

ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ *Kalopanax septemlobus* (Thunb.) Koidz. НА СЕВЕРНОЙ ГРАНИЦЕ АРЕАЛА ПО ДАННЫМ СЕКВЕНИРОВАНИЯ РЕГИОНОВ ХЛОРОПЛАСТНОЙ ДНК

© 2021 г. Е. А. Васюткина¹, *, И. Ю. Адрианова¹

¹Федеральный научный центр биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии Дальневосточного отделения Российской академии наук, Владивосток, 690022 Россия

*e-mail: levina@biosoil.ru

Поступила в редакцию 30.07.2020 г.

После доработки 04.09.2020 г.

Принята к публикации 23.09.2020 г.

Проведен анализ нуклеотидного полиморфизма межгенных спейсеров *psbA-trnH*, *rpl32-trnL* и *trnS-trnfM* хлоропластной ДНК у представителей умеренно-теплолюбивого вида *Kalopanax septemlobus* на северной границе ареала. Нуклеотидные замены и индельные вариации выявили три гаплотипа (Н1–Н3), из них гаплотип Н3 обнаружен только на о. Сахалин. В Приморском крае широко распространен гаплотип Н1, частота встречаемости которого составила 92.4%. Генетическое разнообразие суммарной выборки Приморского края оказалось очень низким – гаплотипическое (h) 0.142, нуклеотидное (π) 0.0001, а суммарной выборки о. Сахалин – средним ($h = 0.600$, $\pi = 0.0018$). Анализ молекулярной дисперсии показал, что около 86% всей генетической изменчивости приходится на различия между двумя регионами ($\Phi_{ST} = 0.857$, $P < 0.0001$). Наблюдаемая изменчивость *K. septemlobus* на российском Дальнем Востоке отражает его биогеографическую историю.

Ключевые слова: *Kalopanax septemlobus*, *Kalopanax pictus*, генетическое разнообразие, межгенные спейсеры, хлоропластная ДНК.

DOI: 10.31857/S0016675821060138

Kalopanax septemlobus (Thunb.) Koidz., калопа-накс семилопастной, или диморфант (синоним *Kalopanax pictus*) – листопадное, умеренно-теплолюбивое дерево, представитель монотипного реликтового рода *Kalopanax* Miq. семейства Araliaceae Juss. [1, 2]. Распространен в Северо-Восточной Азии, куда входят Центральный и Восточный Китай, п-ов Корея, острова Японского архипелага и южная часть российского Дальнего Востока (РДВ) [3–5]. Юг РДВ является северной границей распространения *K. septemlobus*; вид встречается на юге Приморского края, в юго-западной части о-ва Сахалин и на южных о-вах (Кунашир, Итуруп, Шикотан) Курильского архипелага [3, 6]. Вид занесен в федеральную и региональные Красные книги [6, 7], статус 3 (R) – редкий вид, представленный небольшими популяциями, которые в настоящее время не находятся под угрозой исчезновения и не являются уязвимыми, но рискуют оказаться таковыми. *K. septemlobus* является ценным медоносом и имеет декоративный внешний вид [8], содержит множество биологически активных веществ, что делает его потенциальным источником пищевых и лекарственных соединений [3, 9]. В настоящее время многие ме-

стообитания *K. septemlobus* на РДВ уничтожаются или деградируют из-за строительства, высокой рекреационной нагрузки и пожаров [10].

В целях сохранения этого уникального вида становится актуальным его искусственное разведение, но при культивировании растений, как правило, происходит обеднение генофонда. Так, популяционно-генетические исследования с использованием разных методов анализа (аллозимный, RAPD, ISSR, nrSSRs) выявили относительно высокий уровень генетического разнообразия в природных популяциях *K. septemlobus* Южной Кореи и Японии [11–13] и сравнительно низкий у культивируемых форм [14]. Огромный интерес представляет собой комплексное исследование образцов *K. septemlobus* из Центрального, Восточного и Западного Китая, Корейского п-ова и Японского архипелага с использованием SSR-маркеров ядерной ДНК, межгенных спейсеров *psbA-trnH*, *rpl32-trnL* и *trnS-trnfM* хлоропластной ДНК (хпДНК) и моделирования палеораспределения для восстановления биогеографической истории этого вида [15]. Полученные результаты являются доказательством существования множества ледниковых рефугиумов в Китае, Южной

Таблица 1. Места сбора *Kalopanax septemlobus* на РДВ, гаплотипы и параметры генетического разнообразия по данным хпДНК

Место сбора (количество образцов)	Гаплотип	Разнообразие (стандартное отклонение)	
		гаплотипическое	нуклеотидное
Приморский край			
Окр. г. Владивосток, 11 км (8)	H1	0.000 (0.000)	0.0000 (0.0000)
Окр. г. Владивосток, Океанский хребет (4)	H1	—	—
О. Русский, зал. Петра Великого Японского моря (10)	H1	0.000 (0.000)	0.0000 (0.0000)
О. Стенина, зал. Петра Великого Японского моря (3)	H1	—	—
О. Фуругельма, зал. Петра Великого Японского моря (1)	H1	—	—
П-ов Гамова, окр. бух. Теляковского (1)	H1	—	—
Окр. пос. Каменушка, правобережье р. Волхушка (2)	H1	—	—
Окр. с. Васильковка (2)	H1	—	—
Окр. пос. Реттиховка (1)	H1	—	—
Заповедник Кедровая падь (2)	H1	—	—
137 км автодороги 05Н-100, перевал Еловый (1)	H1	—	—
Мыс Пещурова, зал. Восток (1)	H1	—	—
П-ов Гамова, окр. бух. Витязь (17)	H1, H2	0.382 (0.113)	0.0002 (0.0002)
Общая выборка Приморского края (53)	H1, H2	0.142 (0.062)	0.0001 (0.0001)
Сахалин			
Перевал Невельский (5)	H1, H3	0.400 (0.237)	0.0012 (0.0009)
Бассейн р. Китосия (1)	H2	—	—
Общая выборка о. Сахалин (6)	H1, H2, H3	0.600 (0.215)	0.0018 (0.0012)

Японии и самой южной части Корейского п-ва; самые северные популяции *K. septemlobus* на о-ве Хоккайдо и на севере Корейского п-ва имеют постледниковое происхождение; общая генетическая структура широкоареального *K. septemlobus* в Восточной Азии сформировалась под воздействием колебаний четвертичного климата в условиях неоднородного ландшафта [15]. Популяционно-генетические исследования *K. septemlobus* на территории РДВ ранее не проводились.

Цель настоящей работы — изучение генетического разнообразия и структуры краевых популяций умеренно-теплолюбивого вида *K. septemlobus* на северной границе его распространения (юг РДВ), а также выявление генетических связей с представителями из основного ареала вида по данным полиморфизма хпДНК.

Индивидуальные препараты тотальной ДНК выделены СТАВ-методом [16] с небольшими модификациями из листовой ткани 59 образцов *K. septemlobus*, собранных из 15 природных мест произрастания в Приморском крае и на о. Сахалин (табл. 1). Амплификацию некодирующих регионов *psbA-trnH*, *rpl32-trnL* и *trnS-trnfM* хпДНК проводили с использованием универсальных праймеров и реакционных условий, рекомендованных

для этих участков с использованием “медленной и холодной” ПЦР-программы [17, 18]. Нуклеотидные последовательности цепей регионов хпДНК определяли на генетическом анализаторе ABI 3500 (Applied Biosystems, USA), затем редактировали в Chromas 2.4.4 (<http://technelysium.com.au/wp/chromas>), выравнивали и объединяли в одну матрицу, используя пакет программ MEGA ver. X [19]. Число гаплотипов, нуклеотидное (π) и гаплотипическое (h) разнообразие (для популяций с числом образцов пять и более), распределение генетической изменчивости внутри и между популяциями (Φ_{ST} , анализ молекулярной дисперсии, AMOVA) рассчитывали с помощью программы Arlequin v. 3.5 [20]. Генеалогические связи гаплотипов анализировали методом медианного связывания (Median-Joining, MJ) в программе Network 10.1 [21].

Для 59 растений *K. septemlobus* определены нуклеотидные последовательности трех межгенных спейсеров хпДНК. Длина региона *psbA-trnH* у всех образцов составила 448 пн, нуклеотидных замен нет. Спейсер *rpl32-trnL* у всех растений имел длину 840 пн и одну замену С→А в позиции 321 в пяти образцах. У *trnS-trnfM* выявлено два варианта длины — 726 и 720 пн, — вследствие присутствия вставки/делеции (индель), замен нет. У всех образ-

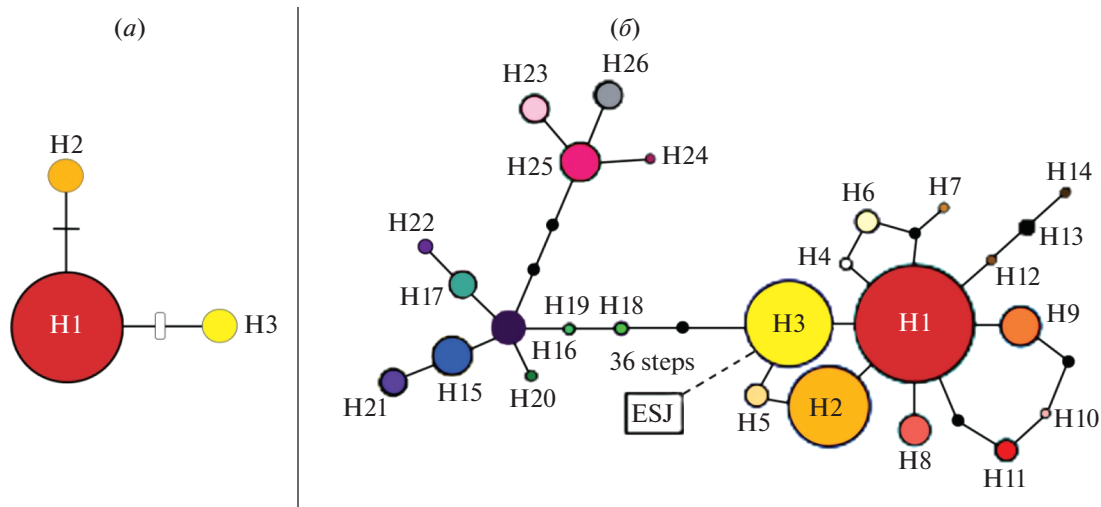


Рис. 1. Медианные сети гаплотипов хпДНК *Kalopanax septemlobus*: *a* – российский Дальний Восток. Размер окружностей отражает примерную частоту встречаемости гаплотипов, черная пересекающаяся линия – точечная мутация, белый пересекающийся блок – делеция нуклеотидов; *б* – Восточная Азия по [15].

цов из Приморского края спейсер *trnS-trnfM* длиной 726 пн, а образцы с о. Сахалин имели оба варианта. Длина объединенных последовательностей трех регионов хпДНК составила 2014 пн, из них 2007 – мономорфные сайты, один сайт переменный и информативный согласно методу максимальной экономии, индель длиной 6 пн. Нуклеотидные замены и индельные вариации позволили выявить три гаплотипа у *K. septemlobus* на юге РДВ (табл. 1). Последовательности регионов *psbA-trnH*, *rpl32-trnL* и *trnS-trnfM* хпДНК каждого гаплотипа депонированы в ENA/EMBL-EVI (номера для H1 – LR860506, LR860509 и LR860512; H2 – LR860508, LR860510 и LR860513; H3 – LR860507, LR860511 и LR860514 соответственно). Гаплотипы H1 и H2 обнаружены в Приморском крае и на о. Сахалин, а гаплотип H3 – только на о. Сахалин. В Приморском крае широко распространен гаплотип H1, частота встречаемости которого составила 92.4%, и только в популяции из бухты Витязь четыре образца имели гаплотип H2. На о. Сахалин в выборке с перевала Невельский у пяти деревьев обнаружен гаплотип H3, а у одного – гаплотип H1; у образца из бассейна р. Китосия, расположенного в 40 км южнее, обнаружен гаплотип H2. На рис. 1, *a* приведена медианная сеть генеалогических связей гаплотипов *K. septemlobus* РДВ. Одна нуклеотидная замена разделяет гаплотипы H1 и H2, индель разделяет гаплотипы H1 и H3.

Из 13 выборок *K. septemlobus* в Приморском крае только три выборки были с числом образцов пять и более (табл. 1), для которых и были рассчитаны показатели генетического разнообразия. Популяции из окрестностей Владивостока и о. Русский оказались мономорфными, а популяция из окрестностей бухты Витязь характеризовалась низким

уровнем как гаплотипического ($h = 0.382$), так и нуклеотидного разнообразия ($\pi = 0.0002$). Параметры генетического разнообразия общей выборки, включающей все исследуемые образцы из Приморского края, оказались еще более низкими (табл. 1).

Сахалинская популяция *K. septemlobus* с перевала Невельский имела практически такой же уровень гаплотипического ($h = 0.400$), но более высокий уровень нуклеотидного ($\pi = 0.0012$) разнообразия по сравнению с выборкой из бухты Витязь Приморского края. Общая выборка с о. Сахалин характеризовалась средними параметрами ($h = 0.600$, $\pi = 0.0018$) генетического разнообразия (табл. 1). Полученные данные о нуклеотидном разнообразии в суммарных выборках Приморского края и о. Сахалин (0.0001 и 0.0018 соответственно) согласуются с таковыми для основного ареала. Так, для группы популяций Юго-Западного Китая нуклеотидное разнообразие составило 0.00064, для группы Северо-Западный Китай–Окинава – 0.00019, для группы Восточный Китай–п-ов Корея–Японский архипелаг – 0.00021 [15]. Низкое генетическое разнообразие или отсутствие такового у хлоропластного генома в популяциях Приморского края может указывать на относительно недавнее происхождение от малого числа основателей.

По результатам AMOVA генетическая дифференциация между общими выборками из двух географических регионов РДВ составила 86% ($\Phi_{ST} = 0.857$, $P < 0.0001$) и является следствием экстремально низкого потока генов между ними, что обусловлено изоляцией расстоянием. Такая же высокая генетическая дифференциация была выявлена между тремя географическими группа-

ми популяций *K. septemlobus* из основного ареала ($F_{CT} = 0.84$) [15].

Нуклеотидные последовательности гаплотипов Н1–Н3 у *K. septemlobus*, произрастающего на территории Приморского края и о. Сахалин, оказались идентичны последовательностям гаплотипов Н1–Н3 основного ареала вида [15]. Генеалогические связи гаплотипов *K. septemlobus* в Восточной Азии представлены на рис. 1, б. Гаплотип Н1 является анцестральным и широко распространенным как на основном ареале (fig. 3b по [15]), так и на его северной границе (рис. 1). Гаплотип Н2, обнаруженный в популяции бухты Витязь Приморского края, распространен также на японских о-вах Хоккайдо и Хонсю и на горе Цзыцзинь (Нанкин) в Восточном Китае [15]. На территории между материковыми популяциями бухты Витязь и горы Цзыцзинь, расположенных друг от друга на расстоянии около 1600 км, выявлен только гаплотип Н1. Мы предполагаем, что возможны несколько вариантов возникновения гаплотипа Н2 в популяции бухты Витязь: во-первых, деревья с гаплотипом Н2 в ближайших популяциях-донорах могли исчезнуть под воздействием природных или антропогенных факторов; во-вторых, гаплотип мог возникнуть в результате случайной мутации при расселении особей с гаплотипом Н1; в-третьих, нельзя исключить возможность заноса семян с гаплотипом Н2 птицами с северных японских островов [22, 23]. Гаплотип Н3, выявленный на о. Сахалин, также присутствует на о-вах Хоккайдо и Хонсю [15].

Известно, что на юге Приморского края представители *K. septemlobus* произрастали еще в нижнем миоцене [24], когда шло формирование Японского моря и дифференциация о. Сахалин и Японских о-вов от континента [25]. Климатические флуктуации, особенно в последний плейстоценовый ледниковый период, способствовали смещению северной границы ареала *K. septemlobus* к югу, в то время как большинство популяций в Центральном Китае и на южных островах Японского архипелага, вероятно, сохранили свою локализацию [15]. Таким образом, выявленная нами низкая вариабельность хлоропластного генома *K. septemlobus* обусловлена реколонизацией территории Приморского края более южными популяциями. Более высокая генетическая изменчивость *K. septemlobus* на о. Сахалин, чем в Приморском крае, связана с его распространением в послеледниковый период из нескольких рефугиумов, существовавших на Японских островах, через мосты суши [15, 25]. Полученные молекулярно-генетические данные могут быть использованы для разработки программ по сохранению этого редкого и ценного вида дальневосточной флоры, а также для разработки мероприятий по рациональному природопользованию.

Исследование выполнено при финансовой поддержке программы Президиума РАН “Дальний Восток” (проекты № 18-4-011).

Авторы выражают благодарность В.Ю. Баркалову, А.С. Майоровой (ННЦМБ ДВО РАН), Е.М. Булах, Т.Ю. Горпенченко за помощь в сборе материала.

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. Ohashi H. Nomenclature of *Kalopanax septemlobus* (Thunb. ex Murray) Koidzumi and classification of its infraspecific taxa (Araliaceae) // J. Jap. Bot. 1994. V. 69. P. 28–31.
2. Chang C.S., Kim H., Kang H.S., Lee D.K. A morphometric analysis of the eastern Asian *Kalopanax septemlobus* (Thunb.) Koidz. (Araliaceae) // Bot. Bull. Acad. Sinica. 2003. V. 44. P. 337–344.
3. Журавлев Ю.Н., Коляда А.С. Агалиеи: женьшень и другие. Владивосток: Дальнаука, 1996. 280 с.
4. Lee D.K., Kang H.-S. Distribution of *Kalopanax septemlobus* and its growth in Northeast Asia // Eurasian J. For. Res. 2002. V. 2. № 5. P. 85–94.
5. Sakaguchi S., Sakurai S., Yamasaki M., Isagi Y. How did the exposed seafloor function in postglacial northward range expansion of *Kalopanax septemlobus*? Evidence from ecological niche modelling // Ecol. Res. 2010. V. 25. P. 1183–1195.
6. Красная книга Сахалинской области: Растения / Отв. ред. Еремин В.М. Южно-Сахалинск: Сахалинское книж. изд-во, 2005. 348 с.
7. Красная книга Российской Федерации (растения и грибы). М.: Т-во науч. изд. КМК, 2008. 855 с.
8. Недолужко В.А. Диморфант семиллопастный *Kalopanax septemlobus* (Thunb.) Koidz. // Биол. редких сосудистых раст. совет. Дальнего Востока. Владивосток: ДВО АН СССР, 1990. С. 132–138.
9. Hyun T.K., Kim J.-S. The pharmacology and clinical properties of *Kalopanax pictus* // J. of Med. Plants Res. 2009. V. 3. № 9. P. 613–620.
10. Гладкова Г.А., Сибурина Л.А., Бутовец Г.Н. Редкие растительные сообщества с калопанаксом семиллопастным на острове Русский (Южное Приморье) // Вестник ДВО РАН. 2015. № 1. С. 34–44.
11. Huh M.K., Jung S.D., Moon H.K. et al. Comparison of genetic diversity and population structure of *Kalopanax pictus* (Araliaceae) and its thornless variant using RAPD // Korean J. Med. Crop Sci. 2005. V. 13. № 2. P. 69–74.
12. Huh M.K. Comparison of genetic diversity and relationships of genus *Kalopanax* using ISSR markers // J. Life Sci. 2006. V. 16. № 5. P. 740–745.

13. *Sakaguchi S., Takeuchi Y., Yamasaki M. et al.* Lineage admixture during postglacial range expansion is responsible for the increased gene diversity of *Kalopanax septemlobus* in a recently colonised territory // *Heredity*. 2011. V. 107. P. 338–348.
14. *Jung S.D., Huh H.W., Hong J.H. et al.* Genetic diversity and population structure of *Kalopanax pictus* (Araliaceae) // *J. Plant Biol.* 2003. V. 46. № 4. P. 255–262.
15. *Sakaguchi S., Qiu Y.-X., Liu Y.-H. et al.* Climate oscillation during the Quaternary associated with landscape heterogeneity promoted allopatric lineage divergence of a temperate tree *Kalopanax septemlobus* (Araliaceae) in East Asia // *Mol. Ecol.* 2012. V. 21. P. 3823–3838. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05652.x>
16. *Isabel N., Tremblay L., Michaud M. et al.* RAPDs as an aid to evaluate the genetic integrity of somatic embryogenesis derived populations of *Picea mariana* (Mill.) B.S.P. // *Theor. Appl. Genet.* 1993. V. 86. P. 81–87.
17. *Shaw J., Lickey E.B., Beck J.T. et al.* The tortoise and the hare II: Relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis // *Am. J. Bot.* 2005. V. 92. P. 142–166. <https://doi.org/10.3732/ajb.92.1.142>
18. *Shaw J., Lickey E.B., Schilling E.E., Small R.L.* Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in angiosperms: The tortoise and the hare III // *Am. J. Bot.* 2007. V. 94. P. 275–288.
19. *Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K.* MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms // *Mol. Biol. Evol.* 2018. V. 35. P. 1547–1549.
20. *Excoffier L., Lischer H.E.L.* Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows // *Mol. Ecol. Resources*. 2010. V. 10. P. 564–567.
21. *Bandelt H.-J., Forster P., Rohlf A.* Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies // *Mol. Biol. Evol.* 1999. V. 16. № 1. P. 37–48.
22. *Нечаев В.А., Гамова Т.В.* Птицы Дальнего Востока России (аннотированный каталог). Владивосток: Дальнаука, 2009. 564 с.
23. *Нечаев В.А., Нечаев А.А.* Семейство Аралиевые и птицы-карпофаги на юге Дальнего Востока // *Вестник ДВО РАН*. 2015. № 1. С. 63–71.
24. *Павлюткин Б.И., Чекрыжов И.Ю., Петренко Т.И.* Геология и флора нижнего миоцена юга Приморья. Владивосток: Дальнаука, 2012. 194 с.
25. *Крестов П.В., Баркалов В.Ю., Омелько А.М. и др.* Реликтовые комплексы растительности современных рефугиумов Северо-Восточной Азии // *Комаровские чтения*. 2009. Вып. 56. С. 5–63.

Genetic Diversity of *Kalopanax septemlobus* (Thunb.) Koidz. at the Northern Range Edge according to Chloroplast DNA Sequencing Data

E. A. Vasyutkina^{a, *} and I. Yu. Adrianova^a

^a*Federal Scientific Center of the East Asia Terrestrial Biodiversity, Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences, Vladivostok, 690022 Russia*

**e-mail: levina@biosoil.ru*

The analysis of nucleotide polymorphism of intergenic spacers *psbA–trnH*, *rpl32–trnL* and *trnS–trnFM* of chloroplast DNA in accessions of *Kalopanax septemlobus* at the northern range edge (Russian Far East) was carried out. The genetic diversity of the total sample from the south of Primorsky krai was very low ($h = 0.142$, $\pi = 0.0001$), and of the total sample of Sakhalin Island was medium ($h = 0.600$, $\pi = 0.0018$). Analysis of molecular variance showed that about 86% of all genetic variability is accounted for by differences between the two geographic regions ($\Phi_{ST} = 0.857$, $P < 0.0001$). Nucleotide substitutions and variations of indels revealed three haplotypes (H1–H3), of which the H3 haplotype was found only on Sakhalin Island. The haplotype H1 is widespread in Primorsky krai which frequency was 92.4%. The observed variability of *K. septemlobus* in the Russian Far East reflects by history of its biogeography.

Keywords: *Kalopanax septemlobus*, *Kalopanax pictus*, castor aralia, genetic diversity, intergenic spacers, chloroplast DNA.