

Молекулярно-цитогенетическое изучение четырех видов *Calendula* (Asteraceae)

Molecular cytogenetics of four species of *Calendula* (Asteraceae)

Саматадзе Т. Е.¹, Юркевич О. Ю.¹, Хазиева Ф. М.², Савченко О. М.²,
Басалаева И. В.², Амосова А. В.¹, Муравенко О. В.¹

Samatadze T. E.¹, Yurkevich O. Yu.¹, Khazieva F. M.², Savchenko O. M.², Basalaeva I. V.², Amosova A. V.¹,
Muravenko O. V.¹

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

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

² Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений, г. Москва, Россия
E-mail: vilar.6@yandex.ru

² All-Russian Institute of medicinal and aromatic plants, Federal Agency for Scientific Organizations, Moscow, Russia

Реферат. Впервые с использованием флуоресцентной гибридизации *in situ* проведено сравнительное исследование хромосомной организации кариотипов четырех видов календулы – *Calendula* L. (Asteraceae): *C. officinalis*, *C. stellata*, *C. tripterocarpa* и *C. arvensis*. Определены числа хромосом в кариотипах: *C. stellata* ($2n = 2x = 14$); *C. officinalis* ($2n = 4x = 32$); *C. tripterocarpa* ($2n = 2x = 30$); *C. arvensis* ($2n = 4x = 44$), и выявлена характерная специфическая локализация кластеров генов 45S и 5S рДНК для каждого вида. В кариотипе *C. officinalis* выявлен дополнительный полиморфный минорный сигнал гибридизации 45S рДНК, который располагался медианно в коротком плече одной хромосомы. Установлено, что рисунок распределения основных сайтов рибосомных генов на хромосомах в кариотипе *C. stellata* ($2n = 2x = 14$) и *C. tripterocarpa* ($2n = 2x = 30$) свидетельствует в пользу гибридного происхождения *C. arvensis* ($2n = 4x = 44$) в результате возможной интрогрессивной гибридизации в процессе эволюции.

Ключевые слова. Флуоресцентная гибридизация *in situ*, хромосомы, хромосомный полиморфизм, *Calendula*, 45S рДНК, 5S рДНК.

Summary. For the first time, a comparative molecular cytogenetic study of four species of *Calendula* L. (Asteraceae): *C. officinalis*, *C. stellata*, *C. tripterocarpa*, and *C. arvensis* was carried out. In each species, chromosome numbers were determined: *C. stellata* ($2n = 2x = 14$), *C. officinalis* ($2n = 4x = 32$), *C. tripterocarpa* ($2n = 2x = 30$), and *C. arvensis* ($2n = 4x = 44$), and also specific chromosome localization of 45S and 5S rDNA clusters was revealed with the use of fluorescence *in situ* hybridization. An additional polymorphic minor 45S rDNA hybridization signal was found in the *C. officinalis* karyotype, which was located median in the short arm of one chromosome. The patterns of chromosome distribution of the major sites of 45S and 5S rDNA in karyotypes of the studied species confirmed the hybrid origin of *C. arvensis* ($2n = 4x = 44$) which could be a result of the introgressive hybridization of two other species: *C. stellata* ($2n = 2x = 14$) and *C. tripterocarpa* ($2n = 2x = 30$) during speciation.

Key words. *Calendula*, chromosomes, chromosomal polymorphism, fluorescence *in situ* hybridization, 45S rDNA, 5S rDNA.

Введение. Род *Calendula* L. (календула) относится к *Calenduleae* Cass., одной из самых маленьких триб семейства Asteraceae (Bremer, 1994) и включает в себя от 10 до 25 видов травянистых растений и полукустарников, распространенных преимущественно в Средиземноморье, Иране, Центральной Европе, Африке, Азии (Norlindh, 1977).

В настоящее время различные виды календулы используются как в традиционной, так и в народной медицине. В цветках и траве календулы присутствуют: флавоноиды, ксантофиллы и каротиноиды, эфирное масло, кумарины (скополетин) (Hiller, Melzig, 2010), водорастворимые полисахариды (14,75 %) (Haensel, Sticher, 2007). В сырье содержатся тритерпеновые сапонины 2–10 % (гликозиды олеаноловой кислоты), тритерпеновые спирты (ψ -таракастерол, таракостерол, фарадиол, арнидиол,

гелиантриол), стероиды. Семена содержат значительное количество жирных кислот (около 20 %), из которых 60 % – календовая кислота. Некоторые виды календулы были протестированы на их противоопухолевый, проапоптотический эффекты, и получены обнадеживающие результаты (Cruceriu et al., 2018; Khouchlaa et al., 2023).

Род *Calendula* является таксономически и цитологически сложным родом из-за его высокой морфологической и кариологической вариации (Norlindh, 1977), а также в связи со спонтанной гибридизацией между различными таксонами (Heun, Joel, 1983).

Известно, что для исследования сложности таксономических групп используются различные цитологические признаки: число, морфология и поведение хромосом в мейозе (Mallick, 2001; Kron et al., 2007). С использованием метода монохромного анализа хромосом проведен морфометрический анализ для некоторых представителей рода *Calendula*, в том числе и для *C. officinalis* (Soliman et al., 2008; Nora et al., 2013), а также установлен размер генома у некоторых видов календулы (Nora et al., 2013). Анализ мейоза позволил получить информацию о генетических последствиях воздействия химических мутагенов в поколениях M_1 и M_2 *C. officinalis* отечественных сортов календулы ‘Золотое море’ (Zolotoe more) и ‘Райский сад’ (Rajskij sad), а привлечение дополнительных современных методов хромосомного анализа позволило охарактеризовать эти растения на уровне генома (Samatadze et al., 2019; Саматадзе и др., 2020).

Несмотря на то, что в последнее время привлекаются различные методы для установления филогенетических взаимоотношений внутри рода *Calendula*, структура кариотипа, его внутри- и межвидовой полиморфизм для большинства видов календулы до настоящего времени исследованы недостаточно.

Целью нашей работы стало сравнительное изучение структуры кариотипов четырех видов рода *Calendula* L.: *C. officinalis* L., *C. stellata* Cav., *C. tripterocarpa* Rupr. и *C. arvensis* L. с использованием молекулярно-цитогенетических подходов для установления их внутри- и межвидовой хромосомной вариабельности и уточнения их геномных и систематических взаимоотношений.

Материал и методы. Посев и последующий сбор коллекционных образцов семян календулы проводился на посевных делянках территории Ботанического сада Всероссийского научно-исследовательского института лекарственных и ароматических растений (ВИЛАР, г. Москва) в 2021–2022 гг.

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 генетических хромосомных маркеров 45S и 5S рДНК. Отобранные хромосомные пластинки фотографировали на флуоресцентном микроскопе Olympus BX61 (Olympus, Токуо, Япония) с помощью черно-белой ПЗС-камеры Cool Snap (Roper Scientific Inc., США). Анализировали не менее 15 выбранных метафазных пластинок с хорошим разбросом хромосом для каждого вида календулы. Полученные изображения обрабатывали, используя программы хромосомного анализа, согласно технологии, принятой в Лаборатории (Муравенко, Зеленин, 2009).

Результаты и обсуждение. Известно, что рибосомная РНК является высоко консервативной, содержит повторяющиеся семейства генов с сотнями и тысячами копий и сосредоточена в одном или более кластерах на одной или многих хромосомных парах (Schwarzacher et al., 1994). Сайты РНК легко картируются на хромосомах при проведении FISH-анализа. Расположение рибосомных генов на хромосомах часто используют в качестве молекулярных маркеров для анализа филогенетических связей между родственными геномами (Бадаева, Салина, 2013).

Нами впервые проведено сравнительное исследование хромосомной организации кариотипов четырех видов календулы: *C. officinalis*, *C. stellata*, *C. tripterocarpa* и *C. arvensis* с использованием молекулярных маркеров хромосом. Установлено для каждого видообразца число хромосом в кариотипах: *C. stellata*, $2n = 2x = 14$; *C. officinalis*, $2n = 4x = 32$; *C. tripterocarpa*, $2n = 2x = 30$; *C. arvensis*, $2n = 4x = 44$.

Выявлено, что для всех изученных видов календулы характерна специфическая локализация кластеров генов 45S и 5S рДНК. По данным FISH-анализа, в кариотипе *C. stellata* обнаружены две пары спутничных хромосом с крупными сайтами гибридизации 45S рДНК и одна пара хромосом, несущих сайты гибридизации 5S рДНК (рис. 1б). В кариотипе *C. officinalis* обнаружены две пары спутничных хромосом с разной степенью интенсивности сайтов гибридизации 45S рДНК и одна пара хромосом, несущих сайты гибридизации 5S рДНК (рис. 1а). В кариотипе *C. officinalis* выявлен дополнительный полиморфный минорный сигнал гибридизации 45S рДНК, который располагался медианно в корот-

ком плече одной хромосомы. У *C. tripterocarpa* обнаружены три пары спутничных хромосом с небольшими сайтами гибридизации 45S рДНК, а у *C. arvensis* пять пар спутничных хромосом, четыре из которых имели крупные сайты гибридизации 45S рДНК, а одна пара – небольшие сайты гибридизации (рис. 1в, г). Установлено, что в кариотипе *C. tripterocarpa* четыре пары хромосом, несущих крупные сайты гибридизации 5S рДНК, а у *C. arvensis* пять пар хромосом, несущих сайты гибридизации 5S рДНК, причем четыре пары имели крупные сайты 5S рДНК, а одна пара хромосом – сайты 5S рДНК небольшого размера (рис. 1в, г).

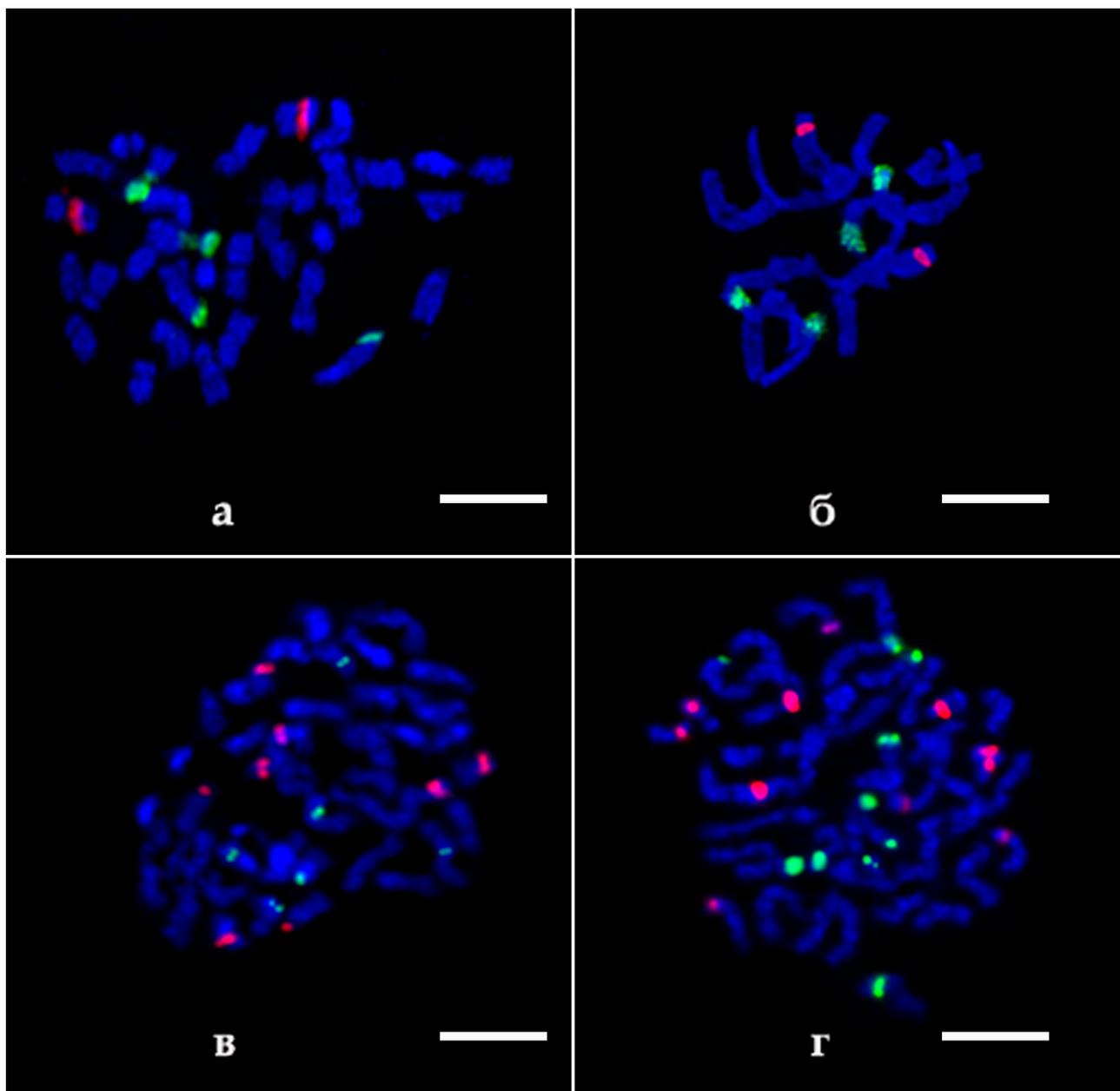


Рис. 1. Флуоресцентная гибридизация in situ в кариотипах: *Calendula officinalis* (а); *C. stellata* (б); *C. tripterocarpa* (в); *C. arvensis* (г) с пробами 45S рДНК (зеленый) и 5S рДНК (красный). Шкала – 5 мкм.

Ранее было установлено, что основным числом хромосом для видов рода *Calendula* является 7 (*C. stellata*, $2n = 14$), 8 (*C. officinalis* и большинство многолетних таксонов Северной Африки и Юго-Западной Европы, $2n = 32$), 9 (некоторые таксоны многолетних растений Северной Африки, $2n = 18$), 11 (*C. arvensis*, $2n = 44$) и 15 (*C. tripterocarpa*, $2n = 30$) (Nordenstam, Källersjö, 2009). Результаты нашего исследования хромосом в кариотипах видовых образцов календулы подтвердили эти данные.

Наше исследование выявило высокое сходство рисунков распределения основных кластеров рибосомных генов в кариотипах видов календулы: *C. officinalis* и *C. stellata*. При этом обнаружена как межвидовая вариабельность, так и внутривидовой полиморфизм по локализации молекулярных маркеров хромосом. В кариотипе *C. officinalis* выявлен дополнительный полиморфный минорный сигнал гибридизации 45S рДНК, который располагался медианно в коротком плече одной хромосомы. Ранее также был выявлен внутривидовой полиморфизм распределения минорных сайтов 45S рДНК на хромосомах в кариотипе *C. officinalis* (Samatadze et al., 2019).

Существует несколько гипотез относительно плоидности календулы и происхождения видов календулы. Одна из гипотез предполагает, что вид *C. arvensis* является тетраплоидным гибридом двух таксонов с числом хромосом 15 и 7 (Heyn et al., 1974). В нашем исследовании рисунок распределения основных сайтов рибосомных генов у видовых образцов *C. stellata* ($2n = 2x = 14$) и *C. tripterocarpa* ($2n = 2x = 30$) свидетельствует в пользу гибридного происхождения *C. arvensis* ($2n = 4x = 44$) в результате возможной, возникшей в процессе эволюции, интрогрессивной гибридизации.

Вместе с тем, чтобы окончательно прояснить филогенетические взаимоотношения внутри сложного рода *Calendula*, необходимо продолжить изучение хромосомной организации геномов этих и других видов календулы по комплексу молекулярно-цитогенетических маркеров. Использование такого подхода позволит не только проводить идентификацию хромосом, сравнивать родственные геномы, но и выявлять взаимосвязи хромосомных маркеров с генетическими особенностями и условиями выращивания изучаемых образцов, что особенно перспективно для проведения направленной селекции при создании новых высокопродуктивных сортов лекарственных растений.

Благодарности. Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда в рамках проекта № 22-26-00221.

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.
- Муравенко О. В., Зеленин А. В.** Исследование хромосомной организации геномов мелкохромосомных растений // Генетика, 2009. – Т. 45. – С. 1516–1529.
- Саматадзе Т. Е., Юркевич О. Ю., Хазиева Ф. М., Морозов А. И., Зошук В. А., Большева Н. Л., Амосова А. В., Муравенко О. В.** Биоморфологические и цитогенетические изменения в *Calendula officinalis* L. после химического мутагенеза // Turczaninowia, 2020. – Vol. 23. № 1. – P. 13–23. DOI: 10.14258/turczaninowia.23.1.2.
- Bremer K.** Asteraceae: cladistics and classification. – Portland: Timber Press, 1994. – P. 752.
- Cruceriu D., Balacescu O., Rakosy E.** *Calendula officinalis*: Potential roles in cancer treatment and palliative care // Integrative Cancer Therapies, 2018. – Vol. 17. – P. 1068–1078.
- Haensel R., Sticher O.** Pharmakognosie-Phytopharmazie. 8., Uebersarbeitete und aktualisierte Auflage. – Heidelberg: Springer, 2007. – S. 1151–1155.
- Heyn C. C., Dagan O., Nachman B.** The annual *Calendula* species: taxonomy and relationships // Israel Journal Botany, 1974. – Vol. 23. – P. 169–201.
- Heyn C. C., Joel A.** Reproductive relationships between annual species of *Calendula* (Compositae) // Plant Systematics and Evolution, 1983. – Vol. 143. – P. 311–329.
- Hiller K., Melzig M. F.** Lexikon der Heilpflanzen und Drogen, 2. Auflage. – Heidelberg, Spektrum, Akademischer Verlag, 2010. – S. 106–107.
- Khouchlaa A., Baaboua A. E., Mouddeh H. E., Lakhdar F., Bakrim S., Menyiy N. E., Belmehdi O. et al.** Traditional Uses, Bioactive Compounds, and Pharmacological Investigations of *Calendula arvensis* L.: A Comprehensive Review // Advances in Pharmacological and Pharmaceutical Sciences, 2023. – ID 2482544.
- Kron P., Suda J., Husband B. C.** Applications of flow cytometry to evolutionary and population biology // Annual Review Ecology, Evolution, and Systematics, 2007. – Vol. 38. – P. 847–876.
- Mallick P. K.** Karyomorphology, Meiotic Behaviours and Pollen Fertility of *Calendula officinalis* L. (Calenduleae-Asteraceae) // International Journal of Applied Sciences and Biotechnology, 2001. – Vol. 9. – P. 75–79. DOI: 10.3126/ijasbt.v9i1.36011
- Nora S., Castro S., Loureiro J., Gonçalves A. C., Oliveira H., Castro M., Santos C., Silveira P.** Flow cytometric and karyological analyses of *Calendula* species from Iberian Peninsula // Plant Systematics and Evolution, 2013. – Vol. 299. – P. 853–864. DOI: 10.1007/s00606-013-0767-0
- Nordenstam B., Kallersjö M.** Calenduleae // Systematics. Evolution and biogeography of the Compositae / V. A. Funk, A. Susanna, T. Stuessy, R. B. Bayer (eds.). – International Association for Plant Taxonomy (IAPT), 2009. – P. 527.

Norlindh T. Calenduleae- Systematic review, chap 34. // The biology and chemistry of the Compositae / V. H. Heywood, J. B. Harborne, B. L. Turner (eds.). – London: Academic Press, 1977. – P. 961–987.

Samatadze T. E., Zoshchuk S. A., Hazieva F. M., Yurkevich O. Yu., Svistunova N. Yu., Morozov A. I., Amosova A. V., Muravenko O. V. Phenotypic and molecular cytogenetic variability in calendula (*Calendula officinalis* L.) cultivars and mutant lines obtained via chemical mutagenesis // Scientific Reports, 2019. DOI: 10.1038/s41598-019-45738-3

Schwarzacher T., Leitch A. R., Heslop-Harrison J. S. DNA: DNA in situ hybridization and methods for light microscopy // Plant cell biology: a practical approach / N. Harris, K. J. Oparka (eds.). – Oxford: Oxford University Press, 1994. – P. 127–155.

Soliman M. I., Rizk R. M. H., Rizk R. M. A. The impact of seed polymorphism of plant genetic resources on the collection strategy of gene banks // Global Journal of Biotechnology and Biochemistry, 2008. – Vol. 3. – P. 47–55.

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.) // Frontiers in Plant Science, 2017. – Vol. 8. – P. 1467. DOI: 10.3389/fpls.2017.01467