

Молекулярно-цитогенетическое изучение *Eranthis* (Ranunculaceae)Molecular cytogenetic study of *Eranthis* (Ranunculaceae)Митренина Е. Ю.¹, Эрст А. С.^{1,2}, Бадаева Е. Д.³, Алексеева С. С.¹, Артёмов Г. Н.¹Mitrenina E. Yu.¹, Erst A. S.^{1,2}, Badaeva E. D.³, Alekseeva S. S.¹, Artemov G. N.¹¹Томский государственный университет, Томск, Россия. E-mail: emitrenina@gmail.com¹Tomsk State University, Tomsk, Russia²Центральный сибирский ботанический сад СО РАН, Новосибирск, Россия. E-mail: erst_andrew@yahoo.com²Central Siberian Botanical Garden SB RAS, Novosibirsk, Russia³Институт общей генетики им. Н. И. Вавилова РАН, Москва, Россия³Vavilov Institute of General Genetics, Moscow, Russia

Реферат. Впервые локализованы последовательности 45S и 5S рибосомальной ДНК на хромосомах пяти видов весенников: *Eranthis cilicica*, *E. hyemalis* (секция *Eranthis*), *E. pinnatifida*, *E. stellata* и *E. tanhoensis* (секция *Shibat-eranthis*). Флуоресцентную гибридизацию *in situ* проводили с олигонуклеотидными ДНК-зондами Oligo-pTa71-2 и Oligo-5S rDNA пшеницы, комплементарными последовательностям 45S и 5S рДНК. Кроме этого, для локализации 45S рДНК разработан и апробирован олигонуклеотидный ДНК-зонд длиной 50 нуклеотидов (Oligo-5.8S rDNA-Ran). Данный зонд создан на основе последовательностей 5.8S рДНК растений сем. Ranunculaceae, взятых из GenBank. Показана специфичная гибридизация зондов Oligo-5S rDNA и Oligo-5.8S rDNA-Ran с хромосомами весенников. Использование зонда Oligo-pTa71-2 не позволило выявить локализацию кластеров 45S рДНК на хромосомах изученных видов.

Ключевые слова. Весенник, рибосомальная ДНК, хромосомы, флуоресцентная гибридизация *in situ*, *Eranthis* Salisb., Ranunculaceae Juss.

Summary. 45S and 5S ribosomal DNA were originally localized on chromosomes of five species of winter aconits, namely, *Eranthis cilicica*, *E. hyemalis* (section *Eranthis*), *E. pinnatifida*, *E. stellata* и *E. tanhoensis* (section *Shibat-eranthis*). Fluorescence *in situ* hybridization was performed with oligonucleotide DNA probes Oligo-pTa71-2 and Oligo-5S rDNA of wheat that are complementary to 45S and 5S ribosomal DNA. In addition, oligonucleotide DNA probe (Oligo-5.8S rDNA-Ran, 50 b) for localization of 45S rDNA was designed and tested. This probe is based on the 5.8S rDNA sequences of some species of fam. Ranunculaceae taken from GenBank. A specific hybridization of the Oligo-5S rDNA and Oligo-5.8S rDNA-Ran probes with the chromosomes of *Eranthis* was shown. The use of the Oligo-pTa71-2 probe did not localize clusters of 45S rDNA on chromosomes of studied species.

Key words. Chromosomes, *Eranthis* Salisb., fluorescence *in situ* hybridization, Ranunculaceae Juss., ribosomal DNA, winter aconite.

Введение. Описание хромосомного набора (кариотипа) является важным аспектом исследования растений. Помимо числа, размера и морфологии хромосом, определяемых при помощи рутинного окрашивания, кариотип характеризуется особенностями распределения последовательностей ДНК разных типов по длине хромосом. Их выявляют при помощи дифференциального окрашивания и флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH). Последний метод позволяет локализовать на хромосомах как уникальные, так и повторяющиеся последовательности ДНК разного типа (Бадаева, Салина, 2013; Braz et al., 2018). Последовательности рибосомальной ДНК (рДНК) – 45S и 5S – относятся к классу консервативных умеренных повторов. Они организованы в виде кластеров из сотен или тысяч копий генов, разделенных межгенными спейсерами (Roa, Guerra, 2014). В пределах вида число локусов рДНК, как правило, стабильно, что делает их подходящими маркерами для идентификации хромосом. Однако между отдельными таксонами число и локализация их кластеров различается, что связано с преобразованиями

кариотипа в процессе эволюции. Таким образом, рДНК подходят для филогенетических исследований как на молекулярном, так и на хромосомном уровне (Ribeiro et al., 2011; Mlinarec et al., 2012).

Объектами нашего исследования являются виды рода весенник, или эрантис. *Eranthis* Salisb. – род многолетних травянистых растений сем. Ranunculaceae Juss., включающий около 10–13 видов, произрастающих в Южной Европе, Средней Азии, на востоке России, в Китае, Корею и Японии (Stefanoff, 1963; Park et al., 2019; Rukšāns, Zetterlund, 2019; Erst et al., 2020). Большая часть видов рода являются эндемиками и имеют ограниченное распространение. Род делят на две секции по окраске цветка, форме корневища и другим морфологическим признакам. К типовой секции *Eranthis* относят виды с желтыми цветками: *E. bulgarica* (Stef.) Stef., *E. cilicica* Scott et Kotschy, *E. hyemalis* (L.) Salisb., *E. iranica* Rukšāns et Zetterl и *E. longistipitata* Regel. В секцию *Shibateranthis* включают виды с белыми цветками: *E. albiflora* Franch., *E. byunsanensis* B.Y. Sun, *E. lobulata* W.T. Wang, *E. pinnatifida* Maxim., *E. pungdoensis* B. U. Oh, *E. sibirica* DC., *E. stellata* Maxim и *E. tanhoensis* Erst. До начала нашей работы род *Eranthis* был мало исследован в цитогенетическом отношении. Нами изучены кариотипы большинства видов рода и показано, что они имеют видоспецифичные особенности, касающиеся числа и морфологии хромосом (Митренина, Эрст, 2019; Erst et al., 2020; неопубликованные данные). Настоящая работа посвящена локализации последовательностей 45S и 5S рДНК при помощи олигонуклеотидных ДНК-зондов на хромосомах пяти видов весенников из двух секций: *E. cilicica*, *E. hyemalis* (секция *Eranthis*), *E. pinnatifida*, *E. stellata* и *E. tanhoensis* (секция *Shibateranthis*).

Материал и методы. Методика сбора и фиксации растительного материала описана в наших предыдущих работах (Митренина, Эрст, 2019; Erst et al., 2020). Флуоресцентную гибридизацию *in situ* проводили по протоколу, описанному в работе Badaeva et al. (2017), с некоторыми модификациями. Для локализации 5S рДНК использовали олигонуклеотидный ДНК-зонд Oligo-5S rDNA: FITC 5'-TCA GAA CTC CGA AGT TAA GCG TGC TTG GGC GAG AGT AGT AC-3' (Yu et al., 2019). Для выявления 45S рДНК использовали олигонуклеотидный ДНК-зонд Oligo-pTa71-2: CY-3 5'-GGG CAA AAC CAC GTA CGT GGC ACA CGC CGC CTA-3' (Tang et al., 2014). Их синтез был произведен в НПК «СИНТОЛ» (г. Москва). Кроме этого, нами разработан и апробирован новый олигонуклеотидный ДНК-зонд для локализации 45S рДНК растений семейства Ranunculaceae. С целью поиска универсальной последовательности ДНК, подходящей для разработки олигонуклеотидного ДНК-зонда проводили анализ последовательностей рДНК нескольких растений. В GenBank были выбраны *Trollius chinensis* (AH006943.2), *Pulsatilla turczaninowii* (GU732649.1), *Adonis shikokuensis* (LC540399.1), *Adonis amurensis* (LC540384.1), *Coptis chinensis* (KC815158.1), *Anemone cernua* var. *koreana* (GU732647.1). Выравнивание последовательностей производили в программе UGENE v38.1 (Унипро, Новосибирск, Россия) с использованием инструмента ClustalW. Была обнаружена консенсусная последовательность длиной 121 нуклеотид, соответствующая гену 5.8S рРНК, универсальность которой среди цветковых растений была подтверждена с помощью анализа в BLAST NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). Уникальность выявленной последовательности проверяли путем выравнивания в BLAST против генома *Arabidopsis thaliana*. Анализ показал, что фрагмент с 63 по 82 нуклеотид имеет гомологию с геном бета-глюкозидазы, поэтому для ДНК-зонда был выбран специфичный фрагмент от 13 до 62 нуклеотида общей длиной 50 нуклеотидов (Oligo-5.8S rDNA-Ran). Данный зонд был синтезирован в ЗАО «Евроген» (г. Москва). Мечение осуществляли флуорофором TAMRA с 5' конца последовательности.

Результаты и обсуждение. В настоящее время олигонуклеотидные ДНК-зонды все чаще применяются для локализации повторяющихся последовательностей при FISH-анализе у злаков (Danilova et al., 2012; Tang et al., 2014; Badaeva et al., 2019). В частности, это относится к зондам Oligo-pTa71-2 и Oligo-5S rDNA, используемым для выявления на хромосомах повторов 45S и 5S рДНК соответственно. Данные зонды были разработаны на основе последовательностей рTa71 и рTa794 пшеницы *Triticum aestivum* L., клонируемых в плаزمиде (Tang et al., 2014; Yu et al., 2019). Применение данных плазмидных зондов эффективно для локализации на хромосомах 45S и 5S рДНК у широкого круга растений, не только однодольных, но и двудольных, и даже голосеменных (Mlinarec et al., 2012; Goryachkina et al., 2013; Yurkevich et al., 2021). Это связано с тем, что гены рРНК являются консервативными (Roa, Guerra, 2014). В последние годы появился ряд работ, в которых олигонуклеотидные зонды применяли не только в исследованиях хромосом злаков, но и для локализации рДНК и других повторов у двудольных растений (Braz et al., 2018; Luo, Liu, 2019; Luo, He, 2021). Использование олигонуклеотидных ДНК-зондов существенно сокращает время проведения экспериментов и поэтому является перспективным подходом для решения разных задач цитогенетики растений.

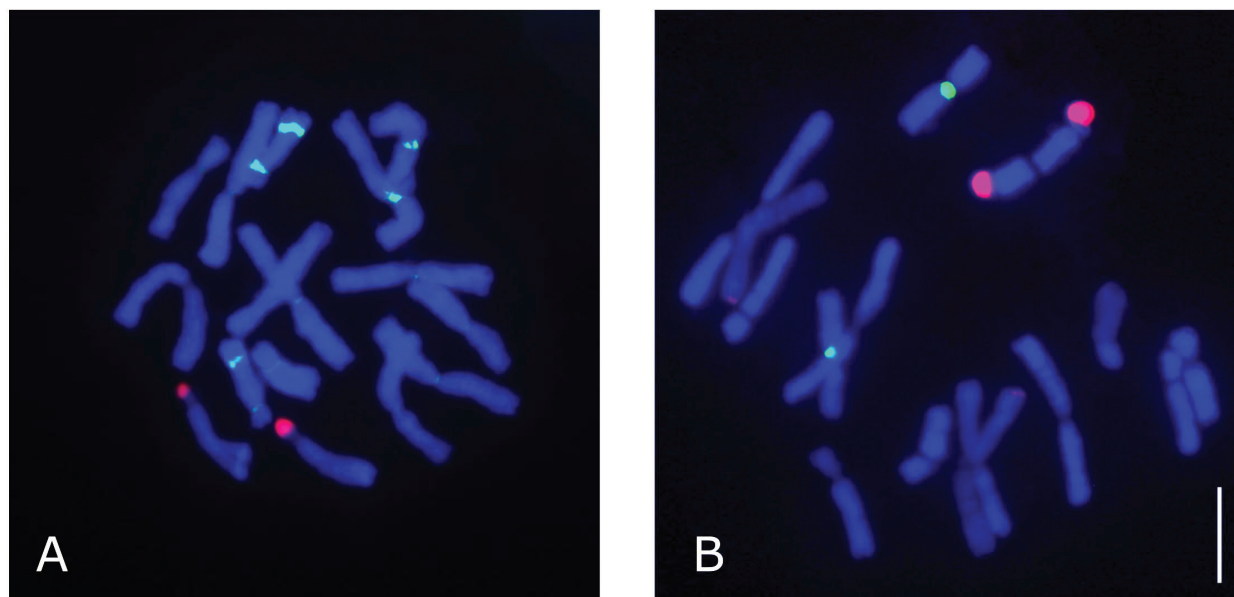


Рис. 1. Флуоресцентная гибридизация *in situ* олигонуклеотидных ДНК-зондов Oligo-5.8S rDNA-Ran (красный) и Oligo-5S rDNA (зеленый) с хромосомами *Eranthis hyemalis*, $2n = 16$ (A) и *Eranthis cilicica*, $2n = 16$ (B). Шкала – 10 мкм.

На первом этапе молекулярно-цитогенетического изучения р. *Eranthis* нами проведена FISH с олигонуклеотидными ДНК-зондами пшеницы Oligo-pTa71-2 и Oligo-5S rDNA на хромосомах *E. cilicica*, *E. pinnatifida*, *E. stellata* и *E. tanhoensis*. У *E. cilicica* выявлена одна область гибридизации Oligo-5S rDNA в прицентромерных районах у пары метацентриков. У *E. pinnatifida* обнаружены крупные блоки повторов 5S рДНК в прицентромерных районах пары средних метацентрических хромосом, а также небольшие блоки в прицентромерных районах пары субметацентриков. У родственных видов *E. stellata* и *E. tanhoensis* наблюдались множественные сайты гибридизации с зондом Oligo-5S rDNA. Данная последовательность была локализована в прицентромерных районах всех хромосом у данных видов, также выявлено несколько интеркалярных и прителомерных блоков 5S рДНК. Гибридизация зонда Oligo-pTa71 с хромосомами *Eranthis* не произошла. Вероятно, это связано с тем, что последовательность данного олигонуклеотидного зонда комплементарна межгенной области 45S рДНК (Tang et al., 2014), которая не является консервативной в отличие от кодирующих последовательностей. В связи с этим нами был разработан и апробирован олигонуклеотидный ДНК-зонд, комплементарный участку гена 5.8S рРНК растений сем. Ranunculaceae (Oligo-5.8S rDNA-Ran).

На втором этапе работы нами проведена двухцветная FISH с данным зондом и Oligo-5S rDNA на хромосомах *E. cilicica*, *E. hyemalis* (рис. 1), *E. pinnatifida* и *E. stellata*. У *E. cilicica*, *E. pinnatifida* и *E. stellata* последовательности 5S рДНК были локализованы в тех же участках хромосом, что и в первом варианте эксперимента. У *E. hyemalis* 5S рДНК выявлена в прицентромерных районах 5 пар хромосом, а в одной паре еще и в интеркалярном районе. Использование пробы Oligo-5.8S rDNA-Ran показало, что она маркирует как области вторичных перетяжек хромосом, так и другие районы. У *E. hyemalis* данная последовательность локализована в виде крупных блоков в коротком плече субтелоцентрических спутничных хромосом. У близкого ему вида *E. cilicica* помимо крупных блоков на коротких плечах субметацентриков выявлены небольшие кластеры 45S рДНК в терминальных районах пары метацентрических хромосом. У *E. stellata* имеется два четки бэнда в интеркалярных районах пары метацентриков, тогда как для *E. pinnatifida* характерно три пары субтеломерных кластеров: два в двух парах крупных метацентриков и два – в спутничных субтелоцентрических хромосомах. Таким образом, для изученных видов эрантисов характерна специфичная локализация кластеров генов 45S и 5S рРНК.

Благодарности. Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда в рамках проекта № 19-74-10082. Авторы выражают благодарность Р. В. Анненкову (г. Томск) за подготовку иллюстрации.

ЛИТЕРАТУРА

- Бадаева Е. Д., Салина Е. А.** Структура генома и хромосомный анализ растений // Вавиловский журнал генетики и селекции, 2013. – Т. 17, № 4/2. – С. 1017–1043.
- Митренина Е. Ю., Эрст А. С.** Кариосистематическое изучение рода *Eranthis* Salisb. (Ranunculaceae) // Проблемы ботаники Южной Сибири и Монголии, 2019. – Т. 1, № 18. – С. 145–149. DOI: 10.14258/pbssm.2019028
- Badaeva E. D., Ruban A. S., Aliyeva-Schnorr L., Municio C., Hesse S., Houben A.** *In situ* hybridization to plant chromosomes. In: Liehr T. (Ed.) Fluorescence *In Situ* Hybridization (FISH) Application Guide. – Springer, Berlin, 2017. – P. 477–494.
- Badaeva E. D., Surzhikov S. A., Agafonov A. V.** Molecular-cytogenetic analysis of diploid wheatgrass *Thinopyrum bessarabicum* (Savul. and Rayss) A. Löve // Comparative Cytogenetics, 2019. – Vol. 13, is. 4. – P. 389–402.
- Braz G. T., He L., Zhao H., Zhang T., Semrau K., Rouillard J.-M., Torres G. A., Jiang J.** Comparative oligo-FISH mapping: An efficient and powerful methodology to reveal karyotypic and chromosomal evolution // Genetics, 2018. – Vol. 208, is. 2. – P. 513–523.
- Danilova T. V., Friebe B., Gill B. S.** Single-copy gene fluorescence *in situ* hybridization and genome analysis: *Acc-2* loci mark evolutionary chromosomal rearrangements in wheat // Chromosoma, 2012. – Vol. 121. – P. 597–611.
- Erst A., Sukhorukov A., Mitrenina E., Skaptsov M., Kostikova V., Krivenko D., Chernisheva O., Troshkina V., Kushunina M., Xiang K., Wang W.** Integrative taxonomic approach reveals a new species of *Eranthis* (Ranunculaceae) from North Asia // PhytoKeys, 2020. – Vol. 140. – P. 75–100.
- Goryachkina O. V., Badaeva E. D., Muratova E. N., Zelenin A. V.** Molecular cytogenetic analysis of Siberian *Larix* species by fluorescence *in situ* hybridization // Plant Syst Evol, 2013. – Vol. 299. – P. 471–479.
- Luo X., Liu J.** Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) analysis of the locations of the oligonucleotides 5S rDNA, (AGGGTTT)₃, and (TTG)₆ in three genera of Oleaceae and their phylogenetic framework // Genes, 2019. – Vol. 10, is. 5. – P. 375.
- Luo X., He Zh.** Distribution of FISH oligo-5S rDNA and oligo-(AGGGTTT)₃ in *Hibiscus mutabilis* L. // Genome, 2021.
- Mlinarec J., Šatović Z., Mihelj D., Malenica N., Besendorfer V.** Cytogenetic and phylogenetic studies of diploid and polyploid members of tribe *Anemoninae* (Ranunculaceae) // Plant Biology, 2012. – Vol. 14. – P. 525–536.
- Park S. Y., Jeon M. J., Ma S. H., Wahlsteen E., Amundsen K., Kim J. H., Suh J. K., Chang J. S., Joung Y. H.** Phylogeny and genetic variation in the genus *Eranthis* using nrITS and cpIS single nucleotide polymorphisms // Horticulture, Environment, & Biotechnology, 2019. – Vol. 60. – P. 239–252.
- Ribeiro T., Loureiro J., Santos C., Morais-Cecilio L.** Evolution of rDNA FISH patterns in the Fagaceae // Tree Genetics & Genomes, 2011). – Vol. 7. – P. 1113–1122.
- Roa F., Guerra M.** Distribution of 45S rDNA sites in chromosomes of plants: Structural and evolutionary implications // BMC Evolutionary Biology, 2012. – Vol. 12. – P. 225.
- Rukšāns J., Zetterlund H.** *Eranthis iranica* (Ranunculaceae) Rukšāns and Zetterlund – new species of winter aconite from Iran // International Rock Gardener, 2018. – Vol. 108. – P. 2–19.
- Stefanoff B.** Weitere materialien zur flora Bulgariens // Izvestiya na Botanicheskiya Institut, Bd, 1963. – Vol. 11. – P. 151–157.
- Tang Z., Yang Z., Fu S.** Oligonucleotides replacing the roles of repetitive sequences pAs1, pSc119.2, pTa-535, pTa71, CCS1, and pAWRC.1 for FISH analysis // Journal of Applied Genetics, 2014. – Vol. 55. – P. 313–318.
- Yu Z., Wang H., Xu Y., Li Y., Lang T., Yang Z., Li G.** Characterization of chromosomal rearrangement in new wheat – *Thinopyrum intermedium* addition lines carrying *Thinopyrum* – specific grain hardness genes // Agronomy, 2019. – Vol. 9. – P. 18.
- Yurkevich O. Y., Samatadze T. E., Selyutina I. Y., Romashkina S. I., Zoshchuk S. A., Amosova, A. V., Muravenko O. V.** Molecular cytogenetics of Eurasian species of the genus *Hedysarum* L. (Fabaceae) // Plants, 2021. – Vol. 10, is. 1. – P. 89.