

Систематика и филогения *Rhododendron brachycarpum* и *Rhododendron fauriei* (Ericaceae) по морфологическим и молекулярным данным

Systematics and phylogeny of *Rhododendron brachycarpum* and *Rhododendron fauriei* (Ericaceae) according to morphological and molecular data

Терентьева Е. И.¹, Линник Е. В.², Самигуллин Т. Х.³, Варлыгина Т. И.¹

Terentieva E. I.¹, Linnik E. V.², Samigullin T. H.³, Varlygina T. I.¹

¹Научно-образовательный центр – Ботанический сад Петра I биологического факультета МГУ им. М. В. Ломоносова, г. Москва, Россия. E-mail: el.terentieva@mail.ru; tat-varlygina@yandex.ru

¹Research and Education Center – Peter the Great Botanical Garden of the Faculty of Biology of the Lomonosov Moscow State University, Vorobjevy Gory, Moscow, Russia

²ФГБУ «Государственный природный заповедник «Курильский», г. Южно-Курильск, Россия. E-mail: elen-linnik@yandex.ru

²FSBI “State Nature Reserve «Kurilsky», Yuzhno-Kurilsk, Russia

³НИИ Физико-Химической биологии им. А. Н. Белозерского МГУ, г. Москва, Россия. E-mail: tagrai@mail.ru

³Belozerky Institute of Physic-Chemical Biology, Moscow State University, Moscow, Russia

Реферат. В статье представлены предварительные результаты по таксономии *Rhododendron brachycarpum* и *Rhododendron fauriei*. Молекулярно-филогенетический анализ по двум маркерам ITS и *trnL-F* показал, что проанализированные образцы двух видов оказались относительно однородны по генетическим дистанциям, а изменчивость морфологических признаков можно рассматривать как результат внутривидовой изменчивости. Проведенные нами исследования не подтвердили самостоятельный статус *R. fauriei*.

Ключевые слова. Морфологические признаки, таксономия, филогения, Ericaceae, ITS и *trnL-F* маркеры, *Rhododendron*.

Summary. The article presents preliminary results on the taxonomy of *Rhododendron brachycarpum* and *Rhododendron fauriei*. Molecular phylogenetic analysis using two markers ITS and *trnL-F* showed that the analyzed samples of the two species were relatively homogeneous in genetic distances, and the variability of morphological features can be considered as a result of intrapopulation variability. Our studies did not confirm the independent status of *R. fauriei*.

Key words. Ericaceae, ITS and *trnL-F* markers, morphological characters, phylogeny, *Rhododendron*, taxonomy.

Введение. Рододендрон (*Rhododendron* L.) – это обширный род растений, насчитывающий около 1300 видов, принадлежащих к семейству Вересковые (Ericaceae Juss.) (Cullen, 1980). Большинство видов рода *Rhododendron* произрастают в умеренном поясе и субтропиках Северного полушария, включая Китай, Корею, Японию, Дальний Восток, Кавказ, Северную Америку, Австралию и Новую Гвинею (Александрова, 1975). В России встречается 21 вид рода *Rhododendron* – на Дальнем Востоке, Камчатке, Кавказе, Сибири и в Европейской части страны (Мазуренко, 1982). Род *Rhododendron* – одна из сложных групп в семействе Вересковые. Среди видов этого рода существует много сложных видовых комплексов, которые нуждаются в таксономическом уточнении. Особый интерес представляют виды, занесённые в Красные книги Российской Федерации (Марчук, Линник, 2024) и Сахалинской области (Чабаненко, 2019), имеющие фрагментированный ареал и малочисленные популяции. К такой группе относятся *Rhododendron brachycarpum* D. Don ex G. Don fil. и *R. fauriei* Franch. Вид *R. fauriei* был описан в 1886 г. по образцам, собранным в Японии в том же месте, где первоначально был описан *R. brachycarpum* в 1834 году (Ohwi, 1965). Отмечается, что у специалистов нет единого мнения относительно таксономического положения данных видов. Основными диагностическими признаками для разделения *R. brachycarpum* и *R. fauriei* являются окраска цветков и наличие или отсутствие опушения на нижней стороне листа. Некоторые систематики считают их синонимами (Александрова, 1975;

Харкевич, Качура, 1981; Баркалов, 2009). Другая группа исследователей рассматривает *R. brachycarpum* и *R. fauriei* как подвиды (Ворошилов, 1982; Chamberlain et al., 1996; Yamazaki, 1996). А. П. Хохряков и М. Т. Мазуренко (1991) предложили рассматривать *R. brachycarpum* и *R. fauriei* как два самостоятельных вида. Полученные предварительные данные по результатам анализа спейсерного участка (ITS1-5.8S-ITS2) ядерной ДНК (Линник и др., 2020) поддерживают исследователей, которые рассматривают *R. brachycarpum* и *R. fauriei* как самостоятельные виды. При этом авторы отмечают, что единичной синаптоморфной замены, которая отличает образцы *R. brachycarpum* с о. Кунашир и о. Хонсю от образцов *R. fauriei* ещё недостаточно для чёткого разделения *R. brachycarpum* и *R. fauriei*, и полученные результаты требуют дальнейшего изучения на большем числе образцов, собранных в разных точках дизъюнктивного ареала и с использованием маркеров хлоропластной ДНК.

Таким образом, для понимания взаимоотношений между *R. brachycarpum* и *R. fauriei* в дополнение к морфологическим данным был проведён молекулярно-генетический анализ некодирующего межгенного спейсера (*trnL-F*) хлоропластной ДНК, а также спейсеров (ITS1-5.8S-ITS2) ядерной рибосомальной ДНК. Согласно литературным данным (Milne, 2004; Li et al., 2015; Khan et al., 2021), это наиболее часто используемые маркеры в молекулярно-филогенетических исследованиях сложных видовых комплексов в роде *Rhododendron*. Кроме того, использование совместного анализа этих последовательностей позволяет получить более достоверные результаты, нежели изучение какой-либо одной из них.

Материалы и методы. В анализ были включены образцы растений, взятые из природных популяций, произрастающих в Сахалинской области на Курильских островах (Кунашир и Итуруп), а также гербарные образцы из Приморского края, Тернейский район (Сихотэ-Алинский заповедник), и с островов Хоккайдо, Хонсю и Кюсю (Япония), хранящиеся в гербарных коллекциях (MHA и MW). У растений из природных популяций были взяты фрагменты вегетативных и генеративных частей и высушены с использованием силикагеля. В работе было проанализировано 10 образцов *R. brachycarpum* и 5 образцов *R. fauriei*.

Выделение ДНК из гербарных и высушенных в силикагеле образцов, а также амплификация участка ITS проводились согласно методике, описанной в работе Valiejo-Roman et al. (2006). Амплификация участков *trnL-F* выполнялась по методике Taberlet et al. (1991).

Дополнительно для молекулярно-филогенетического анализа из базы данных GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>) были взяты нуклеотидные последовательности ITS (ITS1-5.8S-ITS2) и *trnL-F* 16 видов рода *Rhododendron*. Выборку таксонов для молекулярно-филогенетического анализа осуществляли, опираясь на работы (Kutsev, Karakulov, 2011; Khan et al., 2021).

Нуклеотидные последовательности всех анализируемых участков выравнивались в программе MUSCLE (Edgar, 2004). Молекулярно-филогенетические деревья были построены по отдельным (ITS) и комбинированным данным (ITS и *trnL-F*) двумя методами – байесовским методом в программе Mr. Bayes 3.1 (Ronquist, Huelsenbeck, 2003), используя модель нуклеотидных замен GTR+G, и методом максимальной экономии в программе PAUP* 4.0b8 (Swofford, 2003). При оценке устойчивости топологии деревьев использовали бутстреп-анализ (Felsenstein, 1985). В качестве внешней группы был использован *Calluna vulgaris* (L.) Hill., выбранный на основании более ранних исследований (Kutsev, Karakulov, 2011; Khan et al., 2021). Визуализация молекулярно-филогенетических деревьев производилась с помощью программы TreeView (Page, 1996).

Результаты и обсуждения. Топологии молекулярных деревьев, полученных двумя методами, не идентичны, но конгруэнтны в основных узлах и характеризуются высоким индексом статистической поддержки – высокими процентами бутстрэпа или высокими значениями апостериорной вероятности. В статье представлено консенсусное молекулярно-филогенетическое дерево, построенное по комбинированным данным (ITS и *trnL-F*) байесовским методом.

В построенном нами филогенетическом дереве (рис. 1) анализируемые образцы *R. brachycarpum* и *R. fauriei* из разных популяций образовали отдельную кладу I с высокой апостериорной вероятностью (1.0). Образцы *R. fauriei* из двух близких популяций, собранные на северо-восточном склоне горного хребта Сихотэ-Алинь в верховые ключей Спорный и Кабаний, сформировали в кладе I отдельный кластер (A) с высокой апостериорной вероятностью (1.0), так как все образцы этого кластера имеют идентичные нуклеотидные последовательности по двум маркерам.

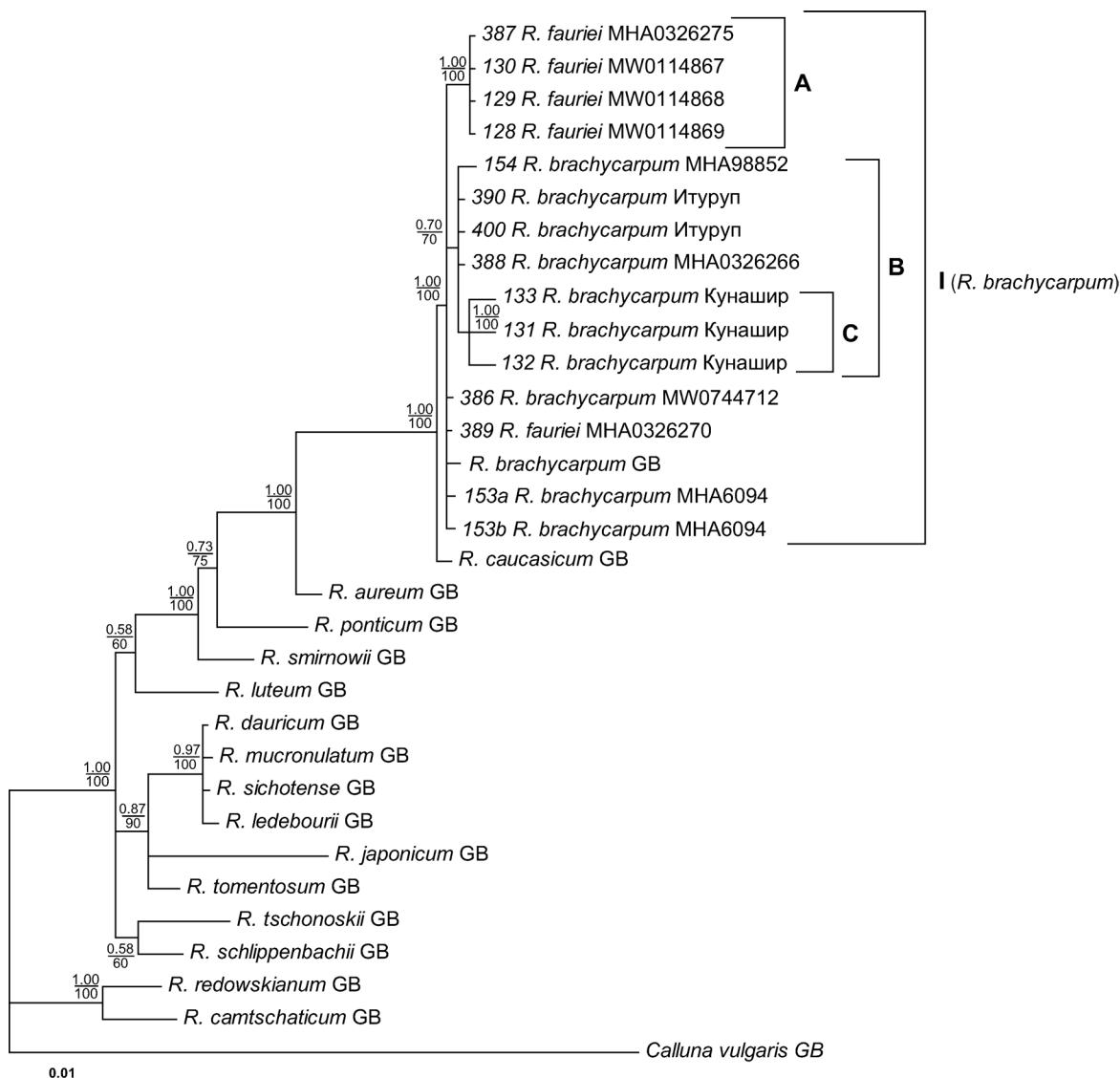


Рис. 1. Консенсусное дерево, построенное по результатам анализа последовательностей участков ITS и *trnL-trnF* с помощью байесовского метода в программе Mr. Bayes 3.1. Числа обозначают поддержку узлов (апостериорная вероятность / значения бутстрепа). Приведены только значения бутстрепа > 50 и значения апостериорной вероятности > 0,70. Названия таксонов в дереве представлены так, как они указаны в базе GenBank (GB) или в Гербарии.

Согласно литературным данным (Шеметова, 1970; Мазуренко, 1980; Хохряков, Мазуренко, 1991), у растений *R. fauriei* из Сихотэ-Алиня белые цветки и нижняя сторона листьев без опушения. При изучении гербарных образцов *R. fauriei* из Сихотэ-Алиня нами было отмечено, что у всех образцов на нижней стороне листьев присутствует опушение разной плотности (<https://plant.depo.msu.ru/>), что не соответствует описанию вида.

На молекулярно-филогенетическом дереве образцы *R. brachycarpum* с Курил вместе с японским образцом 154 из Хонсю формируют кластер (B), в котором образцы *R. brachycarpum* из популяций о. Кунашир 131, 132 и 133 группируются вместе, с апостериорной вероятностью (0,9). При этом гербарный образец 389 (определен как *R. fauriei*) с о. Итуруп не сгруппировался с образцами кластера (A), а вместе с японскими образцами *R. brachycarpum* 153a, 153b и 386 из о. Хоккайдо и о. Кюсю занял сестринское положение к образцам кластера (B).

В кластер (B) вошли образцы растений *R. brachycarpum* как с розовыми, так и белыми цветками, при этом нижняя сторона листьев покрыта опушением разной плотности. В ходе наших наблюдений было замечено, что у взрослых листьев опушение опадает и нижняя сторона листа становится зелёной. Эти данные соответствуют наблюдениям (Вриш, 2011).

В результате анализа нуклеотидных последовательностей по двум маркерам не было выявлено чётких генетических различий на уровне синапоморфных замен, а были отмечены отдельные точечные мутации: замены, вставки одного или нескольких нуклеотидов, которые скорее характеризуют отдельные образцы, а не популяции. При этом уровень генетической вариабельности по последовательностям ITS и *trnL-F* между образцами *R. fauriei* из Сихотэ-Алиня (кластер А) и образцами *R. brachycarpum* с Курил и Японии составил 0,0045–0,0066 (PAUP* 4.0b8), что соответствует значениям в пределах вида и указывает на генетическую близость исследуемых образцов.

Полученные данные молекулярно-филогенетических исследований хорошо согласуются с результатами мультилокусного анализа генотипирования ядерной микросателлитной ДНК (SSRs), с помощью которого была проведена оценка генетического разнообразия *R. brachycarpum* по всему его ареалу (Polezhaeva et al., 2021). Проведённая авторами корреляция между значениями анализа степени популяционной дифференциации (FST) и матрицами географических расстояний (тест Мантелля) при рассмотрении всех популяций также была статистически незначимой.

На основании вышеизложенного можно предположить, что проанализированные образцы *R. brachycarpum* и *R. fauriei* оказались относительно однородны по генетическим дистанциям, а изменчивость морфологических признаков можно рассматривать как результат внутрипопуляционной изменчивости. Проведенные нами исследования по двум маркерам ITS и *trnL-F* не подтвердили самостоятельный статус *R. fauriei*.

Коллектив авторов считает, что полученные сведения по морфологическим данным и молекулярно-филогенетическому анализу подлежат дальнейшему рассмотрению с большим числом образцов из популяций Японии, а также включения в анализ дополнительных маркеров хлоропластной ДНК, что позволит получить более надёжные результаты по таксономии *R. brachycarpum* и *R. fauriei*.

Благодарности. Работа выполнена в рамках государственного задания по плановой теме «Изучение флоры России и сопредельных территорий: разработка вопросов их рационального использования и охраны» (ЦИТИС 121031600194-4).

ЛИТЕРАТУРА

- Александрова М. С.** Рододендроны природной флоры СССР. – М.: Изд-во Наука, 1975. – 112 с.
- Баркалов В. Ю.** Флора Курильских островов. – Владивосток: Изд-во Дальннаука, 2009. – С. 125–126.
- Ворошилов В. Н.** Определитель растений Советского Дальнего Востока. – М.: Изд-во Наука, 1982. – 460 с.
- Вриц Д. Л.** Концепция статуса *Rhododendron brachycarpum* D. Don на Сихотэ-Алине // Матер. Всеросс. науч. конф. с международным участием, посвященной 80-летию со дня рождения академика Л. Н. Андреева (5–7 июля, Москва). – М.: Товарищество научных изданий КМК, 2011. – С. 97–100.
- Линник Е. В., Дегтярева Г. В., Ефимов С. В., Варлыгина Т. И., Терентьевая Е. И.** Предварительные итоги мониторинга рододендрона короткоплодного (*Rhododendron brachycarpum* D. Don ex G. Don fil.) на острове Кунашир (Сахалинская область) // Проблемы ботаники Южной Сибири и Монголии, 2020. – Т. 19, № 2. – С. 71–75. <https://doi.org/10.14258/pbssm.2020078>
- Мазуренко М. Т.** Вересковые кустарнички Дальнего Востока. – М.: Наука, 1982. – 184 с.
- Мазуренко М. Т.** Рододендроны Дальнего Востока, структура и морфогенез. – М.: Наука, 1980. – 232 с.
- Марчук Е. А., Линник Е. В.** Рододендрон Фори (*Rhododendron fauriei* Franch.) // Красная книга Российской Федерации: Растения и грибы / отв. ред. д.б.н. Гельтман Д. В. – 2-е офиц. изд. – М.: ВНИИ «Экология», 2024. – С. 246.
- Харкевич С. С., Качура Н. Н.** Редкие виды растений Советского Дальнего Востока и их охрана. – М.: Наука, 1981. – 185 с.
- Хохряков А. П., Мазуренко М. Т.** Вересковые – Ericaceae Juss. // Сосудистые растения советского Дальнего Востока. – СПб.: Наука, 1991. – Т. 5. – С. 119–166.
- Чабаненко С. И.** Рододендрон короткоплодный (*Rhododendron brachycarpum* D. Don ex G. Don.) // Красная книга Сахалинской обл.: Растения и грибы / отв. ред. Ерёмин В. М., Таран А. А. – Кемерово: ООО «Технопринт», 2019. – С. 76.
- Шеметова Н. С.** *Rhododendron fauriei* French – новый вид для материевой части Дальнего Востока // Ботан. журн., 1970. – Т. 55, № 4. – С. 550–551.
- Chamberlain D. F., Hyam R., Argent G., Fairweather G., Walter K. S.** The genus *Rhododendron* – its classification and synonymy. – Edinburgh: Royal Botanical Garden of Edinburgh Press, 1996. – 181 p.
- Cullen J.** A Revision of *Rhododendron*. I. Subgenus *Rhododendron* Sections *Rhododendron* and *Pogonanthum* // Notes from the Royal Botanic Garden Edinburgh, 1980. – Vol. 39. – P. 1–207.
- Edgar R. C.** MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput // Nucleic Acids Research, 2004. – Vol. 32. – P. 1792–1797.

- Felsenstein J.** Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap // Evolution, 1985. – Vol. 39. – P. 783–791.
- Khan G., Nolzen J., Schepker H., Albach D. C.** Incongruent phylogenies and their implications for the study of diversification, taxonomy, and genome size evolution of *Rhododendron* // American Journal of Botany, 2021. – Vol. 108, № 1. – P. 1957–1981.
- Kutsev M. G., Karakulov A. V.** Reconstruction of phylogeny of the genus *Rhododendron* L. from Russia based on the molecular genetic data // Forestry Ideas, 2011. – Vol. 17, № 1. – P. 62–65.
- Li-J. Y., Jie L., Möller M., Lin Z., Xue-Mei Z., De-Zhu L., Lian-Ming G.** DNA barcoding of *Rhododendron* (Ericaceae), the largest Chinese plant genus in biodiversity hotspots of the Himalaya-Hengduan Mountains // Mol. Ecol. Resour., 2015. – Vol. 15. – P. 932–944.
- Milne R. I.** Phylogeny and biogeography of *Rhododendron* subsection *Pontica*, a group with a tertiary relict distribution // Mol. Phylogen. Evol., 2004. – Vol. 33. – P. 389–401.
- Ohwi J.** Flora of Japan. –Washington: Smithsonian Institution, 1965. – 1110 p.
- Page R. D. M.** Tree View: An application to display phylogenetic trees on personal computers // Bioinformatics, 1996. – Vol. 12, № 4. – P. 357–358. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/12.4.357>.
- Polezhaeva M. A., Marchuk E. A., Modorov M. V., Ranyuk M. N., Bondarchuk S. N., Fukuda T., Kim S.-C., Hojnowski C.** Insights into the genetic diversity and population structure of *Rhododendron brachycarpum* (Ericaceae) in East Asia as characterized by SSR markers // Plant Systematics and Evolution, 2021. – Vol. 307, № 1. – P. 1–13.
- Ronquist F. R., Huelsenbeck J. P.** MrBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models // Bioinformatics, 2003. – Vol. 19. – P. 1572–1574.
- Swofford D. L.** PAUP*. Phylogenetic analysis using parsimony (and Other Methods), version 4.0. – Sunderland: Massachusetts, Inc. Publishers, Sinauer Associates, 2003.
- Taberlet P., Gielly L., Pautou G., Bouvet J.** Universal primers for amplification of 3 noncoding regions of chloroplast DNA // Plant Mol. Biol., 1991. – Vol. 17, № 5. – P. 1105–1109.
- Valiejo-Roman C. M., Terentieva E. I., Samigullin T. H., Pimenov M. G., Ghahremani-Nejad F., Mozaaffarian V.** Molecular data (nrITS-sequencing) reveal relationships among Iranian endemic taxa of the Umbelliferae // Feddes Repert. 2006. – Vol. 117. – P. 367–388.
- Yamazaki T.** A revision of the genus *Rhododendron* in Japan, Taiwan, Korea and Sakhalin. – Tokyo: Tsumura Laboratory, 1996. – 179 p.