

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ РОДОДЕНДРОНА ЗОЛОТИСТОГО (*Rhododendron aureum* Georgi) ПО ЯДЕРНЫМ МИКРОСАТЕЛЛИТНЫМ ЛОКУСАМ

© 2019 г. М. А. Полежаева^{1,2, *}, Н. А. Тихонова³, М. В. Модоров¹,
М. Н. Ранюк¹, О. С. Корчагина¹

¹Институт экологии растений и животных Уральского отделения
Российской академии наук, Екатеринбург, 620144 Россия

²Институт биологических проблем Севера Дальневосточного отделения
Российской академии наук, Магадан, 685000 Россия

³Институт леса им. В.Н. Сукачева Сибирского отделения
Российской академии наук, Красноярск, 660036 Россия

*e-mail: polezhaevam@mail.ru

Поступила в редакцию 06.07.2018 г.

После доработки 26.09.2018 г.

Принята к публикации 09.10.2018 г.

Проведен анализ генетической изменчивости восьми выборок (63 особей) широкоареального вида *Rhododendron aureum* – одного из ведущих компонентов горных экосистем Сибири и Дальнего Востока. По данным полиморфизма пяти локусов ядерных микросателлитов выявлен высокий уровень генетического разнообразия в популяциях из Сибири (Западный и Восточный Саяны) и Камчатки (средние значения $H_o = 0.667$, $H_e = 0.638$). АМОВА показал, что около 16% генетического разнообразия приходится на межпопуляционные различия ($F_{st} = 0.161$, $p = 0.001$). Установлено, что вид имеет неоднородную генетическую структуру – образцы с Камчатки образуют отдельный кластер и демонстрируют высокую гомогенность, а образцы из Западной и Восточной Сибири имеют смешанное происхождение. Полученные результаты указывают на перспективность использования данного типа маркеров для широкомасштабных исследований *R. aureum* с целью реконструкции истории расселения вида.

Ключевые слова: SSR-маркеры, популяционная структура, генетическая изменчивость, микросателлиты.

DOI: 10.1134/S0016675819060110

Рододендрон золотистый (*Rhododendron aureum* Georgi, сем. Ericaceae) – вечнозеленый кустарник, обычно распространенный в высокогорном альпийском и субальпийском поясах до 2700 м над уровнем моря в зарослях кедрового стланика. Часто спускается в верхние части лесного пояса, произрастает на болотах, в кустарничковых тундрах. Обладая пластичной жизненной формой, в зависимости от местообитания представлен различными экобиоморфами – от небольшого кустарничка до 30 см до почти 2-метрового кустарника [1].

Вид имеет широкий ареал: Западная Сибирь (Алтай), Восточная Сибирь (Саяны, Прибайкалье, Забайкалье, Восток Якутии), Дальний Восток, включая Чукотку, Камчатку, Сахалин, Курильские и Командорские о-ва. Известно изолированное местонахождение в горах Путорана. За

пределами России произрастает в Монголии, Корее, Китае, Японии.

Рододендрон золотистый – ведущий компонент высокогорных экосистем. Обладает ландшафтнообразующей функцией в условиях сурового климата: поддерживает экологический баланс, формирует специфический почвенный микробиом, предотвращает эрозию почв [2]. Наряду со многими альпийскими видами, рододендрон золотистый имеет значение в качестве модельного объекта-индикатора климатических колебаний, происходивших как в прошлом, так и в настоящее время [3, 4]. Кроме того, растительное сырье данного вида содержит ряд биохимических веществ, обладающих фармакологическими свойствами [5], что вместе с высокой декоративностью обуславливает антропогенную нагрузку на некоторые его популяции. Вид включен в красные книги ряда субъектов РФ (Кемеровской, Читинской об-

ластей, Забайкальского края, Агинского Бурятского АО).

Популяционно-генетические исследования *R. aureum* необходимы для оценки адаптивного потенциала вида в условиях изменения окружающей среды и определения статуса популяций для разработки форм охраны их ресурсов. Фундаментальный интерес исследования связан с пополнением перечня модельных объектов широкоареальных растений, генетическая структура которых отражает процессы изменения климата в истории и, таким образом, удобных для реконструкции динамики растительности Северной Евразии в плейстоцене–голоцене [6, 7].

Исследования генетического и популяционного разнообразия различных представителей рода *Rhododendron* многочисленны [8–12 и др.], однако для *R. aureum* они практически отсутствуют [13–17]. В данном исследовании было решено использовать мультилокусный анализ микросателлитов ядерной ДНК. Генетическое разнообразие *R. aureum* по данному типу маркеров изучено лишь в единичных популяциях из Японии, Китая и о. Сахалин [15–17]. Знания о генетической изменчивости и популяционной структуре *R. aureum* на всем ареале позволит реконструировать историю расселения вида.

Цель данной работы – оценка параметров генетической изменчивости и степени популяционной дифференциации рододендрона золотистого в Сибири и на Камчатке с использованием локусов ядерных микросателлитов.

В анализ были включены данные по 63 растениям рододендрона золотистого: четыре выборки (32 растения) из Западного Саяна, две выборки (15 растений) из Восточного Саяна, две выборки (16 растений) с п-ва Камчатка. Местоположение и географические координаты указаны в табл. 1. Для анализа ДНК использовали высушенные в силикагеле листья. ДНК выделяли по стандартному протоколу для растительных тканей (СТАВ-метод) [18]. Исследованы локусы, разработанные для *R. aureum* и *R. brachycarpum*: *RD4*, *RD8*, *RDE12* [16] и *RA20*, *RA31* [17]. Условия ПЦР описаны в [16, 17]. Длины амплифицированных фрагментов определяли на Genetic Analyzer 3130 (Applied Biosystems, США) в присутствии маркера молекулярной массы S-450 (Гордиз, Россия). Хроматограммы расшифровывали в программе GeneMapper v. 4.0.

Для расчета параметров генетического разнообразия, индекса фиксации Райта, дифференциации популяций, анализа иерархической структуры изменчивости (AMOVA), РСА-анализа матрицы генетических расстояний, сравнения генетических и географических расстояний с по-

мощью теста Мантелла была использована программа GenAlEx 6.5 [19]. Анализ генетической структуры всей исследуемой выборки без учета их популяционной принадлежности проводили в программе STRUCTURE 2.2 с использованием байесовского алгоритма кластеризации, применяющего марковские цепи [20]. На основании данных о генотипах метод разделяет выборку на заданное число кластеров (K), определяя для каждой особи вероятность отнесения к тому или иному кластеру. Алгоритм был повторен 5 раз для значений K от 2 до 5 при использовании модели “admixture” (учитывает вероятное смешанное происхождение образцов при условии независимости частот аллелей между кластерами) с количеством итераций 100000, первые 10000 итераций отбрасывали. Выбор оптимального числа групп осуществляли в программе Structure harvest [21], реализующей метод, предложенный Эвано с соавт. [22].

Все отобранные микросателлитные локусы обнаружили изменчивость в исследуемых образцах. Количество выявленных аллелей в локусах по всем выборкам варьирует от 6 до 13: локус *RD4* – выявлено 6 аллелей, *RD8* – 13 аллелей, *RDE12* – 9 аллелей, *RA20* – 10 аллелей, *RA31* – 11 аллелей. Всего при анализе пяти микросателлитных локусов идентифицировано 49 аллельных вариантов, из них девять встречаются во всех выборках. Среднее число аллелей на локус варьирует в выборках от 3.40 до 5.20, эффективное число аллелей – от 2.35 до 3.91. Максимальные значения этих параметров выявлены в выборках с Камчатки. Значения наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготности высоки и варьируют соответственно от 0.540 до 0.780 и от 0.565 до 0.733. Средние значения этих показателей составляют: $N_a = 4.13$, $N_e = 2.98$, $H_o = 0.667$, $H_e = 0.638$.

Среднее значение индекса фиксации F равно -0.055 , что указывает на небольшой переизбыток гетерозиготных генотипов. Средние значения F_{is} и F_{it} , отражающие соответственно инбридинг особи относительно популяции и инбридинг особи относительно вида в целом, равны -0.059 ($SE = 0.052$) и 0.144 ($SE = 0.053$). Генетическая дифференциация между всеми анализируемыми выборками составила 16% ($F_{st} = 0.161$, $p = 0.001$) с учетом камчатских популяций и 7% ($F_{st} = 0.071$, $p = 0.001$) при их исключении. Иерархический анализ AMOVA показал, что на долю изменчивости между тремя географическими регионами (Западный Саян, Восточный Саян, Камчатка) приходится 17% от выявленной изменчивости. Остальная изменчивость (83%) сосредоточена внутри популяций. Наибольший вклад в межпо-

Таблица 1. Параметры генетического разнообразия микросателлитных локусов в выборках *Rhododendron aureum*

№ п.п.	Популяция	Координаты, с.ш./в.д.	N	N_a	N_e	H_o	H_e	$F \pm SE$
1	Красноярский край, Западный Саян, Ергаки, Тармазаковский мост	52°85'/92°41'	8	4.20	2.68	0.650	0.616	-0.059 ± 0.086
2	Красноярский край, Западный Саян, Каменный городок	52°53'/92°54'	10	3.40	2.35	0.540	0.565	0.030 ± 0.144
3	Западный Саян I	52°81'/93°12'	10	4.00	2.70	0.620	0.607	-0.020 ± 0.067
4	Западный Саян II	51°59'/93°07'	4	3.60	2.89	0.750	0.644	-0.178 ± 0.064
5	Республика Бурятия, Восточный Саян, граница с Республикой Тува	52°30'/98°78'	4	3.60	2.81	0.750	0.613	-0.115 ± 0.282
6	Республика Тува, Восточный Саян, хр. Обручева	52°03'/94°07'	11	4.40	2.71	0.655	0.618	-0.077 ± 0.133
7	Камчатский кр., вулк. Авачинский	53°21'/158°75'	10	5.20	3.79	0.780	0.710	-0.116 ± 0.118
8	Камчатский кр., гора Вокчажец	53°07'/157°93'	6	4.60	3.91	0.667	0.733	0.093 ± 0.088
	В среднем			4.13 (0.180)	2.98 (0.142)	0.667 (0.031)	0.638 (0.015)	-0.055 ± 0.047

Примечание. N – размер выборки, N_a – среднее число аллелей на локус, N_e – эффективное число аллелей на локус, H_o – наблюдаемая гетерозиготность, H_e – ожидаемая гетерозиготность, F – индекс фиксации Райта, SE – стандартная ошибка.

пуляционную дифференциацию вносят локусы *RDE12* и *RA20* (25.0 и 23.6% соответственно).

Генетические дистанции D Нея [23] между популяциями варьируют от 0.054 до 2.349. Согласно тесту Мантела [24], генетическое расстояние между популяциями обнаруживает статистически значимую связь с географическим расстоянием между ними: $r = 0.959$, $p = 0.013$ с учетом камчатских популяций, $r = 0.684$, $p = 0.045$ – при их исключении. Наибольшие дистанции характерны для выборки с Камчатки со всеми остальными выборками (D варьирует от 1.246 до 2.349). Низкий уровень различий выявлен между выборками в пределах Западного Саяна (D варьирует от 0.054 до 0.269). Чуть выше он между двумя выборками Восточного Саяна ($D = 0.577$). В целом между выборками Западного и Восточного Саяна D варьирует от 0.201 до 0.534.

На основании генетических расстояний проведен анализ популяционной структуры вида методом главных координат. На ординации большая часть проанализированных выборок формирует слабодифференцированную группу, выборки с Камчатки значительно удалены. Большая часть изменчивости – 73.59% приходится на первую ось, на вторую – 10.87% (рисунок не приводится). Аналогичные результаты получены с использованием алгоритма Байеса. Максимальное значение логарифма апостериорной вероятности было получено для трех групп ($K = 3$). Это означает, что с максимальной вероятностью выборка может быть разделена на три генетических кластера (рис. 1). Все образцы с Камчатки с высокой вероятностью отнесены к единому кластеру (рис. 1). Образцы из Западной и Восточной Сибири имеют смешанную генетическую природу. Наблюда-

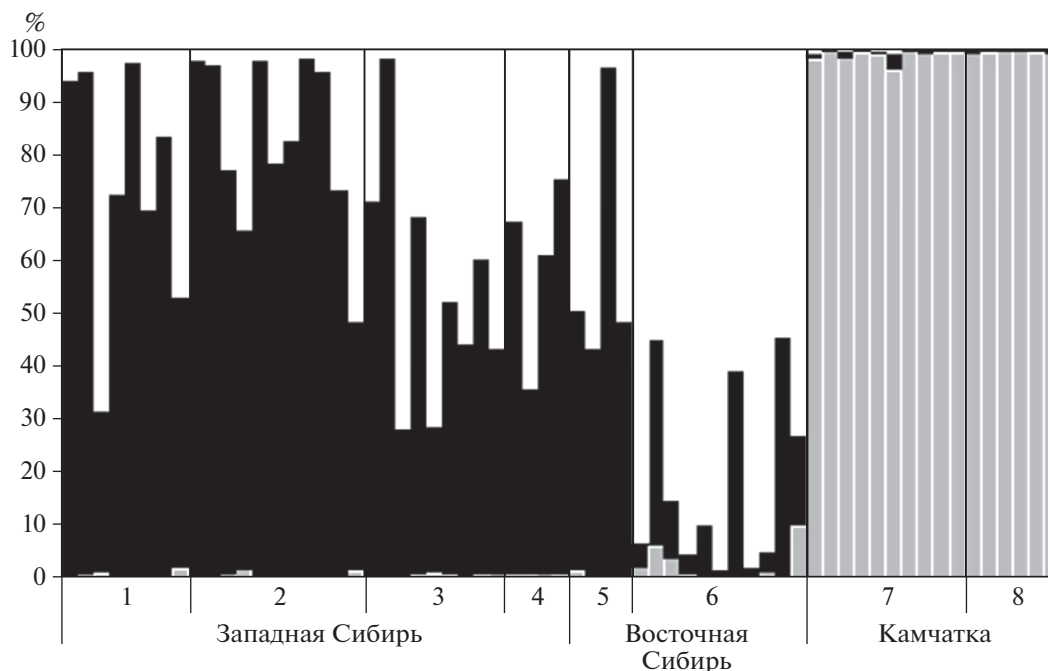


Рис. 1. Вероятность отнесения 63 образцов *Rhododendron aureum* к одному из трех кластеров при “admixture” анализе в программе STRUCTURE по данным анализа пяти микросателлитных локусов. Каждый вертикальный столбец соответствует одному образцу, а относительная доля разных цветовых сегментов в нем обозначает вероятность принадлежности данного образца к соответствующему кластеру. 1–8 – номер популяции см. табл. 1.

ется тенденция к дифференциации выборки из Восточного Саяна (хр. Обручева), однако в силу малочисленности особей ее невозможно интерпретировать однозначно.

Уровни изменчивости и подразделенности популяций рододендрона золотистого в Сибири и на Камчатке по маркерам ядерных микросателлитов близки к значениям, полученным ранее для других представителей рода. Так, для широкоареального европейского вида *R. ferrugineum* значения H_e составили 0.29–0.44 в Пиренеях, 0.37–0.68 в выборках из Альп и Апеннинского п-ва. Значение F_{st} между всеми выборками составило 0.095, доля изменчивости между региональными кластерами – 24% [11]. Схожий уровень гетерозиготности наблюдается также у ряда других видов рододендронов [8–10]. В нашем исследовании даже для малочисленных выборок рододендрона золотистого показан высокий уровень генетического разнообразия (табл. 1). Рядом авторов схожая картина наблюдалась для эндемичных или ограниченных по размеру популяций этого вида в Китае, Японии и на о-ве Сахалин [15–17].

Наблюдаемую дифференциацию между популяциями сибирского и дальневосточного регионов можно объяснить разделением общего ареала в истории крупными биогеографическими барьерами,

таким как Верхоянский и Сихотэ-Алинский хребты. Многие исследования холодоустойчивых видов, бореального, альпийского и субальпийского поясов выявили их значительную генетическую подразделенность, связанную с историей последних оледенений [25–28].

В результате проведенного популяционно-генетического исследования рододендрона золотистого из сибирской и дальневосточной частей его ареала установлено, что микросателлитные локусы ядерной ДНК являются перспективными маркерами для широкомасштабных биогеографических исследований данного вида.

Работа (сбор образцов) выполнена в рамках государственного задания Института экологии растений и животных УрО РАН, проведение молекулярно-генетического анализа поддержано грантом РФФИ (№ 15-04-01640а).

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Александрова М.С. Рододендроны природной флоры СССР. М.: Наука, 1975. 112 с.
2. Wang X., Lin L., Zhao W. et al. *Rhododendron aureum* Georgi formed a special soil microbial community and competed with above-ground plants on the tundra of

- the Changbai Mountain, China // *Ecol. Evol.* 2017. V. 7. P. 7503–7514. doi 10.1002/ece3.3307
3. *Sturm M., Racine C., Tape K.* Climate change: Increasing shrub abundance in the Arctic // *Nature*. 2001. V. 411. P. 546–547. doi 10.1038/35079180
 4. *Tape K.D., Hallinger M., Welker J.M. et al.* Landscape heterogeneity of shrub expansion in Arctic Alaska // *Ecosystems*. 2012. V. 15. P. 711–724. doi 10.1007/s10021-012-9540-4
 5. *Oleznikov D.N., Dudareva L.V., Osipenko S.V., Penzina T.A.* Chemical composition of *Rhododendron aureum* (gold rosebay) essential oil from Pribaikal'e (Russian Federation) // *J. Serb. Chem. Soc.* 2010. V. 75. P. 209–215.
 6. *Hewitt G.* The genetic legacy of the Quaternary ice ages // *Nature*. 2000. V. 405. P. 907–913. doi 10.1038/35016000
 7. *Abbott R.J., Smith L.C., Milne R.I. et al.* Molecular analysis of plant migration and refugia in the Arctic // *Science*. 2000. V. 289. P. 1343–1346. doi 10.1126/science.289.5483.1343
 8. *Naito K., Isagi Y., Kameyama Y., Nakagoshi N.* Population structures in *Rhododendron metternichii* var. *hondoense* assessed with microsatellites and their implication for conservation // *J. Plant Res.* 1999. V. 112. P. 405–412. doi 10.1007/PL00013895
 9. *Tan X.X., Li Y., Ge X.J.* Development and characterization of eight polymorphic microsatellites for *Rhododendron simsii* Planch (Ericaceae) // *Conserv. Genet.* 2009. V. 10. P. 1553–1555. doi 10.1007/s10592-008-9791-y
 10. *Wang X.Q., Huang Y., Long C.L.* Assessing the genetic consequences of flower-harvesting in *Rhododendron decorum* Franchet (Ericaceae) using microsatellite markers // *Biochem. Syst. Ecol.* 2013. V. 50. P. 296–303. doi 10.1016/j.bse.2013.04.009
 11. *Charrier O., Dupont P., Pornon A., Escaravage N.* Microsatellite marker analysis reveals the complex phylogeographic history of *Rhododendron ferrugineum* (Ericaceae) in the Pyrenees // *PLoS One*. 2014. V. 9. e92976. doi 10.1371/journal.pone.0092976
 12. *Polezhaeva M.A., Pimenova E.A., Tikhonova N.A. et al.* Plastid DNA diversity and genetic divergence within *Rhododendron dauricum* s.l. (*R. dauricum* s.s., *R. ledebourii*, *R. sichotense* and *R. mucronulatum*; Ericaceae) // *Plant Syst. Evol.* 2018. V. 304. P. 763–774. doi 10.1007/s00606-018-1508-1
 13. *Hirao A.S., Kameyama Y., Ohara M. et al.* Seasonal changes in pollinator activity influence pollen dispersal and seed production of the alpine shrub *Rhododendron aureum* (Ericaceae) // *Mol. Ecol.* 2006. V. 15. P. 1165–1173. doi 10.1111/j.1365-294X.2006.02853.x
 14. *Wang X., Zhao W., Li L. et al.* Clonal plasticity and diversity facilitates the adaptation of *Rhododendron aureum* Georgi to alpine environment // *PLoS One*. 2018. V. 13. e0197089. doi 10.1371/journal.pone.0197089
 15. *Liu Y.-F., Xing M., Zhao W. et al.* Genetic diversity analysis of *Rhododendron aureum* Georgi (Ericaceae) located on Changbai Mountain using ISSR and RAPD markers // *Plant. Syst. Evol.* 2012. V. 298. P. 921–930. doi 10.1007/s00606-012-0601-0
 16. *Li L.-F., Song N., Tang E.H., Xiao H.X.* Genomic and EST microsatellites for *Rhododendron aureum* (Ericaceae) and cross-amplification in other congeneric species // *Amer. J. Bot.* 2011. V. 98. P. 250–252. doi 10.3732/ajb.1100153
 17. *Kwak M., Won H., Hong J., Lee B.Y.* Isolation and characterization of 19 novel microsatellite loci in *Rhododendron aureum* and *Rhododendron brachycarpum* (Ericaceae) // *Biochem. Syst. and Ecol.* 2015. V. 61. P. 520–523. doi 10.1016/j.bse.2015.07.011
 18. *Devey M.E., Bell J.C., Smith D.N. et al.* A genetic linkage map for *Pinus radiata* based on RFLP, RAPD and microsatellite markers // *Theor. Appl. Genet.* 1996. V. 92. P. 673–679.
 19. *Peakall R., Smouse P.E.* GenALex 6: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research // *Mol. Ecol. Notes*. 2006. V. 6. P. 288–295. doi 10.1111/j.1471-8286.2005.01155.x
 20. *Pritchard J.K., Stephens M., Donnelly P.* Inference of population structure using multilocus genotype data // *Genetics*. 2000. V. 155. P. 945–959.
 21. *Earl D.A., von Holdt B.M.* Structure harvester: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method // *Conserv. Genet.* 2012. V. 4. P. 359–361. doi 10.1007/s12686-011-9548-7
 22. *Evanno G., Regnaut S., Goudet J.* Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study // *Mol. Ecol.* 2005. V. 14. P. 2611–2620. doi 10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x
 23. *Nei M.* Genetic distance between populations // *Amer. Naturalist*. 1972. V. 106. P. 283–292.
 24. *Mantel N.* The detection of disease clustering and a generalized regression approach // *Cancer Res.* 1976. V. 27. P. 209–220.
 25. *Alsos I.G., Engelskjøn T., Gielly L. et al.* Impact of ice ages on circumpolar molecular diversity: insights from an ecological key species // *Mol. Ecol.* 2005. V. 14. P. 2739–2753. doi 10.1111/j.1365-294X.2005.02621.x
 26. *Eidesen P.B., Alsos I.G., Popp M. et al.* Nuclear vs plastid data: Complex Pleistocene history of a circumpolar key species // *Mol. Ecol.* 2007. V. 16. P. 3902–3925. doi 10.1111/j.1365-294X.2007.03425.x
 27. *Polezhaeva M.A., Lascoux M., Semerikov V.L.* Cytoplasmic DNA variation and biogeography of *Larix* Mill. in Northeast Asia // *Mol. Ecol.* 2010. V. 19. P. 1239–1252. doi 10.1111/j.1365-294X.2010.04552.x
 28. *Hantemirova E.V., Heinze B., Knyazeva S.G. et al.* A new Eurasian phylogeographical paradigm? Limited contribution of southern populations to the recolonization of high latitude populations in *Juniperus communis* L. (Cupressaceae) // *J. Biogeogr.* 2016. doi 10.1111/jbi.12867

Genetic Differentiation of *Rhododendron aureum* Georgi at Nuclear Microsatellite Loci**M. A. Polezhaeva^{a, b, *}, N. A. Tikhonova^c, M. V. Modorov^a, M. N. Ranyuk^a, and O. S. Korchagina^a**^a*Institute of Plant and Animal Ecology, Ural Branch Russian Academy of Science, Ekaterinburg, 620144 Russia*^b*Institute of Biological Problems of the North Far East Branch of Russian Academy of Sciences, Magadan, 685000 Russia*^c*Sukachev Institute of Forest, Siberian Branch Russian Academy of Science, Krasnoyarsk, 660036 Russia***e-mail: polezhaevam@mail.ru*

SSR analysis of *Rhododendron aureum* Georgi in eight populations (63 samples) from Siberia (West and East Sayans) and Kamchatka was performed. Polymorphism of five SSR loci showed a high level of genetic diversity in all the populations (mean values $H_o = 0.667$, $H_e = 0.638$). The analysis of molecular variation (AMOVA) revealed that about 16% of the genetic diversity of *R. aureum* occurs in interpopulation differences ($F_{st} = 0.161$, $p = 0.001$). Bayesian approach in the STRUCTURE program reveal that the species has a heterogeneous genetic structure – samples from Kamchatka form a separate cluster and show high homogeneity, and samples from Western and Eastern Siberia are of mixed origin. The obtained results indicate the prospects of using this type of markers for population-genetic studies of *R. aureum*.

Keywords: SSR-markers, population structure, genetic variability, microsatellites.