

СВЯЗЬ ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ С МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИМИ РАЗЛИЧИЯМИ У ВИДОВ РОДА *Rhododendron* L. ПРИ ИНТРОДУКЦИИ*

Т.В. БАРАНОВА¹, Р.Н. КАЛЕНДАРЬ², В.Н. КАЛАЕВ¹, В.Н. СОРОКОПУДОВ³,
Ю.В. БУРМЕНКО³

В настоящее время актуальны исследования цитологических основ наследственности и изменчивости у древесных растений, которые все больше привлекают внимание исследователей в связи с перспективами вовлечения этих биологических объектов в сферу применения био- и геномных технологий для решения задач экологии, сохранения биоразнообразия, продовольственной и сырьевой обеспеченности. Показано изменение митотической активности, которая может возрастать и снижаться в зависимости от интенсивности стрессовых нагрузок, описано увеличение частоты патологий митоза и др. Однако попытки выявить сходство и различия цитогенетических особенностей у древесных растений на основании результатов молекулярно-генетического сравнения не предпринимались. Последовательности внутренних транскрибированных спейсерных областей (ITS) ядерной рибосомной ДНК использовались для создания филогенетической гипотезы разделения видов древесных растений рода *Aralia* (J. Wen, 2000), уточнения систематического положения *Rhododendron* (Т.В. Баранова с соавт., 2014), других родов семейства *Ericaceae* (O. Schwery с соавт., 2015). В представленной работе впервые выполнено сравнение нуклеотидных последовательностей спейсера ITS1-ITS2 материнских растений и цитогенетических показателей (митотической активности, частоты и спектра патологических митозов, числа клеток с остаточными ядрышками на стадии метафазы-телофазы митоза) у семенного потомства четырех видов *Rhododendron*, интродуцированных в условиях Центрально-Черноземного региона России. Семена рододендронов проращивали в чашках Петри при комнатной температуре. Корешки окрашивали ацетогематоксилином, ополаскивали дистиллированной водой и готовили давленные микропрепараты с использованием жидкости Гойера. Кластерный анализ нуклеотидных последовательностей и построение дендрограммы проводили с помощью метода ML (Maximum Likelihood, Nearest-Neighbor-Interchange) в программе MEGA. Идентичность нуклеотидной последовательности спейсера ITS1-ITS2 у видов рода *Rhododendron* приводит к их большему сходству по совокупности цитогенетических показателей. Однако полной аналогии цитогенетических характеристик у изученных видов, имеющих идентичную ITS1-ITS2 последовательность, не отмечается. На основании выполненного сравнения можно предположить, что у изученных представителей рода *Rhododendron* генетическое сходство обуславливает сходство цитогенетических показателей. Среди семенного потомства можно выделить две группы: первая — *Rhododendron dauricum* и *Rh. mucronulatum* с высоким значением митотической активности в корневой меристеме проростков (соответственно $7,6 \pm 0,3$ % и $7,7 \pm 0,7$ %), вторая — *Rh. sichotense* и *Rh. ledebourii* с соответствующими низкими показателями ($5,6 \pm 0,7$ % и $6,1 \pm 0,6$ %). Наибольшую цитогенетическую нестабильность отмечали у *Rh. ledebourii* ($5,2 \pm 1,1$ %, частота патологий митоза у этого вида максимальная), у трех других видов она была ниже (доля патологий митоза от $3,5 \pm 0,5$ % у *Rh. sichotense* до $1,6 \pm 0,4$ % у *Rh. dauricum*). Повышенный процент клеток с остаточным ядрышком на стадии метафазы—телофазы митоза свидетельствует о большей интенсивности синтетических процессов, связанных с адаптацией в условиях интродукции. По этому показателю мы можем сформировать две группы: первая — *Rh. sichotense* с высокой частотой клеток с остаточным ядрышком на стадии метафазы—телофазы митоза ($13,3 \pm 1,2$ %); вторая — с низкими значениями анализируемого показателя, в которую вошли *Rh. mucronulatum* ($9,1 \pm 1,1$ %), *Rh. dauricum* ($10,2 \pm 1,0$ %) и *Rh. ledebourii* ($10,9 \pm 1,3$ %). Несмотря на различие цитогенетических показателей у семенного потомства изученных видов, кластерный анализ совокупности характеристик митоза и ядрышковой активности позволил разделить исследуемые виды на две группы: в первую вошли *Rh. mucronulatum* и *Rh. dauricum*, во вторую — *Rh. ledebourii* и *Rh. sichotense*. При этом цитогенетические характеристики семенного потомства исследованных форм видоспецифичны.

Ключевые слова: *Rhododendron* L., рододендрон, семенное потомство, интродуцент, цитогенетические характеристики, цитогенетические показатели, митотическая активность, цитогенетические аномалии, патологии митоза, остаточные ядрышки, последовательности спейсера ITS1-ITS2, кластерный анализ.

Древесные растения все больше привлекают внимание исследователей

* Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ «Исследование мутабельности семенного потомства интродуцентов на примере *Rhododendron ledebourii* Pojark.» (проект № 14-34-50505).

в связи с перспективами вовлечения этих биологических объектов в сферу применения био- и геномных технологий для решения задач экологии, сохранения биоразнообразия, продовольственной и сырьевой обеспеченности, в связи с чем актуализируется необходимость изучения цитологических и молекулярно-генетических основ наследственности у таких растений.

В настоящее время в России цитогенетические характеристики достаточно широко исследуют у видов хвойных (1), особенно у представителей семейства *Pinaceae* (2-4). Среди лиственных растений изучаются аборигенные виды, например *Betula pendula* (5-7), *Quercus robur* (8), а также интродуцированные формы, такие как *Catalpa*, *Tilia* (9), *Rhododendron* (10-12). У древесных растений показано изменение ряда цитогенетических характеристик (в частности, митотической активности, которая может возрастать и снижаться в зависимости от интенсивности стрессовых нагрузок), увеличение частоты патологий митоза и др. На цитогенетические показатели семенного потомства древесных растений влияют химические поллютанты (5, 13), радиационное загрязнение (14), тяжелые металлы (4, 15, 16). Цитогенетические реакции в стрессовых условиях у семенного потомства многих древесных растений сходны, что вызывает вопросы об их видоспецифичности (или неспецифичности) и зависимости от внешних факторов. При этом попытки выявить сходство и различия цитогенетических особенностей древесных растений на основании результатов молекулярно-генетического сравнения не предпринимались.

Последовательности внутренних транскрибированных спейсерных областей (ITS) ядерной рибосомной ДНК использовались для создания филогенетической гипотезы разделения видов древесных растений рода *Aralia* (17), уточнения систематического положения *Rhododendron* (18), других родов семейства *Ericaceae* (19). Оценка молекулярно-генетического подобия видов проводится не только в целях изучения филогении (на основании сравнения последовательностей ДНК) (20-24), биогеографии (25), но и в работах по биотехнологии (26, 27), биоинженерии (28), для выявления генетических маркеров (29), подтверждения гибридного статуса и различий донорских родительских форм у декоративных гибридов, в том числе видов *Rhododendron* (30). Так, ISSR маркер использовали для разделения групп одного и того же вида по различным признакам, например по изменению активности ферментов в ответ на химический стресс (31).

Выбор видов *Rhododendron* в качестве объекта исследований обусловлен тем, что сейчас эти растения активно изучаются с точки зрения молекулярной систематики (20, 22, 31, 32), генетического разнообразия (34-36) и хемосистематики (37, 38), тогда как сведения об их цитогенетических особенностях отрывочны (39) и в основном ограничиваются оценкой ploидности (10, 11). Проводились подробные исследования по цитологии рододендрона канадского (*Rhododendron canadense* (L.) Torr.) (12). В современной классификации для видов *Rh. mucronulatum* Turcz., *Rh. dauricum* L., *Rh. ledebourii* Pojark. и *Rh. sichotense* Pojark. указана подсекция *Rhodorastrum* (Maxim.) Cullen, секция *Rhododendron*, подрод *Rhododendron* (35, 40). Очевидно, что для установления генетического сходства и различия видов одной подсекции, близких по морфологии, необходимы сравнительные исследования нескольких групп параметров.

Сокращение численности и уменьшение генетического разнообразия рододендронов в естественных условиях становится причиной снижения и адаптивного потенциала растений, а сложность идентификации видов этих красивоцветущих кустарников по морфологическим признакам, в свою очередь, затрудняет работу по сохранению биоразнообразия этих видов. Выяс-

нение того, насколько молекулярно-генетическое сходство обуславливает цитогенетические реакции в условиях интродукции, позволит лучше понимать механизмы адаптации растений к среде обитания для поддержания их биопотенциала в искусственных условиях.

Мы впервые провели анализ ITS1-ITS2 последовательностей и сравнили молекулярно-генетические и цитологические особенности серии *Dauricum* подсекции *Rhodorastrum* (Maxim.) Cullen (секция *Rhododendron*, подрод *Rhododendron*), а также выявили видоспецифичность цитогенетических характеристик у четырех изученных видов рододендрона при интродукции в условиях Центрально-Черноземного региона России.

Цель работы заключалась в изучении цитогенетических и молекулярно-генетических особенностей видов рододендрона в условиях, нетипичных для их естественного произрастания.

Методика. Использовали семена группового сбора четырех видов рода *Rhododendron*: *Rh. mucronulatum* Turcz., *Rh. dauricum* L., *Rh. ledebourii* Pojark. и *Rh. sichotense* Pojark., интродуцированных в Ботаническом саду им. Б.М. Козо-Полянского Воронежского государственного университета (географические координаты: 39°22' северной широты, 51°40' восточной долготы, высота над уровнем моря 168,2 м). Возраст анализируемых растений 30-35 лет. Выборка состояла из 5 растений каждого вида. Для молекулярно-генетических исследований отбирали листья растений.

ДНК выделяли с использованием СТАВ буфера (1,5 М NaCl, 20 мМ Na₃-EDTA, 100 мМ HEPES pH 5,3, 25 °С, 1,5 % СТАВ) по протоколу PrimerDigital Oy (<http://primerdigital.com/dna.html>). Участок ITS1-ITS2 амплифицировали с праймерами ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') и ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (41), синтезированными в «Eurofins MWG, Inc.» (Германия) (<https://www.eurofinsgenomics.eu/>). Для амплификации фрагментов ITS1-ITS2 использовали стандартный протокол для Taq ДНК-полимеразы. Реакцию проводили в 25 мкл реакционной смеси, содержащей 25 нг ДНК, 1× DreamTaq буфер (с 1,5 мМ MgCl₂), 0,2 мМ dNTPs, 0,3 мкМ каждого праймера и 1 ед. DreamTaq ДНК-полимеразы («Thermo Fisher Scientific, Inc.», США), в амплификаторе MasterCycler Gradient («Eppendorf AG», Германия): начальная денатурация 3 мин при 95 °С; 20 циклов — 15 с при 95 °С, 60 с при 60 °С, 30 с при 72 °С; завершающая элонгация — 5 мин при 72 °С.

Амплифицированные фрагменты разделяли электрофорезом в 1,5 % агарозном геле (RESolute Wide Range, «Biozym Scientific GmbH», Германия), продукты визуализированы бромистым этидием. Для определения длины фрагментов ДНК использовали маркер молекулярной массы (GeneRuler DNA Ladder Mix, #SM0331, «Thermo Fisher Scientific, Inc.», США).

Фрагменты ДНК экстрагировали из агарозного геля с помощью набора QIAquick Gel Extraction Kit («Qiagen, Inc.», США). Лигирование фрагментов ПЦР-продуктов в плазмидный T-вектор pGEM-T («Promega, Inc.», США) выполняли согласно протоколу производителя. Плазмидной ДНК трансформировали клетках *Escherichia coli* штамма JM109 («Promega, Inc.», США). Клетки, несущие плазмиду со вставкой, детектировали посредством бело-синей селекции на среде с ампициллином (в конечной концентрации 100 мкг/мл), хромогенным субстратом 5-бром-4-хлор-3-индолил-β-D-галактопиранозидом (X-Gal, 20 мг/мл) и изопропил-β-D-1-тио-галактопиранозидом (IPTG, 200 мг/мл). Проверку колоний на наличие вставки ПЦР-продуктов, клонированных в векторе, проводили с помощью ПЦР с универсальными рUC праймерами (M13, прямой и обратный).

Сервис по секвенированию последовательностей амплифициро-

ванной ДНК был предоставлен лабораторией ДНК-секвенирования Института биотехнологии (университет Хельсинки; http://www.biocenter.helsinki.fi/bi/dnagen/sequencing_service.htm). Использовался капиллярный секвенатор 3730xl DNA Analyzer («Thermo Fisher Scientific, Inc.», США). Данные по ITS1-ITS2 участкам получили для видов *Rh. mucronulatum* Turcz., *Rh. dauricum* L., *Rh. ledebourii* Pojark. и *Rh. sichotense* Pojark, произрастающих в условиях интродукции в Центральном Черноземье. Кластерный анализ нуклеотидных последовательностей и построение дендрограммы проводили методом ML (Maximum Likelihood, Nearest-Neighbor-Interchange) в программе MEGA v.6 (23, 24).

Для цитогенетических исследований семена рододендронов проращивали в чашках Петри при комнатной температуре. По достижении корешками длины 0,5-1 см их фиксировали (в 9 ч утра) в ацетоалкоголе (смесь 96 % этилового спирта и ледяной уксусной кислоты, 3:1), после чего материал хранили в холодильнике при температуре +4 °С. Корешки проростков подвергали мацерации в 18 % растворе HCl при 60 °С в течение 1-2 мин, затем 15 мин промывали в 45 % уксусной кислоте, окрашивали ацетогематоксилином в течение 1-1,5 ч, ополаскивали дистиллированной водой и готовили давленные микропрепараты с использованием жидкости Гойера. Препараты (по 20 для каждого вида рододендрона) изучали с помощью микроскопа LABOVAL-4 («Carl Zeiss, Inc.», Швейцария) при общем увеличении 40×1,5×10.

В каждом микропреparate (один препарат соответствует одному корешку и одному проростку) исследовали около 500-700 клеток. Всего просмотрели около 42500 клеток изучаемых видов рода *Rhododendron*. На микропрепаратах анализировали следующие цитогенетические показатели: митотическую активность (митотический индекс МИ — отношение числа делящихся клеток к общему числу подсчитанных клеток, %), процентное соотношение числа клеток по стадиям митоза, частота патологий митоза (отношение числа клеток с нарушениями к общему числу делящихся клеток, %), доля клеток с остаточными ядрышками на стадии метафазы—анафазы митоза (отношение числа клеток с остаточными ядрышками к общему числу клеток на указанных стадиях, %). Классификацию патологических митозов проводили по И.А. Алову (42).

Компьютерную статистическую обработку данных проводили с помощью пакета программ Stadia v.7.0 (<http://top-torrent.ws/soft-torrent/4463-samtasia-studio-70.html>, «TechSmith Corporation», США). Процедура группировки данных и их обработка изложены А.П. Кулаичевсу (43). Для выражения значений каждого цитогенетического показателя использовали среднюю с ошибкой средней ($\bar{x} \pm \text{SEM}$). Выборки сравнивали по частоте патологий митоза и доле клеток с остаточными ядрышками, используя X-критерий рангов Ван-дер-Вардена, так как анализируемые признаки не подчиняются нормальному распределению. Различия считали статистически значимыми при $P < 0,05$, $P < 0,01$. Кластерный анализ выполняли с использованием метрики нормированного евклидова расстояния и стратегии классификации группового соседа. В матрицу данных для кластерного анализа включали следующие цитогенетические показатели семенного потомства: МИ, подсчитанный с учетом клеток на стадии профазы (%), МИ, подсчитанный без учета клеток на стадии профазы (%), доля (%) клеток в профазе, клеток в метафазе, клеток в ана-телофазе, частота патологий митоза (%), доля клеток с остаточными ядрышками на стадии метафазы—телофазы митоза (%).

Результаты. Данные молекулярно-генетического анализа ITS1-ITS2

последовательностей представлены на дендрограмме (рис. 1). Видно, что *Rh. mucronulatum* и *Rh. dauricum* имеют идентичную ITS1-ITS2 последовательность. У *Rh. ledebourii* с *Rh. mucronulatum* и *Rh. dauricum* различия по ITS1-ITS2 последовательности составили 1 нуклеотид, между *Rh. sichotense* и *Rh. mucronulatum*, *Rh. sichotense* и *Rh. dauricum* разница по ITS1-ITS2 последовательности составляла 2 нуклеотида. Различия между *Rh. ledebourii* и *Rh. sichotense* для спейсера ITS1-ITS2 соответствовали 3 нуклеотидам.

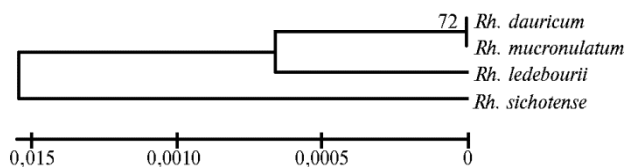


Рис. 1. Нуклеотидные различия по ITS1-ITS2 последовательности у видов рода *Rhododendron* L. (метод Maximum Likelihood, Nearest-Neighbor-Interchange, программа MEGA v.6).

В таблицах 1 и 2 представлены цитогенетические показатели изученных видов рода *Rhododendron*

Клеточное деление — высококанализованный процесс (8). У видов рододендронов, которые мы проанализировали, показатели митоза варьировали (см. табл. 1).

1. Цитогенетические характеристики видов рода *Rhododendron* ($x \pm SEM$)

Вид	МИ, %		Число клеток, %		
	с учетом профаз	без учета профаз	в профазе	в метафазе	в ана-телофазе
<i>Rhododendron dauricum</i> L.	7,6±0,3	3,9±0,2	48,9±2,0	13,3±1,4 ^б	41,7±2,3
<i>Rh. mucronulatum</i> Turcz.	7,7±0,7	4,9±0,7	37,5±1,9 ^б	10,2±0,9 ^{**}	51,9±1,4 [*]
<i>Rh. sichotense</i> Pojark.	5,6±0,7 ^а	3,0±0,4 ^а	45,8±1,1	14,6±2,2	39,6±3,2 ^{**б}
<i>Rh. ledebourii</i> Pojark.	6,1±0,6 [*]	3,8±0,4	37,9±1,9 ^{**г}	18,7±2,1 [*]	43,4±1,7

Примечание. МИ — митотический индекс.

^{*}, ^{**} Различия с *Rhododendron dauricum* статистически значимы соответственно при $P < 0,05$ и $P < 0,01$.

^а — различия с *Rh. mucronulatum* статистически значимы ($P < 0,05$); ^б — различия с *Rh. mucronulatum* статистически значимы ($P < 0,01$); ^в — различия с *Rh. sichotense* статистически значимы ($P < 0,05$); ^г — различия с *Rh. sichotense* статистически значимы ($P < 0,01$).

2. Цитогенетические аномалии видов рода *Rhododendron* ($x \pm SEM$)

Вид	Патологические митозы, %	Клетки с остаточными ядрышками, %
<i>Rhododendron dauricum</i> L.	1,6±0,4	10,2±1,0
<i>Rh. mucronulatum</i> Turcz.	3,4±0,3	9,1±1,1
<i>Rh. sichotense</i> Pojark.	3,5±0,5	13,3±1,2 ^а
<i>Rh. ledebourii</i> Pojark.	5,2±1,1 [*]	10,9±1,3 ^б

^{*} Различия с *Rhododendron dauricum* статистически значимы при $P < 0,05$.

^а — различия с *Rh. mucronulatum* статистически значимы ($P < 0,05$); ^б — различия с *Rh. sichotense* статистически значимы ($P < 0,05$).

Так, среди семенного потомства можно выделить две группы по митотической активности: первая — *Rhododendron dauricum* и *Rh. mucronulatum* с высоким значением МИ в корневой меристеме проростков (соответственно 7,6±0,3 % и 7,7±0,7 %), вторая — *Rh. sichotense* и *Rh. ledebourii* с соответствующими низкими показателями (5,6±0,7 % и 6,1±0,6 %). Анализ распределения клеток по стадиям митоза показал, что изученные виды сгруппировались следующим образом. Число клеток на стадии профазы у *Rh. dauricum* (48,9±2,0 %) и *Rh. sichotense* (45,8±1,1 %) было значительным, а у *Rh. mucronulatum* (37,5±1,9 %) и *Rh. ledebourii* (37,9±1,9 %) — невысоким. Повышенный процент профазных клеток свидетельствует о возможных нарушениях митотического аппарата (44) и активации системы checkpoint-контроля целостности генетического материала (45). Подобные цитологические ответы мы можем объяснить индивидуальными (видоспецифическими) особенностями растений. Виды *Rh. mucronulatum* и *Rh. dauricum*, не имеющие молекулярно-генетических различий по последовательности ITS1-ITS2, входят в группу с высокими значениями митотического индекса, подсчитанного с учетом клеток на стадии профазы. *Rh. ledebourii*

и *Rh. sichotense*, которые отличающиеся друг от друга по последовательности ITS1-ITS2, принадлежат к группе с меньшими МИ.

Число клеток на стадии метафазы митоза было максимальным у *Rh. ledebourii* ($18,7 \pm 2,1$ %) и *Rh. sichotense* ($14,6 \pm 2,2$ %), минимальным — у *Rh. mucronulatum* ($10,2 \pm 0,9$ %) и *Rh. dauricum* ($13,3 \pm 1,4$ %). Задержка клеток на стадии метафазы может свидетельствовать о нарушении формирования веретена деления (42). Группировка видов по времени прохождения стадии ана-телофазы митоза оказалась иной. Наибольшую долю клеток на этой стадии отмечали у *Rh. mucronulatum* ($51,9 \pm 1,4$ %), у остальных видов эти значения были значительно ниже (см. табл. 1). Увеличение числа клеток на стадии ана-телофазы митоза свидетельствует о нарушении формирования клеточной стенки (44).

Наибольшую цитогенетическую нестабильность наблюдали у *Rh. ledebourii* ($5,2 \pm 1,1$ %, частота патологий митоза максимальная), у трех других видов она была ниже (от $3,5 \pm 0,5$ % у *Rh. sichotense* до $1,6 \pm 0,4$ % у *Rh. dauricum*) (см. табл. 2). Можно предположить, что в условиях интродукции генетическая система *Rh. ledebourii* наименее адаптирована. Спектр нарушений в основном был представлен отставаниями хромосом в анафазе и метакинезе. Мосты отмечались только у *Rh. mucronulatum* (25 % от общего числа патологий митоза) и *Rh. sichotense* (12 % от общего числа патологий митоза). Более высокая доля клеток с остаточным ядрышком на стадии метафазы—телофазы митоза свидетельствует о большей интенсивности синтетических процессов (6), связанных с адаптацией в условиях интродукции. По этому показателю выделились две группы: первую образовал вид *Rh. sichotense* ($13,3 \pm 1,2$ %) с высоким процентом клеток с остаточным ядрышком на стадии метафазы—телофазы митоза, во вторую вошли *Rh. mucronulatum* ($9,1 \pm 1,1$ %), *Rh. dauricum* ($10,2 \pm 1,0$ %) и *Rh. ledebourii* ($10,9 \pm 1,3$ %) с меньшей долей таких аномалий.

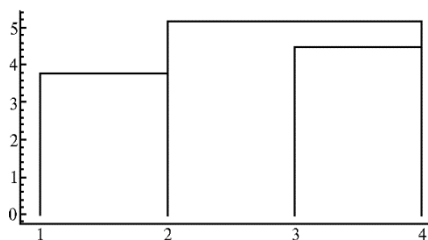


Рис. 2. Дендрограмма кластерных расстояний между видами рода *Rhododendron* L. по цитогенетическим характеристикам: 1 — *Rh. dauricum*, 2 — *Rh. mucronulatum*, 3 — *Rh. sichotense*, 4 — *Rh. ledebourii* (использована метрика нормированного евклидова расстояния и стратегия классификации группового соседа; показатели, включенные в матрицу данных, см. в разделе «Методика»).

Несмотря на различие цитогенетических показателей у семенного потомства изученных видов, кластерный анализ совокупности характеристик митоза и ядрышковой активности позволил выделить две группы (рис. 2): первая — *Rh. mucronulatum* и *Rh. dauricum*, вторая — *Rh. ledebourii* и *Rh. sichotense*. Наибольшее кластерное расстояние отмечалось между совокупностями цитогенетических показателей у *Rh. mucronulatum* и *Rh. sichotense*, наименьшее — между видами *Rh. mucronulatum* и *Rh. dauricum*, что согласуется с полученными нами данными молекулярно-генетических исследований, которые показали сходную группировку этих видов. При интродукции в Центральное Черноземье материнские растения изучаемых видов находились в одинаковых условиях (Ботанический сад им. Б.М. Козо-Полянского Воронежского государственного университета), поэтому можно говорить о проявлении видоспецифичности цитогенетических показателей их семенного потомства. Данные наших исследований о сходстве цитогенетических характеристик видов рода *Rhododendron* согласуются с результатами М.В. Белоусова с соавт. (37) по хемотаксономии, морфологии и анатомии, кото-

рые показали наибольшее морфологическое (вторичное) сходство тех же видов и объясняли это сходными экологическими условиями в местах произрастания в естественных ареалах видов. Заслуживает внимания тот факт, что по молекулярно-генетическим и цитогенетическим характеристикам виды сгруппированы сходным образом. Кластерное расстояние, вычисленное на основании изучения цитогенетических свойств, между видами *Rh. mucronulatum* и *Rh. dauricum* наименьшее. Эти виды имеют одинаковую последовательность ITS1-ITS2, *Rh. ledebourii* отличается от них по одному нуклеотиду, *Rh. sichotense* — по двум нуклеотидам, что соответствует большому кластерному расстоянию между цитогенетическими показателями. Различие между *Rh. ledebourii* и *Rh. sichotense* для спейсеров ITS1-ITS2 составляет три нуклеотида. Однако разница по ITS-последовательности в 1-3 нуклеотида не играет значимой роли при определении молекулярно-генетических характеристик. Таким образом, сходство нуклеотидной последовательности у видов рода *Rhododendron* обуславливает их большую близость по совокупности цитогенетических особенностей.

Итак, идентичность нуклеотидной последовательности спейсера ITS1-ITS2 у видов рода *Rhododendron* серии *Dauricum* приводит к их большему сходству по совокупности цитогенетических показателей. Однако у видов, имеющих идентичную последовательность ITS1-ITS2, не отмечается полного совпадения цитогенетических характеристик. На основании выполненного нами сравнения можно предположить, что у изученных представителей рода *Rhododendron* серии *Dauricum* генетическая однородность обуславливает сходство цитогенетических свойств. Цитогенетические характеристики семенного потомства у исследованных форм видоспецифичны.

¹ФГБОУ ВО Воронежский государственный университет,
394018 Россия, г. Воронеж, Университетская пл., 1,
e-mail: tanyavos-tric@rambler.ru ✉, dr_huixs@mail.ru;

Поступила в редакцию
20 марта 2018 года

²University of Helsinki, Institute of Biotechnology,
00014 Finland, Helsinki, Viikinkaari 1, P.O. Box 65,
e-mail: ruslan.kalendar@mail.ru;

³ФГБНУ Всероссийский селекционно-технологический
институт садоводства и питомниководства,
115598 Россия, г. Москва, ул. Загорьевская, 4,
e-mail: sorokopud2301@mail.ru, burmenko_j@mail.ru

Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology], 2018, V. 53, № 3, pp. 511-520

RELATIONSHIP BETWEEN CYTOGENETIC CHARACTERISTICS AND MOLECULAR-GENETIC DIFFERENCES IN SPECIES OF THE GENUS *Rhododendron* L. WHEN INTRODUCED

T.V. Baranova¹, R.N. Kalendar², V.N. Kalayev¹, V.N. Sorokopudov³, J.V. Burmenko³

¹Voronezh State University, 1, Universitetskaya pl., Voronezh, 394018 Russia, e-mail tanyavos-tric@rambler.ru (✉
corresponding author), dr_huixs@mail.ru;

²University of Helsinki, Institute of Biotechnology, 00014 Finland, Helsinki, Viikinkaari 1, P.O. Box 65, e-mail
ruslan.kalendar@mail.ru;

³All-Russian Horticultural Institute for Breeding, Agrotechnology and Nursery, Federal Agency for Scientific Organizations, 4, ul. Zagor'evskaya, Moscow, 115598 Russia, e-mail sorokopud2301@mail.ru, burmenko_j@mail.ru
ORCID:

Baranova T.V. orcid.org/0000-0002-3526-7974

Sorokopudov V.N. orcid.org/0000-0002-0133-6919

Kalendar R.N. orcid.org/0000-0003-3986-2460

Burmenko J.V. orcid.org/0000-0002-6172-9597

Kalayev V.N. orcid.org/0000-0002-4247-4509

The authors declare no conflict of interests

Acknowledgements:

Supported financially by grant from Russian Foundation for Basic Research «Investigation of the mutability of seed offspring of introductions by the example of *Rhododendron ledebourii* Pojark.» (project № 14-34-50505)

Received March 20, 2018

doi: 10.15389/agrobiology.2018.3.511eng

Abstract

Currently, woody plants attract special attention given the prospects of their involving in bio- and genomic technologies to address challenges of sustainable environment, biodiversity, food security and production of raw materials. Thence, studies of cytogenetic characteristics of woody plants are increasingly relevant. The change in a number of cytogenetic characteristics, in particular, mitotic activity, which may increase and decrease depending on the intensity of stress loads, an increase in the pathology of mitosis, etc., has been shown. However, attempts to identify the similarities and differences in cytogenetic characteristics in woody plants on the basis of the results of molecular genetic comparison weren't conducted yet. Sequences of the internal transcribed spacer (ITS) regions of nuclear ribosomal NA were used to generate a phylogenetic hypothesis for disjuncting of wood species of the genus *Aralia* (J. Wen, 2000), to specify of *Rhododendron* systematic state (T.V. Baranova et al., 2014) and other genera of the family *Ericaceae* (O. Schwery et al., 2015). Cluster analysis of nucleotide sequences and construction of the dendrogram were carried out using the ML (Maximum Likelihood, Nearest-Neighbor-Interchange) method in the MEGA software. Germination of *Rhododendron* seeds was carried out in Petri dishes at room temperature. Roots were stained with acetohe-matoxylin, rinsed with distilled water, and suppressed micro-preparations were prepared using Goyer's fluid. Nucleotide sequences of the ITS1-ITS2 spacer of the parent plants and cytogenetic parameters (mitotic activity, level and spectrum of pathological mitoses, number of cells with residual nucleoli in the metaphase-telophase mitosis stage) we obtained from seed progeny in four *Rhododendron* species introduced into the conditions of the Central Black Earth region of Russia. The identity of the nucleotide sequence of the spacer ITS1-ITS2 in species of the genus *Rhododendron* leads to their greater similarity in the aggregate of cytogenetic indices. However, there is no complete analogy of cytogenetic characteristics in the species studied that have the identical sequence ITS1-ITS2. On the basis of this comparison, it can be assumed that genetic similarity in the studied *Rhododendron* species causes the similarity of cytogenetic indices. According to mitotic activity in the root meristem of the seedlings, two groups can be distinguished among the seed progeny, i.e. with a high value of mitotic activity, namely *Rhododendron dauricum* (7.6 ± 0.3 %) and *Rh. mucronulatum* (7.7 ± 0.7 %), and with low value, namely *Rh. sichotense* (5.6 ± 0.7 %) and *Rh. ledebourii* (6.1 ± 0.6 %). The greatest cytogenetic instability is noted in *Rh. ledebourii* (5.2 ± 1.1 %, the level of pathologies of mitosis in this species is maximal), in three other species it was lower (from 3.5 ± 0.5 % for *Rh. sichotense* to 1.6 ± 0.4 % for *Rh. dauricum* mitosis pathologies). A higher level of cells with a residual nucleolus at the stage of metaphase—telophase mitosis indicates a greater intensity of synthetic processes associated with adaptation in conditions of introduction. For this indicator, we can distinguish two groups: i) *Rh. sichotense* (13.3 ± 1.2 %) with a high level of cells with a residual nucleolus at the stage of metaphase—telophase of mitosis, and ii) *Rh. mucronulatum* (9.1 ± 1.1 %), *Rh. dauricum* (10.2 ± 1.0 %) and *Rh. ledebourii* (10.9 ± 1.3 %) with low values. Despite the difference in cytogenetic parameters in the seed offspring of the studied species, a cluster analysis of the totality of the characteristics of the course of mitosis and nucleolar activity made it possible to distinguish two groups: 1) *Rh. mucronulatum* and *Rh. dauricum*; 2) *Rh. ledebourii* and *Rh. sichotense*. The cytogenetic characteristics of the seed offspring of the species studied are species-specific.

Keywords: *Rhododendron* L., rhododendrons, seed progeny, introduced plants, cytogenetic characteristics, mitotic activity, cytogenetic abnormalities, mitotic pathologies, persistent nucleoli, ITS1-ITS2 sequences, cluster analysis.

REFERENCES

1. Sedel'nikova T.S., Muratova E.N., Pimenov A.V. Variability of chromosome numbers in gymnosperms. *Biol. Bull. Rev.*, 2011, 1(2): 100-109 (doi: 10.1134/S2079086411020083).
2. Korshikov I.I., Tkacheva Yu.A., Privalikhin S.N. Cytogenetic abnormalities in Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) seedlings from natural populations and an introduction plantation. *Cytol. Genet.*, 2012, 46(5): 280-284 (doi: 10.3103/S0095452712050064).
3. Oudalova A.A., Geras'kin S.A. The time dynamics and ecological genetic variation of cytogenetic effects in the Scots pine populations experiencing anthropogenic impact. *Biol. Bull. Rev.*, 2012, 2(3): 254-267 (doi: 10.1134/S207908641203005X).
4. Belousov M.V., Mashkina O.S., Popov V.N. Cytogenetic response of Scots pine (*Pinus sylvestris* L., 1753) (*Pinaceae*) to heavy metals. *Comp. Cytogenet.*, 2012, 6(1): 93-106 (doi: 10.3897/CompCytogen.v6i1.2017).
5. Vostrikova T.V., Butorina A.K. Cytogenetic responses of birch to stress factors. *Biol. Bull. Russ. Acad. Sci.*, 2006, 33(2): 185-190 (doi: 10.1134/S1062359006020142).
6. Kalaev V.N., Karpova S.S., Artyukhov V.G. Cytogenetic characteristics of weeping birch (*Betula pendula* Roth) seed progeny in different ecological conditions. *Bioremediation, Biodiversity & Bioavailability*, 2010, 4(1): 77-83.
7. Mashkina O.S., Butorina A.K., Tabackaja T.M. Karelian birch as a model for studying genetic and epigenetic variation related to the formation of patterned wood. *Russian Journal of Genetics*,

- 2011, 47(8): 951-957 (doi: 10.1134/S1022795411080126).
8. Artyukhov V.G., Kalaev V.N. *Radiatsionnaya biologiya. Radioekologiya*, 2005, 45(5): 619-628 (in Russ.).
 9. Gavrilov I.A., Butorina A.K. *Tsitologiya*, 2001, 43(10): 934-940 (in Russ.).
 10. Jones J.R., Ranney T.G., Eaker T.A. A novel method for inducing polyploidy in *Rhododendron* seedlings. *J. Amer. Rhododendron Soc.*, 2008, 62: 130-135.
 11. De K.K., Saha A., Tamang R., Sharma B. Investigation on relative genome sizes and ploidy levels of Darjeeling-Himalayan species using flow cytometer. *Indian Journal of Biotechnology*, 2010, 9(1): 64-68.
 12. Lattier J.D., Ranney T.G., Lynch N.P. History and cytological reassessment of *Rhododendron canadense*. *Journal of American Rhododendron Society*, 2013, 67: 92-98.
 13. Kalaev V.N., Karpova S.S. The influence of air pollution on cytogenetic characteristics of birch seed progeny. *Forest Genetics*, 2003, 10(1): 11-18.
 14. Kalaev V.N., Butorina A.K. Cytogenetic effect of radiation in seed of oak (*Quercus robur* L.) trees growing on sites contaminated by Chernobyl fallout. *Silvae Genetica*, 2006, 55(3): 93-101 (doi: 10.1515/sg-2006-0014).
 15. Vostrikova T.V. Instability of cytogenetic parameters and genome instability in *Betula pendula* Roth. *Russ. J. Ecol.*, 2007, 38(2): 80-84 (doi: 10.1134/S1067413607020026).
 16. Mashkina O.S., Kuznetsova N.F., Isakov Yu.N., Butorina A.K. Self-fertility in Scots pine as a mechanism of resistance to chemical mutagens. *Russ. J. Ecol.*, 2009, 40: 399-404 (doi: 10.1134/S1067413609060046).
 17. **Wen J.** Internal transcribed spacer phylogeny of the Asian and Eastern North American disjunct *Aralia* Sect. *Dimorphanthus* (*Araliaceae*) and its biogeographic implications. *Int. J. Plant Sci.*, 2000, 161(6): 959-966 (doi: 10.1086/317563).
 18. Baranova T.V., Kalendar' R.N., Kalaev V.N. *Sibirskii lesnoi zhurnal*, 2014, 6: 30-46 (in Russ.).
 19. Schwery O., Onstein R.E., Bouchenak-Khelladi Y., Xing Y., Carter R.J., Linder H.P. As old as the mountains: the radiations of the *Ericaceae*. *New Phytol.*, 2015, 207(2): 355-367 (doi: 10.1111/nph.13234).
 20. Goetsch L., Eckert A.J., Hall B.D. The molecular systematics of *Rhododendron* (*Ericaceae*): a phylogeny based upon *RPB2* gene sequences. *Systematic Botany*, 2005, 30(3): 616-626 (doi: 10.1600/0363644054782170).
 21. Löytynoja A., Goldman N. An algorithm for progressive multiple alignment of sequences with insertions. *PNAS USA*, 2005, 102(30): 10557-10562 (doi: 10.1073/pnas.0409137102).
 22. Lanying Z., Yongqing W., Li Z. Genetic diversity and relationship of *Rhododendron* species based on RAPD analysis. *American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci.*, 2008, 3(4): 626-631.
 23. Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.*, 2011, 28(10): 2731-2739 (doi: 10.1093/molbev/msr121).
 24. Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipiński A., Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.*, 2013, 30(12): 2725-2729 (doi: 10.1093/molbev/mst197).
 25. Mizuta D., Nakatsuka A., Kobayashi N. Development of multiplex PCR markers to distinguish evergreen and deciduous azaleas. *Plant Breeding*, 2008, 127(5): 533-535 (doi: 10.1111/j.1439-0523.2008.01487.x).
 26. Skaptsov M.V., Kutsev M.G., Krasnoborodkina M.A., Trosnichkov A.A., Kaigalov I.V., Shmakov A.I. *Problemy botaniki Yuzhnoi Sibiri i Mongolii*, 2017, **16**: 264-267 (in Russ.).
 27. Skaptsov M.V., Kutsev M.G., Krasnoborodkina M.A., Smirnov S.V., Uvarova O.V., Sinitsyna T.A., Kechaikin A.A., Shmakov A.I. *Turczaninowia*, 2017, 20(4): 119-124 (doi: 10.14258/turczaninowia.20.4.13) (in Russ.).
 28. Li D.Z., Gao L.M., Li H.T., Wang H., Ge X.J., Liu J.Q., Chen Z.D., Zhou S.L., Chen S.L., Yang J.B., Fu C.X., Zeng C.X., Yan H.F., Zhu Y.J., Sun Y.S., Chen S.Y., Zhao L., Wang K., Yang T., Duan G.W. Comparative analysis of a large dataset indicates that internal transcribed spacer (ITS) should be incorporated into the core barcode for seed plants. *PNAS USA*, 2011, 108(49): 19641-19646 (doi: 10.1073/pnas.1104551108).
 29. Milne R.I. Phylogeny and biogeography of *Rhododendron* subsection Pontica, a group with a tertiary relict distribution. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 2004, 33(2): 389-401 (doi: 10.1016/j.ympev.2004.06.009).
 30. Ramzan F., Younis A., Lim K.B. Application of genomic in situ hybridization in horticultural science. *International Journal of Genomics*, 2017, 2017: ID 7561909 (doi: 10.1155/2017/7561909).
 31. Al-Qurainy F., Khan S., Tarroum M., Nadeem M., Alansi S., Alshameri A. Biochemical and genetical responses of *Phoenix dactylifera* L. to cadmium stress. *BioMed Research International*, 2017, 2017: Article ID 9504057 (doi: 10.1155/2017/9504057).
 32. Zhang J.L., Zhang C.Q., Gao L. M., Yang J. B., Li H.T. Natural hybridization origin of *Rhododendron agastum* (*Ericaceae*) in Yunnan, China: inferred from morphological and molecular evidence. *J. Plant Res.*, 2007, 120(3): 457-463 (doi: 10.1007/s10265-007-0076-1).
 33. Zha H.G., Milne R.I., Sun H. Morphological and molecular evidence of natural hybridization between two distantly related *Rhododendron* species from the Sino-Himalaya. *Bot. J. Linn. Soc.*, 2008, 156(1): 119-129 (doi: 10.1111/j.1095-8339.2007.00752.x).

34. Tikhonova N.A., Polezhaeva M.A., Pimenova E.A. AFLP-analysis of genetic diversity in closely related species of rhododendrons subsection *Rhodorastra* (*Ericaceae*) in Siberia and the Russian Far East. *Russ. J. Genet.*, 2012, 48(10): 985-992 (doi: 10.1134/S1022795412100110).
35. Kutsev M.G., Karakulov A.V. *Turczaninowia*, 2010, 13(3): 59-62 (in Russ.).
36. Huang C.C., Hung K.H., Hwang C.C., Huang J.C., Lin H.D., Wang W.K., Wu P.Y., Hsu T.W., Chiang T.Y. Genetic population structure of the alpine species *Rhododendron pseudochrysanthum* sensu lato (*Ericaceae*) inferred from chloroplast and nuclear DNA. *BMC Evol. Biol.*, 2011, 11(1): 108 (doi: 10.1186/1471-2148-11-108).
37. Belousov M.V., Basova E.V., Yusubov M.S., Berezovskaya T.P., Tkachev A.V. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya*, 2000, 3: 45-64 (in Russ.).
38. Karpova E.A., Karakulov A.V. *Turczaninowia*, 2011, 14(3): 145-149 (in Russ.).
39. Vostrikova T.V., Kalaev V.N. *Materialy Mezhdunarodnykh nauchnykh chtenii «Dendrologiya v nachale XXI veka»* [Proc. Int. Conf. Dendrology — at the beginning of XXI century]. St. Petersburg, 2010: 50-53 (in Russ.).
40. Chamberlain D.F., Hyam R., Argent G., Fairweather G., Walter K.S. *The genus Rhododendron, its classification and synonymy*. Royal Botanic Garden Edinburgh, Oxford, 1996.
41. White T.J., Bruns T., Lee S., Taylor J.W. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR Protocols: a guide to methods and applications*. M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky, T.J. White (eds.). Academic Press, San Diego, 1990: 315-322.
42. Alov I.A. *Tsitofiziologiya i patologiya mitotza* [Cytophysiology and pathology of mitosis]. Moscow, 1972 (in Russ.).
43. Kulaichev A.P. *Metody i sredstva kompleksnogo analiza dannykh* [Methods and means of complex data analysis]. Moscow, 2006 (in Russ.).
44. Kazantseva I.A. *Patologiya mitotza v opukholyakh cheloveka* [Pathology of mitosis in human tumors]. Novosibirsk, 1981 (in Russ.).
45. Lebedeva L.I., Fedorova S.A., Trunova S.A., Omelyanchuk L.V. Mitosis: regulation and organization of cell division. *Russ. J. Genet.*, 2004, 40(12): 1313-1330 (doi: 10.1007/s11177-005-0050-8).