

УДК 575.86

М.Г. Куцев¹
А.В. Каракулов²M.G. Kutsev
A.V. Karakulov**РЕКОНСТРУКЦИЯ ФИЛОГЕНИИ РОДА *RHODODENDRON* L. (ERICACEAE)
ФЛОРЫ РОССИИ НА ОСНОВЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ СПЕЙСЕВ ITS1-ITS2****RECONSTRUCTION OF PHYLOGENY OF THE GENUS *RHODODENDRON* L. (ERICACEAE)
FROM RUSSIA BASED ON ITS1-ITS2 SEQUENCES**

Аннотация. Построение естественной классификационной схемы таксона является одной из задач систематики растений, при этом должны быть учтены эволюционные пути развития. Для анализа микроизменений вида наиболее подходят данные о нуклеотидном составе ДНК. Нами исследован участок ITS1-ITS2 (internal transcribed spacer 1, gene 5.8S ribosomal RNA, internal transcribed spacer 2) ядерной ДНК представителей рода *Rhododendron* L., произрастающих на территории России. На основе данных нуклеотидных последовательностей и статистического анализа подтверждена оправданность одной из альтернативных классификационных схем.

Ключевые слова: *Rhododendron*, internal transcribed spacer, филогения, Россия.

Summary. One of the tasks of systematics is the construction of a natural classification pattern of a taxon, moreover, evolutionary ways of development should be taken into account. Data on DNA nucleotide composition are best suited for analyzing microchanges of the species. ITS1-ITS2 (internal transcribed spacer 1, gene 5.8S ribosomal RNA, internal transcribed spacer 2) fragment of nuclear DNA of *Rhododendron* L. representatives growing in Russia was studied.

Noteworthy is a clear-cut distinction of the species of the subgenus *Therorodion*: *Rh. redowskianum* and *Rh. kamschaticum*, which were considered by some researchers to be the same species – *Rh. redowskianum* as a high-mountain ecological form of *Rh. kamschaticum*.

Phylogeny of Russian *Rhododendron* species reconstructed on the basis of ITS1-ITS2 sequences corresponds to anatomical-morphological classification of D. Chamberlain (1996) with modification.

Key words: *Rhododendron*, internal transcribed spacer, phylogeny, Russia.

Введение

Виды рода *Rhododendron* L. являются широко используемыми декоративными и лекарственными растениями. Однако, в настоящий момент отсутствует единая общепринятая классификационная схема таксона, что объясняется объемом рода (более 800 видов) и наличием у его представителей большого количества конвергентных морфологических признаков, осложняющих построение естественных систем. Проведенные ранее исследования (Gao et al., 2002; Lanying et al., 2008) показали возможность использования результатов RAPD-анализа и секвенирования ITS-участка при выявлении филогенетических связей на видовом и надвидовом уровнях, при этом полученные данные хорошо коррелировали с существующей таксономией рода. В связи с этим имеется необходимость раз-

работки детальной классификационной схемы рода с применением как классических анатомо-морфологических методов, так и молекулярно-генетического анализа.

Материалы и методы

Материалы для молекулярно-генетического анализа были взяты с живых растений, культивируемых в Центральном сибирском ботаническом саду СО РАН, привезенных из мест естественного распространения видов. Выделение тотальной ДНК производили из высушенных в силикагеле листьев с помощью набора Diamond DNA (АВТ Ллс., Россия) по протоколу фирмы-изготовителя. Амплификация ITS1-ITS2 региона проведена по методике Н. Фризена (2007) с модификациями с использованием прямого праймера 5'-AAGGTTTCCGTAGGTGAAC-3', обратного – 5'-TATGCTTAAACTCAGCGGG-3' (Desfeux and

¹ Алтайский государственный университет, пр-т Ленина, 61; 656049, Барнаул, Россия; e-mail: m_kucev@mail.ru

² Центральный сибирский ботанический сад СО РАН, ул. Золотодолинская, 101; 630090, Новосибирск, Россия; e-mail: krk007@rambler.ru

¹ Altai State University; Lenina st., 61, 656049, Barnaul, Russia

² Central Siberian Botanical Garden, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences; Zolotodolinskaya st., 101, 630090, Novosibirsk, Russia

Lejeune, 1996). Для реакции амплификации использована ПЦР-смесь следующего состава: 31,5 мкл H₂O; 2 мкл ДНК; 5 мкл 10X буфера; 5 мкл 25 mM MgCl₂; по 2 мкл 10 mM каждого праймера; 2 мкл 20 mM dNTPs (по 5 mM каждого). Таq-полимеразу в объеме 0,2 мкл (5 ед./мкл) вносили после первого цикла прогрева непосредственно в ПЦР-смесь (так называемый «горячий старт»), что позволило повысить выход продукта амплификации, избавиться от неспецифичного отжига праймеров и образования димеров праймеров (ПЦР “в реальном времени”, 2009).

Амплификация проводилась по следующей программе: 1 цикл: 95°C – 120 сек; 35 циклов: 95°C – 20 сек, 56 °C – 30 сек, 72 °C – 80 сек; завершающая стадия: 72 °C – 10 мин, охлаждение при 4°C.

Очистку ампликата перед секвенированием проводили с помощью набора NucleoSpin® Extract II Kit (Macherey-Nagel) по протоколу фирмы-изготовителя.

Секвенирование проведено на автоматическом секвенаторе ABI Prism 3130xl. Впервые данный участок расшифрован для *Calluna vulgaris* L., *Rh. adamsii* Rehd., *Rh. dauricum* L., *Rh. caucasicum* Pall., *Rh. fauriei* Franch., *Rh. japonicum* (A. Gray) Su-

ring., *Rh. ledebourii* Pojark., *Rh. parvifolium* Adams, *Rh. sichotense* Pojark., *Rh. smirnowii* Trautv. Остальные использованные в анализе последовательности взяты из GenBank NCBI (таблица 1).

Результаты и обсуждение

Для изученных нами представителей выявлена невысокая степень вариабельности участка ITS1-ITS2. Проведен кластерный анализ нуклеотидных последовательностей с помощью метода ME (minimum evolution) в программе MEGA 4.1 (Kumar et al., 2008) и построено дерево бутстреп-консенсуса. Выравнивание нуклеотидных последовательностей проведено комбинированным способом – автоматическое с помощью ClustalW с дополнительной корректировкой «вручную». Общая длина выравнивания составила 638 пар нуклеотидов. Бутстреп-тест проведен в 10000 репликаций. В качестве out-group взята *Calluna vulgaris* L. – вид, показавший наибольшее родство к видам рода *Rhododendron* L. на основе анализа нуклеотидных последовательностей с помощью BLAST NCBI. На основе данного анализа получена реконструкция филогении ITS1-ITS2 региона, отображающая эволюционные связи между видами рода *Rhododendron* (рис. 1). Следует отметить, что кладограммы, построенные с

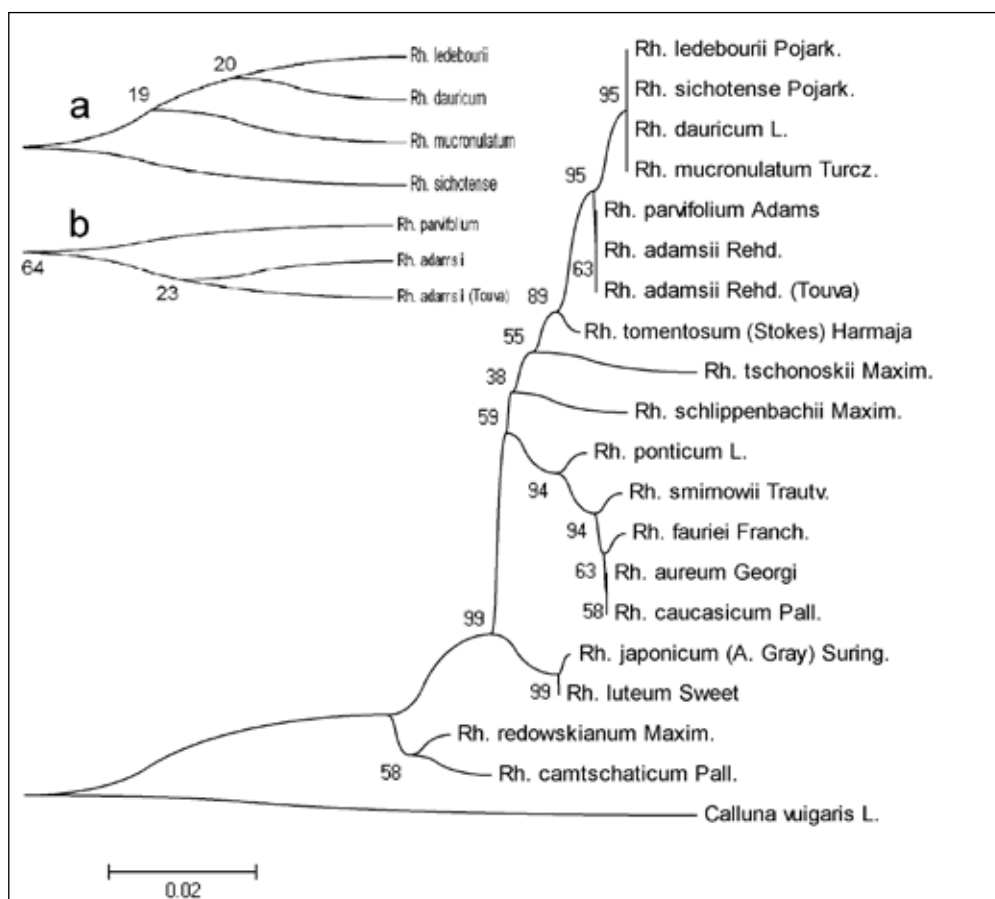


Рис. 1. ME-клатограмма представителей рода *Rhododendron* L. на основе последовательностей ITS1-5.8S-ITS2.

Таблица 1

Проанализированные последовательности ITS1-ITS2

Название вида	Номер последовательности в GenBank	Дата опубликования последовательности в GenBank	Авторы
<i>Calluna vulgaris</i> L.	HM854157	01-OCT-2010	Kutsev M.G., Karakulov A.V., Uvarova O.V.
<i>Rh. adamsii</i> Rehd.	HM854164	01-OCT-2010	Kutsev M.G., Karakulov A.V., Uvarova O.V.
<i>Rh. adamsii</i> Rehd. (from Touva)	HM854162	01-OCT-2010	Kutsev M.G., Karakulov A.V., Uvarova O.V.
<i>Rh. aureum</i> Georgi	AF393409	31-OCT-2002	Gao L.M., Li D.L., Yang J.B.
<i>Rh. camtschaticum</i> Pall.	X97426	07-MAY-1996	Aert R., Hyam R., Chamberlain D., Karp A., Voleckaert G.
<i>Rh. caucasicum</i> Pall.	HM854165	01-OCT-2010	Kutsev M.G., Karakulov A.V., Uvarova O.V.
<i>Rh. dauricum</i> L.	HM854158	01-OCT-2010	Kutsev M.G., Karakulov A.V., Uvarova O.V.
<i>Rh. fauriei</i> Franch.	HM854166	01-OCT-2010	Kutsev M.G., Karakulov A.V., Uvarova O.V.
<i>Rh. japonicum</i> (A. Gray) Suring.	HM854167	01-OCT-2010	Kutsev M.G., Karakulov A.V., Uvarova O.V.
<i>Rh. ledebourii</i> Pojark.	HM854159	01-OCT-2010	Kutsev M.G., Karakulov A.V., Uvarova O.V.
<i>Rh. luteum</i> Sweet	X96814	21-JUL-1998	Scheiber S.M., Jarret R.L., Robacker C.D.
<i>Rh. mucronulatum</i> Turcz.	AF393412	31-OCT-2002	Gao L.M., Li D.L., Yang J.B.
<i>Rh. palustre</i> var. <i>palustre</i> (<i>Rh. tomentosum</i> (Stokes) Harmaja)	AF393413	31-OCT-2002	Gao L.M., Li D.L., Yang J.B.
<i>Rh. parvifolium</i> Adams	HM854160	01-OCT-2010	Kutsev M.G., Karakulov A.V., Uvarova O.V.
<i>Rh. ponticum</i> L.	X97415	07-MAY-1996	Aert R., Hyam R., Chamberlain D., Karp A., Volckaert G.
<i>Rh. redowskianum</i> Maxim.	AF393418	31-OCT-2002	Gao L.M., Li D.L., Yang J.B.
<i>Rh. schlippenbachii</i> Maxim.	AF404816	31-OCT-2002	Gao L., Li D., Yang J., Zhang C.
<i>Rh. sichotense</i> Pojark.	HM854163	01-OCT-2010	Kutsev M.G., Karakulov A.V., Uvarova O.V.
<i>Rh. smirnowii</i> Trautv.	HM854161	01-OCT-2010	Kutsev M.G., Karakulov A.V., Uvarova O.V.
<i>Rh. tschonoskii</i> Maxim.	X96806	11-APR-1996	Aert R., Hyam R., Chamberlain D., Karp A., Volckaert G.

помощью метода МР (maximum parsimony) имели сходную топологию и бутстреп-поддержку клад.

Виды рододендронов распределились на филогенетическом древе в соответствии с анатомо-морфологической классификацией, принятой в Западной Европе (Chamberlain, 1996).

Rh. adamsii и *Rh. parvifolium* обнаруживают тесную степень родства и выделение их в разные секции – соответственно, *Pogonanthum* и *Rhododendron* – сомнительно.

В подсекции *Rhodorastrum* (Maxim.) Cullen секции *Rhododendron* подрода *Rhododendron*, согласно классификации Д. Чемберлена, наблюдается низкая степень дифференциации видов *Rh. mucronulatum*, *Rh. dauricum*, *Rh. ledebourii* и *Rh. sichotense*, что указывает на недавнее обособление этих видов (рис. 1а). Кроме того, в данной кладе наблюдаются низкие уровни поддержки, что не дает возможности установить истинные филогенетические связи.

Нельзя достоверно определить положение *Rh. schlippenbachii* Maxim. и *Rh. tschonokii* Maxim. в филогенетической схеме, т. к. образуемая данными видами клада имеет низкий уровень бутстреп-поддержки. В отношении этих двух видов стоит придерживаться мнения М.С. Александровой (1972), выделяющей их в самостоятельные таксоны подродового ранга.

Следует отметить четкое разделение ви-

дов из подрода *Therorhodium*: *Rh. redowskianum* и *Rh. camtschaticum*, которые ранее часть исследователей считали одним видом, полагая *Rh. redowskianum* высокогорной экологической формой *Rh. camtschaticum* (Александрова, 1975).

Наконец, ставится под сомнение самостоятельность рода *Ledum* L.: *Rh. tomentosum* (Stokes) Норманн (= *Ledum palustre* L.) расположен в самом центре дендрограммы рода *Rhododendron*, следовательно он является представителем этого рода, что уже отмечено в классификации Дэвида Чемберлена (Chamberlain, 1996).

Закключение

Таким образом, реконструированная на основе ITS1-ITS2-последовательности филогения видов рода *Rhododendron* L. соответствует анатомо-морфологической классификации Д. Chamberlain (1996) с небольшими дополнениями. Реконструкция филогении на основе последовательностей ITS1-ITS2 возможна лишь в отношении хорошо обособленных видов рода *Rhododendron* L. Для выявления обособленности видов в Sect. *Rhododendron* необходимо проведение популяционно-генетических исследований на основе методов, позволяющих провести скрининг всего генома (ISSR, RAPD или AFLP).

Работа выполнена в рамках Государственного контракта П483 от 13 мая 2010 г. Федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России».

ЛИТЕРАТУРА

- Александрова М.С. Рододендроны природной флоры СССР. – М., 1975. – 112 с.
- Коропачинский И.Ю., Встовская Т.Н. Древесные растения Азиатской России. – Новосибирск, 2002. – 707 с.
- Малышев Л.И. О новых и редких видах с Восточного Саяна // Ботанические материалы Гербария Ботанического ин-та АН СССР. – М.-Л., 1961. – № 21. – С. 451–467.
- ПЦР “в реальном времени”/ под ред. д. б. н. Д.В. Ребрикова. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2009. – 215 с.
- Фризен Н. Молекулярные методы, используемые в систематике растений. – Барнаул: АзБука, 2007. – 64 с.
- Chamberlain D. The genus *Rhododendron*, its classification and synonymy. – Edinburgh, 1996. – 181 p.
- Clemet M., Posada D., Crandall K.A. TCS: a computer program to estimate gene genealogies // Molecular Ecology, 2000. – V. 9, № 10. – P. 1657–1660.
- Desfeux C., Lejeune B. Systematics of Euromediterranean *Silene* (Caryophyllaceae): evidence from a phylogenetic analysis using ITS sequences // Comptes Rendus de l'Academie des Sciences de Paris, 1996. – Vol. 319, № 4. – P. 351–358.
- Gao L. M., Li D.Z., Zhang C.Q., Yang J.B. Infrageneric and sectional relationships in the genus *Rhododendron* (Ericaceae) inferred from ITS sequence data // Acta bot. sin., 2002. – Vol. 44. – 11. – P. 1351–1356.
- Kumar S., Dudley J., Nei M., Tamura K. MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences // Briefings in Bioinformatics, 2008. – Vol. 9. – P. 299–306.
- Lanying Z., Yongqing W., Li Z. Genetic diversity and relationship of *Rhododendron* species based on RAPD analysis // American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci., 2008. – Vol. 3, № 4. – P. 626–631.