



УДК 582.998.4:58.009+57.575:575.174.015.3

Хромосомный полиморфизм *Calendula officinalis* по молекулярно-цитогенетическим маркерам

Т. Е. Саматадзе^{1,4}(†), О. Ю. Юркевич^{1,5}, Ф. М. Хазиева^{2,6}, С. Н. Суслина^{3,7}, О. М. Савченко^{2,8},
И. В. Басалаева^{2,9}, А. И. Морозов^{2,10}, А. В. Амосова^{1,11}, О. В. Муравенко^{1,12*}

¹ Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН, ул. Вавилова, д. 32, г. Москва, 119991, Россия

² ФГБНУ Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений, ул. Грина, д. 7, г. Москва, 117216, Россия

³ Российский университет дружбы народов, ул. Миклухо-Маклая, д. 6, г. Москва, 117198, Россия

⁴ ORCID iD: <http://orcid.org/0000-0002-1012-3560>

⁵ E-mail: olikys@gmail.com; ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0003-4124-2367>

⁶ E-mail: vilar.6@yandex.ru; ORCID iD: <http://orcid.org/0000-0003-4454-0773>

⁷ E-mail: suslina-sn@rudn.ru; ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0002-7333-2263>

⁸ E-mail: nordfenugreek@gmail.com; ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0001-8756-6098>

⁹ E-mail: basalaeva4.i@yandex.ru; ORCID iD: <http://orcid.org/0000-0001-8243-3026>

¹⁰ E-mail: vilaragro@mail.ru; ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0002-4293-8457>

¹¹ E-mail: amomar@mail.ru; ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0002-5208-6702>

¹² E-mail: olgmur1@yandex.ru; ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0003-3150-8598>

* Автор для переписки

Ключевые слова: внутривидовая изменчивость, календула, кариотип, хромосомные маркеры, C/DAPI-дифференциальное окрашивание, FISH, 45S рДНК и 5S рДНК.

Аннотация. В кариотипах *Calendula officinalis* L. (Asteraceae) ($2n = 32$) из различных эколого-географических мест произрастания изучен внутривидовой полиморфизм по рисункам локализации на хромосомах молекулярно-цитогенетических маркеров: C/DAPI-бэндов и кластеров 45S и 5S рДНК. У всех образцов календулы в проксимально-медианных районах хромосом обнаружены вариабельные C/DAPI-бэнды. FISH с зондами рибосомных генов выявил сходную локализацию на хромосомах основных кластеров 45S и 5S рДНК: кластеры 45S рДНК на хромосомах 1 и 9, а также кластер 5S рДНК на длинном плече хромосомы 10. Дополнительно в кариотипах образцов календулы из Крыма и Беларуси обнаружены минорные сайты 45S рДНК. Выявлена внутривидовая изменчивость по числу и локализации минорных сайтов 45S рДНК на хромосомах *C. officinalis* из различных мест произрастания.

Chromosomal polymorphism of *Calendula officinalis* revealed by molecular cytogenetic markers

T. E. Samatadze¹(†), O. Yu. Yurkevich¹, F. M. Khazieva², S. N. Syslina³, O. M. Savchenko²,
I. V. Basalaeva², A. I. Morozov², A. V. Amosova¹, O. V. Muravenko¹

¹ Engelhardt Institute of Molecular Biology RAS, Vavilova St., 32, Moscow, 119991, Russian Federation

² All-Russian Institute of Medicinal and Aromatic Plants, Green St., 7, Moscow, 117216, Russian Federation

³ Peoples' Friendship University of Russia named after Patrice Lumumba, Miklukho-Maklaya St., 6, Moscow, 117198, Russian Federation

Keywords: *Calendula*, C/DAPI-banding, chromosome markers, FISH, intraspecific chromosome variability, karyotype, 45S rDNA and 5S rDNA.

Summary. In karyotypes of *Calendula officinalis* L. (Asteraceae) ($2n = 32$) from various ecological and geographical places of growth, intraspecific polymorphism was studied based on patterns of chromosomal localization of molecular cytogenetic markers: C/DAPI bands and also 45S and 5S rDNA clusters. In all calendula samples, variable C/DAPI bands were found in the proximal-median regions of chromosomes. FISH revealed similar localization on chromosomes of the main 45S and 5S rDNA clusters: 45S rDNA clusters were localized on chromosomes 1 and 9, and 5S rDNA cluster was detected on the long arm of chromosome 10. Additionally, minor sites of 45S rDNA were identified in the karyotypes of calendula samples from Crimea and Belarus. Intraspecific variability in number and location of the minor 45S rDNA sites was revealed on chromosomes of *C. officinalis* plants from different places of growth.

Введение

Calendula L. – род травянистых растений и полукустарников сем. Астровые (Asteraceae), распространенных преимущественно в Средиземноморье, Иране, Центральной Европе, Африке и Азии, включающий от 25 до 27 видов (Ао, 2007). В настоящее время различные виды календулы используются как в традиционной, так и в народной медицине (Haensel, Sticher, 2007). В сырье календулы лекарственной (*Calendula officinalis* L.) содержатся тритерпеновые сапонины 2–10 % (гликозиды олеаноловой кислоты), тритерпеновые спирты (ψ-таракастерол, таракастерол, фарадиол, арнидиол, гелиантриол) и стероиды (Копова, Рыбалко, 1990). Некоторые виды календулы были протестированы на их противоопухолевый и проапоптотический эффекты, и были получены обнадеживающие результаты (Cruceriu et al., 2018; Khouchlaa et al., 2023). Широкий спектр биологически-активных соединений календулы открывает перспективы для разработки новых современных лекарственных препаратов. Это требует глубокого и разностороннего изучения генетических особенностей и геномов лекарственных видов календулы, в первую очередь, календулы лекарственной в связи с ее широким применением в фармацевти-

ческой, медицинской, пищевой промышленности и в косметологии (Khalid, Silva, 2012).

Исследование хромосом у видов рода *Calendula* осуществлялось, как правило, с использованием монокромного окрашивания (Darlington, Wylie, 1955; Meusel, Ohle, 1966; Norlindh, 1977; Heyn, Joel, 1983; Vogt, Oberprieler, 2008; Baciu et al., 2013; Fallahi et al., 2020). Установлено, что род *Calendula* отличается широким диапазоном чисел хромосом: от $2n = 14$ до $2n \sim 85$. Такой широкий размах чисел хромосом внутри рода связывают со спонтанной гибридизацией между видами с последующей дупликацией их геномов (Lanza, 1919; Heyn et al., 1974; Heyn, Joel, 1983; Gonçalves et al., 2023a). *Calendula officinalis* L. в основном описывается как тетраплоид, кариотип которого представлен 32 хромосомами ($2n = 4x = 32$) (Murín, 1997; Probatova et al., 2001; Chen, et al., 2003). По другим данным, кариотип этого вида может содержать $2n = 28$ (Garcia et al., 2010; Rice et al., 2015; Mallick, 2021). FISH-анализ показал, что на хромосомах *C. officinalis* ($2n = 28$) локализовано четыре сайта 45S рДНК и два сайта 5S рДНК (Garcia et al., 2010). Другие исследователи выявили аналогичное число кластеров рибосомных генов и в кариотипе *C. officinalis* с $2n = 32$ (Esmaeili et al., 2020). Сравнительно недавно проведено кариогеномное исследование отече-

ственных сортов и мутантных форм *C. officinalis* (Samatadze et al., 2019). Показано, что кластеры 45S рДНК и 5S рДНК являются эффективными молекулярными маркерами, позволяющими проводить идентификацию хромосом *C. officinalis* (Samatadze et al., 2019). Однако до настоящего времени внутривидовая изменчивость хромосом *C. officinalis* практически не исследована.

Целью настоящей работы стало изучение внутривидового хромосомного полиморфизма по рисункам C/DAPI-бэндов и локализации сайтов 45S рДНК и 5S рДНК на хромосомах в кариотипах образцов *C. officinalis* из различных мест произрастания.

Материалы и методы

Материалом для исследования послужили образцы *C. officinalis* из четырех мест произрастания, полученные из коллекции семян Отдела агробиологии ВИЛАР (г. Москва):

K214/102, Республика Крым, Никитский ботанический сад (г. Ялта);

K500-147, Ботанический сад НАН Беларуси (г. Минск);

K304-221, Ботанический сад (г. Ярославль);

K27-2291, фармакопейный участок Ботанического сада ВИЛАР (г. Москва).

Приготовление хромосомных препаратов и флуоресцентную гибридизацию *in situ* (FISH) проводили согласно описанным ранее методикам (Muravenko, Zelenin, 2009; Samatadze et al., 2018). Анализ хромосомного полиморфизма у растений методом FISH проводили, используя пробы 45S рДНК (pTa71) и 5S рДНК (pTa794) (Gerlach, Bedbrook, 1979; Gerlach, Dyer, 1980), которые метили с помощью наборов для метки ДНК флуорохромами SpectrumAqua и SpectrumRed (Abbott Molecular, Wiesbaden, Германия). Процедуру FISH осуществляли по ранее описанной методике (Samatadze et al., 2019).

После процедуры FISH хромосомы окрашивали 0,1 мкг/мл DAPI (4',6-диамидино-2-фенилиндо́л) (Serva, Heidelberg, Германия), растворенным в среде Vectashield (Vector laboratories, Peterborough, Великобритания). Это позволило получить C/DAPI-дифференциальную окраску метафазных хромосом.

Анализ хромосомных препаратов проводили с помощью флуоресцентного микроскопа Olympus BX61 (Olympus, Токио, Япония), сопряженного с черно-белой ПЗС-камерой Cool Snap (Roper Scientific, Трентон, США). Для каждого

образца *C. officinalis* анализировали не меньше 10 растений, по 10–20 метафазных пластинок на растение. Полученные изображения хромосомных пластинок обрабатывали, используя программу Adobe Photoshop 10.0 (Adobe, Сан-Хосе, США).

Результаты

В кариотипах всех изучаемых образцов календулы содержатся в основном субметацентрические хромосомы ($2n = 32$), размер которых колеблется от 3,5 до 5,0 мкм. Кариотипы исследованных растений характеризуются наличием двух спутничных пар хромосом (1 и 9) (рис. 1). Идентификацию хромосом в кариотипах изученных образцов *C. officinalis* проводили в соответствии с разработанной ранее классификацией (Samatadze et al., 2019).

У всех изученных образцов *C. officinalis* хромосомы имели сходные рисунки распределения C/DAPI-бэндов мелких и средних размеров, которые были локализованы в основном в проксимально-дистальных районах (рис. 2, 3). Сравнительный визуальный анализ рисунков C/DAPI-бэндинга на метафазных хромосомах изученных образцов показал их сходство с ранее выявленными рисунками C/DAPI-дифференциального окрашивания хромосом в кариотипах отечественных сортов календулы «Райский сад» и «Золотое море» (Samatadze et al., 2019). Субтеломерные, интеркалярные и прилегающие к вторичным перетяжкам C/DAPI-бэнды были более полиморфными. В кариотипе календулы из Крыма на спутниках хромосом 1 и 9 располагались крупные C/DAPI-бэнды (рис. 3г).

У всех изучаемых образцов *C. officinalis* FISH-анализ выявил кластеры 45S рДНК на спутничных хромосомах 1 и 9 на вторичных перетяжках и в прилегающих районах, а также сайты 5S рДНК на длинном плече хромосомы 10 (рис. 2, 3). В кариотипах образцов календулы из Крыма и Беларуси обнаружены минорные сайты 45S рДНК, расположенные медианно в коротком плече хромосомы 5. В кариотипе календулы из Крыма на хромосоме 10 наблюдалась ко-локализация сайта 5S рДНК с минорным локусом 45S рДНК (рис. 3). Гетероморфизм гомологов пары хромосом 10 по ко-локализации минорного локуса 45S рДНК с сайтом 5S рДНК был отмечен нами у сорта «Золотое море» (Samatadze et al., 2019). У других изученных образцов на

этой хромосоме минорные сайты 45S рДНК отсутствовали (рис. 3).

Обсуждение

Для *C. officinalis*, как и для многих видов рода *Calendula*, выявлено значительное разнообразие морфологических признаков (Heyn, Joel, 1983; Gonçalves et al., 2023a). У этого вида календулы ярко выражена гетерокарпичность семян (разнокачественность) (Heyn, Joel, 1983; Gonçalves et al., 2023b), варибельность окраски цветков, их количества и рядов семян в соцветии (Kostylev et al., 2011; Khazieva et al., 2023). Кроме того, у календулы лекарственной наблюдается варибельность химического состава сырья в зависимости от количества язычковых цветков и окраски соцветия (Khalid, Silva, 2012), а также от места произрастания растений в различных эколого-географических районах (Shorin, Kriklivaya, 2013; Voronin et al., 2021). Исследование генетической изменчивости у видов рода *Calendula* с помощью молекулярных маркеров RAPD выявило высокий уровень полиморфизма исследуемых генотипов *C. officinalis* (Baciu et al., 2013). Вместе с тем внутривидовой хромосомный полиморфизм *C. officinalis* изучен недостаточно. Несмотря на обнаруженные ранее два разных числа хромосом в кариотипе этого вида, у изученных нами образцов календулы по числу хромосом различий не наблюдалось (Murín, 1997; Probatova et al., 2001; Chen, et al., 2003; Garcia et al., 2010; Rice et al., 2015; Esmaeili et al., 2020; Mallick, 2021).

Ранее установлено, что размеры метафазных хромосом календулы лекарственной варьируют от 0,4 до 2,6 мкм (Mallick, 2021). Наши исследования показали, что после предобработки интеркалятором ДНК, замедляющим конденсацию хромосом в митозе, в кариотипе изученных образцов и сортов календулы лекарственной размеры хромосом возрастают до 3,5–5,0 мкм (Samatadze et al., 2019). Как правило, у мелкохромосомных видов цветковых растений гетерохроматин локализуется большей частью в проксимально-медианных и реже – в медиано-дистальных районах хромосом (Muravenko et al., 2009; Yurkevich et al., 2013; Samatadze et al., 2018). У изученных образцов на недоконденсированных хромосомах C/DAPI-бэнды выявляются практически во всех районах хромосомных плеч, как и у сортов *C. officinalis* (Samatadze et al., 2019). Известно, что полиморфизм гетерохроматических районов хромосом вносит суще-

ственный вклад в структурно-функциональные особенности геномов и механизмы их адаптации (Prokofieva-Belgovskaya, 1986). Популяции растений с разным содержанием биологически активных веществ могут иметь в кариотипах разные полиморфные варианты гетерохроматических районов хромосом (Pierozzi, 2001; Penas, 2008; Samatadze et al., 2012, 2018). Также описана зависимость полиморфизма гетерохроматических районов хромосом от условий произрастания популяций растений (Chuksanova, 1971; Samatadze et al., 2001; Rachinskaya, 2011).

Сравнительный визуальный анализ рисунков C/DAPI-бэндинга, выявленных на хромосомах изученных образцов, показал их значительное сходство как между собой, так и с рисунками C/DAPI-дифференциального окрашивания хромосом отечественных сортов календулы «Райский сад» и «Золотое море» (Samatadze et al., 2019). При этом рисунки C/DAPI-бэндинга с учетом морфологии хромосом позволили определить гомологичные пары в кариотипах изученных образцов календулы в соответствии с разработанной ранее классификацией (Samatadze et al., 2019). Вместе с тем в кариотипах изучаемых образцов календулы наибольшая варибельность размеров C/DAPI-бэндов выявлена в районах, прилегающих к вторичной перетяжке или спутничной нити, где также были картированы основные кластеры 45S рДНК. Полагают, что полиморфизм этих районов хромосом связан с изменчивостью числа рибосомных генов и их различной функциональной активностью (Mukai et al., 1991; Muravenko et al., 1991, 2009; Zoldos et al., 1999; Samatadze et al., 2012).

У высших растений консервативные семейства рибосомных генов представлены сотнями и тысячами копий в одном или более кластерах, на одной или нескольких хромосомных парах (Guerra, 2000; Badaeva, Salina, 2013). Расположение кластеров рДНК на хромосомах часто используют в качестве молекулярных маркеров для идентификации хромосом, геномов, видовой принадлежности и выявления филогенетических связей между видами (Yurkevich, 2013; Samatadze et al., 2019; Amosova et al., 2022; Muravenko et al., 2022). У *C. officinalis* обнаружено консервативное расположение основных сайтов 45S и 5S рДНК как в кариотипах образцов из разных популяций, так и у сортов, изученных ранее (Samatadze et al., 2019), что позволило использовать эти молекулярные маркеры для более точной идентификации хромосом.

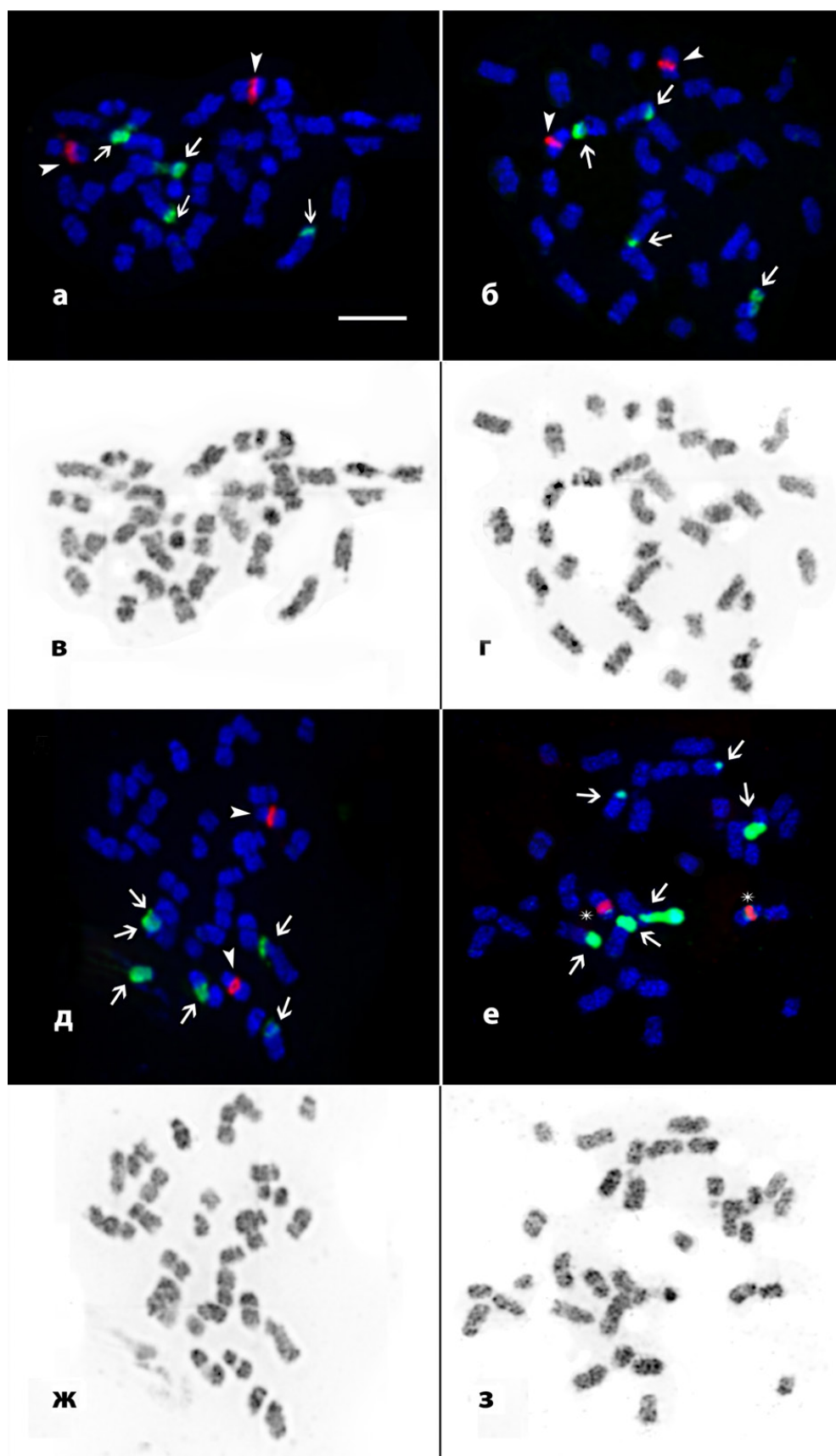


Рис. 1. Метафазные пластинки образцов *Calendula officinalis* ($2n = 32$) из различных мест произрастания. FISH с пробами 45S рДНК (зеленый) и 5S рДНК (красный): а – К304-221; б – К 27-2291; д – К500-147; е – К214/102 и C/DAPI-бэндинг (инвертирование изображение) этих же пластинок: в, г, ж, з. Стрелками показаны спутничные хромосомы, головками стрелок – хромосомы, несущие сайты 5S рДНК генов, звездочкой – ко-локализация 45S рДНК и 5S рДНК. Масштабная линейка – 5 мкм.

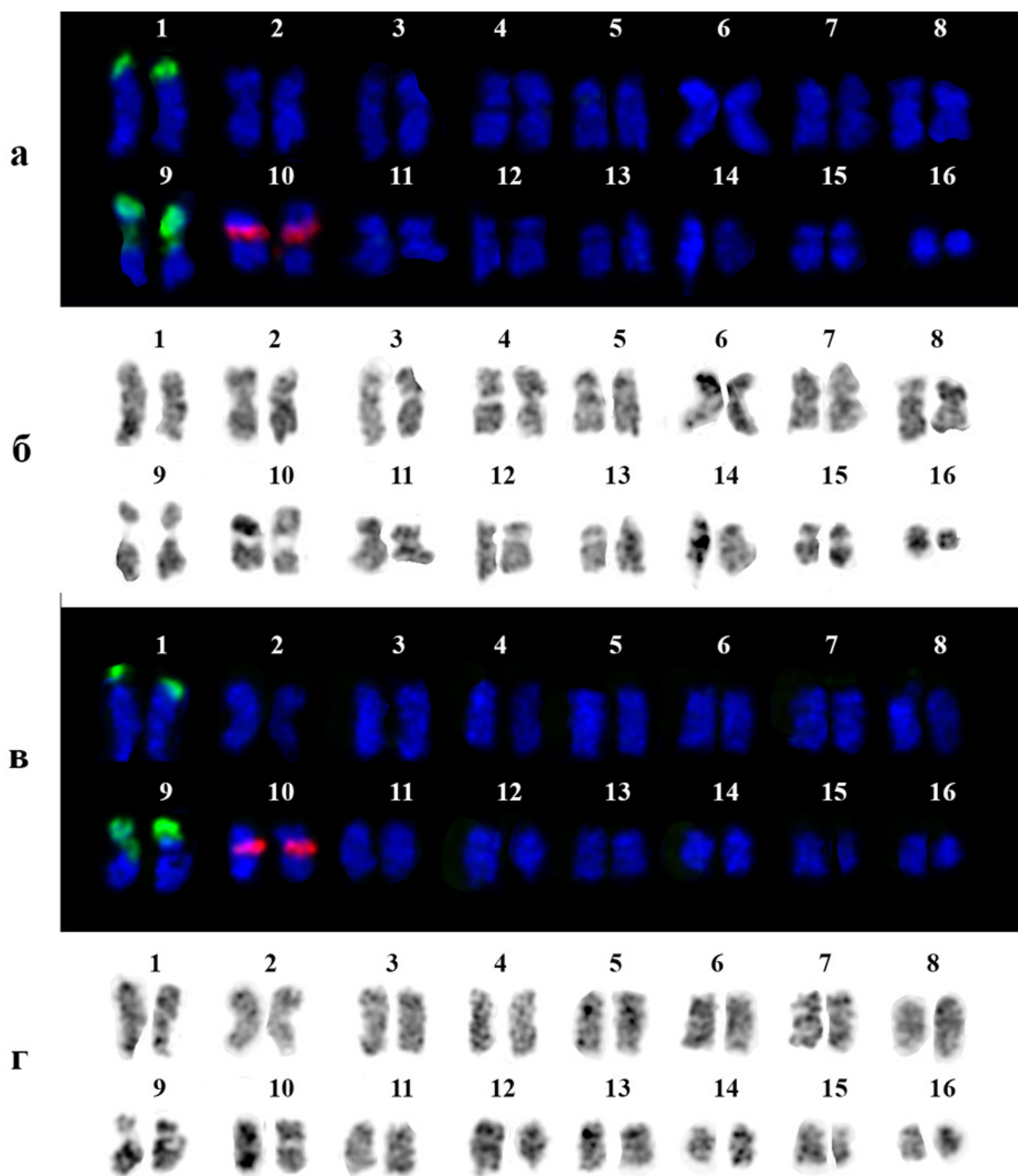


Рис. 2. Кариотипы образцов *Calendula officinalis*: а, б – К304-221; в, г – К27-2291. FISH с пробами 45S рДНК (зеленый), 5S рДНК (красный) и C/DAPI-бэндинг (инвертирование изображение) метафазных хромосом.

Мобильность рДНК – достаточно распространенное явление в геноме растений. Высокая скорость рекомбинации в терминальной области хромосом и активность мобильных элементов способствуют изменению количества сайтов рДНК в этом районе (Schubert, Wobus, 1985; Raskina et al., 2004; Roa, Guerra, 2012; Denisenko,

2022). Для некоторых видов растений выявлена высокая вариабельность числа локусов 45S рДНК: *Phaseolus vulgaris* L., *Atropa belladonna* L., *Macleaya cordata* (Willd.) R. Br., некоторых видов *Gossypium* L., *Hedysarum neglectum* Ledeb. (Pedrosa-Harand et al., 2006; Samatadze et al., 2012; Gan et al., 2013; Volkov et al., 2017; Yurkevich et al., 2019).

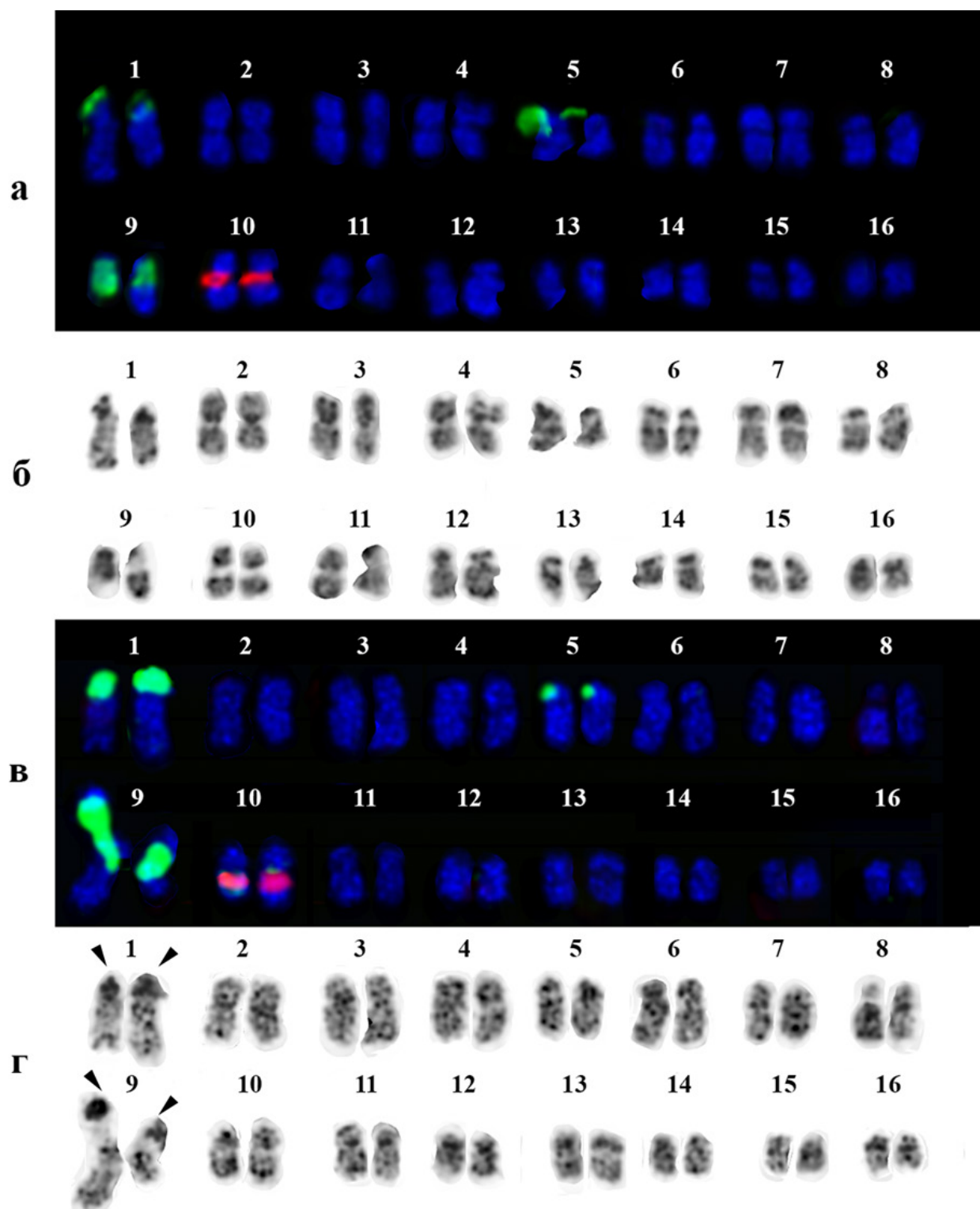


Рис. 3. Кариотипы образцов *Calendula officinalis*: а, б – K500-147; в, г – K214/102. FISH с пробами 45S рДНК (зеленый), 5S рДНК (красный) и C/DAPI-бэндинг (инвертированное изображение) метафазных хромосом. Стрелками показаны C/DAPI-бэнды спутничных хромосом.

Также показано различное число сайтов рДНК в кариотипах у сортов озимого и ярового рапса, адаптированных к определенным эколого-географическим зонам (Amosova et al., 2014). При

этом не обнаружено прямой зависимости между средой обитания, морфологией цветков, системой размножения и филогенетическим положением вида, а также количеством сайтов рДНК

(Rosato et al., 2017). Вариации числа сайтов рДНК связывают и с межвидовой гибридизацией на границах ареалов видов (Rosato et al., 2017; Yurkevich et al., 2019). В нашем исследовании у двух образцов календулы из Крыма и Беларуси обнаружены дополнительные минорные сайты 45S рДНК на хромосоме 5, что демонстрирует наличие внутривидовой вариабельности числа сайтов 45S рДНК в кариотипе *C. officinalis*. Ранее показано, что у некоторых видов растений сем. Asteraceae обнаружена ко-локализация кластеров 5S и 26S рДНК на хромосомах (Garcia et al., 2010; Abd El-Twab, Kondo, 2012; Samatadze et al., 2019; Esmaeili et al., 2020). Ко-локализация 5S и 45S рДНК на хромосоме 10 в кариотипах у образца из Крыма и ранее изученного сорта «Золотое море» (Samatadze et al., 2019) демонстрирует, что и *C. officinalis* можно отнести к таким видам.

Таким образом, сравнительный хромосомный анализ кариотипов образцов *C. officinalis*

($2n = 32$) из разных мест произрастания выявил внутривидовую вариабельность рисунков C/DAPI-дифференциального окрашивания и локализации 45S и 5S рДНК. Полученные результаты могут указывать на адаптивные возможности генома *C. officinalis* к изменяющимся эколого-географическим условиям произрастания. Результаты исследования могут быть использованы для изучения хромосомной изменчивости в геномах различных ценных лекарственных видов растений, а также в селекционных программах при выведении сортов растений, адаптированных к определенным климатическим зонам, что позволит в дальнейшем решать вопросы по сохранению их растительных ресурсов и обеспечению сырьем фармацевтической промышленности.

Благодарности

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ № 24-26-00187.

REFERENCES / ЛИТЕРАТУРА

- Abd El-Twab M. H., Kondo K. 2012. Physical mapping of 5S and 45S rDNA in *Chrysanthemum* and related genera of the Anthemideae by FISH, and species relationships. *J. Genet.* 91: 245–249.
- Amosova A. V., Yurkevich O. Yu., Bolsheva N. L., Samatadze T. E., Zoshchuk S. A., Muravenko O. V. 2022. Repeatome analyses and satellite DNA chromosome patterns in *Deschampsia sukatschewii*, *D. cespitosa*, and *D. antarctica* (Poaceae). *Genes* 13(5): 762. <https://doi.org/10.3390/genes13050762>
- Amosova A. V., Zemtsova L. V., Grushetskaya Z. E., Samatadze T. E., Mozgova G. V., Pilyuk Y. E., Volovik V. T., Melnikova N. V., Zelenin A. V., Lemesh V. A., Muravenko O. V. 2014. Intraspecific chromosomal and genetic polymorphism in *Brassica napus* L. detected by cytogenetic and molecular markers. *J. Genet.* 93: 133–143.
- Ao C. 2007. Comparative anatomy of bisexual and female florets, embryology in *Calendula officinalis* (Asteraceae), a naturalized horticultural plant. *Sci. Hortic.* 114: 214–219. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2007.06.019>
- Baciu A.-D., Pamfil D., Mihalte L., Sestras A. F., Sestras R. E. 2013. Phenotypic variation and genetic diversity of *Calendula officinalis* (L.). *Bulg. J. Agri. Sci.* 19(1): 143–151.
- Badaeva E. D., Salina E. A. 2013. Genome structure and chromosome analysis of plants. *Vavilov Journal of Genetics and Breeding* 17(4/2): 1017–1043. [In Russian] (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).
- Chen R. Y., Song W. Q., Li X. L., Li M. X., Liang G. L., Chen C. B. 2003. *Chromosome atlas of major economic plants genome in China*. Vol. 3. Beijing, China: Science Press. 809 pp.
- Chuksanova N. A. 1971. Heterochromatin in the evolution of plant chromosomes. *Cytology* 13(6): 776–783. [In Russian] (Чуксанова Н. А. Гетерохроматин в эволюции хромосом растений // Цитология, 1971. Т. 13, № 6. С. 776–783).
- Cruceriu D., Balacescu O., Rakosy E. 2018. *Calendula officinalis*: Potential roles in cancer treatment and palliative care. *Integr. Cancer Ther.* 17(4): 1068–1078. <https://doi.org/10.1177/1534735418803766>
- Darlington C. D., Wylie A. P. 1955. *Chromosome atlas of flowering plants*. New York, USA: The Macmillan Company. 519 pp.
- Denisenko O. 2022. Epigenetika genov ribosomnykh RNK. *Epigenetics of ribosomal RNA genes*. [Advances in biological chemistry] 62: 225–241. [In Russian] (Денисенко О. Эпигенетика генов рибосомных РНК // Успехи биологической химии, 2022. Т. 62. С. 225–241).
- Esmaeili G., Laere K. V., Muylle H., Leus L. 2020. Artificial chromosome doubling in allotetraploid *Calendula officinalis*. *Front. Plant Sci.* 11: 622. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00622>
- Fallahi M., Mohammadi A., Miri S. M. 2020. The natural variation in six populations of *Calendula officinalis* L.: A karyotype study. *J. Genet. Resour.* 6(1): 34–40. <https://doi.org/10.22080/jgr.2020.2541>

- Gan Y., Liu F., Chen D., Wu Q., Qin Q., Wang C., et al.** 2013. Chromosomal locations of 5S and 45S rDNA in *Gossypium* genus and its phylogenetic implications revealed by FISH. *PLoS ONE* 8(6): e68207. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068207>
- Garcia S., Panero J. L., Siroky J., Kovarik A.** 2010. Repeated reunions and splits feature the highly dynamic evolution of 5S and 35S ribosomal RNA genes (rDNA) in the Asteraceae family. *BMC Plant Biology* 10: 176.
- Gerlach W. L., Bedbrook J. R.** 1979. Cloning and characterization of ribosomal RNA genes from wheat and barley. *Nucleic Acids Res.* 7: 1869–1885.
- Gerlach W. L., Dyer T. A.** 1980. Sequence organization of the repeating units in the nucleus of wheat which contain 5S rRNA genes. *Nucleic Acids Res.* 8: 4851–4855.
- Gonçalves A. C., Ouhammoud A., Amirouche R., Santos C., Figueiredo E., Silveira P.** 2023a. A taxonomic revision of *Calendula* (Asteraceae) in Morocco, including some taxa from Algeria and Tunisia. *Phytotaxa* 605(1): 1–83. <https://doi.org/10.11646/PHYTOTAXA.605.1>
- Gonçalves A. C., Oliveira H., Loureiro J., Castro S., Fidalgo M. E., Riberiro T., Ouhammoud A., Amirouche R., Morais-Cecilio L., Paulo C. S.** 2023b. Contribution to the knowledge of genome size variation in *Calendula* L. (Asteraceae) with special focus on the SW Mediterranean region. *Plant Biosystems* 157: 312–324. <https://doi.org/10.1080/11263504.2023.2165551>
- Guerra M.** 2000. Patterns of heterochromatin distribution in plant chromosomes. *Gen. Mol. Biol.* 23: 1029–1041.
- Haensel R., Sticher O.** 2007. *Pharmakognosie-Phytopharmazie*. 8. Ueberarbeitete und aktualisierte Auflage. Heidelberg: Springer. 1570 s.
- Heyn C. C., Dagan O., Nachman B.** 1974. The annual *Calendula* species: taxonomy and relationships. *Israel J. Bot.* 23: 1201–1969.
- Heyn C. C., Joel A.** 1983. Reproductive relationships between annual species of *Calendula* (Compositae). *Plant Syst. Evol.* 143: 311–329.
- Khalid A. K., Silva J. A.** 2012. Biology of *Calendula officinalis* Linn. Focus on pharmacology, biological activities and agronomic practices. *Med. Aromat. Plant Sci. Biotech.* 6: 12–27.
- Khazieva F. M., Samatadze T. E., Korotkih I. N.** 2023. *Nogotki lekarstvennyye [Pot marigold]*. Moscow: Nauka. 141 pp. [In Russian] (**Хазиева Ф. М., Саматадзе Т. Е., Коротких И. Н.** Ноготки лекарственные. М.: Наука, 2023. 141 с.).
- Khouchlaa A., Baaboua A. E., Moudden H. E., Lakhdar F., Bakrim S., El Menyiy N. et al.** 2023. Traditional uses, bioactive compounds, and pharmacological investigations of *Calendula arvensis* L.: A comprehensive review. *ADV Pharmacol. Pharm. Sci.* <https://doi.org/10.1155/2023/2482544>
- Konovalova O. A., Rybalko A. S.** 1990. Biologically active products of *Calendula officinalis*. *Rastitelnyye Resursy [Vegetation Resources]* 3: 448–463. [In Russian] (**Коновалова О. А., Рыбалко А. С.** Биологически активные вещества *Calendula officinalis* // Растительные ресурсы, 1990. № 3. С. 448–463).
- Kostylev D. A., Ismagilov R. R., Timofeeva O. V.** 2011. Seed material of *Calendula officinalis* in the Cis-Urals. *Agrarian Bulletin of the Urals* 1(80): 9–10. [In Russian] (**Костылев Д. А., Исмагилов Р. Р., Тимофеева О. В.** Семенной материал календулы лекарственной в Предуралье // Аграрный вестник Урала, 2011. № 1(80). С. 9–10).
- Lanza D.** 1919. *Monografia del genere Calendula L.* Palermo: Scuola Tip. Boccone del Povero. 166 pp.
- Las Penas M. L., Bernardello G., Kiesling R.** 2008. Karyotypes and fluorescent chromosome banding in *Pyrrhocactus* (Cactaceae). *Plant Syst. Evol.* 272: 211–222.
- Mallick P. K.** 2021. Karyomorphology, meiotic behaviours and pollen fertility of *Calendula officinalis* L. (*Calenduleae* – Asteraceae). *Int. J. Appl. Sci. Biotechnol.* 9: 75–79. <https://doi.org/10.3126/ijasbt.v9i1.36011>
- Meusel H., Ohle H.** 1966. Zur taxonomie und cytologie der gattung *Calendula*. *Österr. Bot. Zeitsch.* 113: 191–210.
- Mukai Y., Endo T. R., Gill B. S.** 1991. Physical mapping of the 18S–26S rRNA multigene family in common wheat: identification of a new locus. *Chromosoma* 100: 71–78.
- Muravenko O. V., Badaev N. S., Borisov Yu. M., Borisova Z. Z., Surin N. A., Zelenin A. V.** 1991. Karyotype formation in related varieties of barley. *Russ. J. Genet.* 27: 2109–2118. [In Russian] (**Муравенко О. В., Бадаев Н. С., Борисов Ю. М., Борисова З. З., Сурин Н. А., Зеленин А. В.** Формирование кариотипа у родственных сортов ячменя // Генетика, 1991. № 27. С. 2109–2118).
- Muravenko O. V., Yurkevich O. Yu., Bolsheva N. L., Samatadze T. E., Nosova I. V., Zelenina D. A., Volkov A. A., Popov K. V., Zelenin A. V.** 2009. Comparison of genomes of eight species of sections *Linum* and *Adenolinum* from the genus *Linum* based on chromosome banding, molecular markers and RAPD analysis. *Genetica* 135(2): 245–255.
- Muravenko O. V., Yurkevich O. Yu., Kalnyuk J. V., Samatadze T. E., Zoshchuk S. A., Amosova A. V.** 2022. Integration of repeatomic and cytogenetic data on satellite DNA for the genome analysis in the genus *Salvia* (Lamiaceae). *Plants* 11: 2244. <https://doi.org/10.3390/plants11172244>
- Muravenko O. V., Zelenin A. V.** 2009. Chromosomal organization of the genomes of small chromosome plants. *Russ. J. Genet.* 45(11): 1516–1529. [In Russian] (**Муравенко О. В., Зеленин А. В.** Исследование хромосомной организации геномов мелкохромосомных растений // Генетика, 2009. Т. 45, № 11. С. 1516–1529).

- Murín A.** 1997. Karyotaxonomy of some medicinal and aromatic plants. *Thaiszia J. Bot.* 7: 75–88.
- Norlindh T.** 1977. *Calenduleae* – systematic review. In: V. H. Heywood, J. B. Harborne, B. L. Turner (eds.). *The biology and chemistry of the Compositae*. London, UK: Academic Press. Pp. 961–987.
- Pedrosa-Harand A., de Almeida C. C., Mosiolek M., Blair M. W., Schweizer D., Guerra M.** 2006. Extensive ribosomal DNA amplification during Andean common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) evolution. *Theor. Appl. Genet.* 112: 924–933.
- Pierozzi N. I., Galgaro M. L., Lopes C. L.** 2001. Application of C-banding in two *Arachis* wild species, *Arachis pintoi* Krapov. and *A. villosulicarpa* Hoehne to mitotic chromosome analyses. *Caryologia* 54: 377–384.
- Probatova N. S., Rudyka Ye. G., Shatalova S. A.** 2001. Chromosome numbers of some plant species from the environs of Vladivostok city (Primorsky Region). *Bot. Zhurn.* 91(1): 168–172. [In Russian] (**Пробатова Н. С., Рудыка Е. Г., Шаталова С. А.** Хромосомные числа у некоторых видов растений окрестностей г. Владивостока (Приморский край) // Бот. журн., 2001. Т. 91, № 1. С. 168–172).
- Prokofyeva-Belgovskaya A. A.** 1986. *Geterokhromaticheskiye rayony khromosom* [Heterochromatic regions of chromosomes]. Moscow: Nauka. 430 pp. [In Russian] (**Прокофьева-Бельговская А. А.** Гетерохроматические районы хромосом. М.: Наука, 1986. 430 с.).
- Rachinskaya O. A., Lemesh V. A., Muravenko O. V., Yurkevich O. Yu., Guzenko E. V., Bol'sheva N. L. et al.** 2011. Genetic polymorphism of flax *Linum usitatissimum* based on the use of molecular cytogenetic markers. *Russ. J. Genet.* 47: 65–75. [In Russian] (**Рачинская О. А., Лемеш В. А., Муравенко О. В., Юркевич О. Ю., Гузенко Е. В., Большеева Н. Л. и др.** Полиморфизм генома льна посевного по молекулярно-цитогенетическим маркерам // Генетика, 2011. Т. 47. С. 65–75).
- Raskina O., Belyayev A., Nevo E.** 2004. Quantum speciation in *Aegilops*: Molecular cytogenetic evidence from rDNA cluster variability in natural populations. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 101: 14818–14823.
- Rice A., Glick L., Abadi S., Einhorn M., Kopelman N. M., Salman-Minkov A., et al.** 2015. The chromosome counts database (CCDB) – a community resource of plant chromosome numbers. *New Phytol.* 206: 19–26. <https://doi.org/10.1111/nph.13191>
- Roa F., Guerra M.** 2012. Distribution of 45S rDNA sites in chromosomes of plants: Structural and evolutionary implications. *BMC Evol. Biol.* 12: 225. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-12-225>
- Rosato M., Álvarez I., Feliner G. N., Rosselló J. A.** 2017. High and uneven levels of 45S rDNA site-number variation across wild populations of a diploid plant genus (*Anacyclus*, Asteraceae) *PLOS One* 12(10): e0187131. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187131>
- Samatadze T. E., Muravenko O. V., Popov K. V., Zelenin A. V.** 2001. Genome comparison of the *Matricaria chamomilla* L. varieties by the chromosome C- and OR-banding patterns. *Caryologia* 54: 299–306.
- Samatadze T. E., Zelenin A. V., Suslina S. N., Amosova A. V., Popov K. V., Zagumennikova T. N., Cicilin A. N., Bykov V. A., Muravenko O. V.** 2012. Comparative cytogenetic study of the forms of *Macleaya cordata* (Willd.) R. BR. from different localities. *Russ. J. Genet.* 48: 72–79. [In Russian] (**Саматадзе Т. Е., Зеленин А. В., Суслина С. Н., Амосова А. В., Попов К. В., Загуменникова Т. Н., Цицилин А. Н., Быков В. А., Муравенко О. В.** Сравнительная цитогенетическая характеристика форм *Macleaya cordata* (Willd.) R. BR. из различных мест произрастания // Генетика, 2012. Т. 48. С. 72–79).
- Samatadze T. E., Zoshchuk S. A., Haziieva F. M., Yurkevich O. Yu., Svistunova N. Yu., Morozov A. I., Amosova A. V., Muravenko O. V.** 2019. Phenotypic and molecular cytogenetic variability in calendula (*Calendula officinalis* L.) cultivars and mutant lines obtained via chemical mutagenesis. *Sci. Rep.* 9(1): 9155. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-45738-3>
- Samatadze T. E., Zoshchuk S. A., Khomik A. S., Amosova A. V., Svistunova N. Yu., Suslina S. N., Haziieva F. M., Yurkevich O. Yu., Muravenko O. V.** 2018. Molecular cytogenetic characterization, leaf anatomy and ultrastructure of the medicinal plant *Potentilla alba* L. *Genet. Res. Crop. Evol.* 65: 1637–1647.
- Schubert I., Wobus U.** 1985. *In situ* hybridization confirms jumping nucleolus organizing regions in *Allium*. *Chromosoma* 92: 143–148.
- Shorin N. V., Kriklivaya A. N.** 2013. Study of cultivar Kalta of *Calendula officinalis* in the conditions of the Omsk Irtysh region. In: *Lekarstvennyye rasteniya: Fundamentalnyye i prikladnyye problemy* [Medicinal plants: Fundamental and applied problems: Proceedings of the I international scientific conference (Novosibirsk, May 21–22, 2013)]. Novosibirsk: NGAU. Pp. 353–355. [In Russian] (**Шорин Н. В., Крикливая А. Н.** Изучение календулы лекарственной сорта Кальта в условиях Омского Прииртышья // Лекарственные растения: Фундаментальные и прикладные проблемы: материалы I Междунар. науч. конф. (г. Новосибирск, 21–22 мая 2013 г.). Новосибирск: Изд-во НГАУ, 2013. С. 353–355).
- Vogt R., Oberprieler C.** 2008. Chromosome numbers of North African phanerogams. VIII. More counts in Compositae. *Willdenowia* 38(2): 497–519.
- Volkov R. A., Panchuk I. I., Borisjuk N. V., Hosiawa-Baranska M., Maluszynska J., Hemleben V.** 2017. Evolutional dynamics of 45S and 5S ribosomal DNA in ancient allohexaploid *Atropa belladonna*. *BMC Plant Biol.* 17(1): 21. <https://doi.org/10.1186/s12870-017-0978-6>

Voronin A. V., Kotyak P. A., Krudu O. N. 2021. Selection assessment of different calendula (*Calendula officinalis*) varieties cultivated in ecological and geographical conditions of Yaroslavl oblast. *Vladimirskiy zemledelets* [Vladimir agricolist] 1: 43–47. [In Russian] (**Воронин А. В., Котяк П. А., Крудю О. Н.** Селекционная оценка различных сортов календулы лекарственной (*Calendula officinalis*), выращенных в эколого-географических условиях Ярославской области // Владимирский земледелец, 2021. № 1. С. 43–47).

Yurkevich O. Yu., Naumenko-Svetlova A. A., Bolsheva N. L., Samatadze T. E., Rachinskaya O. A., Kudryavtseva A. V., Zelenina D. A., Volkov A. A., Zelenin A. V., Muravenko O. V. 2013. Investigation of genome polymorphism and seed coat anatomy of species of section *Adenolinum* from the genus *Linum*. *Genet. Resour. Crop Evol.* 60(2): 661–676. <https://doi.org/10.1007/s10722-012-9865-z>

Yurkevich O. Yu., Samatadze T. E., Zoshchuk S. A., Romashkina S. I., Selyutina I. Yu., Amosova A. V., Muravenko O. V. 2019. Chromosomal polymorphism on localization of 45S and 5S rDNA in *Hedysarum neglectum* (Fabaceae). *Flora and Vegetation of Asian Russia* 1(33): 48–52. [In Russian] (**Юркевич О. Ю., Саматадзе Т. Е., Зошук С. А., Ромашикина С. И., Селютина 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. № 1(33). С. 48–52).

Zoldos V., Papes D., Cerbah M., Panaud O., Besendorfer V., Siljak-Yakovlev S. 1999. Molecular-cytogenetic studies of ribosomal genes and heterochromatin reveal conserved genome organization among 11 *Quercus* species. *Theor. Appl. Genet.* 99: 969–977.