

Сравнительный анализ геномов шести видов *Hedysarum* L. (Fabaceae) с использованием метода rapidGISH

Comparative analysis of genomes of six species of *Hedysarum* L. (Fabaceae) by the rapidGISH technique

Юркевич О. Ю.¹, Саматадзе Т. Е.¹, Селютина И. Ю.², Ромашкина С. И.³, Семенов А. Р.¹, 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, Semenov A. R.¹, Zoshchuk S. A.¹, Amosova A. V.¹, Muravenko O. V.¹

¹ ФГБУН 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 ФГБНУ 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. Проведен сравнительный анализ геномов шести видов копеечников с использованием метода быстрой геномной гибридизации *in situ* (rapidGISH), который позволяет выявлять общие высокоповторяющиеся последовательности ДНК, а также показывает характер их распределения на хромосомах сравниваемых видов. На хромосомах *H. alpinum*, *H. theinum* из секции *Hedysarum* обнаружена дисперсная локализация геномной ДНК *H. flavescens* (сек. *Hedysarum*). На хромосомах *H. neglectum* из этой же секции наблюдались кластерные сигналы гибридизации ДНК *H. flavescens*. Локализация геномной ДНК *H. alpinum* выявлена на всех участках хромосом *H. flavescens* и *H. theinum*. На хромосомах *H. grandiflorum* и *H. dahuricum* из сек. *Multicaulia* обнаружены небольшие кластерные и дисперсные сигналы гибридизации геномной ДНК *H. flavescens* и *H. alpinum*. Полученные результаты указывают на наличие общих высокоповторяющихся последовательностей ДНК разных типов организации на хромосомах изученных видов, что свидетельствует об общности происхождения, но разной степени их родства.

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

Summary. A comparative analysis of genomes of six *Hedysarum* species was carried out using the rapid genomic *in situ* hybridization (rapidGISH) technique, which makes it possible to identify common highly repetitive DNA sequences, and also shows the patterns of their distribution on chromosomes of the studied species. Dispersed localization of genomic DNA of *H. flavescens* (sect. *Hedysarum*) was found on chromosomes of *H. alpinum* and *H. theinum* (both belonged to sect. *Hedysarum*). On chromosomes of *H. neglectum* from the section *Hedysarum*, clustered hybridization signals of genomic DNA of *H. flavescens* were observed. The localization of *H. alpinum* genomic DNA was found along the all chromosomes of *H. flavescens* and *H. theinum*. On chromosomes of *H. grandiflorum* and *H. dahuricum* (both from sect. *Multicaulia*), small clustered and dispersed hybridization signals of genomic DNA of *H. flavescens* and *H. alpinum* were found. Thus, in the studied species, common highly repetitive DNA sequences of different types of their chromosome organization were revealed. Our findings indicate the presence of common origin of the species from the sections *Hedysarum* and *Multicaulia* with different degree of their relationship.

Key words. Chromosome, GISH analysis, *Hedysarum*, 45S rDNA, 5S rDNA.

Введение. Род *Hedysarum* L. включает в себя ценные лекарственные виды, а также виды, относящиеся к природным кормовым ресурсам. Проявляемый интерес к данной группе растений связан с повышенным содержанием различных биологически активных соединений (флавоноиды, тритерпеноиды, кумарины, лигнаны, алкалоиды, аминокислоты, стеролы, высшие жирные кислоты, полисахариды и дубильные вещества) (Кукушкина и др., 2011; Liu и др., 2005; Dong и др., 2013). Основное внимание привлекают противовирусные свойства растений рода *Hedysarum* из сек. *Hedysarum* (=Gamotion Basin.)

и *Multicaulia* s.l., которые обусловлены наличием ксантона мангиферина. Систематика и филогения у имеющих ресурсы полезных видов *Hedysarum* и их сородичей активно изучаются, в том числе по молекулярным маркерам (Duan и др., 2015; Liu и др., 2017; Nafisi и др., 2019). Тем не менее остается много нерешенных вопросов, связанных с происхождением различий в основных хромосомных числах, а также с плоидным статусом, изменчивостью, происхождением и родственными взаимоотношениями геномов видов *Hedysarum*. Для понимания процессов видообразования и определения филогенетического родства между таксономическими группами растений особое значение приобретает сравнение их геномов с использованием геномной гибридизации *in situ* (GISH), которая позволяет выявить на хромосомах родственных видов гомологичные повторяющиеся последовательности ДНК (Amosova и др., 2015). С применением FISH и rapidGISH проведен сравнительный анализ геномов в кариотипах шести видов из сек. *Hedysarum* и *Multicaulia*, и на основе рисунков распределения кластеров рДНК и геномных ДНК на хромосомах установлена общность их происхождения и разная степень родства.

Материалы и методы. Сбор материала *H. neglectum* Ledeb., *H. theinum* Krasnob., *H. dahuricum* Turcz. проводился в природных популяциях на территории Южной Сибири. Семена видов *H. grandiflorum* Pall., *H. alpinum* L. и *H. flavescens* Rgl. et Schmalh. получены из коллекции отдела агробиологии и селекции ВИЛАР, Москва, РФ. Среди всех изученных нами видов *H. alpinum* обладает самым широким ареалом распространения, который пересекается с ареалами обитания видов *H. theinum* и *H. neglectum* (Курбатский, 1994). Виды *H. flavescens* и *H. neglectum* также имеют общий географический ареал в горных районах Памира и Алтая (Байтенов, 2001).

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 цитогенетических хромосомных маркеров 45S и 5S рДНК. После FISH-анализа на тех же хромосомных препаратах проводили процедуру rapidGISH (Amosova и др., 2015). Для GISH в качестве зондов использовали геномную ДНК *H. flavescens* и *H. alpinum*, которую выделяли из молодых листьев с использованием стандартного протокола СТАВ (Rogers, Bendich, 1985).

Анализ хромосомных пластинок проводили с помощью флуоресцентного микроскопа Olympus BX61 (Olympus, Токуо, Япония), оснащенного черно-белой ПЗС-камерой Cool Snap (Roper Scientific Inc., США).

Результаты и обсуждение. По данным FISH-анализа в кариотипах видов сек. *Hedysarum* ($2n = 14$) *H. theinum* и *H. flavescens* обнаружены одна пара спутничных хромосом с сайтами 45S рДНК и одна пара хромосом с сайтами 5S рДНК. У *H. alpinum* выявлены две пары хромосом с сигналом 5S рДНК. В отличие от других исследованных видов, в кариотипе *H. neglectum* наблюдались две пары спутничных хромосом (хр. 5 и 6) с сайтами гибридизации 45S рДНК и сайт 5S рДНК (хр. 3). В отличие от видов секции *Hedysarum*, основной сайт 45S рДНК у изученных видов секции *Multicaulia* ($2n = 16$) расположен на более крупной метацентрической хр. 2, а не на субметацентрической хр. 5. Кроме того, сайты 5S рДНК у видов этой секции расположены на коротком плече метацентрической хр. 3 дистально, а не проксимально (рис. 1, рис. 2).

Ранее виды рода *Hedysarum* были сгруппированы в соответствии с их основными числами хромосом $x = 7$ (сек. *Hedysarum*) или $x = 8$ (сек. *Multicaulia* и *Stracheya* (Benth.) B. H. Choi et H. Ohashi) (Choi, Ohashi, 2003; Arslan и др., 2012). Кроме того, используя nrDNA ITS и три пластидных участка (*matK*, *trnL-F*, *trnH-psbA*) были выделены три клады в пределах рода *Hedysarum*, соответствующие секциям *Hedysarum*, *Multicaulia* и *Stracheya* (Duan и др., 2015). Результаты наших исследований показали высокое сходство кариотипов изученных видов секций *Multicaulia* (Boiss.) B. Fedtsch. (*H. dahuricum*) и *Subacaulia* (Boiss.) B. Fedtsch. (*H. grandiflorum*) ($2n = 16$), что согласуется с мнением систематиков об объединении секций *Multicaulia* и *Subacaulia* в одну секцию *Multicaulia* s.l. (Choi, Ohashi, 2003; Duan и др., 2015). Полученные результаты также согласуются с филогенетическими исследованиями, основанными на секвенировании ядерной и пластидной ДНК, которые не подтвердили монофильность рода *Hedysarum* (Duan и др., 2015; Liu и др., 2017; Nafisi и др., 2019).

Для уточнения родственных взаимоотношений геномов изученных видов копеечников был применен вариант rapidGISH, который позволяет выявлять общие высокоповторяющиеся последовательности и показывает характер их распределения на хромосомах в геномах сравниваемых видов. Эти ДНК-повторы имеют наиболее высокую скорость эволюционной изменчивости в геномах родственных видов, что позволяет оценить в определенной степени, насколько далеко разошлись геномы и направление изменчивости высоких повторов в процессе видообразования (Amosova и др., 2015).

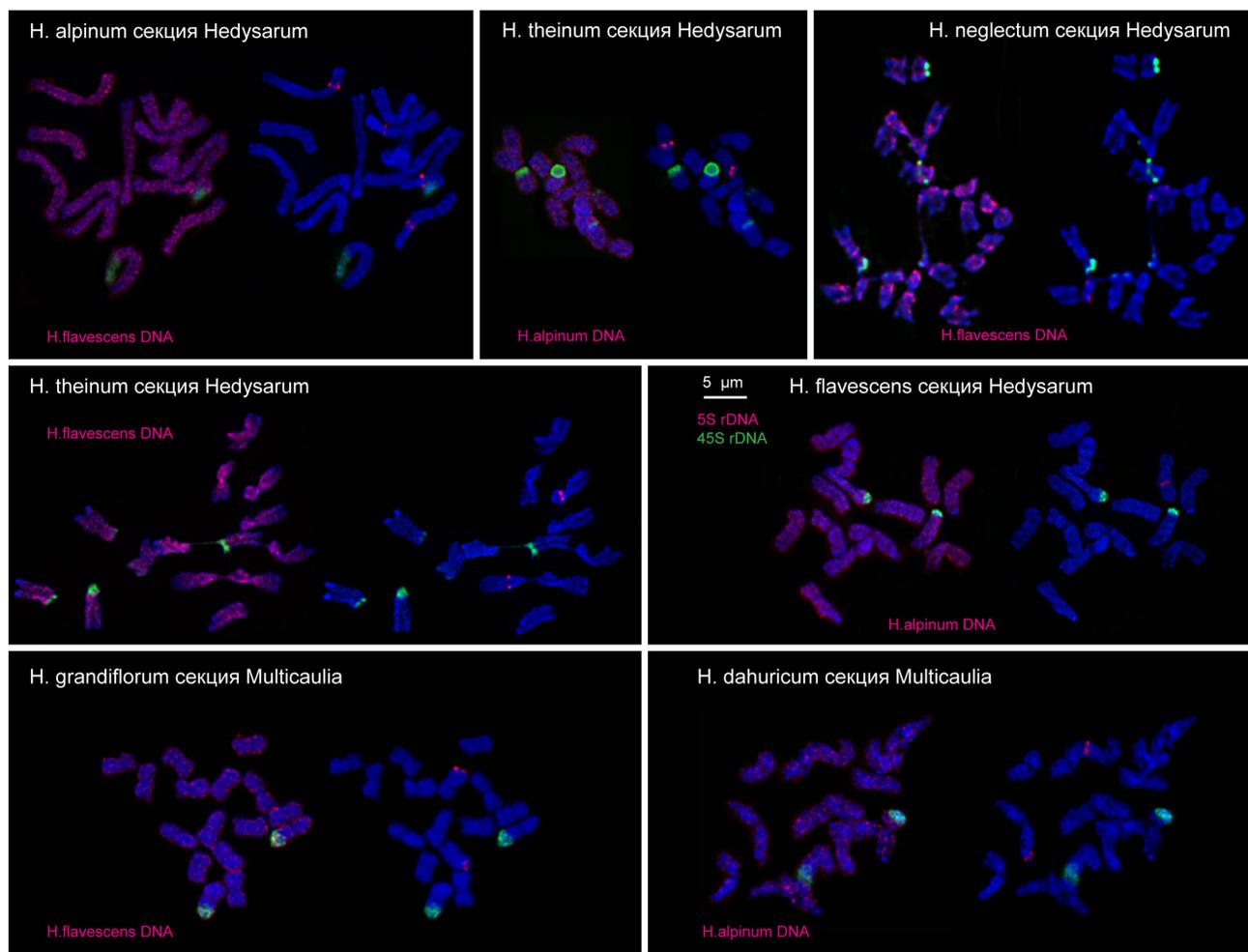


Рис.1. Метафазные пластинки изученных образцов *H. alpinum*, *H. flavescens*, *H. theinum*, *H. neglectum* после FISH (слева) с пробями 45S рДНК (зеленый) и 5S рДНК (красный) и rapidGISH (справа) с пробями 45S рДНК (зеленый) и геномной ДНК *H. flavescens*, *H. alpinum* (красный). Хромосомы окрашены DAPI – синий. Bar – 5 мкм.

В результате проведения rapidGISH с зондом геномной ДНК *H. flavescens* на хромосомах видов *H. theinum* и *H. alpinum* из секции *Hedysarum* выявлено относительно равномерное дисперсное расположение достаточно интенсивных сигналов гибридизации по всем хромосомам в метафазных пластинках (рис. 2). На хромосомах этих видов, за исключением *H. alpinum*, сигналы гибридизации геномной ДНК *H. flavescens* не наблюдались в дистальных районах хромосомных плеч. Использование зондов геномных ДНК *H. flavescens* и *H. alpinum* на хромосомах *H. neglectum* в обоих случаях выявило более кластерное распределение сигналов гибридизации, как правило, в проксимальных районах всех хромосом. На хромосомах *H. theinum* и *H. flavescens* локализация ДНК *H. alpinum* выявлена на всех участках хромосом.

На хромосомах видов *H. dahuricum* и *H. grandiflorum* из секции *Multicaulia* процедура rapidGISH с использованием геномных ДНК *H. flavescens* и *H. alpinum* выявила слабые мелкие дисперсные сигналы по всей длине хромосом (рис. 2).

Таким образом, сходство хромосомной структуры кариотипов у изученных видов секции *Hedysarum* (= *Gamotion*) и наличие в их геномах большого количества общих повторяющихся последовательностей ДНК демонстрирует их близкое родство и происхождение от общего предкового вида. Обнаружение менее интенсивного сигнала гибридизации общих повторов ДНК на хромосомах видов их двух изученных секций *Hedysarum* и *Multicaulia* указывают на более отдаленное родство геномов. Тем не менее полученные результаты подтверждают наличие по меньшей мере одного общего предка для видов секций *Hedysarum* и *Multicaulia*, что не исключает их полифилетического происхождения (Duan и др., 2015; Liu и др., 2017; Nafisi и др., 2019). По версии Байтенова (Байтенов, 2001), к одному их гипотетических предковых видов наиболее близок *H. flavescens*. Он полагает, что *H. flavescens* и другие

желтоцветковые виды представляют первичную мезофильную группу из горных массивов Памира, Алтая и Тянь-Шаня, которая в процессе эволюции была подвержена миграции и могла широко распространиться по Евразии. При этом могли создаваться мощные вторичные очаги видообразования, в том числе и в Сибири (Байтенов, 2001).

Благодарности. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ № 23-26-00037.

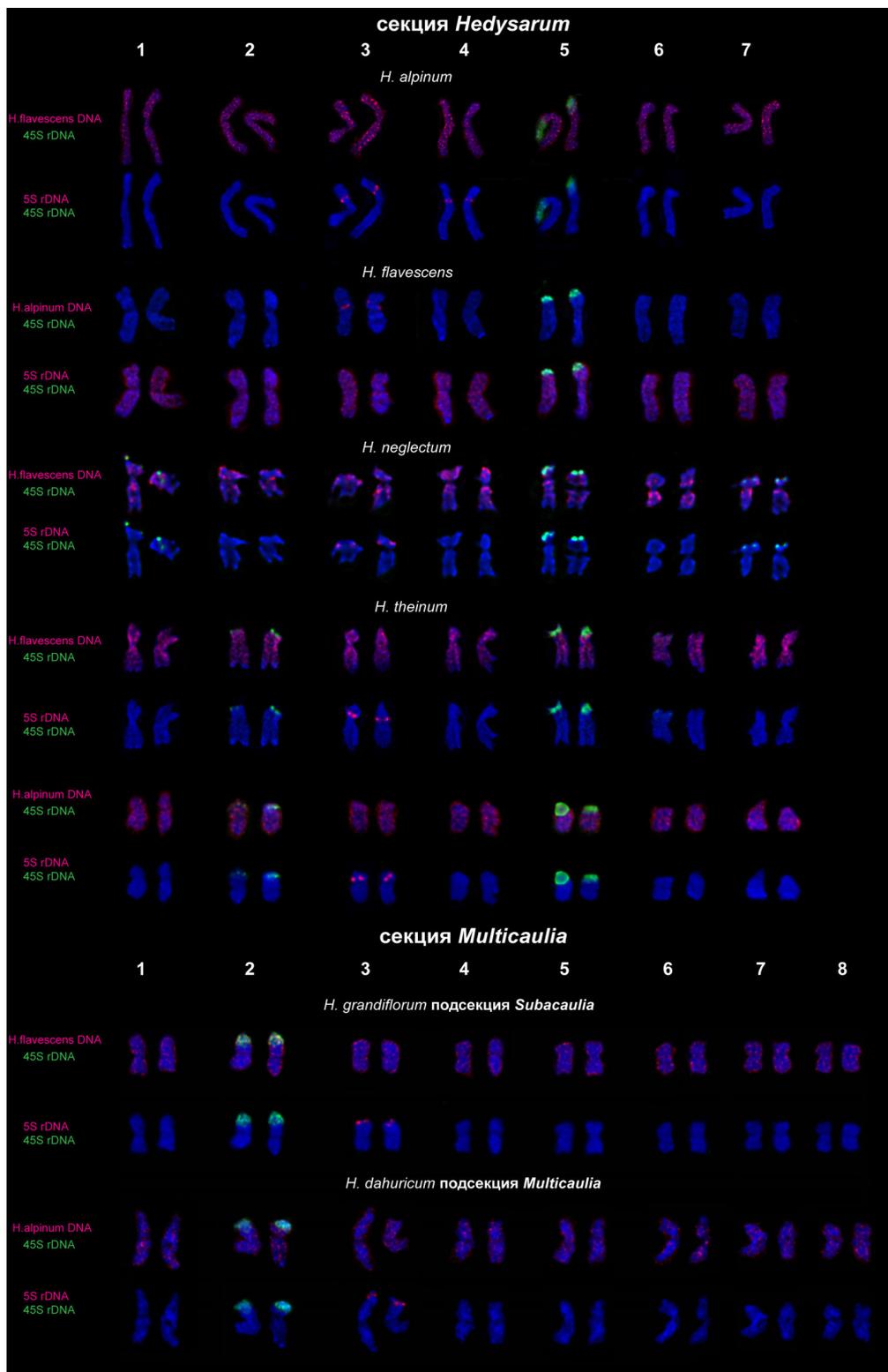


Рис. 2. Кариограммы изученных образцов *H. alpinum*, *H. flavescens*, *H. theinum*, *H. neglectum* после FISH с пробами 45S рДНК (зеленый) и 5S рДНК (красный) и GISH с пробами 45S рДНК (зеленый) и геномной ДНК *H. flavescens*, *H. alpinum* (красный). Хромосомы окрашены DAPI – синий.

ЛИТЕРАТУРА

- Байтенов М. С.** Родовой комплекс флоры // Флора Казахстана: В 2-х т. Т. 2. – Алматы: Гылым, 2001. – 280 с.
- 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. // Флора Сибири. Т. 9. – Новосибирск: Наука, 1994. – С. 153–165.
- Amosova A. V., Bolsheva N. L., Samatadze T. E., Twardovska M. O., Zoshchuk S. A., Andreev I. O., Badaeva E. D., Kunakh V. A., Muravenko O. V.** Molecular cytogenetic analysis of *Deschampsia antarctica* Desv. (Poaceae), Maritime Antarctic // PLoS One, 2015. – 10(9): e0138878. DOI: 10.1371/journal.pone.0138878
- 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, № 1. – P. 11–17. DOI: 10.1080/00087114.2012.678079
- 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. DOI: 10.2307/3647455
- 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. – 7:124. DOI: 10.1186/1752-153X-7-124
- 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. – Vol. 64, is. 1. – P. 49–64. DOI: <http://www.jstor.org/stable/24639244>
- Liu P. L., Wen J., Duan L., Arslan E., Ertugrul K., Chang Z. Y.** *Hedysarum* L. (Fabaceae: *Hedysareae*) is not monophyletic – Evidence from phylogenetic analyses based on five nuclear and five plastid sequences // PLoS ONE, 2017. – 12:e0170596. DOI:10.1371/journal.pone.0170596
- Liu Yi., Yu-Ying Zhao, Guang-Zhong Tu, Hu-Biao Chen** Flavonoids of the roots of *Hedysarum kirghisorum* // Biochemical Systematics and Ecology, 2005. – Vol. 33, is. 8. – P. 809–812. DOI: 10.1016/j.bse.2005.01.007
- Nafisi H., Kazempour-Osaloo S., Mozaffarian V., Schneeweiss G. M.** Molecular phylogeny and divergence times of the genus *Hedysarum* (Fabaceae) with special reference to section *Multicaulia* in Southwest Asia // Plant. Syst. Evol., 2019. – Vol. 305. – P. 1001–1017. DOI: 10.1007/s00606-019-01620-3
- Rogers S. O., Bendich A. J.** Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues // Plant Mol. Biol., 1985. – Vol. 5. – P. 69–76.
- Yurkevich O. Y., Kirov I. V., Bolsheva N. L., Rachinskaya O. A., Grushetskaya Z. E., Zoshchuk 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. DOI: 10.3389/fpls.2017.01467