

ВНУТРИВИДОВАЯ СТРУКТУРА *Rhododendron camtschaticum* Pall. НА ПОЛУОСТРОВЕ КАМЧАТКА: ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АСПЕКТ

© 2020 г. М. А. Полежаева¹, *, М. В. Модоров¹, А. Н. Полежаев², Е. А. Марчук³

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

³Ботанический сад-институт Дальневосточного отделения
Российской академии наук, Владивосток, 690024 Россия

*e-mail: polezhaevam@mail.ru

Поступила в редакцию 10.06.2019 г.

После доработки 04.07.2019 г.

Принята к публикации 03.10.2019 г.

Проведен анализ изменчивости трех межгенных спейсеров хлоропластной ДНК у 47 образцов *Rhododendron camtschaticum* на территории п-ова Камчатка и Командорских островов. Анализ молекулярной дисперсии (AMOVA) показал, что около 99% генетического разнообразия приходится на межпопуляционные различия ($F_{ST} = 0.99$, $p < 0.001$). Выявлено две генетических линии, вероятно обусловленных северным и южным миграционными потоками. Образцы из Центральной и Северной Камчатки образуют отдельный кластер и демонстрируют высокую гомогенность, что поддерживает таксономическую самостоятельность подвида *R. camtschaticum* ssp. *glandulosum*. В выборках из южной части полуострова выявлен полиморфизм, вместе с образцами с Командорских островов они соответствуют подвиду *R. camtschaticum* ssp. *camtschaticum*.

Ключевые слова: хпДНК, *trnK-matK*, *trnH-psbA*, *trnF-trnV*, популяционная структура, генетическая изменчивость.

DOI: 10.31857/S0016675820060089

Изучение близкородственных групп растений — одна из задач систематики и эволюционной биологии. Относительно дальневосточных рододендронов существует ряд вопросов о таксономическом статусе некоторых видов. Среди них рододендрон камчатский (*Rhododendron camtschaticum* Pall., сем. Ericaceae). Ареал вида охватывает приокеанические области Дальнего Востока: Сахалин, Курильские, Командорские острова, Камчатку, Чукотку, побережье Охотского моря. За пределами России — Северную Японию, Алеутские острова и Аляску.

Рододендрон камчатский — листопадный кустарник 5–20 (реже 50) см высотой. Листья около 2 см длиной, обратнойцевидные, по краю бахромчато-реснитчатые, собраны в розетки у основания плодущих побегов; на стерильных побегах расположены равномерно. Цветки ярко-розовые от 3 до 5 см в диаметре, по 1–3 на цветоносах 4–10 см высотой. Вид распространен в высокогорном альпийском и субальпийском поясах, чаще на гольцах, также спускается в верхние части

лесного пояса. Типовой образец описан с п-ва Камчатка [1, 2].

Отечественные ботаники выделяют две разновидности *R. camtschaticum*: var. *pallasianum* (=ssp. *camtschaticum*) и var. *pumilum* (=ssp. *glandulosum*), описанные Е.А. Буш и В.Л. Комаровым [1, 3–6]. В иностранной литературе они указываются в качестве самостоятельных видов — *R. camtschaticum* Small и *R. glandulosum* Standl. ex Small [7–9]. Спорная ситуация отчасти объясняется тем, что на территории Аляски виды произрастают аллопатрично, в то время как на территории России — симпатрично (в основном на п-ве Камчатка). Считается, что на российском Дальнем Востоке географическое распространение разновидностей не имеет резкого разграничения, и *R. camtschaticum* ssp. *glandulosum* является экологической формой характерной для более сурового климата [1]. Отсутствуют упоминания областей с совместным обитанием двух подвидов и указания о возможной гибридизации.

В качестве таксономически значимых признаков в разграничении вариаций вида традиционно используют длину листа, отношение длины долей

Таблица 1. Географические координаты мест сбора *R. camtschaticum* и показатели генетического разнообразия хпДНК в изученных выборках

	Популяция	Координаты, с.ш./в.д.	N	N_h	H
1	Камчатский кр., Елизовский р-н, окрест. влк. Мутновской	52°58'/158°23'	10	H1:10	0
2	Камчатский кр., Елизовский р-н, природный парк "Голубые озера"	53°10'/158°08'	10	H1:6 H2:4	0.533
3	Камчатский кр., Елизовский р-н, окрест. влк. Авачинский	53°25'/158°82'	10	H1:7 H2:3	0.467
4	Камчатский кр., Быстринский р-н, Козыревский хр., окрест. пос. Эссо	55°94'/158°68'	10	H3:10	0
5	Камчатский кр., Алеутский р-н, Командорские о-ва (о. Беринга и о. Медный)	54°51'/166°23'	5	H1:5	0
6	Камчатский кр., Корякский АО, Олюторский р-н, окрест. пос. Ачайваям	60°96'/170°46'	2	H3:2	0

Примечание. N – размер выборки, N_h – число гаплотипов, H – показатель гаплотипического разнообразия.

венчика к длине всего венчика; наличие/отсутствие опушения венчика, наличие простых/железистых волосков по краю листовой пластинки у *ssp. camtschaticum* и *ssp. glandulosum* соответственно [1, 7, 9]. Однако эти признаки значительно варьируют [9]. Также *ssp. glandulosum* характеризуется меньшими размерами растения (до 10 см) и наличием длинных столоновидных подземных побегов [3].

В последнее время для уточнения таксономии и биогеографии видов успешно используются молекулярно-генетические маркеры. Наиболее распространены маркеры ядерного и хлоропластного геномов. Однако, ставшие классическими для систематики растений маркеры ядерного ITS-региона (ITS1–5.8S рРНК–ITS2), часто малоинформативны для решения филогенетических вопросов относительно эволюционно молодых групп. Например они показали низкое разрешение в кладе близкородственных видов подсекции *Rhodorastra* [10], в то время как маркеры некодирующих регионов хлоропластной ДНК выявили четкую генетическую структуру [11].

В данной работе проведена оценка параметров генетической изменчивости и степени дивергенции популяций рододендрона камчатского на Камчатке с использованием локусов хлоропластной ДНК, наследуемой у покрытосеменных по материнской линии. Исследование генетической изменчивости данного вида и уточнения внутривидовой таксономии дадут новую информацию о видообразовании на Дальнем Востоке России и в целом для Берингийского региона.

Проанализировано 47 растений рододендрона камчатского из природных популяций: 30 образцов из трех популяций с южной части полуострова (окрестности г. Елизово, природный парк "Голубые озера", окрестности вулканов Авачинский

и Мутновский); десять – из центральной части (окрестности пос. Эссо), пять образцов с Командорских островов (четыре – о-в Беринга, один – о. Медный), два образца из Корякского автономного округа (Олюторский р-н) (рис. 1, табл. 1). ДНК выделяли по стандартному протоколу для растительных тканей (СТАВ-метод) [12] из свежих или высушенных в силикагеле листьев, а также из гербарных образцов. На первом этапе на панели из восьми образцов была проведена амплификация с универсальными праймерами для девяти маркерных хлоропластных фрагментов. Согласно протоколу и температурному профилю ПЦР, рекомендованными авторами, проведена амплификация части фрагментов *trnK–matK* (*matK*) [13] и *psbC–trnS* (CS) [14]; трех участков *trnT–trnF* (TabAB, TabCD, Tab EF) [15]; *trnF–TrnV* [16]; *trnH–psbA* (HA), *trnS–trnG* (SG) [17] и *atpH–atpI* [18]. Фрагменты SG и TabAB показали нестабильную амплификацию. Для остальных методом прямого секвенирования на генетическом анализаторе ABI 3130 (Applied Biosystems, USA) были определены последовательности и выявлены варибельные сайты. Для анализа всего материала были отобраны маркерные фрагменты, в которых обнаружено больше трех варибельных сайтов: HA, *matK* и FV.

Выравнивание последовательностей проводили вручную в программе BioEdit [19]. Расчет числа гаплотипов (N_h), показателя гаплотипического разнообразия (H), уровней дифференциации и распределения генетической изменчивости внутри и между популяциями (анализ молекулярной дисперсии, AMOVA) проводили в программе Arlequin v. 3.5.1.2 [20]. Дерево отношений гаплотипов хпДНК построено в программе Network v. 4.6.1.2 [21]. Каждая мутация (моонуклеотидная замена или индел, независимо от размера), кодировалась как единичное мутационное событие.

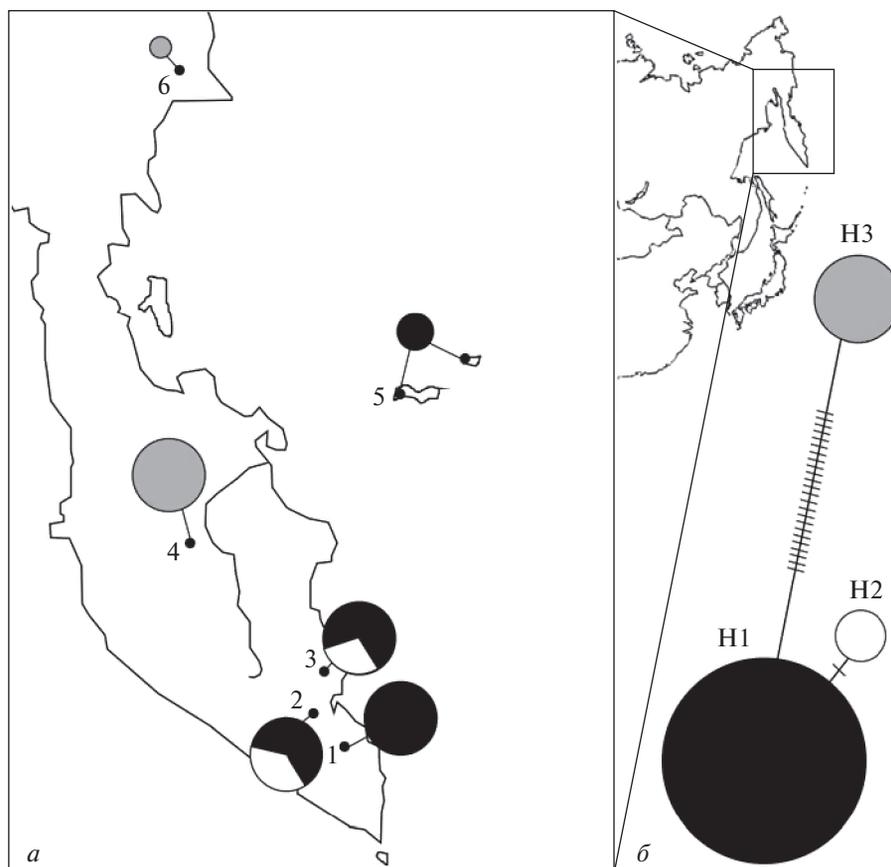


Рис. 1. *a* – местоположение изученных выборок, распределение обнаруженных гаплотипов хпДНК; *б* – дерево гаплотипов хпДНК (Н1–Н3). Размер окружностей отражает частоту встречаемости гаплотипов, поперечные тонкие штрихи на ветвях дерева – мутационные события.

Длина объединенной последовательности по трем фрагментам составила 1964 п.о. (НА 1–370; *matK* 371–1140; FV 1141–1964). Выявлено 25 переменных сайтов (табл. 2), из них во фрагменте *trnH-psbA* – шесть мононуклеотидных замен и один микросателлит А8–А9; во фрагменте *trnK-matK* – восемь замен; во фрагменте *trnF-TrnV* – восемь замен, микросателлит А7–А8 и инсерция 98 п.о. Изменчивость сгруппировалась в три гаплотипа (Н1–Н3). Последовательности фрагментов для каждого гаплотипа размещены в GenBank под номерами доступа MN125545–MN125551. Уровень изменчивости нуклеотидных последовательностей соответствует таковому для комплекса *R. dauricum* s. l., для которого в четырех фрагментах хпДНК совокупно выявлено 28 переменных сайтов [11].

Распределение гаплотипов в популяциях и их частоты отображены на рис. 1. В выборках с южной части полуострова Камчатка (выборки 2 и 3) обнаружено два гаплотипа. Минорный гаплотип Н2 отличается от гаплотипа Н1 единственной точечковой заменой во фрагменте *trnH-psbA* (табл. 2, по-

зиция 183). В образцах из окрестностей влк. Мутновский и с Командорских о-вов выявлен доминирующий на юге гаплотип Н1. В выборке из центральной части Камчатки, а также из Корякского автономного округа полиморфизм отсутствует, выявлен гаплотип Н3 (табл. 1), значительно отличающийся от первых двух гаплотипов (табл. 2).

Высокая дифференциация наблюдается между всеми выборками $F_{ST} = 0.9982$, $p < 0.001$, а также между регионами: из центральной и северной частей полуострова (выборки 5 и 6) с выборками с юга и с Командорских о-вов (выборки 1–4) ($F_{ST} = 0.9978$, $p = 0.05$). Таким образом географическое распределение гаплотипов и дифференциация по данным изменчивости хпДНК соответствует двум описанным подвидам.

Ранее зарубежными авторами [22] с использованием семи ядерных локусов было показано отличие нескольких образцов из Центральной Камчатки (четыре образца из окрестностей Эссо) от южных (шесть образцов из окрестностей влк. Авачинского). Выявлены родственные отношения

Таблица 2. Сегрегирующие сайты для трех гаплотипов хпДНК. Референсный гаплотип Н1

Гаплотип	Позиция нуклеотида																								
	<i>trnH-psbA</i>							<i>matK</i>							<i>trnF-TrnV</i>										
	7	8	9	1	1	1	2	5	5	5	6	6	6	9	9	1	1	1	1	1	1	1	2	2	
	4	0	9	8	8	9	3	4	4	7	2	3	4	5	6	1	2	2	4	4	5	8	9	9	7
				3	4	0	0	7	9	4	5	7	1	6	5	6	2	6	2	2	5	6	0	1	9
																1	5	0	0	5	9	7	6	0	0
Н1	A	G	A8	C	C	A	A	G	G	G	C	A	A	A	A	C	G	A7	A	del	C	T	T	T	T
Н2	.	.	.	T
Н3	C	T	A9	.	G	G	C	T	C	T	A	T	G	C	C	G	T	A8	T	ins	T	G	G	G	G

южнокамчатских образцов с японскими популяциями, а также с популяциями с Алеутских островов. Образцы из окрестностей Эссо в указанной публикации принимаются в качестве самостоятельного вида *R. glandulosum* (= *Therorhodium glandulosum*) и используются в качестве аутгруппы. Они значительно дивергированы, образуя отдельный генетический кластер.

Таким образом, данные по изменчивости хпДНК на большем количестве образцов с Камчатки согласуются с полученными ранее [22], поддерживая тезис о самостоятельности двух видов *R. glandulosum* и *R. camtschaticum*. Однако выявленная дифференциация по маркерам хпДНК не согласуется с разделением видов по морфологическим признакам. Так для Командорских островов и Камчатки в качестве преобладающего указывается *R. camtschaticum* ssp. *glandulosum*, типичный подвид встречается реже [4, 5]. В ходе полевых работ типичные на вид растения *R. camtschaticum* (15–30 см высотой), нами были собраны в популяциях из природного парка “Голубые озера” и на плато в окрестностях влк. Мутновский. Все остальные исследованные образцы, имели вид арктической расы (до 10 см высотой) и принимались нами условно за ssp. *glandulosum*. При рассмотрении под биноклем преобладали образцы с простыми волосками по краю листа. В выборке из окрестностей Эссо образцы варьировали по наличию простых или железистых волосков по краю листа как между растениями, так и в пределах одного растения. Опушение венчика присутствовало в выборках “Голубые озера” и из окрестностей вулкана Авачинский, в выборке из окрестностей Эссо – венчик голый. В выборке из окрестностей вулкана Мутновский на момент сбора не было цветущих растений, остальные образцы выделены из гербария, оценить венчик не было возможности.

Наблюдаемая дифференциация между центральными и северными выборками с одной стороны и южными совместно с Командорскими островами с другой, отражает существование на полуострове двух генетических линий вероятно обусловленных северным и южным миграционными потоками. Такой паттерн генетической структуры согласуется с историей биоты на полуострове, выявленной по ели, лиственнице и пихте [23–25]. Ограниченные центральной частью Камчатки популяции *Picea jezoensis*, *Larix kurilensis* ssp. *glabra* и *Abies gracilis* по генетическим данным представляют собой остаточные популяции видов, имевших ранее более широкий ареал на территории Дальнего Востока России. Глобальные изменения климата, повлекшие вымирание древесной растительности на территории северо-востока Азии, привели к изоляции их в благоприятных условиях на полуострове. Для лиственницы предполагается вторичный контакт с более молодым видом *L. cajanderi*, пришедшим с севера. Аналогичные события с повторным заселением Камчатки с севера популяциями рододендрона камчатского, находившегося в длительной изоляции на Чукотке и побережье Охотского моря и достаточно дивергировавшими от первоначального вида, можно предположить и в данном случае. Для детального восстановления истории вида необходим анализ большего количества образцов с севера и юга ареала (Чукотка, Магаданская обл., Сахалин и Курильские острова), а также использование мультилокусного анализа с привлечением ядерных маркеров.

Авторы выражают благодарность Е.А. Марчук и Е.А. Хантемировой за помощь во время полевых работ, а также А.В. Могилевой за образцы с Командорских островов.

Работа (сбор образцов) выполнена в рамках государственного задания Института экологии

растений и животных УрО РАН, проведение молекулярно-генетического анализа поддержано грантом РФФИ № 18-04-00616.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием в качестве объекта животных.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием в качестве объекта людей.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Александрова М.С.* Рододендроны природной флоры СССР. М.: Наука, 1975. 112 с.
2. *Усенко Н.В.* Деревья, кустарники и лианы Дальнего Востока: справочная книга. Хабаровск: Приамурские ведомости, 2010. 272 с.
3. Сосудистые растения советского Дальнего Востока. Т. 5 / Отв. ред. Харкевич С.С. СПб.: Наука, 1991. 390 с.
4. *Якубов В.В., Чернягина О.А.* Каталог флоры Камчатки (сосудистые растения). П-Камчатский: Камчатпресс, 2004. 165 с.
5. *Мочалова О.А., Якубов В.В.* Флора Командорских островов. Владивосток: БПИ ДВО РАН, 2004. 120 с.
6. *Юрцев Б.А., Королева Т.М., Петровский В.В. и др.* Конспект флоры Чукотской тундры. СПб.: ВВМ, 2010. 628 с.
7. *Hulten E.* Flora of Alaska and Neighboring Territories: A Manual of the Vascular Plants. Stanford: Stanford University Press, 1968. 1008 p.
8. *Viereck L.A., Little E.L., Jr.* Alaska Trees and Shrubs. Fairbanks, AK: University of Alaska Press, 2007. 265 p.
9. *Kron K.A., Judd W.S.* The *rhododion* // Flora of North America Editorial Committee / Eds. Flora of North America North of Mexico. 20+ vols. New York: Oxford University Press, 2009. V. 8. P. 453–543.
10. *Куцев М.Г., Каракулов А.В.* Реконструкция филогении рода *Rhododendron* L. (Ericaceae) флоры России на основе последовательности спейсеров ITS1_ITS2 // *Turczaninowia*. 2010. Т. 13. № 3. С. 59–62.
11. *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. <https://doi.org/10.1007/s00606-018-1508-1>
12. *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. <https://doi.org/10.1007/BF00226088>
13. *Johnson L.A., Soltis D.E.* Phylogenetic inference in Saxifragaceae sensu stricto and Gilia (Polemoniaceae) using matK sequences // *Ann Mol. Bot. Gard.* 1995. V. 82. P. 149–175. <https://doi.org/10.2307/2399875>
14. *Demesure B., Sodji N., Petit R.J.* A set of universal primers for amplification of polymorphic non-coding regions of mitochondrial and chloroplast DNA in plants // *Mol. Ecol.* 1995. V. 4. P. 129–134. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.1995.tb00201.x>
15. *Taberlet P.T., Geilly L., Patou G., Bouvet J.* Universal primers for amplification of three noncoding regions of chloroplast DNA // *Pl. Mol. Biol.* 1991. V. 17. P. 1105–1109. <https://doi.org/10.1007/BF00037152>
16. *Dumolin-Lapegue S., Pemonge M.-H., Petit R.J.* An enlarged set of consensus primers for the study of organelle DNA in plants // *Mol. Ecol.* 1997. V. 6. P. 393–397. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.1997.00193.x>
17. *Hamilton M.B.* Four primer pairs for the amplification of chloroplast intergenic regions with intraspecific variation // *Mol. Ecol.* 1999. V. 8. P. 521–523.
18. *Grivet D., Heinze B., Vendramin G.G., Petit R.J.* Genome walking with consensus primers: Application to the large single copy region of chloroplast DNA // *Mol. Ecol. Not.* 2001. V. 1. P. 345–349. <https://doi.org/10.1046/j.1471-8278.2001.00107.x>
19. *Hall T.A.* Bioedit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT // *Nucl. Acids Symp. Ser.* 1999. V. 41. P. 95–98. <https://doi.org/10.1111/jbi.12867>
20. *Excoffier L., Lischer H.* Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows // *Mol. Ecol. Res.* 2010. V. 10. P. 564–567. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x>
21. *Bandelt H.J., Forster P., Ruhl A.* Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies // *Mol. Biol. Evol.* 1999. V. 16. P. 37–48. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026036>
22. *Hata D., Higashi H., Yakubov V. et al.* Phylogeographical insight into the Aleutian flora inferred from the historical range shifts of the alpine shrub *Therorhodium camtschaticum* (Pall.) Small (Ericaceae) // *J. Biogeog.* 2016. V. 44. P. 283–293. <https://doi.org/10.1111/jbi.12876>
23. *Aizawa M., Yoshimaru H., Saito H. et al.* Phylogeography of a northeast Asian spruce, *Picea jezoensis*, inferred from genetic variation observed in organelle DNA markers // *Mol. Ecol.* 2007. V. 16. P. 3393–3405. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294x.2007.03391.x>
24. *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. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2010.04552.x>
25. *Semerikova S.A., Semerikov V.L., Lascoux M.* Post-glacial history and introgression in *Abies* (Pinaceae) species of the Russian Far East inferred from both nuclear and cytoplasmic markers // *J. Biogeography*. 2010. V. 38. № 2. P. 326–340. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2699.2010.02394.x>

Intraspecific Structure of the *Rhododendron camtschaticum* Pall. on Kamchatka Peninsula: Genetic Aspect

M. A. Polezhaeva^{a, *}, M. V. Modorov^a, A. N. Polezhaev^b, and E. A. Marchuk^c

^aInstitute of Plant and Animal Ecology, Ural Branch, Russian Academy of Science, Ekaterinburg, 620144 Russia

^bInstitute of Biological Problems of the North Far East Branch, Russian Academy of Sciences, Magadan, 685000 Russia

^cBotanical Institute-Garden Far East Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok, 690024 Russia

*e-mail: polezhaevam@mail.ru

The analysis of variability of three intergenic spacers of chloroplast DNA in 47 samples of *Rhododendron camtschaticum* in the Kamchatka Peninsula and the Commander Islands was performed. The analysis of molecular dispersion (AMOVA) revealed that about 99% of genetic diversity occurs in interpopulation differences ($F_{ST} = 0.99$, $p < 0.001$). Two genetic lines have been identified, probably due to the northern and southern migration routes. Samples from central and northern Kamchatka form a separate cluster and demonstrate high homogeneity, which supports the taxonomic independence of the subspecies *R. camtschaticum* ssp. *glandulosum*. In samples from the southern part of the peninsula, polymorphism was revealed, together with samples from the Commander Islands they correspond to *R. camtschaticum* ssp. *camtschaticum*.

Keywords: cpDNA, *trnK-matK*, *trnH-psbA*, *trnF-trnV*, population structure, genetic variation.