

УДК 575.11+575.8:582.918.3

ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОТНОШЕНИЯ В РОДЕ *Primula* L. (Primulaceae) НА ОСНОВАНИИ СРАВНЕНИЯ НУКЛЕОТИДНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ITS-РЕГИОНА ЯДЕРНОЙ рДНК

© 2009 г. Н. К. Ковтонюк¹, А. А. Гончаров²

¹Центральный сибирский ботанический сад Сибирского отделения Российской академии наук,
Новосибирск 630090;

e-mail: kovtonyuk2004@mail.ru

²Биолого-почвенный институт Дальневосточного отделения Российской академии наук,
Владивосток 690022;

e-mail: gontcharov@biosoil.ru

Поступила в редакцию 20.12.2007 г.

Определены нуклеотидные последовательности ITS-региона ядерной рДНК для 34 видов рода *Primula* L. и одного вида рода *Cortusa* L. семейства Primulaceae Vent. и проведен анализ их филогенетических отношений. Впервые включены в анализ виды, встречающиеся во флоре России, а также сопредельных территорий. Полученные результаты позволяют уточнить систему рода *Primula* и подтверждают его секционное деление, но не всегда согласуются с делением рода на подроды по системе J. Richards. Полученные данные отвергают самостоятельность рода *Cortusa*, помещая его в качестве одной из вершинных групп секции *Cortusoides* Balf. f. рода *Primula*.

Род *Primula* L. (Первоцвет) является самым крупным в семействе Primulaceae Vent. и по данным разных авторов насчитывает 430–500 видов, распространенных во влажных и умеренных районах Северного полушария [1, 2]. Лишь несколько видов *Primula* встречаются в горах Африки (Эфиопия), тропической Азии (о-ва Ява и Суматра) и в горах Южной Америки. Первоцветы растут в лесном поясе, на равнинных лугах, на альпийских лужайках, в нивальных и луговинных тундрах. Отмечено несколько центров видового разнообразия рода *Primula*: восточные Гималаи и провинция Юньнань в Китае; переднеазиатский центр, включая Кавказ; горы Европы от Пиренеев через Альпы до Карпат; горы Восточной Азии и западной части Северной Америки [3].

Большинство видов рода *Primula* – многолетние короткокорневищные, травянистые растения, иногда монокарпиче, с розеточными побегами. Многие виды *Primula* являются декоративными растениями и на их основе выведены многочисленные сорта садовых примул [4, 5].

Первая монография по роду *Primula* была опубликована в 1817 г. [6], но эта работа еще не содержала классификации. Детально систему рода разработал F. Pax [7], для известных в то время 210 видов рода автор предложил выделить 21 секцию. В дальнейшем W. Smith и H. Fletcher [8] разделили род на 30 секций, предложенная ими система частично используется и в недавней монографической обработке рода *Primula*, где более 400 видов подразделены на 6 подродов и 37 сек-

ций [2]. Некоторые авторы подразделяют *Primula* на несколько подродов [9, 10].

Первая работа по флоре России “Flora Rossica” C. Ledebour [11] включала 14 видов *Primula*. Во “Флоре СССР” приводятся 67 видов рода из двух подродов, 10 секций и 19 рядов [12]. По нашей оценке, во флоре России произрастает 41 вид первоцветов, однако самостоятельность многих из них не признается зарубежными исследователями [2].

Существовавшие в XX столетии системы рода *Primula* были основаны на морфологических признаках и эколого-географических характеристиках: типе почкосложения, форме и размерах листовой пластинки, черешка, прицветников и чашечки, лопастей отгиба венчика, размерах коробочки, наличии или отсутствии опушения или мучнистого налета на различных частях растения [1, 3, 5, 9, 12–15]. Диагностические признаки секций и некоторых видов были расширены за счет привлечения данных о структуре поверхности семян первоцветов, исследованных с помощью сканирующего электронного микроскопа [16, 17]. Тем не менее в филогении рода *Primula* остались спорные вопросы, связанные с объемом секций, положением вновь описанных таксонов, эволюцией морфологических признаков разного таксономического ранга. Оказалось, что характеристики фенотипа не всегда достаточно для решения спорных вопросов систематики и филогении растений на различных таксономических уровнях [18–21].

В XXI в. начались исследования хлоропластной ДНК, что позволило уточнить систему рода *Primula*. Первыми были работы I. Trift [22, 23], выполненные под руководством А. Anderberg и М. Kallersjö в Стокгольме. Анализировался ген *rbcL* хлоропластной ДНК на 39 образцах первоцветов из 32 видов *Primula*, и всего анализировалось 90 образцов из порядка *Primulales* Lindl. Затем последовали работы E. Conti и A. Mast с соавт. [24, 25]. Авторы провели реконструкцию филогенетической истории семейства Primulaceae, сравнив последовательность интронов хлоропластных генов *trnL* и *rpl16* для 95 видов рода *Primula* и 22 родов из родственных семейств. Исследования показали, что в роде *Primula* самый большой подрод *Aleuritia* (Duby) Wendelbo, включающий 15 секций по системе J. Richards [1], распадается на три слабосвязанные между собой группы. Это рассматривалось как доказательство полифилетического происхождения подрода *Aleuritia*.

Последняя система рода *Primula*, предложенная J. Richards [2], была построена с учетом анализа и сравнения нуклеотидных последовательностей хлоропластной ДНК и фенотипических признаков таксонов. Автор сам отмечал, что использование хлоропластной ДНК накладывает определенные ограничения – исследуется только генетический материал, передаваемый по материнской линии, при этом картина филогенетических построений может быть неполной. Кроме того, виды, произрастающие на территории России и являющиеся объектом нашего исследования, в эти работы не включены либо анализировались частично.

В настоящее время достаточно широкое распространение получило изучение филогенетических отношений растений на основе анализа последовательностей внутренних транскрибируемых спейсеров (ITS1 и ITS2) на участке 18S–26S ядерной рДНК [26–29]. Хотя этот участок относительно невелик (600–700 пар нуклеотидов) и приблизительно одинаков у покрытосеменных, он достаточно информативен для выяснения филогенетических отношений на уровне семейств, родов, секций, особенно в тех случаях, когда внешнее сходство таксонов не всегда отражает их родство.

В данной работе представлены результаты сравнения нуклеотидных последовательностей внутреннего транскрибируемого спейсерного участка ядерной рибосомальной ДНК (ITS-региона) у видов рода *Primula* флоры России и сопредельных территорий с целью установления филогенетических связей внутри рода и уточнения положения североазиатских и восточноевропейских видов *Primula*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для исследования послужили образцы 34 видов из рода *Primula* и одного вида из рода *Cortusa* L., собранные во время экспедиционных поездок в различные регионы России, либо взятые с растений из коллекции ЦСБС СО РАН, а также с дублетных образцов, хранящихся в гербариях LE, MW, MHA, NS, NSK, VLA. При этом самые старые гербарные образцы, из которых была успешно выделена ДНК, датировались 1901 г. (*P. warshenewskiana* Fedtsch.). Также в анализ включали нуклеотидные последовательности видов рода *Primula* и других родов семейства Primulaceae (роды *Androsace* L., *Vitaliana* Sest. и *Douglasia* Lindl.) из базы данных GenBank (таблица).

Выделение, амплифицирование и секвенирование ДНК. Выделение и очистку общей ДНК клетки проводили с использованием QIAGEN DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany), следуя инструкциям производителя. Участок рибосомального оперона, кодирующий 3'-конец 18S рДНК, внутренний транскрибируемый спейсер 1 (ITS1), 5.8S рДНК, ITS2 и 5'-конец 26S рДНК амплифицировали с помощью полимеразной цепной реакции (далее ПЦР), используя праймеры N-nc18S10 и C26A. Продукты ПЦР использовали для циклического секвенирования с набором BigDye v.3.1 ("Applied Biosystems") и праймерами N18L18, N5.8S, ITS2, ITS4 [29]. Определение нуклеотидных последовательностей обеих цепей ПЦР продуктов проводили на секвенаторе ABI PRIZM 310 ("Applied Biosystems"). Последовательности собирали, используя пакет программ Staden [30].

Выравнивание последовательностей и построение филогенетических деревьев. Для анализа филогенетических взаимоотношений между представителями рода *Primula* была создана матрица данных, включающая вновь полученные последовательности и взятые из базы данных GenBank (таблица). В качестве внешнего корня были выбраны роды *Douglasia*, *Androsace* и *Vitaliana* из семейства Primulaceae, проявившие наибольшую близость к роду *Primula* [24]. Нуклеотидные последовательности выравнивались вручную в программе SeaView [31], следуя консервативным элементам первичной и вторичной структуры ITS региона.

Филогенетические деревья строили с использованием методов максимального правдоподобия (Maximum Likelihood, далее ML), объединения соседей (Neighborhood-Joining, далее NJ) и максимальной парсимонии (Maximum Parsimony, далее MP) в филогенетической программе PAUP 4.0b10 [32]. Эволюционные модели для анализов ML и NJ выбирали в программе Modeltest 3.04 [33]. Дистанции для NJ-анализа рассчитывали через ML-оптимизацию. Для ML и MP анализов исполь-

Исследованные образцы видов рода *Primula* и близких родов, их номера в базе GenBank последовательностей ITS-региона рДНК

Вид	Номер	Вид	Номер
<i>P. farinosa</i> L.	AF260772	<i>P. maximoviczii</i> Regel	AM920497
<i>P. farinosa</i> L.	AF164014	<i>P. japonica</i> A. Gray	AM920496
<i>P. bukukunica</i> Kovt.	AM920466	<i>P. bulleyana</i> Forrest	AF396690
<i>P. kawasimae</i> Hara	AM920467	<i>P. beesiana</i> Forrest	AF396689
<i>P. fauriei</i> Franch.	AM920468	<i>P. secundiflora</i> Franch.	AF260759
<i>P. borealis</i> Duby	AM920470	<i>P. poissoni</i> Franch.	AF396692
<i>P. serrata</i> Georgi	AM920469	<i>P. pulverulenta</i> Duthie	AF323699
<i>P. stricta</i> Hornem.	AF260766	<i>P. patens</i> (Turcz.) E. Busch	AM920485
<i>P. frondosa</i> Janka	AF260765	<i>P. jesoana</i> Mig.	AM920486
<i>P. scandinavica</i> Brunn	AF260769	<i>P. saxatilis</i> Kom.	AM920487
<i>P. mazurenkoae</i> A.P.Khokhr.	AM920471	<i>P. cortusoides</i> L.	AM920488
<i>P. mistassinica</i> Michx	AF260770	<i>P. kaufmanniana</i> Regel	AM920489
<i>P. modesta</i> Bisset & S.Moore	AF260762	<i>Cortusa altaica</i> Losinsk.	AM920491
<i>P. incana</i> M.E.Jones	AF260771	<i>C. matthioli</i> L.	AY232293
<i>P. sachalinensis</i> Nakai	AM920472	<i>C. matthioli</i> L.	AY566866
<i>P. fistulosa</i> Turkev.	AM920473	<i>C. matthioli</i> L.	AY566867
<i>P. tschuktschorum</i> Kjellm.	AF260767	<i>P. longiscapa</i> Ledeb.	AM920474
<i>P. valentinae</i> Fed.	AM920475	<i>P. obconica</i> Hance	AF323698
<i>P. egaliksensis</i> Wormsk.	AM920476	<i>P. malacoides</i> Franch.	AF323700
<i>P. warshenewskiana</i> Fedtsch.	AM920477	<i>P. sinensis</i> Lour.	AF323695
<i>P. auriculata</i> Lam.	AM920478	<i>P. rupestris</i> Balf. f. & Farrer	AF323697
<i>P. florindae</i> Kingdon-Ward	AF396691	<i>P. glutinosa</i> Wulfen	AF260755
<i>P. sikkimensis</i> Hooker f.	AF396696	<i>P. minima</i> L.	AF260756
<i>P. vulgaris</i> Hudson	AM920479	<i>P. spectabilis</i> Tratt.	AJ427794
<i>P. veris</i> L.	AF323701	<i>P. auricula</i> L.	AM920498
<i>P. ruprechtii</i> Kusnez.	AM920480	<i>P. palinuri</i> Petagn.	AJ427790
<i>P. veris</i> L.	AY680704	<i>P. carniolica</i> Jacq.	AJ427768
<i>P. macrocalyx</i> Bunge	AM920481	<i>P. auricula</i> L.	AJ427755
<i>P. vulgaris</i> Hudson	AJ427800	<i>P. latifolia</i> Lapeyr.	AJ427783
<i>P. veris</i> L.	AM920484	<i>P. hirsuta</i> All.	AJ427777
<i>P. pallasii</i> Lehm.	AM920482	<i>P. villosa</i> Wulfen	AJ427797
<i>P. elatior</i> (L.) Hill	AM920659	<i>P. angustifolia</i> Torr.	AF260754
<i>P. poloninensis</i> (Domin) Fed.	AM920483	<i>P. cuneifolia</i> Ledeb.	AM920499
<i>P. turkestanica</i> Hort.	AM920492	<i>Androsace ciliata</i> DC.	AY275034
<i>P. nivalis</i> Pall.	AM920493	<i>A. pyrenaica</i> Lam.	AY275035
<i>P. xanthobasis</i> Fed.	AM920494	<i>Vitaliana primuliflora</i> Bertol.	AY275050
<i>P. eximia</i> Greene	AF260768	<i>Douglasia nivalis</i> Lindl.	AY275026
<i>P. botschantzevii</i> Czukav. et Kovalevsk.	AM920490	<i>D. beringensis</i> S. Kelso, Jurtsev et D. F. Murray	AF260773
<i>P. tschuktschorum</i> Kjellm.	AM920495		

Примечание. Жирным шрифтом выделены виды, последовательности которых определены в настоящей работе.

зовали эвристический поиск оптимальной топологии. Устойчивость (статистическую поддержку) филогенетических деревьев в NJ и MP анали-

зах оценивали методом бутстрепа [34], используя 1000 бутстреп-реплик. Значения процента бутстрепа (Bootstrap Percentage, далее BP) менее 50%

не рассматривались и не указаны на рисунке. В бутстреп-анализе МР-деревьев в каждой реплике проводили 10 эвристических поисков оптимальной топологии со случайным порядком добавления таксонов.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Длина спейсерного участка (ITS1, 5.8S и ITS2) у исследованных видов варьировала от 618 пар нуклеотидов (далее пн) для *Primula jesoana* Miq. до 640 пн у нескольких видов при незначительно повышенном составе оснований G + C ($53.72 \pm 1.3\%$). Для видов рода *Cortusa* количество нуклеотидов в ITS-регионе было 621 при сходном содержании G + C. ITS-регион у видов, выбранных в качестве внешнего корня, отличался меньшей длиной (605 ± 1.3 пн) и более высоким процентом G + C ($60.7 \pm 1.4\%$). Как и у большинства покрытосеменных, в роде *Primula* ITS1 длиннее ITS2 (250.2 ± 3.8 пн против 215.6 ± 2.8 пн). SYM-модель эволюции нуклеотидных последовательностей, дополненная пропорцией инвариантных позиций (I) и гамма-параметром (Г), была выбрана программой Modeltest как наиболее адекватно описывающая наш набор данных. Результаты ML-анализа 77 таксонов представлены на рисунке. На дереве представители рода *Primula* сгруппировались в четыре основных кластера.

Кластер I с высокой достоверностью (100% BP) объединяет представителей четырех секций рода *Primula*. Именно в состав этого кластера включено большинство последовательностей, полученных нами. Высокоустойчивая (100% BP) клада типовой секции *Primula* (7 видов и 10 последовательностей) характеризуется длинной ветвью и является сестринской по отношению к крупной кладе (22 вида и 23 последовательности) с 87–99% BP, объединяющей представителей трех секций: *Aleuritia* Duby, *Oreophlomis* (Ruprecht) Fedorov и *Sikkimensis* Balf. f. Последние две секции представлены в нашем анализе двумя видами каждая, и их монофилия поддержана высокими значениями бутстрепа (90–100%; рисунок). В составе многовидовой секции *Aleuritia* выделились несколько мелких достоверных субклад, однако в целом секция не имеет статистической поддержки.

Кластер II (100% BP) объединяет примерно равновеликие клады видов секций *Crystallophlomis* (Ruprecht) Fedorov и *Proliferae* Pax. Клада *Proliferae* является высокоустойчивой, тогда как поддержка для клады *Crystallophlomis* низка (63% BP только в NJ). В нее вошли две территориально изолированные группы видов: южносибирские высокогорные виды, фенотипически очень близкие – *P. turkestanica* Hort., *P. nivalis* Pall., *P. xanthobasis* Fed. (78–93% BP), и берингийские виды *P. eximia* Greene, *P. tschuktschorum* Kjellm. (80–85% BP).

Кластер III объединяет (92/81 BP) виды *Primula* из секций *Auganthus* (Link) Pax ex Balf. f., *Cortusoides* Balf. f., *Obconicolisteri* Balf. f., *Monocarpicae* Flanchet ex Pax и род *Cortusa*. Этот кластер хорошо структурирован и порядок ветвления в нем статистически достоверен. Базальное положение в кластере занимает секция *Auganthus* (100% BP), за ней следуют секции *Obconicolisteri* и *Monocarpicae*, а клада секции *Cortusoides* (62% BP) занимает верхинное положение в кластере. Представители рода *Cortusa* формируют одну из вершинных клад (93–97% BP) в секции *Cortusoides*.

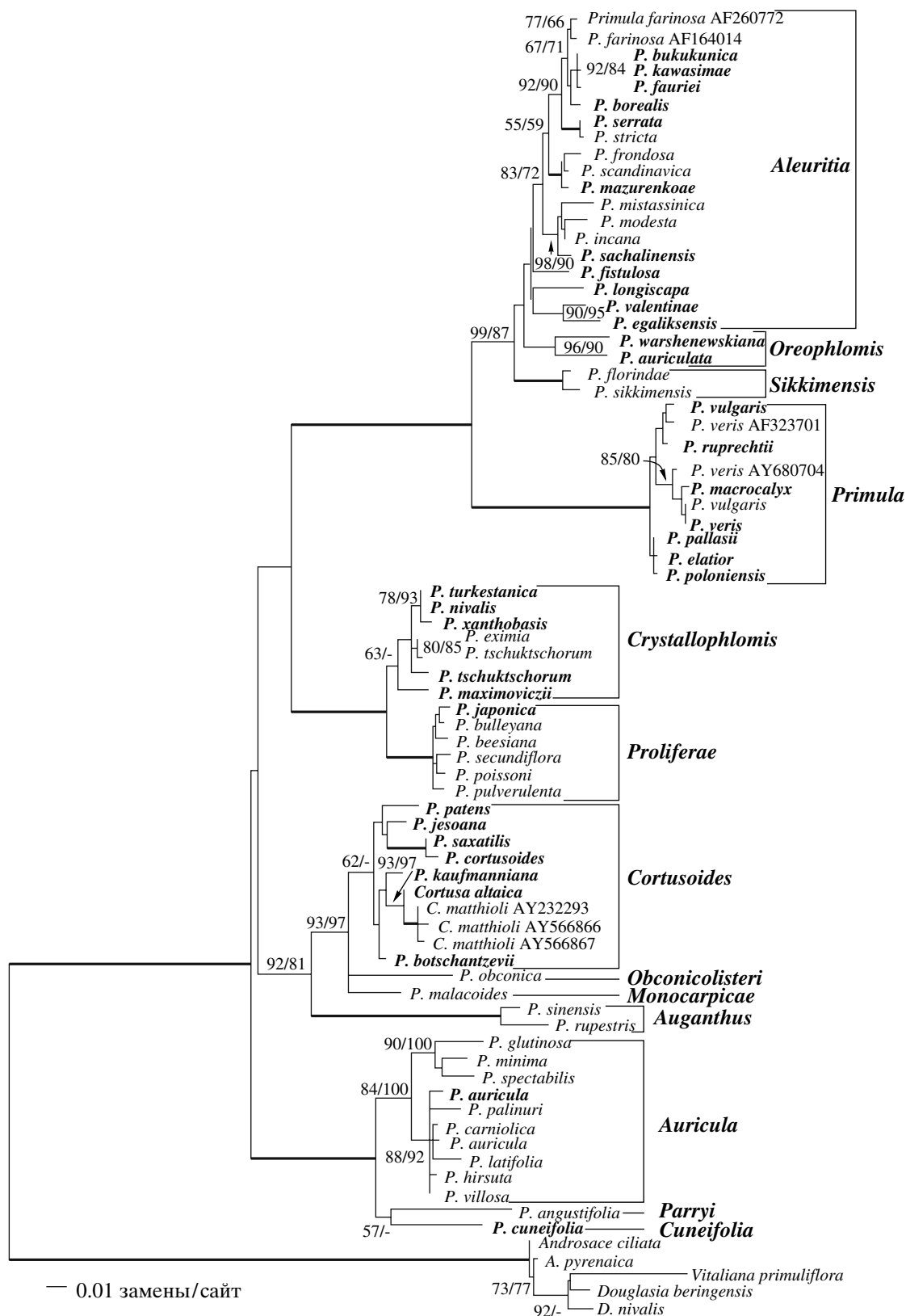
В состав высокоустойчивого (100% BP) кластера IV вошли представители секций *Auricula* Duby, *Parryi* W.W. Smith ex Wendelbo и *Cuneifolia* Balf. f. Клада *Auricula* достаточно хорошо поддержана бутстрепом (84–100% BP) и в ее составе выделены несколько достоверных подклад. Клады *Parryi* и *Cuneifolia* (57% BP только в NJ) являются сестринской группой по отношению к *Auricula*.

Порядок ветвления кластеров на дереве достоверно установить не удалось. Топологически кластер IV занимает базальное положение, за ним следует кластер III, а кластеры II и I формируют сестринскую пару.

ОБСУЖДЕНИЕ

В нашей работе в анализ впервые были включены нуклеотидные последовательности ITS-региона рДНК 34 видов рода *Primula* из восьми секций, представленных во флоре России и близлежащих территорий, ранее не учтенные в опубликованных работах, а также материалы, размещенные в базе данных GenBank. Всего анализировалось 77 образцов, из них – 68 образцов по 63 видам *Primula* из 13 секций. Роды *Cortusa* (4 образца по двум видам), *Androsace* (2 вида), *Douglasia* (2 вида), *Vitaliana* (1 вид) из трибы *Primuleae* семейства Primulaceae были взяты в качестве внешнего корня. Нами установлены четыре крупные группы в составе рода *Primula*, соответствующие кластерам I–IV.

Базальный кластер IV соответствует подроду *Auriculastrum* (Link) Wendelbo в системе рода *Primula* [2]. В него вошли три секции: *Cuneifolia* ($x = 11$), *Parryi* ($x = 22$) и *Auricula* ($x = 33$). Следует отметить, что в целом для рода *Primula* обнаружены основные числа хромосом $x = 12, 11, 10, 9$ и 8 , при этом $x = 11$ наиболее широко распространено и чаще встречается в трибе *Primuleae* и в самом роде *Primula*. Это послужило поводом рассматривать $x = 11$ как анцестральный признак, присущий более примитивным видам *Primula* [2]. Внутри подрода *Auriculastrum* явно прослеживается тренд плоидности ($x = 11, 22, 33$), он объединяет виды с особым типом листьев – листья в почкосложении завернуты на верхнюю поверхность пластинки,



Филогенетическое дерево представителей рода *Primula*, основанное на сравнении 77 ITS рДНК последовательностей методом максимального правдоподобия. Цифрами указана устойчивость ветвей, рассчитанная для NJ/MP-анализов методом бутстрепа. Ветви, поддержанные 100% БР в обоих методах, выделены толстыми линиями. Жирным шрифтом выделены виды, последовательности которых определены в настоящей работе.

плотные, кожистые. У всех остальных видов *Primula* листья в почкосложении завернуты на нижнюю поверхность пластинки, перепончатые, реже плотные. Лишь у некоторых видов секции *Crystallophloemis* [12] в онтогенезе листья сначала завернуты на верхнюю поверхность, но позже снова заворачиваются на нижнюю листовую поверхность. Если рассматривать онтогенез как сжатую форму филогенеза, то тип почкосложения с листьями, завернутыми на верхнюю поверхность пластинки, характерный для подрода *Auriculastrum*, следует рассматривать как анцестральный признак, а подрод *Auriculastrum* как более древний в роде *Primula*.

Кластер III (рисунок) объединяет секции *Auganthus* ($x = 12$), *Monocarpicae* ($x = 9$), *Obconicolisteri* ($x = 12$), *Cortusoides* ($x = 11, 12$) и виды рода *Cortusa*. Кластер соответствует подроду *Auganthus* Wendelbo по системе Richards [2], за исключением рода *Cortusa*. У первоцветов этого подрода листовые пластинки мягкие, перепончатые, часто морщинистые, опушенные многоклеточными волосками.

Виды рода *Cortusa* (три европейских образца *C. matthioli* L. и наш образец *C. altaica* Losinsk.) входят в III кладу и достоверно близки видам секции *Cortusoides*, что подтверждается высоким значением бутстрепа (93–97%). Подобные результаты были получены и в предыдущих исследованиях [23, 25]. Род *Cortusa* ($x = 12$), рядом авторов принимаемый как монотипный с видом *C. matthioli*, имеет широкий евроазиатский ареал и распадается в восточной части ареала на ряд мелких видов, фенотипически очень близких первоцветам секции *Cortusoides* (*P. kaufmanniana* Regel, *P. jesoana* Mig., *P. geranifolia* Hook). От них кортузы отличаются только строением цветка: у всех *Cortusa* короткие тычиночные нити при основании соединены перепонкой в кольцо, тогда как у первоцветов тычиночные нити несросшиеся. Этот признак сближает род *Cortusa* с олиготипным родом *Kaufmannia* Regel, два среднеазиатских вида которого имеют тычиночные нити, сросшиеся в утолщенное кольцо. До сих пор нередко случаи ошибочного определения гербарного материала по кортузам и первоцветам секции *Cortusoides*. Наши исследования не подтверждают самостоятельности рода *Cortusa*, возможно его следует рассматривать отдельной секцией в подроде *Auganthus*.

Кластер II включает секции *Proliferae* ($x = 11$) и *Crystallophloemis* ($x = 11$). В секции *Crystallophloemis* достоверно обособились три морфологически близких между собой вида – *P. nivalis*, *P. xanthobasis*, *P. turkestanica* (BP = 78 и 93%).

Кластеры II и I вместе без секции *Primula* соответствуют подроду *Aleuritia* в системе J. Richards [2]. Наши исследования еще раз подтверждают

неоднородность и искусственность подрода *Aleuritia*.

В кластере I клады *Primula* ($x = 11$) с диплоидными видами ($2n = 22$) соответствует типовой секции и подроду *Primula* в системе J. Richards [2]. В секции *Primula* проанализированы нуклеотидные последовательности викарирующих видов: *P. macrocalyx* Bunge и *P. veris* L. (BP = 85/80), а также трех близких видов – *P. pallasii* Lehm., *P. elatior* (L.) Hill. и *P. poloniensis* (Domin) Fed. В этот же подрод входит монотипная секция *Sredinskya* Stein с одним видом *P. grandis* Trautv. ($2n = 22$) из Абхазии и Сванетии (Грузия). Для подрода характерны растения волосистые без мучнистого налета, с сильно морщинистыми листьями.

В кластер I входят также три клады, соответствующие секциям *Sikkimensis* ($x = 11, 2n = 22$), *Oreophloemis* ($x = 11, 2n = 22, 44$), *Aleuritia* ($x = 9$). Эти три секции из кластера I и кластер II (секции *Crystallophloemis* и *Proliferae*) входят в состав подрода *Aleuritia* по системе J. Richards [2], построенной на основе фенотипических признаков и анализа хлоропластной ДНК.

Секция *Aleuritia*, топологически дальше всех отстоящая от корня дерева, представлена наиболее полиморфными североазиатскими и североамериканскими видами первоцветов. Основное число хромосом в ней $x = 9$ рассматривается как более прогрессивный признак [2]. Большинство видов секции диплоиды, с $2n = 18$ (*P. farinosa* L., *P. longiscapa* Ledeb., *P. modesta* Bisset & S. Moore, *P. frondosa* Janka, *P. mistassinica* Michx), есть тетраплоиды с $2n = 36$ (*P. borealis* Duby, *P. serrata* Georgi), гексаплоиды с $2n = 54$ (*P. scotica* Hook., *P. incana* M.E. Jones), октаплоиды с $2n = 72$ (*P. scandinavica* Brunn, *P. magellanica* Lehm.) и $2n = 126$ (*P. stricta* Hornem.).

В нашем исследовании монофилия секции *Aleuritia* не получила статистической поддержки, как, впрочем, и в работах других авторов. Относительно высокая дивергенция последовательностей в секции может быть одной из причин ее полиморфности.

Из секции *Aleuritia* нами намечен к описанию вид *P. bukukunica* Kovtonyuk in shet., собранный в Сохондинском заповеднике и интродуцированный в ЦСБС. По результатам анализа последовательностей нуклеотидов ITS-региона ядерной рДНК *P. bukukunica* близок к *P. kawasimae* Naga и *P. fauriei* Franch. (BP = 92–84%), эти виды отличаются формой листовой пластинки и имеют непрерывающийся ареал.

Эндемичный вид *P. sachalinensis* Nakai из этой же секции, собранный нами на о-ве Сахалин, на грязевом вулкане Магунтан в окрестностях ж.-д. ст. Пугачево, показал статистически достоверное сходство (BP = 98/90) с видами Аляски и Северной Канады – *P. mistassinica*, *P. modesta*, *P. incana*, а не

с *P. farinosa*, с которым его нередко объединяют. Наши исследования еще раз подтверждают видовую самостоятельность эндемичного вида *P. sachalinensis*.

Ранее RAPD-данные, являющиеся более чувствительным методом на межвидовом уровне, подтвердили генетическое родство байкальского эндемика *P. pinnata* M.Pop. et Fed. и южносибирского вида *P. serrata* Georgi [35–38].

Проведенное сравнение нуклеотидных последовательностей внутреннего транскрибируемого спейсера рибосомальной ДНК позволило уточнить филогенетические отношения между таксонами внутри рода *Primula*, а также филогенетические связи между родами в этом семействе. Данный метод позволяет выделить клады, соответствующие секциям рода *Primula*. Полученные результаты в значительной мере согласуются с секционным делением рода *Primula* и результатами предшествующих исследований, основанных на ином наборе данных и использующих другие маркеры [23–25]. В то же время полученные кластеры не всегда согласуются с дробным делением рода *Primula* на подроды по системе J. Richards [2]. Вероятно, деление рода *Primula* на два подрода по типу почкосложения и ряд секций с учетом остальных признаков выглядит более логично. Исследования не подтверждают самостоятельности рода *Cortusa*, возможно его следует рассматривать отдельной секцией в подроде *Auganthus*.

Авторы благодарят кураторов гербарных коллекций за предоставленную возможность использования дублетного материала для молекулярного анализа, а также выражают признательность Н.В. Фризену за помощь в проведении исследований. Сбор материала и исследования проводились при поддержке грантов РФФИ (07-04-00877а, 07-04-10106-к), интеграционного проекта СО РАН № 34, экспедиционных грантов СО РАН, 2001–2007 гг., грантов ДВО РАН (09-III-A-06-167 и -188) и Grant-in-Aid for the Scientific Program (A) 19255004 (Representative: Katsuhiko Kondo) of JSPS.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Richards J. *Primula*. Illustrated by B. Edwards. Portland, Oregon: Timber Press, 1993. 300 p.
2. Richards J. *Primula*. Illustrations by B. Edwards. New edition. Portland, Oregon: Timber Press, 2003. 348 p.
3. Буш Е.А. *Primulaceae* // Флора Сибири и Дальнего Востока. Л., 1926. С. 7–81.
4. Kovtonyuk N.K., Bogatyrev N.R., Ovchinnikov Yu. V. *Primula* biodiversity conservation in the Central Siberian Botanical Garden, Novosibirsk, Russia // Botanical Gardens Conservation News. 2000. № 3. P. 43–44.
5. Kovtonyuk N.K. Family *Primulaceae*. Flora of Siberia. V. 11. *Pyrolaceae-Lamiaceae (Labiatae)*. Enfield: NH, USA. Science Publ., 2006. P. 37–56.
6. Lehmann J.G.C. Monographia generis *Primularum*. Lipsiae, 1817. 115 p.
7. Pax F., Knuth R. *Primulaceae* // Das Pflanzenreich. IV, 237 / Ed. Engler H.G.A. Berlin, 1905. S. 1–386.
8. Smith W.W., Fletcher H.R. The genus *Primula*: section *Candelabra* // Trans. Bot. Soc. Edinb. 1941. V. 33. P. 122–181.
9. Wendelbo P. Studies in *Primulaceae*. II. An account of *Primula* subgenus *Sphondylia* with a review of the subdivision of the genus // Univ. Bergen. Arbok. Mat. Naturv. Ser. 1961. V. 11. P. 1–31.
10. Valentine D.H., Kress A. *Primula* L. // Flora Europaea. Cambridge, 1972. V. 3. P. 15–20.
11. Ledebour C. F. Flora Rossica. Stuttgartiae, 1947–1949. V. 3. P. 1. S. 7–15.
12. Федоров Ан. А. Первоцвет – *Primula* L. // Флора СССР. М.; Л.: Изд-во АН СССР, 1952. Т. 18. С. 111–202.
13. Ковтонюк Н.К. Семейство *Primulaceae* – Примуловые // Флора Сибири. *Pyrolaceae – Lamiaceae (Labiatae)*. Новосибирск: Наука, 1997. Т. 11. С. 30–47.
14. Ковтонюк Н.К. Семейство *Primulaceae* – Примуловые или Первоцветные // Конспект флоры Сибири: Сосудистые растения. Новосибирск: Наука, 2005. С. 76–80.
15. Halda J.J. The genus *Primula* in cultivation and in the wild. Denver, Colorado: Tethys Books, 1992. 364 p.
16. Ковтонюк Н.К. Признаки скульптуры поверхности семян в систематике рода *Primula (Primulaceae)* на примере сибирских видов // Бот. журн. 1999. Т. 84. № 7. С. 41–46, 160–163.
17. Kovtonyuk N.K. Evolution of seed surfaces in some *Primulaceae* from Northern Asia // 14 Symp. Biodiversitat und Evolutionsbiologie. Zusammenfassungen der Fortrage und Poster. Jena, 1999. S. 101.
18. Антонов А.С. Геносистематика растений. М.: ИКЦ “Академкнига”, 2006. 293 с.
19. Шнеер В.С. Краткий очерк способов получения, обработки и трактовки данных по последовательностям ДНК в систематике растений. I. Выделение и секвенирование ДНК; выравнивание последовательностей // Бот. журн. 2005. Т. 90. № 1. С. 3–18.
20. Шнеер В.С. Краткий очерк способов получения, обработки и трактовки данных по последовательностям ДНК в систематике растений. II. Методы построения филогенетических деревьев и оценки их достоверности; о выборе таксонов и последовательностей ДНК для анализа // Бот. журн. 2005. Т. 90. № 3. С. 304–331.
21. Фризен Н. Молекулярные методы, используемые в систематике растений. Барнаул: АзБука, 2007. 64 с.
22. Trift I. Phylogenetic relationships within non-monophyletic *Primulaceae* // Postgraduate thesis. Univ. Stockholm, Sweden, 2001. 25 p.
23. Trift I., Kallersjo M., Anderberg A. The monophyly of *Primula (Primulaceae)* evaluated by analysis of sequences from the chloroplast gene *rbcl* // Systematic Botany. 2002. V. 27. № 2. P. 396–407.
24. Conti E., Suring E., Boyd D. et al. Phylogenetic relationships and character evolution in *Primula* L.: usefulness of ITS sequence data // Plant Biosystems. 2000. V. 134. № 3. P. 385–392.

25. Mast A. R., Kelso S., Richards J. et al. Phylogenetic relationships in *Primula* L., and related genera (*Primulaceae*) based on noncoding chloroplast DNA // Int. J. Plant Sci. 2001. V. 162. № 6. P. 1381–1400.
26. Anderberg A.A., Trift I., Kallersjo M. Phylogeny of *Cyclamen* L. (*Primulaceae*): Evidence from morphology and sequence data from the internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA // Pl. Syst. Evol. 2000. V. 220. P. 147–160.
27. Zhang L.B., Kadereit J.W. Classification of *Primula* sect. *Auricula* (*Primulaceae*) based on two molecular data sets (ITS, AFLPs), morphology and geographical distribution // Bot. J. Lin. Soc. 2004. V. 146. P. 1–26.
28. Гончарова С.Б., Артюкова Е.В., Гончаров А.А. Филогенетические связи представителей подсемейства Sedoidea (*Crassulaceae*) на основании сравнения последовательностей ITS-региона ядерной рДНК // Генетика. 2006. Т. 42. № 6. С. 803–811.
29. Wen J., Zimmer E.A. Phylogeny and biogeography of *Panax* L. (the ginseng genus, *Araliaceae*): Inferences from ITS sequences of nuclear ribosomal DNA // Mol. Phylog. Evol. 1996. V. 6. № 2. P. 167–177.
30. Bonfield J.K., Smith K.F., Staden R. A new DNA sequence assembly program // Nucl. Acids Res. 1995. V. 23. P. 4992–4999.
31. Galtier N., Gouy M., Gautier C. SeaView and Phylo_win, two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny // Comp. Applic. Biosci. 1996. V. 12. № 4. P. 543–548.
32. Swofford D.L. PAUP* Phylogenetic analysis using parsimony (and other methods). Beta version 10. Sunderland: Sinauer Associates, 2002.
33. Posada D., Crandal K.A. MODELTEST: testing the model of DNA substitution // Bioinformatics. 1998. V. 14. P. 817–818.
34. Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap // Evolution. 1985. V. 39. P. 783–791.
35. Ковтонюк Н.К., Иванов М.К., Ревенко А.А. К использованию RAPD-анализа в систематике рода *Primula* L. (*Primulaceae*) // Проблемы ботаники Южной Сибири и Монголии: Материалы 1-й междунар. научно-практич. конф. (Барнаул, 26–28 ноября 2002 г.). Барнаул: АзБука, 2002. С. 107–114.
36. Ковтонюк Н.К., Виньковская О.П., Conti E. Классическое местонахождение узколокального эндемика *Primula pinnata* M. Pop. et Fed. // Проблемы охраны растительного мира Сибири: Тез. докл. междунар. совещания (Новосибирск, 21–24 авг. 2001 г.). Новосибирск, 2001. С. 55–56.
37. Ковтонюк Н.К., Новикова Т.И., Черных Е.В. Эндемичный вид *Primula pinnata*: Проблемы систематики и сохранения *inter situ* // Turczaninowia. 2004. Т. 7. № 2. С. 9–29.
38. Ковтонюк Н.К., Eveleigh P. Сохранение и изучение дикорастущих первоцветов (*Primula* L., *Primulaceae*) в ботанических садах // Материалы Всерос. конф. “Роль ботанических садов в сохранении биоразнообразия растительного мира Азиатской России: настоящее и будущее” (Новосибирск, 17–19 июля 2006 г.). Новосибирск, 2006. С. 138–140.

Phylogenetic Relationships in the Genus *Primula* L. (*Primulaceae*) Inferred from the ITS Region Sequences of Nuclear rDNA

N. K. Kovtonyuk^a and A. A. Goncharov^b

^a Central Siberian Botanical Garden, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630090 Russia

^b Institute of Biology and Soil Sciences, Russian Academy of Sciences, Vladivostok, 690022 Russia;

e-mail: gontcharov@biosoil.ru

The nucleotide sequences of the nuclear rDNA ITS regions were determined for 34 species of the genus *Primula* L. and one species of the genus *Cortusa* L., family *Primulaceae* Vent., and used to infer the phylogenetic relationships among these species. This analysis species of the Russian flora and the flora of adjacent territories were studied for the first time. The results clarified the taxomic structure of the genus *Primula* and confirmed the entity of some of its sections; but not the subgenera sensu J. Richards. Our data do not support an independent status of the genus *Cortusa*, placing it as one of the terminal lineages of the section *Cortusoides* Balf. f. in the genus *Primula*.