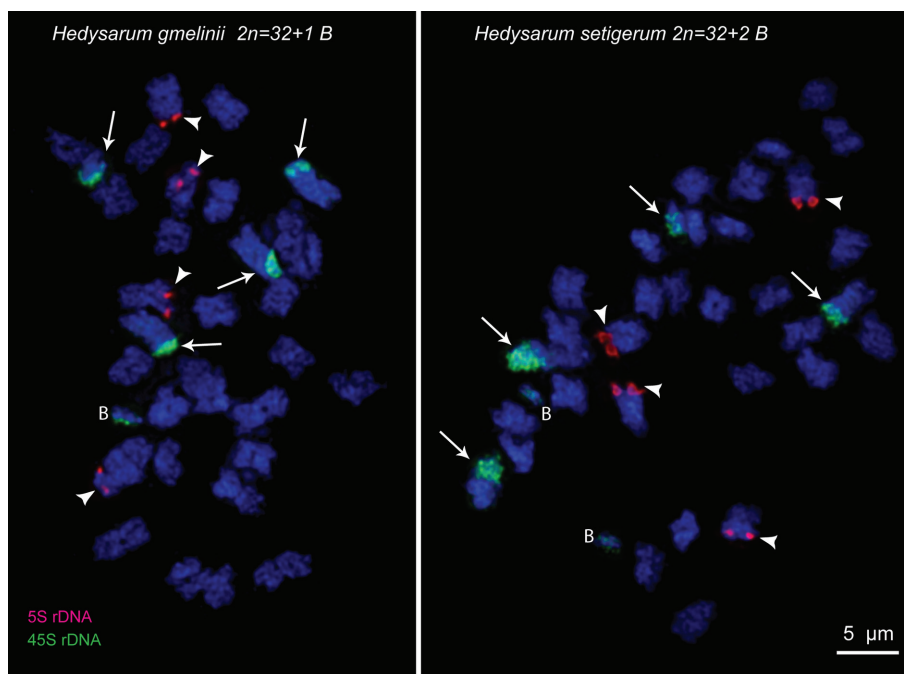


Рис. 1. Метафазные пластинки *H. gmelinii* ($2n = 32$) и *H. setigerum* ($2n = 32$). Хромосомы окрашены по DAPI. FISH с пробами 45S рДНК (зеленый) и 5S рДНК (красный). Стрелками обозначены спутничные хромосомы, головками стрелок – хромосомы, несущие сайты 5S рДНК генов, В – В-хромосомы.

видуального растения и в популяции варьирует от 1 до 3. У одного образца *H. gmelinii* из Горного Алтая добавочные хромосомы в кариотипе не выявлены. Известно, что В-хромосомы характеризуются мозаичностью распределения как внутри популяции, так и у отдельных ее представителей, а также часто содержат рРНК гены (Camacho et al., 2000). Таким образом, выявленные добавочные хромосомы обладают всеми признаками В-хромосом. Обнаружение В-хромосом в образцах из разных популяций видов *H. gmelinii* и *H. setigerum* позволило уточнить число хромосом основного набора (А-хромосом) $2n = 4x = 32$, которое при монохромном окрашивании хромосом варьировало у разных авторов (Курбатский, 1994; Курбатский, Малахова, 2003; Черкасова, 2009).

Проведенный ранее ISSR-анализ указывает на близкое родство *H. setigerum* и *H. gmelinii*, что согласуется с их сходством по морфологическим признакам (Zvyagina et al., 2016). На основании этих данных предлагается рассматривать *H. setigerum* как подвид *H. gmelinii* (Zvyagina et al., 2016). Результаты проведенного нами FISH-анализа хромосом в кариотипах изученных видов в целом подтверждают данные других авторов. Вместе с тем, чтобы окончательно прояснить пloidный статус *H. setigerum* и *H. gmelinii*, а также уточнить таксономическое положение *H. setigerum*, необходимо продолжить изучение хромосомной организации геномов этих родственных видов с помощью дополнительных молекулярных маркеров.

Благодарности. Работа поддержана Программой фундаментальных исследований государственных академий наук в рамках темы № 121052000140-2.

ЛИТЕРАТУРА

- Курбатский В. И.** *Hedysarum* L. // Флора Сибири. Т. 9. – Новосибирск: Наука, 1994. – С. 153–165.
- Курбатский В. И., Малахова Л. А.** Числа хромосом для некоторых видов *Hedysarum* L. на юге Красноярского края (Минусинская степь) // Систематические заметки по материалам Гербария им. П. Н. Крылова при Томском государственном университете, под ред. А. В. Положий. 2003. – Т. 93. – С. 12–18.
- Мальшиев Л. И.** Конспект флоры Азиатской России: Сосудистые растения. – Новосибирск: Изд-во СО РАН, 2012. – 640 с.
- Федченко Б. А.** Копеечник – *Hedysarum* L. // Флора СССР. – М.–Л.: Изд-во АН СССР, 1948. – Т. 13. – С. 301–318.
- Черкасова Е. С.** Числа хромосом редких видов *Hedysarum* (Fabaceae) // Бот. журн., 2009. – Т. 94, № 1. – С. 135–138.
- 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. – Vol. 65, No 1. – P. 11–17.
- Camacho J. P., Sharbel T. F., Beukeboom L. W.** Philos B-chromosome evolution // *Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, 2000. – Vol. 355. – P. 163–78.
- Choi B. H., Ohashi H.** Generic criteria and an infrageneric system for *Hedysarum* and related genera (*Papilionoideae-Leguminosae*) // *Taxon*, 2003. – Vol. 52. – P. 567–576.
- Duan L., Wen J., Yang X., Liu P. L., Arslan E., Ertugrul K., Chang Z. Y.** Phylogeny of *Hedysarum* and tribe *Hedysareae* (*Leguminosae: Papilionoideae*) inferred from sequence data of ITS, matK, trnL-F and psbA-trnH // *Taxon*, 2015. – V. 64. – P. 49–64.
- Liu Y., Xu L., Chang Zh., Zhu X., Sun H., Yakovlev G. P., Choi B.-H., Larsen K., Bartholomew B.** Tribe *Hedysarae* // *Flora of China*. – Missouri Botanical Garden Press, 2010. – Vol. 10. – P. 512–545.
- Liu Yi., Zhao Yu-Ying, Tu Guang-Zhong, Chen Hu-Biao.** Flavonoids of the roots of *Hedysarum kirghisorum* // *Biochemical Systematics and Ecology*, 2005. – Vol. 33, Iss. 8. – P. 809–812.
- 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. – Vol. 8. – P. 1467.
- Zvyagina N. S., Dorogina O. V., Catalan P.** Genetic relatedness and taxonomy in closely related species of *Hedysarum* (Fabaceae) // *Biochemical Systematics and Ecology*, 2016. – Vol. 69. – P. 176–187.