

УДК 575.8:575.22

К ВОПРОСУ ФИЛОГЕНИИ ВИДОВ РОДА *RHODODENDRON* L. НА ОСНОВАНИИ ИССЛЕДОВАНИЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ СПЕЙСЕРОВ ITS1-ITS2

© 2014 г. Т. В. Баранова¹, Р. Н. Календарь², В. Н. Калаев¹

¹ Воронежский государственный университет

394068, Воронеж, ул. Ботанический сад, 1

² Хельсинкский университет, институт биотехнологии

Финляндия, 00014, Хельсинки, ул. Виикинкаари, 1, п. я. 65

E-mail: tanyavostric@rambler.ru, dr_huixs@mail.ru, ruslan.kalendar@helsinki.fi

Поступила в редакцию 15.07.2014 г.

Исследован участок ITS1-ITS2 (Internal Transcribed Spacer, между 18S и 25S рибосомальными генами, включающий 5.8S ген) последовательностей ядерной ДНК рода *Rhododendron* L. Работа предусматривала проведение дополнительного анализа ITS1-ITS2 последовательностей, выявление филогенетических связей и обобщение данных по филогении видов рода *Rhododendron* L. на основании исследований других авторов с использованием молекулярных и классических методов. Анализ последовательности рибосомального спейсера выявил низкую вариабельность между видами рода *Rhododendron* серии *Dauricum*. *Rh. mucronulatum* Turcz., *Rh. dauricum* L. и некоторые другие изучаемые виды имели идентичную нуклеотидную ITS1-ITS2 последовательность, указывающую на неправомерность разделения их на отдельные виды. Обнаружены виды, отличающиеся друг от друга на 1–2 или несколько нуклеотидов, что дает возможность предполагать их филогенетическую общность и не исключает принадлежности к одной таксономической единице. По результатам анализа ITS1-ITS2 последовательностей выделено 16 групп видов со сходной последовательностью. При сравнении морфологических описаний некоторых видов рода *Rhododendron* L. со сходной последовательностью ITS1-ITS2 отмечаются их небольшие различия. На основании результатов молекулярно-генетического анализа предполагается принадлежность *Rhododendron dauricum* L., *Rh. ledebourii* Pojark., *Rh. sitchotense* Pojark. и *Rh. mucronulatum* Turcz. к одному виду. Установление филогенетических связей на основе последовательностей ITS1-ITS2 применимо только в отношении сильно обособленных видов рода *Rhododendron* L. Для уточнения филогенетических связей рода *Rhododendron* L. необходимо расширить сравнительный анализ ДНК-последовательности для других универсальных генов или сложных повторов (ретротранспозоны).

Ключевые слова: филогения, филогенетическая общность, ядерная рибосомальная РНК, ITS последовательность, нуклеотид, рододендрон, внутренний нетранскрибируемый спейсер, видоспецифичность.

ВВЕДЕНИЕ

Для построения филогенетических связей растений необходимо уточнить их систематическое положение, что возможно с помощью современных методов молекулярно-генетического анализа. Для видов характерна специализация нуклеотидной последовательности геномной ДНК, а также последовательностей ДНК пластид и митохондрий. Для детекции конкретного вида на уровне

геномной ДНК широко используются универсальные последовательности, присущие всем видам, например рибосомальные гены (18S, 25S и 5.8S). Последовательность нуклеотидов в рибосомальных генах неизменна для всех растительных видов, но последовательность нуклеотидов внутреннего транскрибируемого спейсера (ITS, Internal Transcribed Spacer, между 18S и 25S рибосомальными генами, включающий 5.8S ген) уникальна для каждого вида. Именно поэтому

нетранслируемый спейсер используется для идентификации видов (White et al., 1990). Проведенные ранее исследования (Gao et al., 2002; Lanying, Yongqing, 2008) показали возможность использования результатов RAPD-анализа и анализа ITS последовательности при выявлении филогенетических связей на видовом и надвидовом уровнях, при этом полученные данные коррелировали с существующей таксономией рода (Куцев, Каракулов, 2010).

Рододендрон даурский *Rhododendron dauricum* L. (Ericaceae) – фенотипически разнообразный вид, обладает обширным ареалом, охватывающим территорию Сибири (Саяны, Забайкалье) и Дальнего Востока России, Монголии, Китая (Александрова, 2003), имеет много форм, различающихся размером и окраской цветков, формой и особенностями роста куста, степенью листопадности в зимнее время. До конца 50-х гг. виды *Rhododendron dauricum* L., *Rh. ledebourii* Pojark., *Rh. mucronulatum* Turcz., *Rh. sichotense* Pojark. не были разграничены. *Rh. ledebourii* определялся как полувечнозеленая форма *Rhododendron dauricum* (Деревья..., 1960). Позднее перечисленные виды стали считаться разными. В настоящее время существует и другая точка зрения: этот таксон включает еще три вида, ранее считавшихся самостоятельными: *Rh. ledebourii* Pojark., *Rh. mucronulatum* Turcz., *Rh. sichotense* Pojark. (Коропачинский, Встовская, 2002; Каракулов, 2005). Несколько форм *Rhododendron dauricum*, различающихся размерами и количеством лепестков, окраской цветков, найдено на Дальнем Востоке и описано ранее (Каракулов, 2005). М. Г. Куцев и А. В. Каракулов (2010) отмечали, что в настоящий момент отсутствует единая общепринятая классификационная схема таксона, что объясняется объемом рода (более 1000 видов) и наличием у его представителей большого количества конвергентных морфологических признаков, осложняющих построение естественных систем. Сведения о них неоднозначные и противоречивые, поэтому для уточнения систематического положения видов и построения филогенетических связей необходимо использовать совре-

менные методы молекулярно-генетического анализа. В связи с этим цель работы состояла в проведении дополнительного анализа ITS1-ITS2 последовательностей, выявлении филогенетических связей и обобщении данных по филогении видов рода *Rhododendron* L. других авторов, полученных ими с использованием как молекулярных, так и классических методов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для молекулярно-генетических исследований отобрали листья четырех видов рододендронов: *Rh. mucronulatum* Turcz., *Rh. dauricum* L., *Rh. ledebourii* Pojark. и *Rh. sichotense* Pojark., интродуцированных в Ботаническом саду им. проф. Б. М. Козо-Полянского Воронежского государственного университета. Возраст анализируемых растений 30–35 лет. Материал получен из Главного ботанического сада (г. Москва) в виде саженцев. Выборка состояла из 4–5 растений каждого образца.

В отличие от проведенных ранее исследований (Куцев, Каракулов, 2010) наши охватывали большее число видов, в том числе секвенированных нами (*Rh. mucronulatum* Turcz., *Rh. dauricum* L., *Rh. ledebourii* Pojark. и *Rh. sichotense* Pojark), были применены тест Таджimy (Tajima) на нейтральность и метод максимального правдоподобия.

Выделение ДНК проводили в СТАВ буфере (2 % СТАВ, 2 М NaCl, 10 mM Na₃ ЭДТА, 100 mM HEPES pH 5.6 при 20 °C) по протоколу: <http://primerdigital.com/dna.html>. Амплификацию участка ITS1-ITS2 проводили с праймерами ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGT CGTAACAAGG) и ITS4 (5'-TCCTCCGCTTA TTGATATGC) (White et al., 1990; <http://www.biology.duke.edu/fungi/mycolab/primers.htm>). Для амплификации фрагментов ITS1-ITS2 использовали стандартный протокол для Taq полимеразы. Реакцию производили в 25 µl реакционной смеси, содержащей 25 нг ДНК, 1x ПЦР буфер с 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP, 0.3 µM каждого праймера и 1 ед. DreamTaq (Thermo Scientific). Амплификацию проводили на амплификаторе MasterCycler Gradient (Eppendorf AG): начальная денатурация

К вопросу филогении видов рода *Rhododendron* L.
на основании исследований последовательности спейсеров ITS1-ITS2

Таблица 1. ITS1-ITS2 последовательности видов рода *Rhododendron*

Вид	Номер ITS1-ITS2 последовательностей в генбанке NCBI	Авторы
1	2	3
<i>Rh. aberconwayi</i>	EF035046 JF978181	Zha H. G., Sun H. (2006); Li et al. (2011)
<i>Rh. adamsii</i>	HM854162 HM854164	Kutsev M. G., Karakulov A. V., Uvarova O. V. (2010)
<i>Rh. aequabile</i>	AY877268 AY877284	Brown G. K., Craven L. A., Udovicic F., Ladiges P. Y. (2006)
<i>Rh. aganniphum</i>	JF978183 JF978184	Zhang et al. (2007)
<i>Rh. agastum</i>	DQ677624 DQ677625 DQ677626 DQ677627 EF028355 EF028356 EF028361 EF028362 JF978185 JF978186 JF978187	Zhang et al. (2007); Li et al. (2011)
<i>Rh. alabamense</i>	AF072478	Scheiber S. M., Jarret R. L., Robacker C. D. (1998)
<i>Rh. albiflorum</i>	X97427	Aert R., Hyam R., Chamberlain D., Karp A., Volckaert G. (1996)
<i>Rh. alborugosum</i>	AY877283	Brown G. K., Craven L. A., Udovicic F., Ladiges P. Y. (2006)
<i>Rh. albrechtii</i>	X96809 AF452235	Aert R., Hyam R., Chamberlain D., Karp A., Volckaert G. (1996); Gao L. M., Li D. Z., Yang J. B., Zhang C. Q. (2002)
<i>Rh. amanoi</i>	AB105224	Setoguchi H., Kajimaru G. (2004)
<i>Rh. annae</i>	AY962559	Zhao X. H., Wang M. Y. (2005)
<i>Rh. anthopogon</i>	X97418	Aert R., Hyam R., Chamberlain D., Karp A., Volckaert G. (1996)
<i>Rh. anthosphaerum</i>	EF035047 JF978190 JF978191 JF978192 JF978193	Zha H. G., Sun H.; Li et al. (2011)
<i>Rh. aperantum</i>	JF978196	Li et al. (2011)
<i>Rh. apoanum</i>	AY877267	Brown G. K., Craven L. A., Udovicic F., Ladiges P. Y. (2006)
<i>Rh. araiophyllum</i>	JF978197	Li et al. (2011)
<i>Rh. arborescens</i>	X96813 AF072477 AB300711	Aert R., Hyam R., Chamberlain D., Karp A., Volckaert G. (1996); Scheiber S. M., Jarret R. L., Robacker C. D. (1998); Mizuta et al. (2008)
<i>Rh. arboreum</i>	JF978199 JF978200 JF978201 JF978202	Li et al. (2011)
<i>Rh. argyrophyllum</i>	X97416	Aert R., Hyam R., Chamberlain D., Karp A., Volckaert G. (1996)
<i>Rh. atlanticum</i>	AF072479	Scheiber S. M., Jarret R. L., Robacker C. D. (1998)
<i>Rh. aureum</i>	AF393409	Gao L. M., Li D. L., Yang J. B. (2002)
<i>Rh. auriculatum</i>	AY962555	Zhao X. H., Wang M. Y. (2005)

1	2	3
<i>Rh. austrinum</i>	AF072480	Scheiber S. M., Jarret R. L., Robacker C. D. (1998)
<i>Rh. bachii</i>	AF393419 AF452228	Gao L. M., Li D. L., Yang J. B. (2002)
<i>Rh. bainbridgeanum</i>	JF978207	Li et al. (2011)
<i>Rh. beesianum</i>	JF978211 JF978213	Li et al. (2011)
<i>Rh. breviperulatum</i>	AF285853 AF432425 AF432458	Tsai C. C., Chen C. H., Huang S. C.; Tsai C. C., Chen C. H., Chou C. H. (2000)
<i>Rh. bureavii</i>	JF978214	Li et al. (2011)
<i>Rh. calostrotum</i>	JF978216 JF978217	Li et al. (2011)
<i>Rh. campylocarpum</i>	JF978220	Li et al. (2011)
<i>Rh. canadense</i>	AY877280	Brown G. K., Craven L. A., Udovicic F., Ladiges P. Y. (2006)
<i>Rh. caucasicum</i>	HM854165	Kutsev M. G., Karakulov A. V. (2010)
<i>Rh. cavaleriei</i>	AF393425	Gao L. M., Li D. L., Yang J. B. (2002)
<i>Rh. cephalanthum</i>	JF978222 JF978223	Li et al. (2011)
<i>Rh. chihsinianum</i>	AY962554	Zhao X. H., Wang M. Y. (2005)
<i>Rh. christi</i>	AY877269	Brown G. K., Craven L. A., Udovicic F., Ladiges P. Y. (2006)
<i>Rh. cinnabarinum</i>	JF978225 JF978227	Li et al. (2011)
<i>Rh. dauricum</i>	HM854158	Kutsev M. G., Karakulov A. V. (2010)
<i>Rh. decorum</i>	DQ295782 EF028354	Zha H. G., Milne R. I., Sun H. (2008); Zhang et al. (2007)
<i>Rh. delavayi</i>	AY962556 DQ295783 EF035043 HM636519 HM636521 JF978238 JF978239 JF978241 JF978242	Zhao X. H., Wang M. Y. (2005); Zha H. G., Milne R. I., Sun H. (2006, 2008); Ma Y., Milne R. I., Zhang C., Yang J. (2011); Li et al. (2011)
<i>Rh. dilatatum</i>	AB105236 AB126639	Setoguchi H., Kajimaru G. (2004); Morimoto J., Kamichi T., Mizumoto I., Hasegawa S., Nomura M., Kobayashi T. (2005)
<i>Rh. duclouxii</i>	AF452231 AF452232	Gao L. M., Li D. Z., Yang J. B., Zhang C. Q. (2002)
<i>Rh. eastmanii</i>	HQ453189	Hrusa G. F., Woods P. W. (2011)
<i>Rh. edgeworthii</i>	EF035051 JF978244	Zha H. G., Sun H.; Li et al. (2011)
<i>Rh. ellipticum</i>	AF432448	Tsai C. C., Chen C. H., Chou C. H. (2001)
<i>Rh. emarginatum</i>	JF978248 JF978250	Li et al. (2011)
<i>Rh. ericoides</i>	AY877270	Brown G. K., Craven L. A., Udovicic F., Ladiges P. Y. (2006)
<i>Rh. eriocarpum</i>	AB105231	Setoguchi H., Kajimaru G. (2004)
<i>Rh. fastigiatum</i>	EF035052 JF978253 JF978255	Zha H. G., Sun H.; Li et al. (2011)

К вопросу филогении видов рода *Rhododendron* L.
на основании исследований последовательности спейсеров ITS1-ITS2

Продолжение таблицы 1

1	2	3
<i>Rh. fauriei</i>	HM854166	Kutsev M. G., Karakulov A. V. (2010)
<i>Rh. ferrugineum</i>	X97419 AF393415 HE585254	Aert R., Hyam R., Chamberlain D., Karp A., Volckaert G. (1996); Gao L. M., Li D. L., Yang J. B. (2002); Bruni I., De Mattia F., Labra M. (2011)
<i>Rh. floccigerum</i>	JF978260	Li et al. (2011)
<i>Rh. formosanum</i>	AF432435 AF432436 AF432437 AF432438 AF297190 AF297191	Tsai C. C., Chen C. H., Chou C. H. (2001); Shih B.-L., Yang Y.-P., Chaw S.-M. (2002)
<i>Rh. fortunei</i>	AF393407	Gao L. M., Li D. L., Yang J. B. (2002)
<i>Rh. fragariiflorum</i>	JF978265	Li et al. (2011)
<i>Rh. fulvum</i>	JF978267	Li et al. (2011)
<i>Rh. fuyuanense</i>	JF978269	Li et al. (2011)
<i>Rh. genestierianum</i>	JF978271 JF978272	Li et al. (2011)
<i>Rh. glischrum</i>	JF978273	Li et al. (2011)
<i>Rh. gracilentum</i>	AY877271	Brown G. K., Craven L. A., Udovicic F., Ladiges P. Y. (2006)
<i>Rh. groenlandicum</i>	X97417	Aert R., Hyam R., Chamberlain D., Karp A., Volckaert G. (1996)
<i>Rh. hainanense</i>	EU296728 EU296730 EU296732	Jin X., Cao P., Ding B., Fu C., Wang H. (2007)
<i>Rh. hancockii</i>	AF393429	Gao L. M., Li D. L., Yang J. B. (2002)
<i>Rh. haofui</i>	AY962552	Zhao X. H., Wang M. Y. (2005)
<i>Rh. heliolepis</i>	JF978283	Li et al. (2011)
<i>Rh. henryi</i>	AF393430	Gao L. M., Li D. L., Yang J. B. (2002)
<i>Rh. herzogii</i>	AY877272	Brown G. K., Craven L. A., Udovicic F., Ladiges P. Y. (2006)
<i>Rh. hirsutum</i>	HE585257	Bruni I., De Mattia F., Labra M. (2011)
<i>Rh. honkongense</i>	X97423	Aert R., Hyam R., Chamberlain D., Karp A., Volckaert G. (1996)
<i>Rh. hybrid</i>	AJ626912 AJ626914 AJ626915	Grant M. L., Toomey N. H., Culham A. C. (2008)
<i>Rh. hyperythrum</i>	AF432443 AF297193	Tsai C. C., Chen C. H., Chou C. H. (2001); Shih B.-L., Yang Y.-P., Chaw S.-M. (2002)
<i>Rh. impeditum</i>	JF978288 JF978289	Li et al. (2011)
<i>Rh. indicum</i>	AB105220 AB105221	Setoguchi H., Kajimaru G. (2004)
<i>Rh. irroratum</i>	AY962558 EF035045 FJ873380 FJ873381 FJ873383 FJ873385 JF978293	Zhao X. H., Wang M. Y.; Zha H. G., Sun H.; Zhang J. L., Zhang C. Q., Milne R. I.; Li et al. (2011)
<i>Rh. japonicum</i>	HM854167	Kutsev M. G., Karakulov A. V. (2010)
<i>Rh. jarvanicum</i>	X97424 AY877274	Aert R., Hyam R., Chamberlain D., Karp A., Volckaert G. (1996); Brown G. K., Craven L. A., Udovicic F., Ladiges P. Y. (2006)

1	2	3
<i>Rh. jasminiflorum</i>	AY877273	Brown G. K., Craven L. A., Udovicic F., Ladiges P. Y. (2006)
<i>Rh. jingangshanicum</i>	AY962557	Zhao X. H., Wang M. Y. (2005)
<i>Rh. kaempheri</i>	X96804	Aert R., Hyam R., Chamberlain D., Karp A., Volkcaert G. (1996)
<i>Rh. kanehirai</i>	AF172290	Tsai C. C., Huang S. C., Tsai S. H. (1999)
<i>Rh. kawakamii</i>	AF432420 AF432450 GQ505308	Tsai C. C., Chen C. H., Chou C. H. (2001, 2013)
<i>Rh. kiusianum</i>	X96805	Aert R., Hyam R., Chamberlain D., Karp A., Volkcaert G. (1996)
<i>Rh. kiyosumense</i>	AB126640	Morimoto J., Kamichi T., Mizumoto I., Hasegawa S., Nomura M., Kobayashi T. (2005)
<i>Rh. laguncularpum</i>	AY877287 AY877289	Brown G. K., Craven L. A., Udovicic F., Ladiges P. Y. (2006)
<i>Rh. lamprophyllum</i>	AF285855	Tsai C. C., Chen C. H., Huang S. C. (2000)
<i>Rh. lasiophylla</i>	X97429	Aert R., Hyam R., Chamberlain D., Karp A., Volkcaert G. (1996)
<i>Rh. lasiostylum</i>	AF285845 AF432457	Tsai C. C., Chen C. H., Huang S. C. (2000); Tsai C. C., Chen C. H., Chou C. H. (2001)
<i>Rh. latoucheae</i>	AF393431	Gao L. M., Li D. L., Yang J. B. (2002)
<i>Rh. ledebourii</i>	HM854159	Kutsev M. G., Karakulov A. V. (2010)
<i>Rh. lepidotum</i>	JF978299 JF978301 JF978302 JF978304 JF978306 JF978307	Li et al. (2011)
<i>Rh. leptanthum</i>	X97421 AY877275	Aert R., Hyam R., Chamberlain D., Karp A., Volkcaert G. (1996); Brown G. K., Craven L. A., Udovicic F., Ladiges P. Y. (2006)
<i>Rh. leptothrium</i>	AF393420 JF978309 JF978310 JF978311 JF978312	Gao L. M., Li D. L., Yang J. B. (2002); Li et al. (2011); Jin X., Cao P., Ding B., Fu C., Wang H. (2012)
<i>Rh. longifalcatum</i>	EU296733 EU296736 EU296738	Jin X., Cao P., Ding B., Fu C., Wang H. (2007)
<i>Rh. loranthiflorum</i>	AY877276	Brown G. K., Craven L. A., Udovicic F., Ladiges P. Y. (2006)
<i>Rh. lukiangense</i>	JF978313	Li et al. (2011)
<i>Rh. luraluense</i>	AY877277	Brown G. K., Craven L. A., Udovicic F., Ladiges P. Y. (2006)
<i>Rh. luteum</i>	X96814 AF072485	Aert R., Hyam R., Chamberlain D., Karp A., Volkcaert G. (1996); Scheiber S. M., Jarret R. L., Robacker C. D. (1998)
<i>Rh. mackenzianum</i>	AF393434 JF978316	Gao L. M., Li D. L., Yang J. B. (2002); Li et al. (2011)
<i>Rh. macrosepalum</i>	AB105222	Setoguchi H., Kajimaru G. (2004)
<i>Rh. maddenii</i>	AY877281 JF978319 JF978320	Brown G. K., Craven L. A., Udovicic F., Ladiges P. Y.; Li et al. (2011)

К вопросу филогении видов рода *Rhododendron* L.
на основании исследований последовательности спейсеров ITS1-ITS2

Продолжение таблицы 1

1	2	3
<i>Rh. malayanum</i>	AY877278	Brown G. K., Craven L. A., Udovicic F., Ladiges P. Y. (2006)
<i>Rh. mariesii</i>	AF285844 AF432470 AF297202 GQ505297 JF978322 JF978323	Tsai C. C., Chen C. H., Huang S. C. (2000–2002); Tsai C. C., Chen C. H., Chou C. H. (2013, 2012); Shih B.-L., Yang Y.-P., Chaw S.-M.; Li et al. (2011)
<i>Rh. maximum</i>	AJ626908	Grant M. L., Toomey N. H., Culham A. C. (2008)
<i>Rh. mekongense</i>	JF978324 JF978326	Li et al. (2011)
<i>Rh. meridionale</i>	EU296739 EU296740 EU296741	Jin X., Cao P., Ding B., Fu C., Wang H. (2007)
<i>Rh. microphyton</i>	JF978327 JF978328 JF978329 JF978330	Li et al. (2011)
<i>Rh. mitriforme</i>	AF393422	Gao L. M., Li D. L., Yang J. B. (2002)
<i>Rh. molle</i>	X97425 AF072486	Aert R., Hyam R., Chamberlain D., Karp A., Volckaert G. (1996); Scheiber S. M., Jarret R. L., Robacker C. D. (1998)
<i>Rh. morii</i>	AF432434 AF297199	Tsai C. C., Chen C. H., Chou C. H. (2001); Shih B.-L., Yang Y.-P., Chaw S.-M. (2002)
<i>Rh. moulmainese</i>	X97422	Aert R., Hyam R., Chamberlain D., Karp A., Volckaert G. (1996)
<i>Rh. mucronulatum</i>	AF393412	Gao L. M., Li D. L., Yang J. B. (2002)
<i>Rh. nakaharai</i>	AF285846 AF432478 AB300709 AB300708	Tsai C. C., Chen C. H., Huang S. C. (2000, 2001); Mizuta et al. (2008)
<i>Rh. nanophyton</i>	AY877290	Brown G. K., Craven L. A., Udovicic F., Ladiges P. Y. (2006)
<i>Rh. nipponicum</i>	AF452234	Gao L. M., Li D. Z., Yang J. B., Zhang C. Q. (2002)
<i>Rh. nivale</i>	JF978336 JF978337	Li et al. (2011)
<i>Rh. occidentale</i>	X97431 AF072487 AF396233 HQ453188 HQ453190 HQ453191 HQ453192 HQ453193 HQ453194 HQ453195 HQ453196 HQ453197 HQ453198 HQ453200 HQ453201 HQ453202 HQ453203 HQ453204 HQ453205 HQ453206 HQ453207	Aert R., Hyam R., Chamberlain D., Karp A., Volckaert G. (2006); Scheiber S. M., Jarret R. L., Robacker C. D. (1998); Fritsch P. W. (2001); Hrusa G. F., Woods P. W. (2011)
<i>Rh. oldhamii</i>	AF285843 AF432454 AF297201	Tsai C. C., Chen C. H., Huang S. C. (2000); Tsai C. C., Chen C. H., Chou C. H. (2001); Shih B.-L., Yang Y.-P., Chaw S.-M. (2002)
<i>Rh. oreotrephes</i>	JF978347 JF978352	Li et al. (2011)
<i>Rh. ovatum</i>	AF432421 AF432476 AF393424 JF978353	Tsai C. C., Chen C. H., Chou C. H. (2001); Gao L. M., Li D. L., Yang J. B.; Li et al. (2011)
<i>Rh. pachypodium</i>	AF393410 JF978355 JF978356 JF978357	Gao L. M., Li D. L., Yang J. B.; Li et al. (2011)
<i>Rh. palustre</i>	AF393413	Gao L. M., Li D. L., Yang J. B. (2002)

1	2	3
<i>Rh. parvifolium</i>	HM854160	Kutsev M. G., Karakulov A. V., Uvarova O. V. (2010)
<i>Rh. pendulum</i>	JF978358 JF978359	Li et al. (2011)
<i>Rh. phaeochrysum</i>	JF978360	Li et al. (2011)
<i>Rh. pneumonanthum</i>	AY877282	Brown G. K., Craven L. A., Udovicic F., Ladiges P. Y. (2006)
<i>Rh. ponticum</i>	X97415	Aert R., Hyam R., Chamberlain D., Karp A., Volckaert G. (1996)
<i>Rh. primuliflorum</i>	AF393416	Gao L. M., Li D. L., Yang J. B. (2002)
<i>Rh. prinophyllum</i>	AF072489	Scheiber S. M., Jarret R. L., Robacker C. D. (1998)
<i>Rh. pseudochrysanthum</i>	AF297196 AF297197 HQ850627 HQ850628 HQ850649	Shih B.-L., Yang Y.-P., Chaw S.-M.; Huang et al. (2011)
<i>Rh. quadrasianum</i>	AY877292	Brown G. K., Craven L. A., Udovicic F., Ladiges P. Y. (2006)
<i>Rh. racemosum</i>	AF393411 JF978373	Gao L. M., Li D. L., Yang J. B.; Li et al. (2011)
<i>Rh. rarum</i>	AY877285	Brown G. K., Craven L. A., Udovicic F., Ladiges P. Y. (2006)
<i>Rh. reticulatum</i>	X96808	Aert R., Hyam R., Chamberlain D., Karp A., Volckaert G. (1996)
<i>Rh. retusum</i>	AY877286	Brown G. K., Craven L. A., Udovicic F., Ladiges P. Y. (2006)
<i>Rh. rex</i>	EF035053	Zha H. G., Sun H. (2006)
<i>Rh. rhodopus</i>	AY877293	Brown G. K., Craven L. A., Udovicic F., Ladiges P. Y. (2006)
<i>Rh. rousei</i>	AY877291	Brown G. K., Craven L. A., Udovicic F., Ladiges P. Y. (2006)
<i>Rh. rubiginosum</i>	EF035048	Zha H. G., Sun H. (2006)
<i>Rh. saluenense</i>	JF978385	Li et al. (2011)
<i>Rh. santapau</i>	AF452229 AY877298	Gao L. M., Li D. Z., Yang J. B., Zhang C. Q. (2002); Brown G. K., Craven L. A., Udovicic F., Ladiges P. Y. (2006)
<i>Rh. saxifragoides</i>	AY877299	Brown G. K., Craven L. A., Udovicic F., Ladiges P. Y. (2006)
<i>Rh. scabrum</i>	AB105225	Kajimaru G., Setoguchi H. (2004)
<i>Rh. schlippenbachii</i>	X96810 AF404816 AB105237	Aert R., Hyam R., Chamberlain D., Karp A., Volckaert G. (1996); Gao L., Li D., Yang J., Zhang C. (2002); Setoguchi H., Kajimaru G. (2004)
<i>Rh. selense</i>	JF978395	Li et al. (2011)
<i>Rh. semibarbatum</i>	X96812	Aert R., Hyam R., Chamberlain D., Karp A., Volckaert G. (1996)

К вопросу филогении видов рода *Rhododendron* L.
на основании исследований последовательности спейсеров ITS1-ITS2

Продолжение таблицы 1

1	2	3
<i>Rh. serpyllifolium</i>	AB105230	Setoguchi H., Kajimaru G. (2004)
<i>Rh. sichotense</i>	HM854163	Kutsev M. G., Karakulov A. V. (2010)
<i>Rh. sikangense</i>	JF978399	Li et al. (2011)
<i>Rh. simsii</i>	AF285848 AB105234 GQ505302 JF978400	Tsai C. C., Chen C. H., Huang S. C. (2000); Setoguchi H., Kajimaru G. (2004); Tsai C.-C., Chen C.-H., Chou C.-H. (2013); Li et al. (2011)
<i>Rh. sinogrande</i>	EF035055	Zha H. G., Sun H. (2006)
<i>Rh. sinonuttalii</i>	JF978407	Li et al. (2011)
<i>Rh. smirnowii</i>	HM854161	Kutsev M. G., Karakulov A. V. (2010)
<i>Rh. spiciferum</i>	AF452230	Gao L. M., Li D. Z., Yang J. B., Zhang C. Q. (2002)
<i>Rh. spinuliferum</i>	AF452233 JF978412 JF978413	Gao L. M., Li D. Z., Yang J. B., Zhang C. Q. (2002); Li et al. (2011)
<i>Rh. tapetiforme</i>	JF978420	Li et al. (2011)
<i>Rh. tashiroi</i>	AF393417	Gao L. M., Li D. L., Yang J. B. (2002)
<i>Rh. tosaense</i>	AB105233	Kajimaru G., Setoguchi H. (2004)
<i>Rh. traillianum</i>	JF978431	Li et al. (2011)
<i>Rh. transiens</i>	AB105232	Setoguchi H., Kajimaru G. (2004)
<i>Rh. trichocladum</i>	AF393414 EF035054	Gao L. M., Li D. L., Yang J. B. (2002); Zha H. G., Sun H. (2006)
<i>Rh. tschonoskii</i>	X96806	Aert R., Hyam R., Chamberlain D., Karp A., Volckaert G. (1996)
<i>Rh. tsusiopyhyllum</i>	X97428	Aert R., Hyam R., Chamberlain D., Karp A., Volckaert G. (1996)
<i>Rh. uvariifolium</i>	JF978443	Li et al. (2011)
<i>Rh. vaccinioides</i>	AY877301 JF978444 JF978445	Brown G. K., Craven L. A., Udovicic F., Ladiges P. Y.; Li et al. (2011)
<i>Rh. vaseyi</i>	X97414 AF072491	Aert R., Hyam R., Chamberlain D., Karp A., Volckaert G. (1996); Scheiber S. M., Jarret R. L., Robacker C. D. (1998)
<i>Rh. vialii</i>	AF393421	Gao L. M., Li D. L., Yang J. B. (2002)
<i>Rh. virgatum</i>	JF978448 JF978449	Li et al. (2011)
<i>Rh. viscosum</i>	AF072492 AB300710	Scheiber S. M., Jarret R. L., Robacker C. D.; Mizuta et al. (2008)
<i>Rh. wadanum</i>	X96807	Aert R., Hyam R., Chamberlain D., Karp A., Volckaert G. (1996)
<i>Rh. wallichii</i>	JF978450	Li et al. (2011)
<i>Rh. wardii</i>	JF978452	Li et al. (2011)
<i>Rh. williamsianum</i>	AJ626909 AJ626910	Grant M. L., Toomey N. H., Culham A. C. (2008)

1	2	3
<i>Rh. xanthostephanum</i>	JF978456 JF978458	Li et al. (2011)
<i>Rh. yakuinsulare</i>	AB105226	Setoguchi H., Kajimaru G. (2004)
<i>Rh. zoelleri</i>	AY877302	Brown G. K., Craven L. A., Udovicic F., Ladiges P. Y. (2006)

при 95 °С 3 мин и последующие 20 циклов при 95 °С – 15 с, при 60 °С – 60 с и при 72 °С – 30 с; последняя элонгация проведена при 72 °С дополнительные 5 мин.

Электрофорез амплифицированных продуктов осуществлен в 1.5%-м агарозном геле (RESolute Wide Range, BIOzym), продукты визуализированы бромистым этидием. Для определения длины фрагментов ДНК использовали маркер молекулярной массы (GeneRules DNA ladder, Thermo Scientific).

Экстракцию фрагмента ДНК из агарозного геля проводили по протоколу фирмы «QIAGEN», а лигирование фрагментов ДНК – с pGEM-T (Promega, США) плазмидным T-вектором. Трансформация плазмидной ДНК произведена в клетках *E. coli* штамма JM109. Клетки, несущие плазмиду со вставкой, детектировали путем бело-синей селекции на среде с ампициллином в конечной концентрации 100 мкг/мл, X-Gal (20 мг/мл) и IPTG (200 мг/мл). Проверку pGEM вектора на наличие клонированных ПЦР продуктов проводили с помощью ПЦР с универсальными рUC праймерами (M13 прямым или обратным).

Секвенирование последовательностей амплифицированной ДНК осуществляли в институте биотехнологии Хельсинского университета с использованием капиллярного секвенатора ABI3700 (Biosystems). Данные ITS1-ITS2 участков получены для видов *Rhododendron* L.: *Rh. mucronulatum* Turcz., *Rh. dauricum* L., *Rh. ledebourii* Pojark. и *Rh. sichotense* Pojark, произрастающих в условиях интродукции в Центральном Черноземье. Остальные ITS1-ITS2 последовательности взяты из генетической базы данных NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/>) и представлены в табл. 1.

Для каждого вида *Rhododendron* L. к последовательностям ITS1-ITS2 из базы данных NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) по-

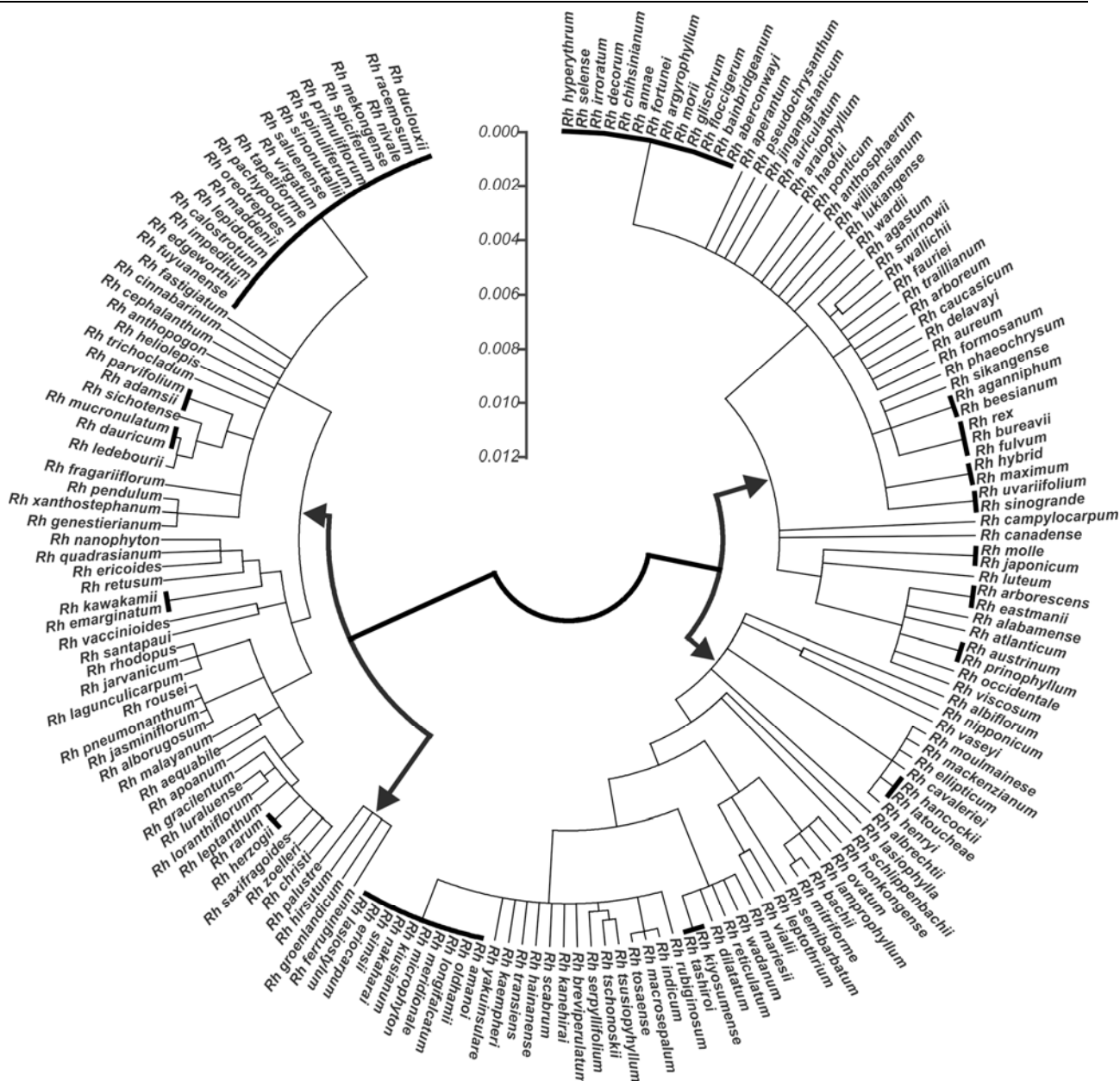
лучена консенсус-последовательность с помощью множественного выравнивания программой Multain (Corpet, 1988).

Используя все ITS1-ITS2 последовательности видов рода *Rhododendron*, провели множественное выравнивание с помощью программ Multain и PRANKSTER (Loytynoja, Goldman, 2005). Полученное множественное выравнивание последовательностей отредактировано «вручную».

Построение дендрограммы проводили с помощью метода ML (Maximum Likelihood, Nearest-Neighbor-Interchange), а также Tajima теста (Tajima, 1989) на нейтральность. Оценку нуклеотидных замен методом максимального правдоподобия осуществляли с помощью программы MEGA 6.0 (Tamura, Nei, 1993; Tamura et al., 2013).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На основе данных кластерного анализа получена схема молекулярной филогении ITS1-ITS2 региона, свидетельствующая об эволюционных связях между видами рода *Rhododendron* (см. рисунок и табл. 2). В целом все анализируемые виды рода *Rhododendron* делятся на две большие группы (расположены в центре дендрограммы), каждая из которых включает по два больших кластера, разделяющихся на множество подкластеров (по 2 и более). У исследуемых видов одного подкластера наблюдается очень низкая вариабельность нуклеотидного состава, у многих видов выявлены идентичные ITS1-ITS2 последовательности. На рисунке выделены наиболее близкие или идентичные по последовательности нуклеотидов ITS1-ITS2 виды, которые могут быть различными экологическими группами или формами одного вида. Отличия в один, два или несколько нуклеотидов наиболее характерны



Филогенетические связи видов рода *Rhododendron* L.

для разных экземпляров большинства видов, и эти отличия ничтожно малы. Виды с идентичной ITS1-ITS2 нуклеотидной последовательностью представлены в табл. 2 по группам (представители каждой группы характеризуются одинаковой ITS1-ITS2 последовательностью).

Тест Таджимы (Tajima) на нейтральность также выявил невысокую дивергенцию между всеми исследуемыми видами рода *Rhododendron* (табл. 3). Значение критерия D теста Таджимы оказалось отрицательным для всех исследованных видов. Из 595 сайтов 167 –

сегрегации, редкие аллели присутствуют с низкой частотой, что говорит о прохождении вида через «бутылочное горлышко». В табл. 4 приведена оценка нуклеотидных замен методом максимального правдоподобия. Среди основных замен имеют место, главным образом, транзиции для пиримидинов (C<->T), реже – для пуринов (A<->G). Трансверсии редки, имеют наименьшую частоту.

В настоящее время не разработана совершенная классификация рода *Rhododendron*. В книге «Деревья и кустарники СССР» указывается, что в значительной части работ за-

Таблица 2. Виды рода *Rhododendron* L. с идентичной ITS1-ITS2 последовательностью

Группа	Вид
1	<i>Rh. fuyuanense</i> , <i>Rh. edgeworthii</i> , <i>Rh. impeditum</i> , <i>Rh. calostrotum</i> , <i>Rh. lepidotum</i> , <i>Rh. maddenii</i> , <i>Rh. oreotrepes</i> , <i>Rh. pachypodum</i> , <i>Rh. tapetiforme</i> , <i>Rh. virgatum</i> , <i>Rh. saluenense</i> , <i>Rh. sinonuttalii</i> , <i>Rh. spinuliferum</i> , <i>Rh. primuliflorum</i> , <i>Rh. spiciferum</i> , <i>Rh. mekongense</i> , <i>Rh. nivale</i> , <i>Rh. racemosum</i> , <i>Rh. duclouxii</i>
2	<i>Rh. adamsii</i> , <i>Rh. parvifolium</i>
3	<i>Rh. dauricum</i> , <i>Rh. mucronulatum</i>
4	<i>Rh. emarginatum</i> , <i>Rh. kawakamii</i>
5	<i>Rh. herzogii</i> , <i>Rh. rarum</i>
6	<i>Rh. amanoi</i> , <i>Rh. oldhamii</i> , <i>Rh. longifalcatum</i> , <i>Rh. meridionale</i> , <i>Rh. microphyton</i> , <i>Rh. kiusianum</i> , <i>Rh. nakaharai</i> , <i>Rh. simsii</i> , <i>Rh. eriocarpum</i> , <i>Rh. lasiostylum</i>
7	<i>Rh. kiyosumense</i> , <i>Rh. tashiroi</i>
8	<i>Rh. hancockii</i> , <i>Rh. latoucheae</i>
9	<i>Rh. austrinum</i> , <i>Rh. prinophyllum</i>
10	<i>Rh. arborescens</i> , <i>Rh. eastmanii</i>
11	<i>Rh. molle</i> , <i>Rh. japonicum</i>
12	<i>Rh. uvariifolium</i> , <i>Rh. sinogrande</i>
13	<i>Rh. hybridum</i> , <i>Rh. maximum</i>
14	<i>Rh. rex</i> , <i>Rh. bureavii</i>
15	<i>Rh. aganniphum</i> , <i>Rh. beesianum</i>
16	<i>Rh. hyperythrum</i> , <i>Rh. selense</i> , <i>Rh. irroratum</i> , <i>Rh. decorum</i> , <i>Rh. chihsinianum</i> , <i>Rh. annae</i> , <i>Rh. fortunei</i> , <i>Rh. argyrophyllum</i> , <i>Rh. morii</i> , <i>Rh. glischrum</i> , <i>Rh. floccigerum</i> , <i>Rh. bainbridgeanum</i> , <i>Rh. aberconwayi</i>

Таблица 3. Результат теста Таджимы (*Tajima*) на нейтральность для 175 последовательностей ITS1-ITS2 видов рода *Rhododendron* L.

Количество сайтов сегрегации <i>S</i>	Отношение количества сайтов сегрегации (<i>S</i>) к <i>n</i> ($n = 595$) числу сайтов ($p_s = S/n$)	Нуклеотидное разнообразие π	Значение критерия Таджимы <i>D</i>
167	0.280672	0.021715	-1.769611

Таблица 4. Матрица оценки нуклеотидных замен методом максимального правдоподобия. Величина вероятности замещения (*r*) одного основания (строки) на другое (столбца), в сумме 100 % (частоты встречаемости нуклеотидов, %: А = 21.15, Т = 24.85, С = 26.50 и G = 27.50)

	А	Т	С	G
А	–	4.36	4.64	12.50
Т	3.71	–	22.10	4.82
С	3.71	20.73	–	4.82
G	9.61	4.36	4.64	–

рубежных авторов принято деление рода *Rhododendron* на так называемые серии и подсерии (series and subseries), объединяющие близкие виды, но не связанные между собой в какую-либо систему. Эти серии, которых выделено 41, располагают в алфавит-

ном порядке их названий, не являющихся, однако, научно узаконенными. По своему объему серии неравнозначны: одни включают группы близких видов, различающихся незначительно, другие – виды, относящиеся к нескольким различным под родам (серия

Azalea). В работах «Флора СССР» (т. XVIII, 1952), «Деревья и кустарники СССР» и в современной классификации принято деление рода *Rhododendron* на подроды. В литературном источнике «Деревья и кустарники СССР» указаны подрод *Rhodorastrum* (Maxim.) Drude для анализируемых видов и серия *Dauricum*. М. Г. Куцев и А. В. Каракулов (2010) подтвердили классификацию Д. Чемберлена и показали, что в подсекции *Rhodorastrum* (Maxim.) Cullen секции *Rhododendron* подрода *Rhododendron* низкая степень дифференциации видов *Rh. mucronulatum*, *Rh. dauricum*, *Rh. ledebourii* и *Rh. sichotense*, что указывает на недавнее обособление этих видов. Такое положение согласуется и с полученными нами результатами, которые укладываются в рамки классификации Д. Чемберлена (Chamberlain et al., 1996). Проведенный анализ последовательностей спейсеров ITS1-ITS2 выявил их идентичность у *Rh. mucronulatum*, *Rh. dauricum*. Наиболее близок к ним *Rh. ledebourii* (отличие составляет 1 нуклеотид) по сравнению с *Rh. sichotense* (отличие в 2 нуклеотида), кластерное расстояние до которого также незначительно (см. рисунок). Различие видов *Rh. ledebourii* и *Rh. sichotense* для спейсеров ITS1-ITS2 составляет 3 нуклеотида.

Кроме того, отмечено, что в данной кладе наблюдаются низкие уровни поддержки, что не дает возможности установить истинные филогенетические связи (Куцев, Каракулов, 2010). Поэтому мы присоединяемся к мнению М. Г. Куцева и А. В. Каракулова (2010) о том, что «реконструкция филогении на основе последовательностей ITS1-ITS2 возможна лишь в отношении сильно обособленных, только некоторых видов рода *Rhododendron*». По мнению данных авторов, «для выявления обособленности видов секции *Rhododendron* необходимо проведение популяционно-генетических исследований на основе методов, позволяющих провести скрининг всего генома (ISSR, RAPD, AFLP)». Например, в результате использования анализа AFLP для уточнения систематического положения серии *Dauricum* (подсекции *Rhodorastrum* (Maxim.) Cullen) на популяционном материале установлены значи-

тельные генетические дистанции между перечисленными видами рододендронов (Тихонова и др., 2012).

Данные выводы подтверждаются исследованиями анатомо-морфологической структуры и ареала *Rh. ledebourii*, *Rh. dauricum*, *Rh. sichotense* и *Rh. mucronulatum*, проведенными М. В. Белоусовым с соавторами (Белоусов и др., 2000). Данными авторами, как и Е. А. Карповой, А. В. Каракуловым (2011), выявлено парное и групповое сходство видов *Rhododendron* серии *Dauricum*. Однако используемые Е. А. Карповой и А. В. Каракуловым (2011) биохимические признаки (состав фенольных соединений) могут быть адаптивными реакциями на комплекс определенных экологических условий. Не случайно виды объединены в две группы по территориальному признаку. Следует отметить, что авторы изучали виды рода *Rhododendron* в природных местообитаниях. Возможно, в условиях интродукции какие-то характеристики будут варьировать.

Морфологические описания некоторых видов с идентичной ITS1-ITS2 нуклеотидной последовательностью, перечисленных в табл. 2, сравнивали по методу М. С. Александровой (2003). Например, *Rh. impeditum* Balf. F. et W. W. Smith (рододендрон плотный), *Rh. racemosum* Franch. (рододендрон кистевой) – низкорослые вечнозеленые кустарники 0.3–0.5 м высотой, с эллиптическими листьями и воронковидными цветками. Первый в природе достигает высоты 0.6 м, он с более мелкими листьями (1–1.5 см длиной, 1 см шириной), с фиолетово-голубыми, редко белыми цветками диаметром до 2.5 см, расположенными по 1–2 на верхушке побега; второй – высотой до 1 м, с листьями 2–6 см длиной и 1–3 см шириной, с темно-розовыми или алыми цветками диаметром 1.5 см, расположенными по 2–3 на верхушке или вдоль побега. Отмечена высокая изменчивость высоты куста и окраски цветков *Rh. racemosum*. *Rh. oreotrephes* W. W. Smith (рододендрон горный) – вечнозеленый кустарник высотой 1.5 м с продолговато-эллиптическими листьями и с 5–8 ширококолокольчатými сиреневыми цветками на концах побегов.

Rh. molle (Blume) G. Don (рододендрон мягкий), *Rh. japonicum* (Gray) Suringar (рододендрон японский) – листопадные кустарники. Первый высотой 1–3 м (в культуре 0.3–0.5 м), второй – 1–2 м, с продолговато-ланцетными реснитчатыми листьями, у первого – опушенными с обеих сторон, 5–15 см длиной, 5 см шириной, у второго – покрытыми волосками, 4–10 см длиной, 2–4 см шириной. Цветки воронковидные, у первого золотисто-желтые диаметром 5–6 см, у второго желтые, лососевые, ярко-красные диаметром 6–8 см, собранные по 6–12 штук. В книге «Деревья и кустарники СССР» (1960) описан *Rh. obtusum* (Lindl.) Planch. f. *japonicum* (Maxim.) Wils. (полувечнозеленый кустарник с розово-сиреневыми, розово-пурпуровыми, красными, иногда с белыми цветками, имеющий множество переходных форм), являющийся исходным для многих культурных форм и сортов. Синонимом его указан *Rh. kiusianum* Makino, который на дендрограмме объединен в один подкластер с *Rh. simsii* Planch. Оба вида относятся к подроду *Tsutsutsi*. Это вечнозеленый или полувечнозеленый кустарник высотой до 1.5 м с розовыми, розово-красными, темно-красными, иногда с белыми цветками.

Rh. decorum Franch. (рододендрон изящный, великолепный), *Rh. fortunei* Lindl. (рододендрон Форчуна) – вечнозеленые кустарники высотой 2–3 м (в природе высота первого 6 м, второго – 4 м) со светло-зелеными продолговато-эллиптическими листьями, у первого длиной 5–15 см и шириной 3–7 см, у второго 7–10 и 3–8 см соответственно, цветки у первого воронковидные диаметром до 5 см, белые или светло-розовые с розоватыми или зеленоватыми пятнами, собранные по 8–10 штук; у второго – воронковидно-колокольчатые, нежно-розовые с зеленовато-желтым зевом, позднее белые, диаметром до 3 см, собранные в соцветия по 6–12 штук. Весьма сходен по морфологии с вышеописанным *Rh. argyrophyllum* Franch. (рододендрон серебристый).

Rh. parvifolium Adams (рододендрон мелколистный) – вечнозеленый кустарник высотой до 1 м или приземистый кустарничек, листья продолговато-ланцетные длиной 1–

2 см, шириной до 0.5 см, сверху кожистые, темно-зеленые, собранные на концах побегов, цветки широко воронковидно-колокольчатые, до 2 см в диаметре, сиреневые, пурпурно-розовые, редко белые, собранные по 2–5 в верхушечных соцветиях. *Rh. adamsii* Rehd. (рододендрон Адамса) – вечнозеленый кустарничек высотой 35–55 см с продолговато-эллиптическими листьями длиной 1–2 см и шириной до 0.5–1 см. Цветки сидячие, по 7–15, венчик воронковидно-колокольчатый, розовый, 1.5 см в диаметре.

Rh. hybridum hort. объединяет большую группу культурных сортов вечнозеленых крупноцветковых рододендронов, при выведении которых использовались дикие виды и культурные сорта, в том числе *Rh. maximum* L. Последний представляет собой вечнозеленый кустарник высотой 1–4 м с продолговато-обратнояйцевидными или яйцевидно-ланцетными листьями длиной 10–30 см, шириной 4–7 см, сверху кожистыми, темно-зелеными, с колокольчатыми цветками 10–13 см в диаметре, светло-розовыми, пурпурно-розовыми, иногда белыми, собранными по 16–24.

Несмотря на то что в результате исследования морфологических и анатомических признаков видов рода *Rhododendron* L. некоторые авторы пришли к выводу об их видовой самостоятельности (Вологодина, 2007; Белоусов и др., 2000), из приведенного описания следует, что некоторые виды рода *Rhododendron* L. с идентичной последовательностью ITS1-ITS2 (см. табл. 2) весьма сходны по морфологии. Например, многие авторы утверждают, что в условиях Дальнего Востока, Латвии, средней полосы России рододендрон даурский *Rhododendron dauricum* L., рододендрон остроколючный *Rh. mucronulatum* Turcz., рододендрон сихотинский *Rh. sichotense* Pojark. – морфологически трудно различимые виды семейства Ericaceae (Зорикова, 1973; Кондратович, 1981; Александрова, 1975, 2003; Вологодина, 2007). Данные виды высокополиморфны, имеют различия по размерам органов растения. В. А. Недолужко (1995) относит их к подвидам одного вида. Возможна гибридизация этих видов, ксеромезофитной линией развития которых является и рододендрон даурский (Врищ и др., 2010).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, предпринята попытка на основе анализа ITS1-ITS2 последовательности уточнить филогению видов рода *Rhododendron* L. Анализ последовательности рибосомального спейсера выявил низкую вариабельность между видами рода *Rhododendron* серии *Dauricum*. *Rh. mucronulatum* Turcz., *Rh. dauricum* L. и некоторые другие изучаемые виды имели идентичную нуклеотидную ITS1-ITS2 последовательность, указывающую на неправомерность разделения их на отдельные виды. Кроме того, обнаружены виды, отличающиеся друг от друга на несколько нуклеотидов, что дает возможность предполагать их филогенетическую общность и не исключает принадлежности к одной таксономической единице.

По результатам анализа ITS1-ITS2 последовательностей выделено 16 групп видов со сходной последовательностью ITS1-ITS2. При сравнении морфологических описаний некоторых видов рода *Rhododendron* L. со сходной последовательностью ITS1-ITS2 отмечаются их небольшие различия. Учитывая литературные данные о высоком полиморфизме видов рода *Rhododendron*, мы не исключаем возможности изменения систематического положения данных видов.

По-видимому, установление филогенетических связей на основе последовательностей ITS1-ITS2 применимо только в отношении сильно обособленных видов рода *Rhododendron* L., поэтому для уточнения филогенетических связей рода *Rhododendron* L. необходимо расширить сравнительный анализ ДНК-последовательности для других универсальных генов или сложных повторов (ретротранспозоны). Например, последовательности генов, у которых последовательности экзонов неизменны у видов одного семейства, подходят для анализа видоспецифичных последовательностей интронов. Кроме того, можно провести сравнительный анализ конкретных последовательностей LTR-ретротранспозонов, общих для всех родственных и далеких видов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Александрова М. С. Рододендроны природной флоры СССР. М.: Наука, 1975. 112 с.
- Александрова М. С. Рододендроны. М.: ЗАО «Фитон+», 2003. 192 с.
- Белоусов М. В., Басова Е. В., Юсубов М. С., Березовская Т. П., Покровский Л. М., Ткачев А. В. Эфирные масла некоторых видов рода *Rhododendron* L. // Химия раст. сырья. 2000. № 3. С. 45–64.
- Вологодина О. С. *Rhododendron mucronulatum* Turcz., *Rh. sichotense* Pojark.: формовое разнообразие, онтогенез, культура: Автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.05. Владивосток: БПИ ДВО РАН, 2007. 18 с.
- Вриц Д. Л. Высокогорный эндемик Сихотте-Алиня рододендрон Боброва // Вестник Воронежского гос. ун-та. Сер. География. Геоэкология. 2010. № 2. С. 52–53.
- Вриц Д. Л., Варченко Л. И., Урусов В. М. Род Рододендрон (*Rhododendron* L.) на Сихотте-Алине: география, экология генезис, хозяйственные перспективы // Вестн. КрасГАУ. 2010. № 10. С. 64–71.
- Деревья и кустарники СССР. Дикорастущие, культивируемые и перспективные для интродукции. М.–Л.: Изд-во АН СССР, 1960. Т. V. 543 с.
- Зорикова В. Т. Биологические особенности дальневосточных рододендронов и введение их в культуру в условиях Приморского края: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Владивосток, 1973. 23 с.
- Каракулов А. В. Новые формы *Rhododendron dauricum* L. (Ericaceae) (из окрестностей Северобайкальска, Бурятия) // Биоразнообразие и пространственная организация растительного мира Сибири, методы изучения и охраны. Новосибирск: ЦСБС СО РАН, 2005. С. 76.
- Карпова Е. А., Каракулов А. В. Фенольные соединения близкородственных видов рода *Rhododendron* L. (Ericaceae) // Turczaniowia. 2011. Т. 14. № 3. С. 145–149.
- Кондратович Р. Я. Рододендроны в Латвийской ССР: биологические особенности культуры. Рига: Зинатне, 1981. 332 с.

- Коропачинский И. Ю., Встовская Т. Н.* Древесные растения Азиатской России. Новосибирск: Изд-во СО РАН, филиал «Гео», 2002. 707 с.
- Куцев М. Г., Каракулов А. В.* Реконструкция филогении рода *Rhododendron* L. (Ericaceae) флоры России на основе последовательностей спейсеров ITS1-ITS2 // *Turczaninowia*. 2010. Т. 13. № 3. С. 59–62.
- Недолужко В. А.* Конспект дендрофлоры российского Дальнего Востока. Владивосток: Дальнаука, 1995. 208 с.
- Тихонова Н. А.* Морфологическая и генетическая дифференциация видов рода *Rhododendron* в горах Южной Сибири: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Красноярск, 2013. 18 с.
- Тихонова Н. А., Полежаева М. А., Пименова Е. А.* AFLP-анализ генетического разнообразия близкородственных видов рододендронов подсемейства *Rhododendroideae* (Ericaceae) Сибири и Дальнего Востока России // *Генетика*. 2012. Т. 48. № 10. С. 1153–1161.
- Флора СССР. Т. XVIII. М.–Л., 1952.
- Biology* // <http://www.biology.duke.edu/fungi/mycolab/primers.htm>
- Chamberlain D. F., Hyam R., Argent G., Fairweather G., Walter K. S.* The genus *Rhododendron*, its classification and synonymy. Oxford: Royal Botanic Garden Edinburgh, 1996. 181 p.
- Corpet F.* Multiple sequence alignment with hierarchical clustering // *Nucleic Acids Res.* 1988. V. 16. N. 22. P. 10881–10890.
- 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. N. 11. P. 1351–1356.
- 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. V. 11(1). P. 108.
- 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. N. 4. P. 626–631.
- 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 // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2011. V. 108(49). P. 19641–19646.
- Loytynoja A., Goldman N.* An algorithm for progressive multiple alignment of sequences with insertions // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2005. V. 102. N. 30. P. 10557–10562.
- Mizuta D., Nakatsuka A., Kobayashi N.* Development of multiplex PCR markers to distinguish evergreen and deciduous azaleas // *Plant Breed.* 2008. V. 127. N. 5. P. 533–535.
- NCBI // <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>
- Nei M., Kumar S.* *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford: Oxford University Press, 2000. 352 p.
- Primerdigital // <http://primerdigital.com/dna.html>
- Tajima F.* Statistical methods for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism // *Genetics*. 1989. V. 123. N. 3. P. 585–595.
- Tamura K., Nei M.* Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees // *Molecular Biology and Evolution*. 1993. V. 10. N. 3. P. 512–526.
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipowski A., Kumar S.* MEGA 6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0 // *Molecular Biology and Evolution*. 2013. V. 30. N. 12. P. 2725–2729.
- White T. J., Bruns T., Lee S., Taylor J. W.* Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics // *PCR Protocols: a guide to methods and applications* / Eds. M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, T. J. White. San Diego: Academic Press, 1990. P. 315–322.
- 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 //

- Botanical J. of the Linnean Society. 2008. V. 156(1). P. 119–129.
- 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. V. 120(3). P. 457–463.

To the Question of *Rhododendron* L. Genus Phylogeny Based on ITS1-ITS2 Spacers Sequence Studies

T. V. Baranova¹, R. N. Kalendar², V. N. Kalaev¹

¹ Voronezh State University, Botanical Garden
Botanicheski sad, 1, Voronezh, 394068 Russian Federation

² University of Helsinki, Institute of Biotechnology
P.O. Box 65, Viikinkaari, 1, Helsinki, 00014 Finland

E-mail: tanyavostric@rambler.ru, dr_huixs@mail.ru, ruslan.kalendar@helsinki.fi

The first and second internal transcribed spacer (ITS1 and ITS2) regions of the ribosomal DNA and 5.8S rRNA gene from *Rhododendron* L. were analysed. This study reveals phylogenetic relationships and collation of data on the phylogeny of the genus *Rhododendron* L. according to the research of other authors using molecular and classical methods. Sequence analysis of ribosomal spacer showed low variability between species of the genus *Rhododendron* series of *Dauricum*. *Rh. mucronulatum* Turcz., *Rh. dauricum* L. and some other studied species had identical nucleotide ITS1-ITS2 sequence indicating the artificial division into separate species. Found species differing from each other by 1–2 or few nucleotides, which allows assuming their common phylogenetic affiliation or excluding one taxonomic unit. According to the analysis of ITS1-ITS2 sequences identified 16 groups of species with similar sequence ITS1-ITS2. When comparing the morphological descriptions of some species of the genus *Rhododendron* L. with a similar sequence of ITS1-ITS2 marked their small differences. Based on the results of molecular genetic analysis it has been assumed that *Rhododendron dauricum* L., *Rh. ledebourii* Pojark, *Rh. sichotense* Pojark and *Rh. mucronulatum* Turcz belong to the same species. The establishment phylogenetic relationships based on sequence ITS1-ITS2, applicable only in respect of highly isolated species *Rhododendron* L. To clarify the phylogenetic relationships of the genus *Rhododendron* L. necessary to expand the comparative analysis of the DNA sequences of universal genes or complex repeats elements (retrotransposons).

Keywords: *phylogeny, phylogenetic community, nuclear ribosomal RNA, ITS sequence, nucleotide, Rhododendron, internal transcribed spacer (ITS) region, species-specific.*