

## Внутривидовая изменчивость *Salvia officinalis* (Lamiaceae) по локализации на хромосомах повторов ДНК

### Intraspecific variability of *Salvia officinalis* (Lamiaceae) according to DNA repeats chromosome patterns

Муравенко О. В.<sup>1</sup>, Кальнюк Ю. В.<sup>1</sup>, Юркевич О. Ю.<sup>1</sup>, Коротких И. Н.<sup>2</sup>, Невкрытая Н. В.<sup>3</sup>, Грунина Е. Н.<sup>3</sup>, Шмараяева А. Н.<sup>4</sup>, Попов К. В.<sup>1</sup>, Саматадзе Т. Е.<sup>1</sup>, Зошук С. А.<sup>1</sup>, Амосова А. В.<sup>1</sup>

Muravenko O. V.<sup>1</sup>, Kalnyuk J. V.<sup>1</sup>, Yurkevich O. Yu.<sup>1</sup>, Korotkikh I. N.<sup>2</sup>, Nevkrytaya N. V.<sup>3</sup>, Grunina E. N.<sup>3</sup>, Shmarayeva A. N.<sup>4</sup>, Popov K. V.<sup>1</sup>, Samatadze T. E.<sup>1</sup>, Zoshchuk S. A.<sup>1</sup>, Amosova A. V.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН, г. Москва, Россия. E-mail: omur@imb.ru  
<sup>1</sup> Engelhardt Institute of Molecular Biology, RAS, Moscow, Russia

<sup>2</sup> Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений (ВИЛАР), г. Москва, Россия. E-mail: slavnica241270@yandex.ru  
<sup>2</sup> All-Russian Scientific Research Institute of Medicinal and Aromatic Plants, Moscow, Russia

<sup>3</sup> Научно-исследовательский институт сельского хозяйства Крыма, г. Симферополь, Республика Крым, Россия. E-mail: nevkritaya@mail.ru  
<sup>3</sup> Research Institute of Agriculture of Crimea, Simferopol, Republic of Crimea, Russia

<sup>4</sup> Ботанический сад Южного федерального университета, Россия, г. Ростов-на-Дону, Россия. E-mail: anshmarayeva@sfedu.ru  
<sup>4</sup> Southern Federal University's botanical garden, Rostov-on-Don, Russia

**Реферат.** Шалфей лекарственный, *Salvia officinalis* L. (Lamiaceae), является широко распространенным хозяйственно-ценным видом. Благодаря высокому содержанию эфирного масла он активно используется в фармацевтической, пищевой, парфюмерной промышленности, а также имеет декоративное значение. Вместе с тем хромосомная структура и организация генома этого вида до сих пор недостаточно хорошо изучена. Впервые проведен анализ внутривидовой изменчивости *S. officinalis* по рисункам FISH-локализации различных повторов ДНК в кариотипах четырех видовых образцов и двух сортов из разных мест произрастания. Анализ рисунков локализации на хромосомах классических маркеров 45S рДНК и 5S рДНК подтвердил стабильность геномов всех изученных видовых образцов и сортов. Также обнаружено наличие внутривидовой изменчивости по распределению повтора сателлитной ДНК SO202 в кариотипах исследуемых образцов. Дополнительно к основному набору хромосом в некоторых кариотипах выявлены В-хромосомы, содержащие кластеры 45S рДНК или SO202. Полученные результаты позволили нам идентифицировать все пары хромосом в кариотипах и построить кариограммы изучаемых видовых образцов и сортов *S. officinalis*. Результаты данного исследования подтвердили стабильность кариотипов указанных образцов по классическим хромосомным маркерам, а также продемонстрировали наличие внутривидовой изменчивости по распределению повтора SO202, что может быть использовано при селекции новых сортов *S. officinalis*.

**Ключевые слова.** Сателлитная ДНК, репитом, шалфей лекарственный, FISH, 45S рДНК, 5S рДНК.

**Summary.** *Salvia officinalis* L. (Lamiaceae) is a widespread economically valuable species. Due to the high content of essential oil, it is actively used in pharmaceutical, food and perfume industries. However, the chromosome structure and organization of its genome is still not well understood. For the first time, an analysis of intraspecific variability of *S. officinalis* was carried out based on the patterns of FISH localization of various DNA repeats in karyotypes of four species samples and two varieties from different habitats. Patterns of chromosome localization on of classical markers, 45S rDNA and 5S rDNA, confirmed the stability of genomes of the studied species samples and varieties. However, the intraspecific variability in localization of SO202 in karyotypes of the studied samples was found. In addition to the main set of chromosomes, B chromosomes were found in some karyotypes, including those containing 45S rDNA and SO202 clusters. The results of this study allowed us to identify all chromosome pairs in karyotypes and construct karyograms of the studied samples of *S. officinalis*. Our findings confirmed the stability of karyotypes of these samples according to the classical chromosomal markers but also demonstrated the presence of intraspecific variability in localization of the SO202 repeat, which can be used in breeding new varieties of *S. officinalis*.

**Key words.** FISH, repeatome, *Salvia officinalis* L., satellite DNA, 45S rDNA, 5S rDNA.

**Введение.** Шалфей лекарственный – *Salvia officinalis* L. (Lamiaceae), является хозяйственно-ценным травянистым растением. Соцветия и листья этого вида содержат большое количество (0,3–0,5 %) эфирного масла, основными компонентами которого являются терпены, флавоноиды и сальвин (Jug-Dujaković et al., 2012; Afonso et al., 2019), поэтому *S. officinalis* широко используется во многих отраслях промышленности, в частности, фармацевтической, пищевой, парфюмерной и декоративной.

Несмотря на экономическую ценность, организация генома и структура хромосом *S. officinalis* до сих пор недостаточно хорошо изучена. Известно, что кариотип *S. officinalis* содержит  $2n = 2x = 14$  хромосом небольшого размера (0,99–2,38 мкм), что затрудняет анализ их морфологии и идентификацию в кариотипе (Tarinejad, Mirshekari, 2010; Martin et al., 2011; Ranjbar et al., 2015). Большая часть цитогенетических исследований у видов рода *Salvia* L. проведена с использованием окрашивания хромосом ацетокармином, ацетоорсеином или гематоксилином, что не позволяло проводить надежную идентификацию хромосом (Ranjbar et al., 2015; Hu et al., 2016; Eroğlu et al., 2021). Сравнительный анализ репитомов двух ценных эфиромасличных видов, *S. officinalis* и *S. sclarea* L. с использованием данных высокопроизводительного секвенирования позволил провести картирование выявленных повторов (семейств) сателлитной ДНК (сатДНК) на хромосомах с помощью процедуры FISH (флуоресцентная гибридизация *in situ*) и впервые провести идентификацию хромосом в кариотипах этих видов (Muravenko et al., 2022). У ряда видов рода *Salvia* обнаружена межпопуляционная изменчивость числа хромосом, диплоидные и полиплоидные популяции, а также выявлены В-хромосомы в кариотипах (Tarinejad, Mirshekari, 2010; Eroğlu et al., 2021; Martin et al., 2022). Считается, что анеуплоидия и полиплоидия могут играть важную роль в процессах видообразования (Ranjbar et al., 2015; Eroğlu et al., 2021). Вместе с тем внутривидовая хромосомная изменчивость у *S. officinalis*, разные сорта которого возделываются в различных регионах, недостаточно изучена. В данной работе для оценки внутривидовой хромосомной изменчивости *S. officinalis* проведено сравнение кариотипов четырех видовых образцов и двух сортов из разных мест произрастания по рисункам FISH-картирования хромосомных маркеров 4S рДНК, 5S рДНК и повтора сатДНК SO202.

**Материалы и методы.** Семена видовых образцов *S. officinalis* из разных мест произрастания были получены из коллекций Ботанического сада ЮФУ, г. Ростов-на-Дону; Донецкого ботанического сада; Научно-исследовательского института сельского хозяйства Крыма, г. Симферополь. Из коллекции Всероссийского научно-исследовательского института лекарственных и ароматических растений (ВИЛАР, г. Москва, РФ), получены семена сорта шалфея лекарственного ‘Фиолетовый аромат’ (выведен методом отбора по размеру габитуса из сорта шалфея лекарственного ‘Кубанец’ в 2018 г. О. А. Быковой, Н. С. Тропининой, А. Ю. Тхагановым, А. Ю. Аникиной и Т. Г. Кадацкой) и сорта шалфея лекарственного ‘Кубанец’ (выведен методом отбора из возделываемой популяция, полученной на основе семян исходной Лубненской популяции (Украинская ЗОС ВИЛАР, г. Лубны Полтавской области) в 2003 г. Н. Т. Конон, А. А. Жученко и А. А. Кодаш). Оба сорта созданы в Северо-Кавказском филиале ВИЛАР (СКФ, Краснодарский край, станция Васюринская).

Приготовление хромосомных препаратов, а также FISH-анализ хромосом проводили по ранее описанным методикам (Muravenko et al., 2022) с использованием меченых стандартных цитогенетических маркеров 4S и 5S рДНК, а также олигонуклеотидного зонда SO202, созданного на основе выявленного в геноме *S. officinalis* повтора сатДНК.

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

**Результаты и обсуждение.** Цитогенетический анализ показал, что кариотип у всех изученных образцов *S. officinalis* содержал  $2n = 2x = 14$  хромосом основного набора размером 2–6 мкм (рис. 1). Это согласуется с предыдущими исследованиями, причем известно, что базовое число хромосом  $x = 7$ , наблюдаемое у *S. officinalis*, является наиболее распространенным внутри рода *Salvia* (Muravenko et al., 2022). Дополнительно к основному набору хромосом, в некоторых образцах были обнаружены 0–2 мелких хромосом (В-хромосомы) (рис. 1Г). Ранее В-хромосомы уже были выявлены в кариотипах представителей этого вида (Muravenko et al., 2022). Известно, что В-хромосомы не имеют гомологов среди хромосом основного набора, отличаются от них по морфологии и структуре хроматина, распределяются неоднородно внутри индивида и/или популяции, и их часто относят к несущественным и генетически инертным элементам (Houben et al., 2014).

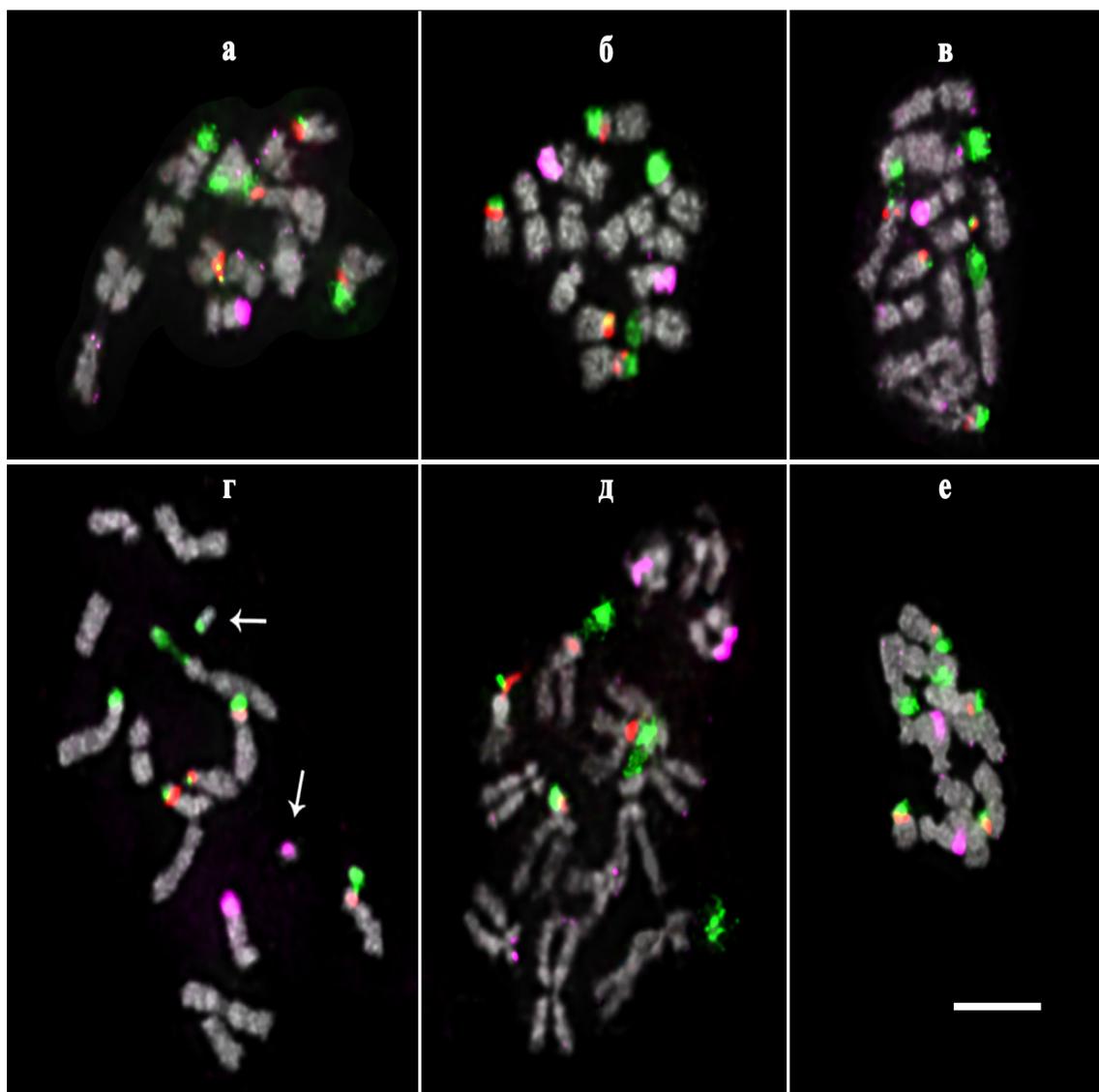


Рис. 1. Метафазные пластинки видовых образцов *Salvia officinalis* после FISH с пробами 45S рДНК (зеленый), 5S рДНК (красный) и SO202 (лиловый): а – образец из ВИЛАР; б – образец из г. Донецк; в – образец из г. Ростов-на-Дону; г – образец из г. Симферополь; д – сорт шалфея лекарственного ‘Фиолетовый аромат’; е – сорт шалфея лекарственного ‘Кубанец’. Хромосомы окрашены DAPI (серый). Стрелки указывают на В-хромосомы. Масштаб – 5 мкм.

Классические хромосомные маркеры (45S и 5S рДНК), а также зонды, разработанные на основе выявленных сатДНК, необходимы для точной идентификации хромосом в кариотипах, для анализа структуры хромосом и выявления хромосомных перестроек, которые играют важную роль в процессе видообразования (Muravenko et al., 2022). У изученных видовых образцов и сортов *S. officinalis* FISH-анализ не выявил различий по картинам распределения классических маркеров на хромосомах основного набора. Яркие сигналы гибридизации 45S рДНК наблюдались в коротких плечах хромосом 2, 3 и 7. На хромосомах 3 и 7 в ко-локализации с 45S рДНК были локализованы кластеры 5S рДНК (рис. 1, 2). Дополнительно в некоторых кариотипах кластер 45S рДНК выявлялся на одной В-хромосоме (рис. 1Г, 2Г). Полученные результаты согласовывались с цитогенетическими данными, описанными ранее для образца *S. officinalis* из другого региона (Франция), что указывает на стабильность кариотипов изучаемых образцов.

Вместе с тем по рисункам распределения на хромосомах повтора SO202 была обнаружена внутривидовая изменчивость. Кластер SO202 выявлялся в субтеломерной области длинного плеча хромосомы 4 у всех изученных образцов, но наблюдался значительный гетероморфизм гомологов. Так, у видовых образцов из ВИЛАР и г. Симферополь крупный кластер SO202 обнаружен только на одном из гомологов хромосомы 4. У образца из г. Ростов-на-Дону на одном из гомологов этой пары наблю-

дался крупный кластер SO202, но на другом гомологе выявлен очень слабый сигнал гибридизации. У образцов из г. Донецк, а также сортов шалфея лекарственного ‘Фиолетовый аромат’ и ‘Кубанец’, обе гомологичные хромосомы несли крупные кластеры SO202. Кроме того, в кариотипах всех изученных образцов, за исключением образца из г. Симферополь, обнаружены минорные кластеры SO202 в субтеломерных областях обоих плеч двух – четырех пар хромосом (рис. 1, 2). Отметим, что у исследованного ранее образца из Франции минорные кластеры SO202 наблюдали в субтеломерных районах всех пар хромосом (Muravenko et al., 2022). Интересно, что в некоторых кариотипах образца из г. Симферополь кластер 45S рДНК также выявлялся на одной В-хромосоме (рис. 1, 2). Ранее показано, что 5S рДНК, 45S рДНК и разные сатДНК могут быть локализованы как на А-, так и на В-хромосомах (Muravenko et al., 2022). Известно также, что В-хромосомы могут включать некоторые последовательности А-хромосом, 5S рДНК, 45S рДНК, транскрибируемые гены и другие повторяющиеся элементы (Houben et al., 2014; Huang et al., 2016; D’Ambrosio et al., 2017). Наши результаты подтверждают эти данные и указывают на то, что формирование В-хромосом у *S. officinalis* могло быть связано с изменениями, происходящими в А-хромосомах при видообразовании.

Считается, что сатДНК представляют собой быстро изменяющуюся фракцию репитомов растений. Известно, что между близкородственными видами наблюдаются различия по числу копий и



Рис. 2. Кариограммы видовых образцов *Salvia officinalis* после FISH с пробами 45S рДНК (зеленый), 5S рДНК (красный) и повтор 202 (лиловый): а – образец из ВИЛАР; б – образец из г. Донецк; в – образец из г. Ростов-на-Дону; г – образец из г. Симферополь; д – сорт шалфея лекарственного ‘Фиолетовый аромат’; е – сорт шалфея лекарственного ‘Кубанец’. Хромосомы окрашены DAPI (серый).

составу нуклеотидов сатДНК, а также по их количеству и распределению в геноме (Becher et al., 2021). У растений обнаружены даже внутривидовые вариации по размеру генома, которые могут отражать различные эволюционные процессы при видообразовании (Becher et al., 2021; Wang et al., 2021). Повторы сатДНК считаются «горячими точками» рекомбинации при реорганизации генома, а локализация сатДНК в интерстициальных и/или теломерных участках гетерохроматина уменьшает генетическую рекомбинацию в соседних участках хромосомы (Miklos, Gill, 1982).

Сравнение рисунков распределения кластеров сатДНК способствует обнаружению гомологичных хромосом в кариотипе, выявлению различий между линиями и популяциями, а также хромосомных перестроек (Heslop-Harrison, 2000). Анализ рисунков локализации молекулярных маркеров на хромосомах изучаемых видовых образцов и сортов *S. officinalis* из разных мест произрастания позволил нам построить кариограммы указанных образцов, а также установить стабильность их кариотипов по числу хромосом основного набора и локализации классических молекулярных маркеров хромосом (45S и 5S рДНК). Помимо этого, выявлена специфическая внутривидовая изменчивость по наличию В-хромосом и рисункам распределения повтора SO202 в кариотипах. Результаты данного исследования важны для оценки внутривидовой генетической изменчивости *S. officinalis* как ценного вида, возделываемого в разных эколого-географических регионах, а также для последующего селекционного отбора новых сортов и форм.

**Благодарности.** Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ № 22-26-00222.

#### ЛИТЕРАТУРА

- Afonso A. F., Pereira O. R., Fernandes Â., Calhella R. C., Silva A. M., Ferreira I. C., Cardoso S. M. Phytochemical composition and bioactive effects of *Salvia africana*, *Salvia officinalis* 'Icterina' and *Salvia mexicana* aqueous extracts // *Molecules*, 2019. – Vol. 24. – P. 4327.
- Becher H., Powell R. F., Brown M. R., Metherell C., Pellicer J., Leitch I. J., Twyford A. D. The nature of intraspecific and interspecific genome size variation in taxonomically complex eyebrights // *Ann. Bot.*, 2021. – Vol. 128. – P. 639–651.
- D'Ambrosio U., Alonso-Lifante M. P., Barros K., Kovačik A., Mas de Xaxars G., Garcia S. B-chrom: A database on B chromosomes of plants, animals and fungi // *New Phytol.*, 2017. – Vol. 216. – P. 635–642.
- Eroğlu H. E., Martin E., Kahraman A., Aslan E. G. The new chromosomal data and karyotypic variations in genus *Salvia* L. (Lamiaceae): Dysploidy, polyploidy and symmetrical karyotype // *Caryologia*, 2021. – Vol. 74. – P. 21–28.
- Heslop-Harrison J. S. Comparative genome organization in plants: from sequence and markers to chromatin and chromosomes // *Plant Cell*, 2000. – Vol. 12. – P. 617–636.
- Houben A., Banaei-Moghaddam A. M., Klemme S., Timmis J. N. Evolution and biology of supernumerary B chromosomes // *Cell. Mol. Life Sci.*, 2014. – Vol. 71. – P. 467–478.
- Hu G. X., Xiang C. L., Liu E. D., Dong H. J., Funamoto T. Karyotypic study of eighteen taxa of *Salvia* (Lamiaceae) from China // *Caryologia*, 2016. – Vol. 69. – P. 50–57.
- Huang W., Du Y., Zhao X., Jin W. B chromosome contains active genes and impacts the transcription of A chromosomes in maize (*Zea mays* L.) // *BMC Plant Biol.*, 2016. – Vol. 16. – P. 88.
- Jug-Dujaković, M., Ristić M., Pljevljakušić D., Dajić-Stevanović Z., Liber Z., Hančević K., Radić T., Šatović Z. High diversity of indigenous populations of dalmatian sage (*Salvia officinalis* L.) in essential-oil composition // *Chem. Biodivers.*, 2012. – Vol. 9. – P. 2309–2323.
- Martin E., Ozlem C., Kahraman A., Celep F., Dogan M. A cytomorphological study in some taxa of the genus *Salvia* L. (Lamiaceae) // *Caryologia*, 2011. – Vol. 64. – P. 272–287.
- Martin E., Celep F., Eroğlu H. E. Comparative chromosomal features and new karyological data in *Salvia*: B chromosomes, polyploidy, dysploidy and symmetric karyotypes // *Braz. J. Bot.*, 2022. – Vol. 45. – P. 625–634.
- Miklos G. L. G., Gill A. C. Nucleotide sequences of highly repeated DNAs; compilation and comments // *Genet. Res.*, 1982. – Vol. 39. – P. 1–30.
- Muravenko O. V., Yurkevich O. Y., Kalnyuk J. V., Samatadze T. E., Zoshchuk S. A., Amosova A. V. Integration of repeatomic and cytogenetic data on satellite DNA for the genome analysis in the genus *Salvia* (Lamiaceae) // *Plants*, 2022. – Vol. 11. – P. 2244.
- Ranjbar M., Pakatchi A., Babataheri Z. J. Chromosome number evolution, biogeography and phylogenetic relationships in *Salvia* (Lamiaceae) // *Webbia J. Plant Taxon Geogr.*, 2015. – Vol. 70. – P. 293–312.
- Tarinejad A. R., Mirshekari B. Study on variation of karyotypes between and within species of *Salvia officinalis* L., *Stachys byzantine* L. and *Dracocephalum molarica* L. // *Acta Hort.*, 2010. – Vol. 853. – P. 39–46.
- Wang D., Zheng Z., Li Y., Hu H., Wang Z., Du X. Which factors contribute most to genome size variation within angiosperms? // *Ecol. Evol.*, 2021. – Vol. 11. – P. 2660–2668.