

УДК 582.912.42:58.084.1/576.356

## Цитогенетический полиморфизм семенного потомства интродуцентов на примере *Rhododendron ledebourii* Pojark.

Ю. В. Бурменко<sup>1</sup>, Т. В. Баранова<sup>2</sup>, В. Н. Калаев<sup>2</sup>, В. Н. Сорокопудов<sup>3</sup>

<sup>1</sup> ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», ул. Победы, 85,  
г. Белгород, 308015, Россия. E-mail: burmenko@bsu.edu.ru

<sup>2</sup> ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет», Университетская пл., 1, г. Воронеж, 394018, Россия.  
E-mail: tanyavostric@rambler.ru

<sup>3</sup> ФГБНУ «Всероссийский селекционно-технологический институт садоводства и питомниководства»,  
ул. Загорьевская, 4, г. Москва, 115598, Россия. E-mail: sorokopud2301@mail.ru

**Ключевые слова:** интродуцент, митотическая активность, остаточные ядрышки, патологии митоза, семенное потомство, цитогенетический полиморфизм, ядрышковые характеристики.

**Аннотация.** Проведено исследование цитогенетического полиморфизма семенного потомства рододендрона Ледебура (*Rhododendron ledebourii* Pojark.) в условиях Центрального Черноземья. По совокупности цитогенетических показателей проростки разделены на группы, различающиеся по степени стабильности генетического материала (слабомутабельная, мутабельная и промежуточные). Дана цитогенетическая характеристика каждой выделенной группы. У семенного потомства мутабельной группы выявлено снижение митотической активности ( $6,7 \pm 0,2$  %); возрастание числа клеток на стадии профазы митоза ( $55,3 \pm 2,3$  %); увеличение уровня патологий митоза ( $4,0 \pm 0,6$  %), указывающее на высокую цитогенетическую нестабильность; повышение уровня клеток с остаточными ядрышками ( $13,4 \pm 1,4$  %) и площади поверхности одиночных ядрышек ( $79,4 \pm 1,8$  %), что связано с изменением биосинтетических процессов у проростков данной группы. Слабомутабельная группа проростков характеризуется повышенной митотической активностью ( $9,1 \pm 0,2$  %) и низкими значениями цитогенетических нарушений ( $1,2 \pm 0,2$  %). В промежуточных группах отмечаются разнонаправленные тенденции изменения цитогенетических показателей: две из них сходны с мутабельной, две другие – со слабомутабельной группой. Сходные с мутабельной промежуточные группы характеризуются более низким (по сравнению с мутабельной группой) уровнем патологий митоза и клеток с остаточными ядрышками, более высокой площадью поверхности одиночных ядрышек и большим числом ядрышек активного типа. Промежуточные группы, близкие по своим цитогенетическим характеристикам к слабомутабельной, имеют по сравнению с ней более низкий митотический индекс, большую площадь поверхности одиночных ядрышек, в данных группах возможна задержка клеток на стадии профазы митоза и возрастание числа метафаз-анафаз с остаточными ядрышками. Сравнение результатов эксперимента с ранее полученными данными для других древесных растений показало, что в мутабельных группах проростков увеличивается уровень патологий митоза и расширяется их спектр с преобладанием нарушений, связанных с фрагментацией хромосом. Слабомутабельная группа характеризуется минимальными значениями патологий митоза с большим числом мостов в спектре нарушений ( $71,3$  %).

## Cytogenetic polymorphism of seed progeny of introduced plants on the example of *Rhododendron ledebourii* Pojark.

J. V. Burmenko<sup>1</sup>, T. V. Baranova<sup>2</sup>, V. N. Kalaev<sup>2</sup>, V. N. Sorokopudov<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education “Belgorod National Research University”,  
Pobedy St., 85, Belgorod, 308015, Russia

<sup>2</sup> Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education “Voronezh State University”,  
Universitetskaya pl., 1, Voronezh, 394018, Russia

<sup>3</sup> Federal State Budgetary Scientific Institution All-Russian Horticultural Institute for Breeding, Agrotechnology  
and Nursery, Zagorevskaya st., 4, Moscow, 115598, Russia

**Keywords:** an introduced plant, cytogenetic polymorphism, mitotic activity, mitotic pathologies, nucleolar characteristics, persistent nucleoli, seed progeny.

**Summary.** The study was made about cytogenetic polymorphism of *Rhododendron ledebourii* Pojark. seed progeny in the conditions of Central Black Soil Region. Based on the analysis of cytogenetic indices complex seedlings has been separated for groups according to the degree of genetic material stability (low-mutable, mutable and intermediate). It has been provided the cytogenetic characteristic of each selected group. In seed progeny of mutable group it has been showed a reduction in the mitotic activity; an increase in cell number of prophase stage of mitosis; an increase in the level of mitotic pathologies, indicating a high cytogenetic instability; an increase in cells with persistent nucleoli and a surface area of single nucleolus, which is associated with a change in biosynthetic processes in seedlings of this group. Low-mutable group of seedlings is characterized by increased mitotic activity and low values of cytogenetic disturbances. In the intermediate group it has been noted divergent trends of cytogenetic indices: two of them are similar to mutable, two of the other – with low-mutable group. The intermediate group similar to the mutable have the lower (in comparison with mutable group) level of mitotic pathologies and cells with persistent nucleoli, the higher surface area of single nucleoli and the larger number of active type nucleoli. Intermediate groups close to their cytogenetic characteristics to low-mutable have in comparison with it the lower mitotic index, a larger surface area of single nucleoli, in these groups could be a delay cells in prophase of mitosis and an increase in the number of metaphases, anaphases with persistent nucleoli. Comparison of experimental results with earlier findings for other woody plants showed that mutable group of seedlings, increases the level of mitosis pathologies and expanding their range with prevalence of disturbances related to the fragmentation of chromosomes. Low-mutable group is characterized by minimum values of mitotic pathologies with a large number of bridges in the spectrum of disturbances.

### Введение

Исследование полиморфизма у древесных растений чаще всего производится на генетическом и биохимическом уровне (Löytynoja, Goldman, 2005; Mizuta et al., 2008; Li et al., 2011; Tamura et al., 2011, 2013; Motohashi et al., 2014; Ramzan et al., 2017; Skaptsov et al., 2017a–c). Однако цитогенетический полиморфизм, под которым мы понимаем разнообразие цитогенетических показателей и ядрышковых характеристик в пределах популяции, у древесных растений изучен слабее. Ранее был установлен цитогенетический полиморфизм по показателям протекания митоза и ядрышковым характеристикам у проростков семян березы повислой (*Betula pendula* Roth.) (Kalaev et al., 2010), дуба черешчатого (*Quercus robur* L.) (Kalaev, Popova, 2014a) и сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) (Mashkina et al., 2009). Результаты цитогенетических исследований находят применение преимущественно в мониторинге загрязнения окружающей среды и лесонасаждений (Kalaev, Butorina, 2006; Vostrikova, Butorina, 2006; Vostrikova, 2007; Oudalova, Geras'kin, 2012; Korshikov et al., 2012) и реже для решения фундаментальных и прикладных вопросов селекции (Mashkina et al.,

2011; Sedel'nikova et al., 2011). Цитогенетический метод может быть использован для отбора материнских растений, продуцирующих семенное потомство с высоким уровнем стабильности генетического материала, в частности, для выделения растений-маточников декоративных древесных, например, *Rhododendron ledebourii* Pojark.

Генетический полиморфизм рода *Rhododendron* L. ранее был исследован методами AFLP, RAPD-анализа и анализа ITS последовательности (Gao et al., 2002; Lanying et al., 2008; Kutsev, Karakulov, 2010; Huang et al., 2011; Tikhonova et al., 2012). На биохимическом уровне полиморфизм видов рода *Rhododendron* изучался с точки зрения молекулярной систематики (Kutsev, Karakulov, 2010) и хемосистематики (Карпова, Каракулов, 2011). Сведения о цитогенетических показателях *R. ledebourii* в литературе отрывочны (Vostrikova, Kalaev, 2010). Цель настоящей работы состояла в исследовании цитогенетического полиморфизма семенного потомства интродукционной популяции рододендрона Ледебур (*Rh. ledebourii*), произрастающего в условиях Центрального Черноземья, выявлении групп проростков с различным уровнем мутабельности.

### Материалы и методы

Для цитогенетического исследования семенного потомства *R. ledebourii* были использованы семена, собранные от 10 материнских (приблизительно 30–40-летних) фенотипически здоровых растений (без визуальных повреждений паразитами) интродукционной популяции Ботанического сада им. проф. Б. М. Козо-Полянского Воронежского государственного университета.

Проращивание семян осуществляли при температуре + 25 °С. По достижении корешками длины 0,5–1 см их фиксировали в 9 часов утра в ацетоалкоголе – смеси 96%-го этилового спирта и ледяной уксусной кислоты (3:1), после чего материал хранили в холодильнике при температуре +4 °С. Из корешков проростков готовили постоянно-давленные микропрепараты с использованием жидкости Гойера по ранее описанной методике (Butorina et al., 2000).

Выборка из 40 проростков для цитологического исследования считается репрезентативной (Kalaev et al., 2010; Kalaev, Popova, 2014a), поэтому анализировали цитогенетические характеристики такого количества. Препараты изучали с помощью микроскопа LABOVAL-4 (Carl Zeiss, Jena) при общем увеличении  $40 \times 1,5 \times 10$ . В каждом микропрепарате (1 препарат соответствует 1 корешку и одному проростку) анализировали около 500–700 клеток. Всего проанализировано около 25 000 клеток изучаемого вида.

На микропрепаратах исследовали следующие цитогенетические показатели: митотическую активность, показателем которой является митотический индекс (МИ) – отношение числа делящихся клеток к общему числу подсчитанных клеток (в %), процентное соотношение числа клеток по стадиям митоза, уровень патологий митоза (как отношение числа клеток с нарушениями к общему числу делящихся клеток, в %), уровень клеток с остаточными ядрышками на стадии метафазы-анафазы митоза (как отношение числа клеток с остаточными ядрышками от общего числа клеток на указанных стадиях, в %). Классификацию патологических митозов проводили по И. А. Алову (Alov, 1972).

Для изучения ядрышковых характеристик в клетках корневой меристемы семенного потомства *R. ledebourii* производили измерение диаметра ядрышек с помощью окулярмикрометра (анализировали по 200 клеток на каждом препарате) и высчитывали площадь поверхности ядрышек (в  $\mu\text{м}^2$ ), определяли процент ядрышек различных типов по классификации, предложенной П. В. Челидзе и О. В. Зацепиной (Chelidze,

Zatsepina, 1988). На препаратах были отмечены ядрышки типа «компактные», «кора-сердцевина» (высокоактивные) и «кора-сердцевина вакуолизованные», «вакуолизованные» (умеренно активные). Ядрышковая активность была исследована по следующим характеристикам: площади поверхности ядрышек и % клеток с определенным типом ядрышек.

Производили компьютерную статистическую обработку данных с помощью пакета программ Stadia 6.0. Процедура группировки данных и их обработка изложены в работе А. П. Кулаичева (Kulaichev, 1996). Сравнение выборок по уровню патологий митоза и уровню клеток с остаточными ядрышками проводили с использованием X-критерия рангов Ван-дер-Вардена, так как данный признак не подчиняется нормальному распределению.

Для оценки степени варьирования признака использовали коэффициент вариации (Cv), который определяли согласно рекомендациям Г. Ф. Лакина (Lakin, 1990). Cv менее 10 % соответствует низкой степени варьирования признака, от 10 до 25 % – средней, свыше 25 % – высокой (Lakin, 1990).

Кластерный анализ проводили с использованием метрики нормированного Эвклидова расстояния, стратегия группировки группового соседа. В матрицу данных для кластерного анализа включали следующие цитогенетические показатели семенного потомства: митотический индекс, подсчитанный с учетом клеток на стадии профазы (в %), митотический индекс, подсчитанный без учета клеток на стадии профазы (в %), % клеток в профазе, % клеток в метафазе, % клеток в ана-телофазе, уровень патологий митоза (в %), уровень клеток с остаточными ядрышками на стадии метафазы–телофазы митоза (в %), площадь поверхности одиночных ядрышек ( $\mu\text{м}^2$ ), площадь поверхности ядрышек типа «кора-сердцевина» ( $\mu\text{м}^2$ ), «кора-сердцевина вакуолизованные» ( $\mu\text{м}^2$ ), «компактные» ( $\mu\text{м}^2$ ), «вакуолизованные» ( $\mu\text{м}^2$ ), % клеток с определенным типом ядрышек. Правильность классификации проростков и отнесения их в ту или иную группу была подтверждена результатами дискриминантного анализа с использованием критерия Махаланобиса.

### Результаты и обсуждение

Цитогенетические показатели семенного потомства рододендрона Ледебура представлены в таблице 1. Коэффициент вариации цитогенетических характеристик семенного потомства *R.*

*ledebourii* показал среднюю и высокую степень изменчивости. Высокий коэффициент вариации характерен для таких параметров, как митотический индекс, подсчитанный с учетом стадии профазы (26,2 %), число клеток на стадии метафазы (37,2 %) и уровень клеток с остаточными ядрышками (40,4 %). Однако наиболее высокий

коэффициент вариации отмечается у такого цитогенетического показателя как уровень патологий митоза (57,1 %), что может свидетельствовать о генетической гетерогенности семенного потомства и наличии различных по стабильности генетического материала групп проростков в выборке.

Таблица 1

Цитогенетические характеристики семенного потомства *Rhododendron ledebourii* Pojark.

Показатели	Значения	Cv, %
Митотический индекс, подсчитанный с учетом профазы, %	7,8 ± 0,2	15,4
Митотический индекс, подсчитанный без учета профазы, %	4,2 ± 0,2	26,2
% клеток на стадии профазы митоза	48,2 ± 1,3	16,8
% клеток на стадии метафазы митоза	13,3 ± 0,8	37,2
% клеток на стадии анафазы-телофазы митоза	38,8 ± 1,3	21,7
Уровень патологий митоза, %	2,8 ± 0,2	57,1
Уровень клеток с остаточными ядрышками, %	9,4 ± 0,6	40,4
Площадь поверхности ядрышек типа «кора-сердцевина», мкм <sup>2</sup>	75,1 ± 1,3	11,3
Поверхности ядрышек типа «кора-сердцевина вакуолизированные», мкм <sup>2</sup>	81,7 ± 2,5	19,6
Площадь поверхности компактных ядрышек, мкм <sup>2</sup>	48,0 ± 1,9	24,6
Площадь поверхности вакуолизированных ядрышек, мкм <sup>2</sup>	45,8 ± 1,2	16,8
Площадь поверхности одиночных ядрышек, мкм <sup>2</sup>	72,8 ± 1,5	12,6
% ядрышек типа «кора-сердцевина»	53,3 ± 1,2	14,5
% ядрышек типа «кора-сердцевина вакуолизированные»	31,1 ± 0,9	19,0
% компактных ядрышек	9,8 ± 0,6	39,8
% вакуолизированных ядрышек	5,6 ± 0,3	37,5

С помощью кластерного анализа (по совокупности цитогенетических характеристик) все анализируемые растения были разделены на группы: мутабельные, слабомутабельные и промежуточные, используя в качестве главного критерия уровень нарушений митотического деления клеток (уровень патологий митоза). Проростки с высоким уровнем патологий митоза относили к мутабельной группе, с низкими значениями патологий – к слабомутабельной группе. Кроме того, выделяли промежуточные группы, которые приближались по своим характеристикам к слабомутабельной и мутабельной группе. Мутабельная группа (№ 4, составляет 20 % от общего числа исследованных проростков) характеризуется максимальным уровнем патологий митоза (4,0 ± 0,6 %), высоким уровнем клеток с остаточными ядрышками (13,4 ± 1,4 %), наибольшим числом клеток на стадии профазы (55,3 ± 2,3 %), самым низким числом клеток в ана-телофазе (31,4 ± 1,9 %), невысоким митотическим индексом (6,7 ± 0,2 %), особенно митотическим индексом, подсчитанным без учета профазы, (3,0 ± 0,2 %), что свидетельствует о задержке клеток на стадии профазы (табл. 2), неспособности клеток

перейти на следующую стадию митоза, обусловленной повреждением генетического материала либо нарушением синтеза белков веретена деления, приводя к ингибированию ростовых процессов у семенного потомства данной группы. Такое явление отмечалось нами ранее у других древесных объектов в условиях антропогенного загрязнения: березы повислой, дуба черешчатого (Butorina et al., 2000). В спектре патологий митоза преобладали отставания хромосом в анафазе и метакинезе (92,8 %), встречалась агглютинация хроматина (5,5 %), мосты были единичны.

Слабомутабельная группа (№ 1, составляет 17,5 % от общего числа исследованных проростков) характеризуется противоположными параметрами: более высоким митотическим индексом, подсчитанным с учетом (9,1 ± 0,2 %) и без учета клеток на стадии профазы (5,7 ± 0,1 %), наибольшим числом клеток в ана-телофазе (45,9 ± 1,4 %), наименьшим числом клеток в профазе (37,7 ± 1,3 %), низким уровнем клеток с остаточными ядрышками (5,9 ± 0,3 %) и минимальным уровнем патологий митоза (1,2 ± 0,2 %) (различия с мутабельной группой достоверны, P < 0,001). Спектр патологий митоза в клетках



Таблица 2  
Цитогенетические характеристики различных по мутабельности групп семенного потомства *Rhododendron ledebourii* Rojanck.

Группы	1	2	3	4	5	6
МИ, подсчитанный с учетом стадии профазы, %	9,1 ± 0,2*	8,5 ± 0,5*	8,4 ± 0,3*	6,7 ± 0,2	6,4 ± 0,1	7,6 ± 0,3*
МИ, подсчитанный без учета стадии профазы, %	5,7 ± 0,1*	5,1 ± 0,2*	4,6 ± 0,2*	3,0 ± 0,2	3,0 ± 0,1	3,9 ± 0,2*
% клеток в профазе	37,7 ± 1,3*	39,9 ± 1,3*	46,1 ± 1,2*	55,3 ± 2,3	53,6 ± 1,3	52,4 ± 1,6
% клеток в метафазе	14,3 ± 1,2	12,7 ± 1,8 <sup>a</sup>	13,1 ± 1,9 <sup>a</sup>	13,0 ± 2,0	11,0 ± 1,3	14,7 ± 2,5
% клеток в анафазе-телофазе	45,9 ± 1,4*	45,1 ± 3,0*	40,5 ± 3,4*	31,4 ± 1,9	37,4 ± 3,3	36,6 ± 2,7
Уровень патологий митоза, %	1,2 ± 0,2*	1,4 ± 0,1*	2,5 ± 0,4*	4,0 ± 0,6	3,7 ± 0,2*	3,5 ± 0,6*
Уровень клеток с остаточными ядрышками, %	5,9 ± 0,3*	5,0 ± 0,2*	8,4 ± 0,9*	13,4 ± 1,4	11,6 ± 0,9*	9,3 ± 0,8*
площадь поверхности ядрышек типа «кора-сердцевина», мкм <sup>2</sup>	67,4 ± 1,6*	68,0 ± 0,4*	68,1 ± 1,2*	80,5 ± 2,2	83,8 ± 0,8*	82,1 ± 2,6
площадь поверхности ядрышек «кора-сердцевина вакуолизированные», мкм <sup>2</sup>	61,9 ± 5,8*	75,4 ± 2,1*	74,5 ± 3,8*	90,4 ± 1,2	95,4 ± 2,4*	91,1 ± 4,9
площадь поверхности «компактных» ядрышек, мкм <sup>2</sup>	45,1 ± 1,8*	42,9 ± 6,3*	46,6 ± 2,5*	50,9 ± 3,4	42,8 ± 0,9*	52,0 ± 7,3 <sup>c</sup>
площадь поверхности «вакуолизированных» ядрышек, мкм <sup>2</sup>	42,6 ± 2,2*	45,6 ± 2,3*	44,6 ± 1,5*	50,4 ± 2,7	41,8 ± 0,8*	48,2 ± 4,4
площадь поверхности одиночных, мкм <sup>2</sup>	61,7 ± 2,2*	66,6 ± 1,3*	67,2 ± 1,9*	79,4 ± 1,8	80,4 ± 0,8	79,7 ± 2,7
% ядрышек типа «кора-сердцевина»	51,3 ± 1,3	63,3 ± 2,8*	51,1 ± 2,3 <sup>c</sup>	52,6 ± 1,5	52,2 ± 1,2	54,5 ± 4,3
% ядрышек типа «кора-сердцевина вакуолизированные»	32,7 ± 1,0	24,0 ± 1,8*	35,5 ± 1,9 <sup>d</sup>	32,6 ± 1,3	31,4 ± 2,0	27,1 ± 2,6
% компактных ядрышек	8,7 ± 1,3*	8,8 ± 1,4*	7,8 ± 1,3*	10,4 ± 1,0	10,8 ± 0,9	11,8 ± 2,0*
% вакуолизированных ядрышек	6,6 ± 0,8*	4,0 ± 0,4 <sup>b</sup>	5,3 ± 0,9	4,4 ± 0,4	5,6 ± 0,6	6,6 ± 0,9*

Примеч.: 1 – слабомутабельная группа; 2 – промежуточная группа; 3 – промежуточная группа; 4 – мутабельная группа; 5 – промежуточная группа; 6 – промежуточная группа; МИ – Митотический индекс.

Различия с группой № 4 (мутабельной) достоверны: \*

слабомутабельной группы был представлен преимущественно мостами (71,3 %), что позволяет говорить о более активной работе системы репарации (Simakov, 1983). Отмечались отстаивания хромосом в анафазе и метакинезе (28,7 %).

При сравнении слабомутабельной и мутабельной групп выявлено, что в последней площадь поверхности одиночных ядрышек и площади поверхности ядрышек каждого типа в отдельности выше, составляя для «кора-сердцевина»  $80,5 \pm 2,2$  %, «кора-сердцевина вакуолизованные»  $90,4 \pm 1,2$  % (различия со слабомутабельной группой достоверны,  $P < 0,01$ ), для «компактных»  $50,9 \pm 3,4$  % и «вакуолизованных»  $50,9 \pm 2,7$  % (различия со слабомутабельной группой достоверны,  $P < 0,05$ ), а число клеток с умеренно активными «вакуолизованными» ядрышками ниже (различия со слабомутабельной группой достоверны,  $P < 0,05$ ) (табл. 2).

В клетках апикальной меристемы корня проростков *R. ledebourii* установлено увеличение площади поверхности одиночных ядрышек в мутабельной группе, что указывает на усиление ядрышковой активности (Arkhipchuk, 1995). Повышение уровня патологий митоза и площадей поверхности одиночных ядрышек в мутабельной группе отмечено в ранее выполненных исследованиях цитогенетического полиморфизма семенного потомства березы повислой (*Betula pendula*) (Kalaev et al., 2010), дуба черешчатого (*Quercus robur*) (Kalaev, Popova, 2014a) и сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris*) (Mashkina et al., 2009). Было показано, что соотношение ядрышек «кора-сердцевина» и «кора-сердцевина вакуолизованные», являющихся типичными в корневой меристеме проростков, меняется в различных по степени мутабельности группах проростков и считается характерным признаком группы (Kalaev et al., 2010). Уровень остаточных ядрышек при делении клеток более высок у проростков мутабельной группы, что, возможно, свидетельствует об усилении метаболической функции в организме.

Как правило, в норме в делящихся клетках ядрышко отсутствует. Феномен появления ядрышкоподобных структур (рис.), соединенных с хромосомами в метафазе, анафазе и ранней телофазе митоза, когда ядерная оболочка отсутствует, хромосомы еще значительно сокращены, а ядрышко во время деления не исчезает, описан у многих растительных и животных объектов (Sheldon et al., 1961; Hsu et al., 1964; Nickols, 1970; Butorina, Isakov, 1989). Такие структуры получили название “persistent nucleo-

li” – остаточные ядрышки. Наличие остаточных ядрышек при делении клеток было обнаружено А. К. Буториной и названо частным случаем усиления ядрышковой активности, адаптационным механизмом на воздействие неблагоприятных условий среды (Butorina et al., 1997). Увеличение уровня клеток с остаточными ядрышками свидетельствует об усилении ядрышковой активности, что происходит за счет дополнительной синтетической деятельности рибосомальных генов.

По цитогенетическим показателям к мутабельной группе наиболее приближена промежуточная группа № 5 (12,5 % от общего числа исследованных проростков). Последняя характеризуется более низким по сравнению с мутабельной группой уровнем патологий митоза и клеток с остаточными ядрышками, меньшей площадью поверхности «вакуолизованных» и «компактных» ядрышек (табл. 2), но наибольшей площадью поверхности ядрышек типа «кора-сердцевина», «кора-сердцевина вакуолизованные», что указывает на повышение ядрышковой активности по сравнению с мутабельной и другими группами. Промежуточная группа № 6 (20 % от общего числа исследованных проростков) отличалась от мутабельной и промежуточной группы № 5 более высоким митотическим индексом, подсчитанным с учетом и без учета профазы, более низким уровнем патологий митоза и клеток с остаточными ядрышками (табл. 2). В данной группе площадь поверхности и число клеток с «компактными» ядрышками (активного типа) повышались по сравнению с этим показателем у мутабельной и промежуточной группы № 5. Изменения перечисленных параметров свидетельствуют о большей цитогенетической стабильности проростков в данной группе, чем в мутабельной.

Промежуточная группа № 2 (10 % от общего числа исследованных проростков) по цитологическим показателям наиболее приближена к слабомутабельной группе, различаясь с ней более низким митотическим индексом (подсчитанным с учетом и без учета профазы) и более низким уровнем клеток с остаточными ядрышками (табл. 2). Однако в данной группе ядрышковая активность повышена за счет увеличения площади поверхности ядрышек умеренно активного типа «кора-сердцевина вакуолизованные» и числа активных ядрышек. Число клеток с ядрышками «кора-сердцевина вакуолизованные» и «вакуолизованные» снижалось, число клеток с ядрышками активного типа «кора-сердцевина» было наибольшим по сравнению с дру-

гими группами (табл. 2). Возможно, невысокая площадь поверхности ядрышек данного типа компенсируется их увеличенным числом, что позволяет говорить об усилении ядрышковой активности.

В отличие от слабомутабельной, промежуточная группа № 3 (20 % от общего числа исследованных проростков) характеризовалась меньшим митотическим индексом (подсчитанным с учетом и без учета профазы), более низким числом клеток в стадии метафазы и ана-телофазы, более высоким уровнем клеток на стадии профазы (табл. 2). Повышенный уровень патологий митоза и клеток с остаточными ядрышками в промежуточной группе № 3 (табл. 2) указывает на меньшую цитогенетическую стабильность данной группы по сравнению со слабомутабельной и промежуточной группой № 2.

Между собой промежуточные группы № 2 и № 3 различались по числу клеток в профазе,

уровню клеток с остаточными ядрышками и уровню патологий митоза, которые были более высокими в группе № 3. Кроме того, у последней число ядрышек активного типа «кора-сердцевина» снижался, но отмечалось увеличение клеток с ядрышками умеренно-активного типа «кора-сердцевина вакуолизированные» (табл. 2).

Полученные данные об изменчивости цитогенетических показателей семенного потомства позволяют говорить о наличии полиморфизма на клеточном уровне у проростков семян *R. ledebourii*, произрастающего в условиях интродукции. Ранее у данного вида было обнаружено значительное морфологическое разнообразие (Tikhonova et al., 2012). Высокая генетическая гетерогенность внутри популяции по каким-либо признакам способствует выживанию видов древесных в неблагоприятных условиях, что было показано у бука европейского и некоторых хвойных (сосны обыкновенной, ели красной и др.)

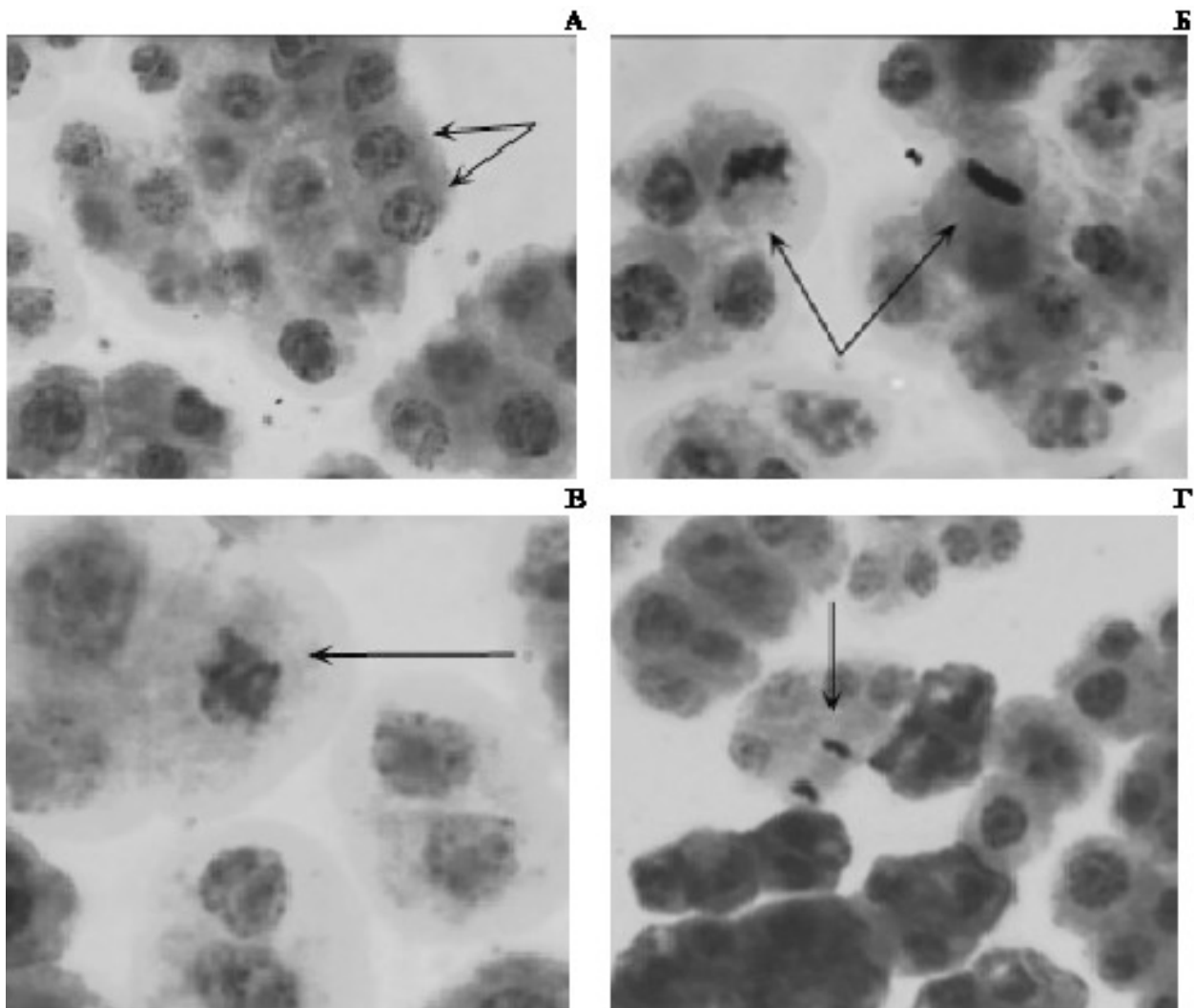


Рис. Стадии митоза в клетках апикальной меристемы корня проростков семян *Rhododendron ledebourii* Pojark.: А – телофаза; Б – метафаза (слева – остаточное ядрышко в метафаза, справа – норма); В – профазы; Г – анафаза.

(Geburek et al., 1987; Hertel, 1992). Было установлено, что более гетерозиготные особи имеют больший спектр адаптивных возможностей для выживания и формирования жизнестойких популяций в условиях загрязненной среды (De Hayes, Hawley, 1992).

О большей адаптированности к условиям среды лесных древесных растений, семенное потомство которых в цитогенетических исследованиях показало более низкий уровень хромосомных aberrаций, свидетельствовали проведенные позднее эксперименты по изучению ростовых показателей проростков и семян дуба черешчатого (Kalaev, Porova, 2014a, б). Была установлена связь между цитогенетическими и морфометрическими характеристиками. Сеянцы, полученные из выборок проростков с повышенной митотической активностью и низким уровнем патологий митоза (слабомутабельные), проявляли лучшую ростовую активность.

Наиболее близкий результат в сравнительном аспекте изучения цитогенетического полиморфизма древесных растений, в том числе *R. ledebourii*, нами отмечен для *Q. robur* (Kalaev, Porova, 2014a), у которого на экологически чистых территориях отмечаются преимущественно проростки промежуточных групп. Можно предположить, что семенное потомство *R. ledebourii*, обладающее меньшей мутабельностью, будет более адаптировано в условиях интродукции по сравнению с другими проростками. Слабомутабельные экземпляры могут быть впоследствии использованы для озеленения загрязненных территорий.

Таким образом, у семенного потомства мутабельной группы выявлено снижение мито-

тической активности ( $6,7 \pm 0,2 \%$ ), возрастание числа клеток на стадии профазы митоза ( $55,3 \pm 2,3 \%$ ), увеличение уровня патологий митоза ( $4,0 \pm 0,6 \%$ ), указывающее на высокую цитогенетическую нестабильность, повышение уровня клеток с остаточными ядрышками ( $13,4 \pm 1,4 \%$ ) и площади поверхности одиночных ядрышек ( $79,4 \pm 1,8 \%$ ), что связано с изменением биосинтетических процессов у проростков данной группы. Слабомутабельная группа проростков характеризуется повышенной митотической активностью ( $9,1 \pm 0,2 \%$ ) и низкими значениями цитогенетических нарушений ( $1,2 \pm 0,2 \%$ ). В промежуточных группах отмечаются разнонаправленные тенденции изменения цитогенетических показателей: две из них сходны с мутабельной, две другие – со слабомутабельной группой.

Установление цитогенетических реакций семенного потомства *R. ledebourii* на измененные условия обитания позволит выявлять проростки с разным уровнем стабильности генетического материала. Разделение семенного потомства на группы позволяет выявить наиболее резистентные и неустойчивые по цитогенетическим показателям родительские особи. В дальнейшем родительские особи могут быть использованы в генетико-селекционных работах для получения различного по мутабельности потомства.

#### Благодарности

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

#### REFERENCES / ЛИТЕРАТУРА

- Alov I. A. 1972. *Cytofisiologiya i patologiya mitosa* [Cytophysiology and pathology of mitosis]. Medicine, Moscow, 232 pp. [In Russian]. (Алов И. А. Цитофизиология и патология митоза. М.: Медицина, 1972. 232 с.)
- Arkhipchuk V. V. 1995. The use of nucleolus characteristics in biotesting. *Cytology and genetics* 29, 3: 6–9 [In Russian]. (Архипчук В. В. Использование ядрышковых характеристик в биотестировании // Цитология и генетика, 1995. Т. 29, № 3. С. 6–9).
- Butorina A. K., Isakov Yu. N. 1989. Puffing of chromosomes in the metaphase – telophase of the mitotic cycle in *Quercus robur*. *Reports of the Academy of Science USSR* 9, 4: 987–988.
- Butorina A. K., Kalaev V. N., Vostrikova T. V., Myagkova O. E. 2000. Cytogenetic characteristics of seed progeny of *Quercus robur* L., *Pinus sylvestris* L., and *Betula pendula* Roth under conditions of anthropogenic contamination in the city of Voronezh. *Cytology* 42(2): 196–201.
- Butorina A. K., Kosichenko N. E., Isakov Yu. N., Pozhidaeva I. M. 1997. The effects of irradiation from the Chernobyl nuclear power plant accident on the cytogenetic behaviour and anatomy of trees. In: *Cytogenetic Studies of Forest Trees and Shrub Species*. Croatia, Zagreb, 211–226 pp.
- Belousov M. V., Mashkina O. S., Popov V. N. 2012. Cytogenetic response of Scots pine (*Pinus sylvestris* L., 1753) (Pinaceae) to heavy metals. *Comparative Cytogenetics* 6(1): 93–106. DOI: 10.3897/CompCytogen.v6i1.2017



- Chelidze, V. P., Zatssepina O. V.** 1988. Morpho-functional classification of nucleoli. *Successes of modern biology* 105(2): 252–267 [In Russian]. (**Челидзе В. П., Зацепина О. В.** Морфофункциональная классификация ядрышек // Успехи современной биологии, 1988. Т. 105, вып. 2. С. 252–267).
- De Hayes D. H., Hawley G. L.** 1992. Genetic implications in the decline of red spruce. *Water, Air, & Soil Pollution* 62, 3–4: 233–248.
- Gao L. M., Li D. Z., Zhang C. Q., Yang J. B.** 2002. Infrageneric and sectional relationships in the genus *Rhododendron* (Ericaceae) inferred from ITS sequence data. *Acta Botanica Sinica* 44(11): 1351–1356.
- Geburek Th., Scholz F., Knabe W., Vornweg A.** 1987. Genetic studies by isozyme gene loci on tolerance and sensitivity in an air polluted *Pinus sylvestris* field trial. *Silvae Genetica* 36(2): 49–53.
- Hertel H.** 1992. Aims and results of basic research in the Institute of forest tree breeding in Waldsiefersdorf, Germany. 2. The use of enzyme gene marks for practical breeding tasks. *Silvae genetica* 41(3): 201–204.
- Hsu T. S., Humphrey R. M., Somers C. E.** 1964. Persistent nucleoli in animal cells following treatments with fluorodeoxyuridine and thymidine. *Experimental cell research* 33(1–2): 74–77.
- 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.** 2011. Genetic population structure of the alpine species *Rhododendron pseudochrysanthum sensu lato* (Ericaceae) inferred from chloroplast and nuclear DNA. *BMC evolutionary biology* 11(1): 108. DOI: 10.1186/1471-2148-11-108
- Kalaev V. N., Butorina A. K.** 2006. Cytogenetic Effect of Radiation in Seed of Oak (*Quercus robur* L.) Trees Growing on Sites Contaminated by Chernobyl Fallout. *Silvae Genetica* 55(1–6): 93–101.
- Kalaev V. N., Karpova S. S., Artyukhov V. G.** 2010. Cytogenetic Characteristics of Weeping Birch (*Betula pendula* Roth) Seed Progeny in Different Ecological Conditions. *Bioremediation, biodiversity & bioavailability* 4(1): 77–83.
- Kalaev V. N., Popov A. A.** 2014 a. Cytogenetic polymorphism of sprouted seeds of trees of *Quercus robur* L. on territories with different level of anthropogenic pollution. *Problems of regional ecology* 2: 176–190 [In Russian]. (**Калаев В. Н., Попова А. А.** Цитогенетический полиморфизм проростков семян деревьев дуба черешчатого (*Quercus robur* L.) на территориях с разным уровнем антропогенного загрязнения // Проблемы региональной экологии, 2014. № 2. С. 176–190).
- Kalaev V. N., Popov A. A.** 2014b. Cytogenetic features and morphological parameters of seed progeny of trees of *Quercus robur* L. growing on territories with different level of anthropogenic pollution. *Bulletin of Voronezh state University. Chemistry Series. Biology. Pharmacy* 4: 63–72 [In Russian]. (**Калаев В. Н., Попова А. А.** Цитогенетические характеристики и морфологические показатели семенного потомства деревьев дуба черешчатого (*Quercus Robur* L.), произрастающих на территориях с разным уровнем антропогенного загрязнения // Вестник Воронежского государственного университета. Серия Химия. Биология. Фармация, 2014. № 4. С. 63–72).
- Karpova E. A., Karakulov A. V.** 2011. Phenolic compounds of closely related species of *Rhododendron* L. (Ericaceae). *Turczaninowia* 14, 3: 145–149 [In Russian]. (**Карпова Е. А., Каракулов А. В.** Фенольные соединения близкородственных видов рода *Rhododendron* L. (Ericaceae) // Turczaninowia, 2011. Т. 14, вып. 3. С. 145–149).
- Kulaichev A. P.** 1996. *Methods and tools for data analysis in the Windows environment. Stadia 6.0.* Computer Science and computers, Moscow, 257 pp. [In Russian]. (**Кулаичев А. П.** Методы и средства анализа данных в операционной среде Windows. Stadia 6.0. М.: Информатика и компьютеры, 1996. 257 с.).
- Korshikov I. I., Tkacheva Yu. A., Privalikhin S. N.** 2012. Cytogenetic Abnormalities in Norway Spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) Seedlings from Natural Populations and an Introduction Plantation. *Cytology and Genetics* 46(5): 280–284. DOI: 10.3103/S0095452712050064
- Kutsev M. G., Karakulov A. V.** 2010. Reconstruction of the phylogeny of the genus *Rhododendron* L. (Ericaceae) flora of Russia on the basis of the sequences of spacers ITS1-ITS2. *Turczaninowia* 13, 3: 59–62 [In Russian]. (**Кутсев М. Г., Каракулов А. В.** Реконструкция филогении рода *Rhododendron* L. (Ericaceae) флоры России на основе последовательностей спейсеров ITS1-ITS2 // Turczaninowia, 2010. Т. 13, вып. 3. С. 59–62).
- Lakin G. F.** 1990. *Biometriya [Biometrics]*. Higher school, Moscow, 352 pp. [In Russian]. (**Лакин Г. Ф.** Биометрия. М.: Высшая школа, 1990. 352 с.).
- Lanying Z., Yongqing W., Li Z.** 2008. Genetic diversity and relationship of *Rhododendron* species based on RAPD analysis. *American-Eurasian J. Agric. Environ. Sci.* 3: 626–631.
- Li D. Z., Gao L. M., Li H. T., et al.** 2011. Comparative analysis of a large dataset indicates that internal transcribed spacer (ITS) should be incorporated into the core barcode for seed plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108(49): 19641–19646. DOI: 10.1073/pnas.1104551108
- Löytynoja A., Goldman N.** 2005. An algorithm for progressive multiple alignment of sequences with insertions. *Proceedings of the National academy of sciences of the United States of America* 102(30): 10557–10562.
- Mashkina O. S., Butorina A. K., Tabackaja T. M.** 2011. Karelian Birch as a Model for Studying Genetic and Epigenetic Variation Related to the Formation of Patterned Wood. *Russian journal of genetics* 47(8): 951. DOI: 10.1134/S1022795411080126
- Mashkina O. S., Kalaev V. N., Muray L. P., Lelikova E. S.** 2009. Cytogenetic response of seed progeny of Scots pine to combined anthropogenic pollution in the area of Novolipetsk metallurgical combine. *Ecologicheskaya genetika [Ecological genetics]* 7, 3: 17–29 [In Russian]. (**Машкина О. С., Калаев В. Н., Мурая Л. С., Леликова Е. С.**

Цитогенетические реакции семенного потомства сосны обыкновенной на комбинированное антропогенное загрязнение в районе Новолипецкого металлургического комбината // Экологическая генетика, 2009. Т. 7, № 3. С. 17–29).

**Mashkina O. S., Kuznetsova N. F., Isakov Yu. N., Butorina A. K.** 2009. Self-fertility in Scots Pine as a mechanism of resistance to chemical mutagens. *Russian journal of ecology* 40(6): 399. DOI: 10.1134/S1067413609060046

**Mizuta D., Nakatsuka A., Kobayashi N.** 2008. Development of multiplex PCR markers to distinguish evergreen and deciduous azaleas. *Plant breeding* 127(5): 533–535. DOI: 10.1111/j.1439-0523.2008.01487.x

**Motohashi Ts., Smirnov S. V., Kucev M., Shmakov A. I., Kondo K. A.** 2014. Study of chromosome numbers of *Petasites frigidus* (L.) Fries and *Petasites radiatus* (JF Gmel.) Toman (Asteraceae) of Altai, Russia. *Chromosome Botany* 9, 3: 65–67. DOI: 10.3199/iscb.9.65

**Nickols W. W.** 1970. Virus-induced chromosome abnormalities. *Ann. Rev. Microbiol.* 24: 479–498.

**Oudalova A. A., Geras'kin S. A.** 2012. The time dynamics and ecological genetic variation of cytogenetic effects in the Scots Pine populations experiencing anthropogenic impact. *Biology Bulletin Reviews* 2(3), 254–267. DOI: 10.1134/S207908641203005X

**Ramzan F., Younis A., Lim K. B.** 2017. Application of genomic in situ hybridization in horticultural science. *International journal of genomics* (2017), ID 7561909, 12 pp. URL: <https://doi.org/10.1155/2017/7561909>

**Sedel'nikova T. S., Muratova E. N., Pimenov A. V.** 2011. Variability of chromosome numbers in gymnosperms. *Biology Bulletin Reviews* 1(2): 100–109. DOI: 10.1134/S2079086411020083.

**Sheldon S., Speers W. S., Lehman J.** 1961. Nucleolar persistence in embryonal carcinoma cells. *Experimental cell research* 132(1): 185–192.

**Simakov E. A.** 1983. Postradiation the restoration of cytogenetic damage in seedlings of seeds of various forms of potato. *Radiobiology* 23(5): 703–706 [In Russian]. (**Симаков Е. А.** О пострadiационном восстановлении цитогенетических повреждений в проростках семян разных форм картофеля // Радиобиология, 1983. Т. 23, вып. 5. С. 703–706).

**Skaptsov M. V., Kutsev M. G., Krasnoborodkina M. A., Smirnov S. V., Uvarova O. V., Sinitsyna T. A., Kechaykin A. A., Shmakov A. I.** 2017a. Sequencing and GO annotation of transcriptome the culture of cells and tissues in vitro *Rumex acetosa*. *Turczaninowia* 20, 4: 119–124 [In Russian]. (**Скапцов М. В., Куцев М. Г., Краснобородкина М. А., Смирнов С. В., Уварова О. В., Синицына Т. А., Кечайкин А. А., Шмаков А. И.** Секвенирование и GO аннотация транскриптома культуры клеток и тканей *Rumex acetosa* in vitro // Turczaninowia, 2017a. Т. 20, вып. 4. С. 119–124. DOI: 10.14258/turczaninowia.20.4.13.

**Skaptsov M. V., Kutsev M. G., Krasnoborodkina M. A., Trosnichkov A. A., Kaygalov I. V., Shmakov A. I.** 2017b. Variability of methylation of satellite DNA and mobile genetic elements *Rumex acetosa* in vitro. In: *Problems of botany of South Siberia and Mongolia: Proceedings of the 16th International Scientific and Practical Conference (Barnaul, 5–8 June 2017)*. Concept, Barnaul, 264–267 pp. [In Russian]. (**Скапцов М. В., Куцев М. Г., Краснобородкина М. А., Тросничков А. А., Кайгалов И. В., Шмаков А. И.** Изменчивость метилирования сателлитной ДНК и мобильных генетических элементов *Rumex acetosa* в культуре in vitro // Проблемы ботаники Южной Сибири и Монголии: материалы XVI Междунар. научн.-практ. конф. Барнаул: Концепт, 2017b. С. 264–267).

**Skaptsov M. V., Lomonosova M. N., Kutsev M. G., Smirnov S. V., Shmakov A. I.** 2017c. The phenomenon of endopolyploidy in some species of the Chenopodioideae (Amaranthaceae). *Botany Letters* 164(1): 47–53. DOI: 10.1080/23818107.2016.1276475.

**Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S.** 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular biology and evolution* 28(10): 2731–2739. DOI:10.1093/molbev/msr121.

**Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., Kumar S.** 2013. MEGA 6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular biology and evolution* 30(12): 2725–2729. DOI: 10.1093/molbev/mst197

**Tikhonova N. A., Polezhaeva M. A., Pimenova E. A.** 2012. AFLP analysis of the genetic diversity of closely related *Rhododendron* species of the section *Rhodorastra* (Ericaceae) from Siberia and the Far East of Russia. *Russian journal of genetics* 48(10): 985–992. DOI: 10.1134/S1022795412100110.

**Vostrikova T. V.** 2007. Instability of cytogenetic parameters and genome instability in *Betula pendula* Roth. *Russian Journal of Ecology* 38, 2: 80–84. DOI:10.1134/S1067413607020026.

**Vostrikova T. V., Butorina A. K.** 2006. Cytogenetic responses of birch to stress factors. *Biology Bulletin* 33(2): 185–190. DOI: 10.1134/S1062359006020142.

**Vostrikova T. V., Kalaev V. N.** 2010. Cytogenetic analysis of some species of trees and shrubs in urban zone. In: *Dendrology in early XXI century: materials of Intern. scientific. read. memory of E. L. Wolf (St. Petersburg, October 6–7)*. St. Petersburg, 50–53 pp. [In Russian]. (**Вострикова Т. В., Калаев В. Н.** Цитогенетические характеристики некоторых видов деревьев и кустарников в условиях городской зоны // Дендрология в начале XXI века: материалы Междунар. научн. чтен. памяти Э. Л. Вольфа (Санкт-Петербург, 6–7 октября 2010 г.). СПб., 2010. С. 50–53).