

УДК 582.715:575

Канд. биол. наук **М.М. КОЗЫРЕНКО**  
(ФНЦ Биоразнообразия ДВО РАН, kozyrenko@biosoil.ru)  
Канд. биол. наук **Е.В. АРТЮКОВА**  
(ФНЦ Биоразнообразия ДВО РАН, artyukova@biosoil.ru)  
Канд. биол. наук **Т.Э. ПОЗДНЯКОВА**  
(ФГБОУ ВО СПбГАУ, erastovna@mail.ru)

### **ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ВИДОВ *Rhodiola* (*R. rosea*, *R. integrifolia*, *R. stephanii* и *R. pinnatifida*) ПО ДАННЫМ ПОЛИМОРФИЗМА МЕЖГЕННЫХ СПЕЙСЕРОВ ХЛОРОПЛАСТНОЙ ДНК**

Полиморфный род *Rhodiola* L. представляет собой одну из сложных в таксономическом отношении групп сем. Crassulaceae. Этот род включает около 70 видов [1, 2], из них 55 (в том числе 16 эндемичных видов) в Китае, причем большинство распространены на Цинхай-Тибетском плато и прилегающих к нему районах, пять видов на северо-востоке Азии, несколько видов в Центральной Азии, включая Тянь-Шань и Алтайские горы. Межконтинентальные дизъюктивные ареалы имеют *R. rosea* L., *R. integrifolia* Raf. и *R. rhodantha* (A. Gray) N. Jacobsen. Виды этого рода являются травянистыми многолетниками, преимущественно высокогорными, однако встречаются и на побережьях морей и рек. Исторически используются в качестве адаптогенов в России и Северной Европе, оказывая также нейропротекторное, кардиопротекторное, антидепрессивное, нейролептическое, ноотропное действие, они увеличивают продолжительность жизни и стимулируют деятельность центральной нервной системы [3].

Лекарственные растения являются категорией особо уязвимой вследствие интенсивной, нерациональной, недостаточно контролируемой заготовки сырья. Кроме того, естественные процессы, такие как аридизация и потепление климата, наблюдающиеся в последние десятилетия, также оказывают неблагоприятное воздействие на состояние природных популяций *Rhodiola*. Эффективный и научно обоснованный выбор путей и форм охраны их ресурсов возможен на основе популяционного подхода с учетом специфики внутривидовой генетической изменчивости, которая определяет адаптивный потенциал вида в условиях трансформации окружающей среды.

Типовой вид рода *R. rosea* (родиола розовая, золотой корень) распространен в высокогорьях бореальной зоны Евразии и Аппалачах, на большей части побережий Арктики и Дальнего Востока, а также на атлантическом побережье Северной Америки. Высокая вариабельность морфологических признаков не позволяет достоверно идентифицировать *R. rosea* и близкие ей таксоны. В различных работах встречается около 50 синонимов *R. rosea*, что наглядно отражает сложность видовой систематики. Вид включен в Красную книгу Российской Федерации как редкий, имеющий ресурсное значение, охраняется по всему ареалу, кроме Красноярского и Алтайского краев, Магаданской области и Республики Тыва. *Rhodiola integrifolia* (родиола цельнолистная) распространена по обеим сторонам Берингова пролива, главным образом в арктических и субарктических регионах Нового и Старого Света, преимущественно там, где отсутствует *R. rosea*, кроме Сибири. У *R. integrifolia* существует около 30 синонимов. Большая часть ареала *R. stephanii* (Cham.) Trautv. et S.A. Mey (родиола Стефана) находится в Маньчжурской провинции, заходит в область российской Арктики – низовья Пенжины, район Гижигинской губы. *Rhodiola pinnatifida* Boriss. (родиола перистонадрезанная) распространена преимущественно в Алтае-Саянской провинции: на Монгольском Алтае, Хангае и Юго-Восточном Алтае, эндемик высокогорий Южной Сибири и Северной Монголии, вид включен в Красные книги Иркутской области, Бурятии и Забайкальского края как находящийся под угрозой исчезновения.

**Цель исследования** – дать оценку генетического разнообразия и популяционной структуры *R. rosea*, *R. integrifolia*, *R. stephanii* и *R. pinnatifida* Boriss. по данным

полиморфизма нуклеотидных последовательностей межгенных спейсеров *atpB–rbcL* и *trnS–trnG* хлоропластной ДНК (хпДНК).

**Материалы, методы и объекты исследования.** Материалом для исследования служили 85 растений из 8 природных популяций *Rhodiola* (табл. 1).

Индивидуальные препараты тотальной ДНК выделены из высушенных в силикагеле листьев с использованием набора DNeasy Plant Mini Kits (Qiagen, Hilden, Germany) согласно протоколу производителя. Нуклеотидные последовательности прямых и обратных цепей, полученные после циклического секвенирования продуктов амплификации, определяли на генетическом анализаторе ABI 3130 (Applied Biosystems, USA). Число гаплотипов (*nh*), гаплотипическое (*h*) и нуклеотидное ( $\pi$ ) разнообразие, уровень межпопуляционной дифференциации ( $\Phi_{ST}$ ), распределение генетической изменчивости по иерархическим уровням (анализ молекулярной дисперсии, AMOVA) рассчитывали с помощью программы Arlequin. Каждую делецию или вставку (индель), независимо от их размера, кодировали как единичное мутационное событие. Генеалогические связи гаплотипов анализировали методом медианного связывания (Median Joining, MJ) в программе NETWORK. Филогенетический анализ проводили методами максимальной экономии (Maximum Parsimony, MP) и ближайшего связывания (Neighbour-Joining, NJ) с помощью пакета программ PAUP. Статистическую достоверность порядка ветвления оценивали с помощью бутстреп-анализа 1000 альтернативных деревьев. В качестве внешней группы в филогенетических анализах использовали образец *Aizopsis kamtschatica* (Fisch.) Grulich, относящийся к роду *Aizopsis* Grulich сем. Crassulaceae [4].

Таблица 1. Исследуемые популяции видов *Rhodiola* и их генетическое разнообразие

Местонахождение (кол-во образцов)	Код	<i>nh</i>	<i>h</i>	$\pi$
<i>R. rosea</i>				
Республика Алтай, Южно-Чуйский хребет, окр. оз. Караколь, 2700 м н.у.м. (9)	ALTR	H1 H2 H3	0,556	0,0065
Красноярский край, хребет Западный Саян, гора Тушканчик, 1500 м н.у.м. (8)	KRAR	H3 H4 H5 H6	0,786	0,0143
Забайкальский край, Сохондинский заповедник, голец Цаган-Ула, 2200 м н.у.м. (6)	ULAR	H7 H8	0,533	0,0004
Центральная Камчатка, окр. пос. Эссо, Срединный Камчатский хр., 1000 м н.у.м. (16)	KAMR	H9	0,000	0,0000
В целом для вида			0,795	0,0137
<i>R. pinnatifida</i>				
Забайкальский край, Сохондинский заповедник, верхнее течение р. Букукун, 1700 м н.у.м. (13)	BURP	H8 H10 H11	0,654	0,0061
<i>R. stephanii</i>				
Забайкальский край, Сохондинский заповедник, берег оз. Букукунское, 2090 м н.у.м. (9)	BURS	H12	0,000	0,0000
Хабаровский край, окр. г. Охотска, долина р. Охота (15)	KHAS	H13	0,000	0,0000
В целом для вида			0,489	0,0027
<i>R. integrifolia</i>				
Центральная Камчатка, влк. Сопка Плоская, 1000 м н.у.м. (9)	KAMI	H14	0,000	0,0000

**Результаты исследования.** Для всех исследованных образцов растений *Rhodiola* определены нуклеотидные последовательности межгенных спейсеров *atpB–rbcL* и *trnS–trnG* хпДНК. Длина этих регионов у образцов разная вследствие присутствия небольших (2–11

нуклеотидов) инделей и мононуклеотидных (поли-А и поли-Т) повторов. Длина *atpB-rbcL* изменялась от 748 до 762 пн, а *trnS-trnG* – от 667 до 685 пн, длина выровненных матриц регионов, включая индели, составила 769 и 700 пн соответственно. Таким образом, общая длина матрицы объединенных последовательностей двух регионов 85 образцов *Rhodiola* составила 1469 пн. Обнаружено 33 переменных сайта, из них 32 информативны согласно методу максимальной экономии. Уровни гаплотипического и нуклеотидного разнообразия в популяциях *Rhodiola* изменялись в пределах 0,000–0,786 и 0,0000–0,0143 соответственно (табл. 1). Наибольшим гаплотипическим разнообразием характеризуется красноярская популяция *R. rosea* (KRAR), а популяции видов *R. stephanii*, *R. integrifolia* и популяция *R. rosea* с Камчатки оказались мономорфными (табл. 1). Нуклеотидная дивергенция между популяциями *R. rosea* достигает пятикратных различий (табл. 2).

Таблица 2. Нуклеотидная дивергенция и генетические дистанции между популяциями *Rhodiola* по данным хпДНК

Популяция	ALTR	KRAR	ULAR	KAMR	BURP	BURS	KHAS	KAMI
<b><math>K_s</math></b>								
ALTR	–	3,42 (0)	2,67 (2)	9,67 (9)	1,97 (0)	16,67 (16)	17,67 (17)	19,67 (19)
KRAR	0,002	–	4,50 (1)	6,75 (4)	3,87 (0)	16,75 (14)	17,75 (15)	19,75 (17)
ULAR	0,002	0,003	–	13,00 (13)	0,69 (0)	19,00 (19)	21,00 (21)	23,00 (23)
KAMR	0,007	0,005	0,009	–	10,31 (9)	22,00 (22)	22,00 (22)	26,00 (26)
BURP	0,001	0,003	0,001	0,008	–	17,31 (16)	18,31 (17)	20,31 (19)
BURS	0,012	0,012	0,013	0,016	0,012	–	5,00 (5)	6,00 (6)
KHAS	0,012	0,013	0,015	0,016	0,013	0,004	–	9,00 (9)
KAMI	0,014	0,014	0,016	0,018	0,014	0,004	0,006	–
<b><math>F_{ST}</math></b>								
ALTR	0,000							
KRAR	0,276	0,000						
ULAR	0,423	0,429	0,000					
KAMR	0,883	0,772	0,995	0,000				
BURP	0,210 ns	0,320	0,116 ns	0,870	0,000			
BURS	0,868	0,775	0,993	1,000	0,849	0,000		
KHAS	0,904	0,837	0,996	1,000	0,889	1,000	0,000	
KAMI	0,870	0,784	0,994	1,000	0,860	1,000	1,000	0,000

$K_s$  – нуклеотидная дивергенция: выше диагонали – среднее число нуклеотидных различий (число фиксированных различий); ниже диагонали – среднее число нуклеотидных замен на один сайт.  $F_{ST}$  – парные генетические дистанции;  $P < 0,0001$ ; ns – незначимое; уровень значимости определен на основе 1023 пермутации. Код популяции см. табл. 1.

Наибольшая дивергенция обнаружена между популяциями видов *R. stephanii* и *R. integrifolia* с одной стороны и популяциями видов *R. rosea* и *R. pinnatifida* с другой, число фиксированных нуклеотидных различий изменялось от 14 до 26. Дивергенция между *R. pinnatifida* и любой популяцией *R. rosea*, кроме камчатской, изменяется в пределах значений межпопуляционной дивергенции *R. rosea*. Нуклеотидная дивергенция камчатской популяции (KAMR) от всех других популяций *R. rosea* достигает межвидовых значений (табл. 2). На существенную дифференциацию хлоропластного генома исследуемых популяций и, следовательно, высокую степень генетической разобщенности между ними указывают высокие парные генетические дистанции ( $F_{ST}$ ). Исключение составили три популяции *R. rosea* (ALTR, KRAR и ULAR) и *R. pinnatifida*, между которыми величина  $F_{ST}$  мала, а в двух случаях (ALTR–BURP и ULAR–BURP) и статистически незначима (табл. 2). Согласно

результатам AMOVA, на изменчивость между популяциями *R. rosea* приходится более 74% от всей генетической изменчивости. В целом вид характеризуется высоким уровнем генетического разнообразия ( $h = 0,795$ ;  $\pi = 0,0137$ ; табл. 1), значительной межпопуляционной дифференциацией ( $\Phi_{ST} = 0,74725$ ;  $P < 0,0001$ ) и слабым генным потоком ( $Nm = 0,23$ ).

Нуклеотидные замены и индельные вариации выявили 14 гаплотипов (H1–H14, табл. 1). Гаплотипы H5 и H6 были уникальными и присутствовали только в популяции KRAR *R. rosea*, гаплотип H3 был общим для популяций ALTR и KRAR *R. rosea*, а гаплотип H8 – для забайкальских популяций *R. rosea* и *R. pinnatifida* (ULAR и BURP соответственно). Для выявления генеалогических связей между гаплотипами построена сеть (рис. 1а), в которой можно выделить две гаплогруппы, разделенные более чем 25 мутационными шагами. Одну гаплогруппу формируют гаплотипы видов *R. rosea* и *R. pinnatifida*, вторую – *R. stephanii* и *R. integrifolia*. Предкового (анцестрального) гаплотипа не выявлено.

На рис. 1б представлено МР-дерево (длина – 141 шаг; индекс соответствия CI = 0,9007; индекс гомоплазии HI = 0,0993; индекс удерживания RI = 0,9872), в котором все образцы из восьми популяций *Rhodiola* с высокой достоверностью образуют две клады, которые соответствуют двум гаплогруппам в сети. Клады маркируются 12 синапоморфными заменами: пять в межгенном спейсере *atpB-rbcL* (T↔C, позиции 153 и 206; G↔A, позиции 207 и 643; T↔A, позиция 258) и семь в *trnS-trnG* (T↔A, позиции 884 и 1125; T↔G, позиции 1151 и 1207; G↔A, позиции 1171 и 1239; T↔C, позиция 1312), и инделем 7 пн (AAACTAG, позиции 1096–1102).

Кладу I (BP 100 и 99% в МР и NJ анализах соответственно) формируют представители популяций *R. rosea* и *R. pinnatifida*, в которой можно выделить статистически поддержанные ветви. Так, одну ветвь с умеренной поддержкой (BP 75 и 65%) образуют семь образцов *R. pinnatifida* и все образцы популяции ULAR *R. rosea*. Кладу II (BP 96 и 98%) сформировали все представители популяций *R. stephanii* и *R. integrifolia* в соответствии с популяционной принадлежностью. Популяция *R. integrifolia* маркировалась пятью заменами (G→T, позиция 49; T→G, позиции 335 и 377; G→A, позиции 502 и 1295), популяция BURS *R. stephanii* – одной заменой в *atpB-rbcL* регионе (G→T, позиция 102) и поли-Т мотивом в *trnS-trnG* (11 повторов, позиции 1036–1046), популяция KHAS этого же вида – тремя заменами в *trnS-trnG* (G→A, позиции 1172 и 1435; A→T, позиция 1369). Необходимо отметить, что две популяции *R. stephanii* не имели общих маркерных замен, однако одна из них (BURS) и популяция *R. integrifolia* имели одну общую маркерную замену в спейсере *trnS-trnG* (A в позиции 1369).

Полученные нами данные о генетическом разнообразии (табл. 1) и популяционной структуре *R. rosea* согласуются с таковыми для других видов *Rhodiola*. Так, у эндемика Цинхай-Тибетского плато *R. alsia* (Froed.) S.H. Fu [5], по данным ITS ядерной ДНК и межгенных спейсеров *rpl20-rps12* и *trnS-trnG* хпДНК, выявлено 19 риботипов и 45 хлоротипов соответственно, генетическая изменчивость внутри и между популяциями распределена приблизительно одинаково ( $\Phi_{ST} = 0,48759$ ). У *R. dumulosa* (Franchet) S. H. Fu [6] – альпийский вид, природные популяции которого в Китае обнаруживают "островную" структуру распределения, по изменчивости четырех регионов хпДНК выявлен высокий уровень генетического разнообразия ( $h = 0,95$ ;  $\pi = 0,0021$ ) и дифференциации ( $\Phi_{ST} = 0,8537$ ). По мнению авторов, такая генетическая структура может быть обусловлена изолированностью популяций, вследствие чего поток генов между ними ограничен и указывает на значительную изоляцию расстоянием. Однако следует отметить, что каждая популяция в отдельности характеризуется средними показателями генетического разнообразия или его отсутствием. Факт выявления единственного гаплотипа в популяциях *R. stephanii*, *R. integrifolia* и камчатской популяции *R. rosea* позволил предположить, что это может быть следствием прохождения этими популяциями в своей истории через "бутылочное горлышко", то есть резкое сокращение численности в прошлом и недавним ее восстановлением. В свою очередь, пространственно изолированные популяции с ограниченным потоком генов обычно претерпевают независимые долгосрочные

эволюционные процессы, приводящие к высокой генетической дифференциации между популяциями, что мы и наблюдаем, например, между популяциями *R. stephanii* (нет общих гаплотипов и общих маркерных замен).

Что касается *R. pinnatifida*, то, по мнению одних авторов [7], подвиды *R. pinnatifida* subsp. *pinnatifida* и *R. pinnatifida* subsp. *subpinnata* являются синонимами *R. stephanii*, другие считают [4], что оба таксона должны рассматриваться в качестве подвидов *R. stephanii*, так как морфологические различия всех трех недостаточно четкие. Кроме того, оба подвида имеют, возможно, гибридогенное происхождение и родителями могут быть *R. stephanii* и *R. rosea* [4]. Результаты проведенного нами молекулярно-генетического анализа исследуемых популяций указывают на то, что забайкальская популяция, растения которой были определены как *R. pinnatifida*, является, по-видимому, *R. rosea* или ее внутривидовым таксоном, и исключают возможность гибридогенного происхождения *R. pinnatifida* от *R. stephanii* и *R. rosea*.

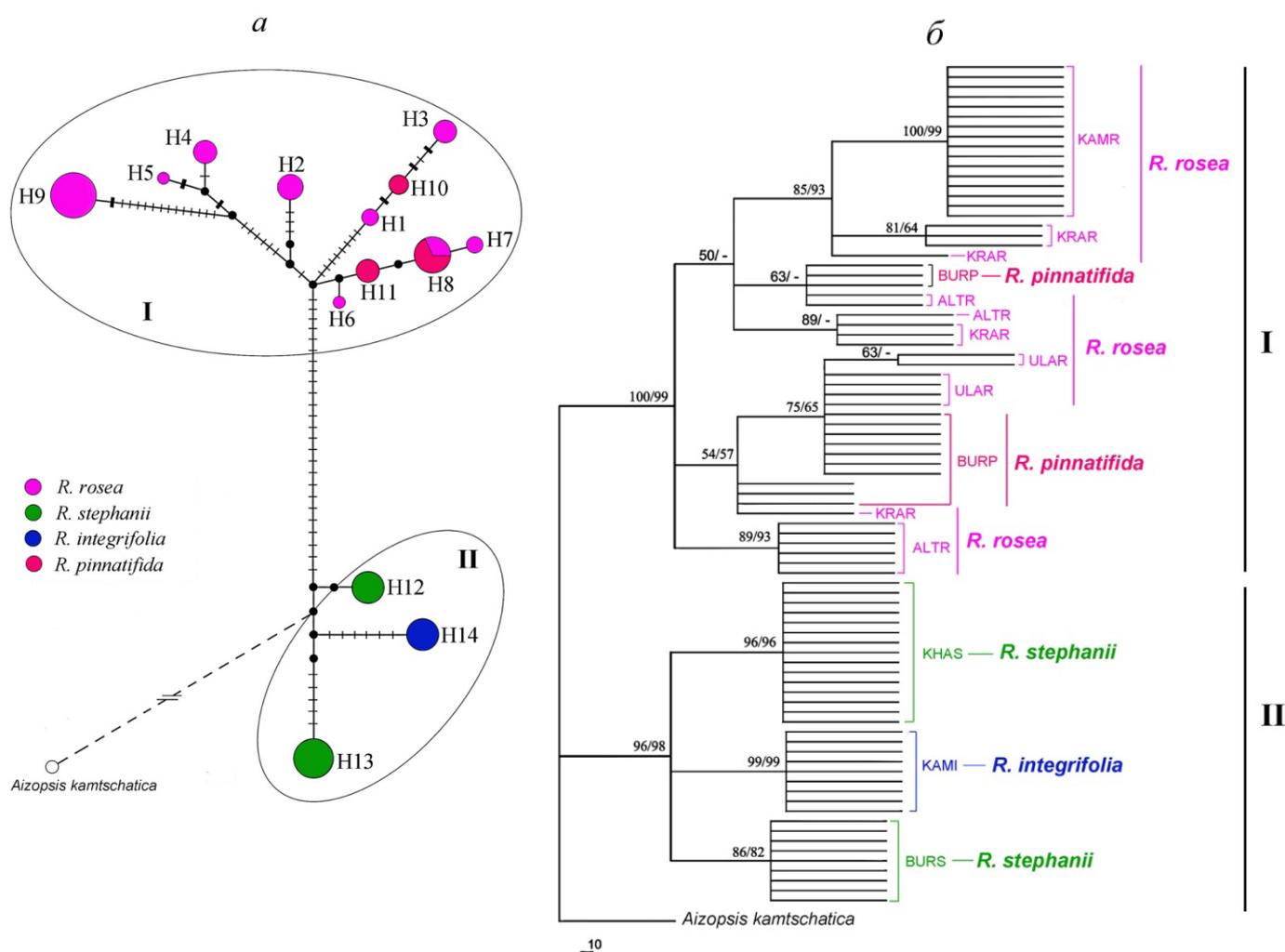


Рис. 1. Генетические взаимоотношения представителей *Rhodiola* на основании сравнения последовательностей двух регионов хпДНК: а – генеалогическая сеть гаплотипов. Размер окружностей отражает частоту встречаемости гаплотипов, маленькие черные кружки – гипотетические гаплотипы, тонкие пересекающие линии – мутации, толстые пересекающие линии – индели; б – МР-дерево. Числами обозначены значения индекса бутстрепа, рассчитанные для МР/НJ методов (выше 50%). Код популяции см. табл. 1.

**Выводы.** Основными факторами высокого уровня дифференциации популяций *Rhodiola* являются, вероятно, изоляция популяций и преобладание клонального размножения у этих видов. Суровые условия окружающей среды в местах их произрастания также могут влиять на генетическую структуру популяций. Сохранение генетического разнообразия

является ключевым фактором для долговременного выживания вида и, чтобы гарантированно охватить все разнообразие, необходима целенаправленная защита всех природных популяций *Rhodiola*.

#### Литература

1. **Fu K.T., Ohba H.** Crassulaceae // Flora of China, vol. 8. – Beijing: Science Press, 2001. – P. 202–268.
2. **Mayuzumi S., Ohba H.** The phylogenetic position of eastern Asian Sedoideae (Crassulaceae) inferred from chloroplast and nuclear DNA sequences // Systematic Botany. – 2004. – V. 29. – P. 587–598.
3. **Саратиков А.С., Краснов Е.А.** Родиола розовая (золотой корень). – Томск: ТГУ, 2004. – 292 с.
4. **Гончарова С.Б.** Очитковые (*Sedoideae*, Crassulaceae) флоры российского Дальнего Востока. – Владивосток: Дальнаука, 2006. – 223 с.
5. **Gao Q., Zhang D., Duan Y., Zhang F., Li Y. et al.** Intraspecific divergences of *Rhodiola alsia* (Crassulaceae) based on plastid DNA and internal transcribed spacer fragments // Botanical Journal of the Linnean Society. – 2012. – V. 168. – P. 204–215.
6. **Hou Y., Lou A.** Phylogeographical patterns of an alpine plant, *Rhodiola dumulosa* (Crassulaceae), inferred from chloroplast DNA sequences // Journal of Heredity. – 2013. – V. 105. – P. 101–110.
7. **Ohba H.** *Rhodiola* // Illustrated Handbook of Succulent Plants: Crassulaceae. – Berlin-Heidelberg-New York: Springer, 2005. – V. 14. – P. 210–227.

#### Literatura

1. **Fu K.T., Ohba H.** Crassulaceae // Flora of China, vol. 8. – Beijing: Science Press, 2001. – P. 202–268.
2. **Mayuzumi S., Ohba H.** The phylogenetic position of eastern Asian Sedoideae (Crassulaceae) inferred from chloroplast and nuclear DNA sequences // Systematic Botany. – 2004. – V. 29. – P. 587–598.
3. **Saratikov A.S.** 1974. Golden Root (*Rhodiola rosea*). – Tomsk: Tomsk State University, 2004. – 292 с.
4. **Gontcharova S.B.** *Sedoideae* (Crassulaceae) of the flora of Russian Far East. – Vladivostok: DalScience, 2006. – 223 с.
5. **Gao Q., Zhang D., Duan Y., Zhang F., Li Y. et al.** Intraspecific divergences of *Rhodiola alsia* (Crassulaceae) based on plastid DNA and internal transcribed spacer fragments // Botanical Journal of the Linnean Society. – 2012. – V. 168. – P. 204–215.
6. **Hou Y., Lou A.** Phylogeographical patterns of an alpine plant, *Rhodiola dumulosa* (Crassulaceae), inferred from chloroplast DNA sequences // Journal of Heredity. – 2013. – V. 105. – P. 101–110.
7. **Ohba H.** *Rhodiola* // Illustrated Handbook of Succulent Plants: Crassulaceae. – Berlin-Heidelberg-New York: Springer, 2005. – V. 14. – P. 210–227.