

**Хромосомный полиморфизм у видов рода *Hedysarum* L. (Fabaceae),
произрастающих в Южной Сибири**

**Chromosome polymorphism in species of the genus *Hedysarum* L. (Fabaceae)
originated from Southern Siberia**

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

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

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

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

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

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

³ Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений, г. Москва, Россия.

E-mail: Romashkin69@inbox.ru

³ All-Russian Institute of medicinal and aromatic plants, Federal Agency for Scientific Organizations, Moscow, Russia

Реферат. Впервые с использованием молекулярно-цитогенетических маркеров изучен хромосомный полиморфизм в кариотипах трех видов из секции *Hedysarum* (= syn. *Gamotion*) рода *Hedysarum* L. (Fabaceae), произрастающих в Южной Сибири. По результатам сравнительного исследования видов обнаружено высокое морфологическое сходство хромосом и рисунков распределения основных кластеров 45S и 5S рибосомных генов в кариотипах *H. alpinum* L., *H. austrosibiricum* В. Fedtsch., *H. theinum* Krasnob., что подтверждает их близкое родство. Значительный внутривидовой полиморфизм по локализации 45S рДНК обнаружен у *H. theinum*. В отличие от двух других видов в кариотипе *H. alpinum* обнаружено две пары хромосом с локализацией локусов 5S рДНК, что может быть использовано в качестве дополнительного видоспецифичного маркера.

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

Summary. For the first time, chromosomal polymorphism in karyotypes of three species from the section *Hedysarum* (= syn. *Gamotion*) of the genus *Hedysarum* L. (Fabaceae) grown in Southern Siberia has been studied with the use of molecular cytogenetic markers. This comparative molecular cytogenetic analysis revealed high similarity in morphology of chromosomes in *H. alpinum* L., *H. austrosibiricum* В. Fedtsch. and *H. theinum* Krasnob. as well as in patterns of distribution of 45S and 5S rDNA loci in their karyotypes confirming their close relationships. Considerable intra-specific polymorphism on 45S rDNA chromosome localization was detected in *H. theinum*. In karyotype of *H. alpinum*, unlike the other two species, two chromosome pairs bearing 5S rDNA locus were observed which could be used as additional species-specific markers.

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

В последние годы значительно расширился поиск новых растений-продуцентов природных биологически активных соединений с широким спектром противоопухолевого, антибактериального, противовирусного и фунгицидного действия, а также обладающих иммуностимулирующими свойствами. К таким растениям можно отнести представителей рода *Hedysarum* L. (копеечник). Из рода *Hedysarum* сегодня подробно изучено не более 10 видов, но и у них состав биологически активных веществ весьма разнообразен и уникален (Неретина и др., 2004; Кукушкина и др., 2011; Фёдорова и др., 2011). Трава копеечника (*Herbal Hedysarum*) является сырьем для получения противовирусного препарата алпиза-

рина. Основную его составляющую, ксантон мангиферин, производят из надземной части копеечника альпийского – *Hedysarum alpinum* L. Еще один вид – копеечник чайный (*Hedysarum theinum* Krasnob.), содержащий большое количество мангиферина и олигомерных катехинов, является редким растением и даже внесен в Красную книгу Республики Алтай (Зиннер и др., 2010; Кукушкина и др., 2011). Природных сырьевых ресурсов копеечника явно недостаточно, поэтому копеечник альпийский и копеечник забытый вводят в культуру, в том числе и с применением биотехнологических подходов (Erst и др., 2014). Многофункциональность биологически активных соединений копеечников открывает перспективы для разработки новых эффективных лекарственных препаратов. Это требует глубокого и разностороннего сравнительного изучения лекарственных и родственных видов копеечников, в первую очередь, их генетических особенностей. Целью данного исследования стало сравнительное изучение структуры кариотипов близкородственных видов из секции *Hedysarum* (*Gamotion*) рода *Hedysarum* с использованием молекулярно-цитогенетических подходов для характеристики их внутри- и межвидовой хромосомной вариабельности и уточнения их геномных и систематических взаимоотношений.

Сбор материала проводился в природных популяциях на территории Южной Сибири. Исследованные виды имеют разный размер ареала и различную эколого-ценотическую приуроченность. Самый широкий ареал у *H. alpinum* – в России он встречается в Арктике, на севере европейской части, в Сибири и на Дальнем Востоке. Произрастает на лесных и сырых лугах, в разреженных лесах, кустарниковых зарослях и по берегам рек (Курбатский, 1994). Эндемичный вид *H. austrosibiricum* В. Fedtsch. обычно обитает в высокогорных областях Южной Сибири (на Алтае, Кузнецком Алатау, в Туве и на западной окраине Восточного Саяна) (Мальшев, 1968). *H. theinum* – высокогорный альпийский эндемичный вид, произрастает на Западном Алтае в пределах Восточного Казахстана и Республики Алтай, в горных массивах Западной Монголии на высоте 1300–2000 м над уровнем моря (Курбатский, 1994).

Приготовление хромосомных препаратов и процедуру FISH (fluorescence *in situ* hybridization) осуществляли по ранее описанной методике (Yurkevich и др., 2017). FISH-анализ хромосом проводился с использованием классических генетических хромосомных маркеров 45S и 5S рДНК. Отобранные хромосомные пластинки фотографировали на флуоресцентном микроскопе Olympus BX61 (Olympus, Токуо, Япония) с помощью чёрно-белой ПЗС-камеры Cool Snap (Roper Scientific Inc., США).

Нами впервые исследована хромосомная организация кариотипов трех видов копеечника: *H. alpinum*, *H. austrosibiricum*, *H. theinum* из секции *Hedysarum* рода *Hedysarum* с использованием молекулярных маркеров хромосом. Все изученные видовые образцы имеют в кариотипе 7 пар хромосом ($2n = 14$) среднего размера. По данным FISH-анализа, в кариотипах всех видов обнаружена одна пара спутничных хромосом с крупными сайтами гибридизации 45S рДНК и одна пара хромосом, несущих сайты гибридизации 5S рДНК. У *H. alpinum* дополнительные сайты 5S рДНК локализовались еще на одной паре хромосом. В кариотипе *H. theinum* обнаружены дополнительные полиморфные минорные сигналы гибридизации 45S рДНК, которые располагались в дистальных районах нескольких пар хромосом.

В настоящее время таксономические и филогенетические проблемы рода *Hedysarum* активно пытаются решить на основе сопоставления данных молекулярно-генетического анализа (Duan и др., 2015; Liu и др., 2017). Однако структура кариотипа, его внутри- и межвидовое разнообразие для большинства видов копеечников исследованы недостаточно, как и известные лекарственные виды из их числа. Ранее показано, что в отличие от других секций, виды секции *Hedysarum* имеют основное число хромосом $n = 7$ (Choi, Ohashi, 2003; Arslan, 2012). Изучение кариотипов видовых образцов *H. alpinum*, *H. austrosibiricum* и *H. theinum* подтвердило эти данные. Наше исследование также выявило высокое морфологическое сходство хромосом и рисунков распределения основных кластеров рибосомных генов в кариотипах всех трех изученных видов, что свидетельствует об их близком родстве. Общее сходство кариотипов и аналогичное распределение основных сайтов рибосомных генов было обнаружено нами ранее у вида *H. neglectum* Ledeb. (Юркевич и др., 2019). При этом обнаружена как межвидовая вариабельность, так и внутривидовой полиморфизм по локализации молекулярных маркеров хромосом. Так, наличие второй пары хромосом с сигналом 5S рДНК из всех изученных видов характерно только для *H. alpinum*, что может быть использовано в качестве дополнительного видоспецифического маркера, подобно наличию второй пары спутничных хромосом в кариотипе *H. neglectum* (Юркевич и др., 2019). Существенный внутривидовой полиморфизм распределения минорных сайтов 45S рДНК на

хромосомах мы обнаружили только у *H. theinum*, который по ряду морфологических и биохимических признаков был выделен И. М. Красноборовым как самостоятельный вид из близкородственного вида *H. neglectum* (Красноборов и др., 1985). Сравнительный молекулярно-цитогенетический анализ кариотипов *H. neglectum* и *H. theinum* подтверждает статус самостоятельного вида *H. theinum*. Копеечник альпийский *H. alpinum*, копеечник южносибирский *H. austrosibiricum*, копеечник чайный *H. theinum*, также как и *H. neglectum*, являются представителями растительности различных поясов гор и межгорных долин. Эти виды отличаются разной степенью специализации в связи с приуроченностью к различным экологическим нишам (Малышев, 1968; Курбатский, 1994). Не исключено, что выявленный внутривидовой хромосомный полиморфизм по локализации рибосомных генов тесно связан с экологической адаптацией представителей секции *Hedysarum* к сложным условиям высокогорий Южной Сибири.

Благодарности. 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 гг. в рамках темы № 01201363824.

ЛИТЕРАТУРА

- Зиннер Н. С., Кукушкина Т. А., Высочина Г. И., Свиридова Т. П.** Биологически активные вещества *Hedysarum alpinum* L. и *H. theinum* Krasnob. (*Fabaceae*), интродуцируемых в Томскую область // Вестник Томского государственного университета. Биология, 2010. – Т. 12, № 4. – С. 116–122.
- Красноборов И. М., Азовцев Г. Р., Орлов В. П.** Новый вид рода *Hedysarum* (*Fabaceae*) из Южной Сибири // Бот. журн., 1985. – Т. 70, № 7. – С. 968–973.
- Кукушкина Т. А., Высочина Г. И., Карнаухова Н. А., Селютин 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. // Флора Сибири. Т. 9. – Новосибирск: Наука, 1994. – С. 153–165.
- Малышев Л. И.** Определитель высокогорных растений Южной Сибири. – М.: Наука, 1968. – 283 с.
- Неретина О. В., Громова А. С., Луцкий И. В., Семенов А. А.** Компонентный состав видов рода *Hedysarum* (*Fabaceae*) // Растительные ресурсы, 2004. – Т. 40, вып. 4. – С. 111–137.
- Фёдорова 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.
- Юркевич О. Ю., Саматадзе Т. Е., Зошук С. А., Ромашикина С. И., Селютин И. Ю., Амосова А. В., Муравенко О. В.** Хромосомный полиморфизм копеечника забытого (*Hedysarum neglectum*, *Fabaceae*) по локализации 45S и 5S рДНК // Растительный мир Азиатской России, 2019. – Т. 33, № 1. – С. 48–52.
- 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, N. 1. – P. 11–17.
- 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.
- 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.
- Erst A. A., Zheleznichenko T. V., Novikova T. I., Dorogina O. V., Banaev E. V.** Ecological and geographic variability of *Hedysarum theinum* and features of its propagation *in vitro* // Contemporary problems of ecology, 2014. – V. 7, issue 1. – P. 67–71.
- Liu Yi., Yu-Ying Zhao, Guang-Zhong Tu, Hu-Biao Chen** Flavonoids of the roots of *Hedysarum kirghisorum* // Biochemical Systematics and Ecology, 2005. – V. 33, I. 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. – 8:1467.