

ИСТОРИЯ ФЛОРЫ

УДК 575.222.72

О.В. Уварова¹

У.А. Боярских²

М.Г. Куцев¹

O.V. Uvarova

U.A. Boyarskikh

M.G. Kutsev

СХОДСТВО И РАЗЛИЧИЕ *RHODIOLA KRYLOVII* POLOZHIIJ ET REVJAK. И *R. ROSEA* L. НА ОСНОВЕ ДАННЫХ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

SIMILARITY AND DIFFERENTIATION *RHODIOLA KRYLOVII* POLOZHIIJ ET REVJAK. AND *R. ROSEA* L. BASED ON DATE OF MOLECULAR-GENETIC ANALYSIS

Аннотация. В публикации приводятся данные о генетической вариабельности *Rhodiola krylovii* Polozhij et Revjak. и *R. rosea* L. на основе RAPD-PCR данных и секвенирования ITS1-5.8S-ITS2 региона ядерной ДНК. Выявлено отсутствие генетической дифференциации видов на Алтае и в Туве.

Ключевые слова: RAPD-PCR-анализ, *Rhodiola krylovii*.

Summary. The data on genetic variability of *Rhodiola krylovii* Polozhij et Revjak. and *R. rosea* L. revealed by RAPD-PCR and sequencing of ITS1-5.8S-ITS2 fragment of nuclear DNA are reported. The lack of genetic differentiation among the two taxa in Altai and Tuva is shown.

Key words: RAPD-PCR-analysis, *Rhodiola krylovii*.

Родиола розовая является ценным лекарственным растением. В корневище и корнях родиолы розовой содержатся фенольные гликозиды (главные из них – родиолозид и салидрозид), п-тиразол, дубильные вещества, лактоны, эфирное масло, галловая, щавелевая, янтарная и лимонная кислоты.

¹ Алтайский государственный университет, пр-т Ленина, 61; 656049, Барнаул, Россия; e-mail: bot@asu.ru

² Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, пр. ак. Лаврентьева, 8; 630090, Новосибирск, Россия; max@niboch.nsc.ru

¹ South-Siberian Botanical Garden, Altai State University; Lenina st., 61, Barnaul, 656049, Russia

² Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Russian Academy of Sciences, Siberian Branch (Novosibirsk)

Жидкий экстракт родиолы розовой обладает стимулирующими и адаптогенными свойствами. Действие препарата обусловлено тиразолом и родиолозидом. Рекомендован как стимулирующее средство при функциональных заболеваниях нервной системы, гипотонии, нервном и физическом истощении. Может быть использован для производства тонизирующих напитков (Атлас ареалов ..., 1983).

В Юго-Восточном Алтае и Туве, наряду с *Rhodiola rosea* L., широко распространена *R. krylovii* Polozhij et Revjak. со спорным таксономическим статусом. Н.В. Ревякина (2006) считает *R. krylovii* близкородственным видом *R. rosea*. В тоже время, ряд авторов (Ohba, 2005; Гончарова, 2006) относят *R. krylovii* к группе родства *R. pinnatifida* Boriss., широко распространенной в Восточной Сибири. Все три вида являются полиморфными, в связи с чем сложно установить границы видовых таксонов на основе одних лишь анатомо-морфологических признаков.

Приведенные ниже признаки не позволяют достоверно различить виды на ювенильной стадии развития. Также отмечаются переходные формы с различной степенью зубчатости листа и промежуточными вариантами признаков других вегетативных органов.

Rhodiola rosea L. 1753, Sp. Pl.: 1035; Пешкова, 1994, Фл. Сиб. 7 : 157. – *R. elongata* Fisch. et Mey. 1841, Schrenk, Enum. Pl. Nov. 1 : 83. – *Sedum roseum* (L.) Scop. 1772, Fl. Carn. ed. 2, 1 : 326; Крылов, 1931, Фл. Зап. Сиб. 6 : 1407. – *S. rhodiola* DC. 1805, Pl. Grass.: 143. – *S. altaicum* G. Don, 1834, Gen. Syst. Bot. 3 : 114. – *S. elongatum* Ledeb. 1846, Fl. Ross. 2 : 178. – **Родиола розовая.**

Корень толстый, вертикальный; корневище образует утолщения в области корневой шейки; каудекс покрыт темно-бурыми чешуевидными треугольными острыми мелкими листьями. Стебли 20–50 (до 60) см выс., 3–6(8) мм диам., немногочисленные, выходят по 1–2 из каждого ответвления каудекса. Листья 0.7–5 см дл., 0.5–1.5(2) см шир., сидячие, от эллиптических до продолговатых, при основании широкоокруглые, иногда стеблеобъемлющие или сердцевидные (особенно нижние), цельнокрайные или в верхней половине расставленно-зубчатые, на верхушке заостренные, у живых растений сизые, плотные. Подпестичные чешуи в 2–5 раз длиннее своей ширины, на верхушке неровно усеченные или выемчатые.

Общее распр.: Алтайская Горная страна: практически все районы; горы Западной Европы; Арктическая Евразия; Дальний Восток; горы Средней и Центральной Азии.

Описан из Европы.

Rh. krylovii Polozhij et Revjak. 1979, Новости сист. высш. раст. 16 : 127; Пешкова, 1994, Фл. Сиб. 7 : 156. – **Р. Крылова.**

Корень толстый, со шнуровидными ответвлениями; корневище не образует утолщения в области корневой шейки; каудекс покрыт темно-бурыми яйцевидными, на верхушке туповатыми или коротко заостренными чешуевидными листьями. Стебли (7)10–30 см выс., 3–6 мм диам., выходят по 2–6 из каждого

ответвления каудекса. Листья 1.5–3(5) см дл., (5)7–10(27) мм шир., ланцетные, к основанию постепенно суженные, в верхней трети крупнозубчатые, у живых растений ярко-зеленые, тонкие. Подпестичные чешуи в 1.5–2 раза длиннее своей ширины, пирамидальные, на верхушке закругленные.

Общее распр.: Алтайская Горная страна; Западная Монголия; Юго-Восточный Алтай; Тува.

Описан с Алтая (Катунский хребет).

Материалы и методы.

Для популяционного анализа методом RAPD-PCR использованы листья, высушенные в силикагеле, для полного секвенирования ITS1-5.8S-ITS2 фрагментов использованы листья с гербарных образцов, хранящихся в гербарии Южно-Сибирского ботанического сада (ALTB).

Места сбора и ссылка на использованные данные приведены в таблице 1.

Выделение ДНК проводилось из 20–50 мг сухой растительной ткани с помощью набора DiamontDNA (ООО «Алтайбиотех»).

RAPD-PCR проводилась в 25 мкл смеси (14.6 мкл H₂O; 2 мкл ДНК; 2.5 мкл 10× буфера; 2.5 мкл 25 мМ MgCl₂; 2 мкл 10 мМ праймера; 1.2 мкл 20 мМ dNTPs; 0.2 мкл Taq-полимеразы) на термальном циклере MyCycler BioRad с использованием реактивов производства ООО «Медиген». Амплификация проводилась по следующей программе: 6 циклов: 95°C – 30 сек, 35°C – 45 сек, 72°C – 80 сек; 36 циклов: 94°C – 45 сек, 36°C – 40 сек, 72°C – 70 сек; завершающая стадия: 72°C – 10 мин, охлаждение при 4°C (Куцев, 2008).

Предварительно на 2 образцах ДНК из имеющегося набора коммерческих декамерных праймеров Carl Roth GmbH Co. опытным путем были выявлены те, которые дают воспроизводимый полиморфный результат (табл. 2).

После этого ПЦР проводилась со всеми образцами из двух близко расположенных популяций. Разделение продукта амплификации производилось в 1.8% агарозном геле и 0.5 М TAE-буфере при 2.5 В/см в горизонтальной электрофорезной камере Pharmacia LKB-GNA 200. После электрофореза гель окрашивался раствором этидиум бромид в концентрации 2.5 мг/л в течение 20 мин. и фотографировался в проходящем УФ-излучении (рис. 1). Результаты вносились в бинарную матрицу для дальнейшей статистической обработки. В результате проведенного RAPD-исследования выявлена внутривидовая изменчивость видов *R. rosea* и *R. krylovii* (выявлено 83 полиморфных признака).

Амплификация ITS1-5.8S-ITS2 фрагмента проводилась по следующей программе (Фризен, 2007): 1 цикл: 95°C – 80 сек; 30 циклов: 94°C – 20 сек, 55°C – 30 сек, 72°C – 3 мин; завершающая стадия: 72°C – 5 мин, охлаждение при 4°C в 50 мкл смеси (14.6 мкл H₂O; 2 мкл ДНК; 2.5 мкл 10× буфера; 2.5 мкл 25 мМ MgCl₂; 2 мкл 10 мМ праймера; 1.2 мкл 20 мМ dNTPs; 0.2 мкл Taq-полимеразы) с использованием праймеров PLANT1 (5'-AAGGTTTCCGTTAGGTGAAC-3') и PLANT2 (5'-TATGCTTAAACTCAGCGGG-3').

Секвенирование производилось на автоматическом секвенаторе ABI

Таблица 1

Характеристика материала по видам *Rhodiola* L.

№	Название вида	Место и дата сбора	Кол-во образцов	Коллектор
Образцы, использованные для RAPD-PCR				
1	<i>R. rosea</i>	РОССИЯ, Республика Тува, Могур-Аксинский р-н, хр., у устья реки (Джетты-Тей), вытекающей из оз. Ак-коль и впадающей в р. Моген-Бурен, 50°17.630' N, 89°39.023' E, Н=2100 м., 21 VII 2009 г.	10	Герман Д.А., Иванова М.С., Белкин Д.Л., Смирнов С.В.
2	<i>R. krylovii</i>	РОССИЯ, Республика Тува, Монгун-Тайгинский р-н, верхнее течение р. Моген-Бурен, 7–8 км выше устья р. Усту-Гимате, 50°10.619' N, 89°44.804' E, Н=1900–2000 м., 19 VII 2009 г.	10	Герман Д.А., Иванова М.С., Белкин Д.Л., Смирнов С.В.
Образцы, использованные для секвенирования				
3	<i>R. rosea</i>	РОССИЯ, Республика Тува, Могур-Аксинский р-н, хр., у устья реки (Джетты-Тей), вытекающей из оз. Ак-коль и впадающей в р. Моген-Бурен, 50°17.630' N, 89°39.023' E, Н=2100 м., 21 VII 2009 г.	1	Герман Д.А., Иванова М.С., Белкин Д.Л., Смирнов С.В.
4		РОССИЯ, Алтайский край, Тигирекский хребет, верх. р. Большой Тигирек, 51°03'93" N, 82°59'24" E, 29 VI 2005 г.	1	Шмаков А.И., Косачев П.А.
5	<i>R. krylovii</i>	РОССИЯ, Республика Тува, Монгун-Тайгинский р-н, верхнее течение р. Моген-Бурен, 7–8 км выше устья р. Усту-Гимате, 50°10.619' N, 89°44.804' E, Н=1900–2000 м., 19 VII 2009 г.	1	Герман Д.А., Иванова М.С., Белкин Д.Л., Смирнов С.В.
6		РОССИЯ, Республика Алтай, Кош-Агачский р-н, хр. Сайлюгем, верхнее течение р. Аргамджи (вост.), 49°14' N, 87°58' E, 09 VIII 2000 г.	1	Костюков С.А., Косачев П.А., Зубенко Р., Варданян А., Ващенко А.
Данные генбанка NCBI				
7	<i>R. rosea</i>	№ FJ769167 (не опубликовано)	1	Olfelt J.P., Furnier G.R., Luby J.J., Handzic N. (2009)
8		№ AV088599	1	Mayuzumi S., Ohba H. (2004)

3100 с использованием набора реагентов BigDye на базе Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН. Секвенирование проводилось по обеим цепям ДНК для повышения достоверности и устранения ошибок прочтения. Статистическая обработка полученных результатов произведена в программах NTSYSpc 2.1 (Rohlf, 1992) и Structure 2.2 (Evanno et al., 2005; Pritchard et al., 2007).

Результаты и обсуждения.

Векторный анализ (Joliffe, 1986) проведен на основе разработанного специально для RAPD-AFLP данных M. Lynch (1990) коэффициента сходства-различия.

В результате получена трехмерная диаграмма распределения экземпляров *R. rosea* и *R. krylovii* с двойной кластеризацией (рис. 2) и незначительной генетической дифференциацией популяций.

Распределения всех экземпляров *R. rosea* и *R. krylovii* из 2 популяций на кластеры выявлено также с помощью F-статистики. Простые популяционно-генетические модели обычно исходят из предположения, что скрещивание между особями в популяции происходит совершенно случайно и что частоты различных генотипов могут быть рассчитаны, исходя из аллельных частот в гаметном пуле. Однако, естественным популяциям нередко свойственна мозаичная (демовая) структура, при которой вероятность скрещивания между особями из одного дема гораздо выше, чем из разных. Еще одним процессом, также приводящим к уменьшению гетерозиготности популяции, является инбридинг. При максимальной степени инбридинга – апомиктов, гомозиготные особи производят только гомозиготных потомков, а у гетерозиготных только половина потомков будет также гетерозиготна. Следовательно, в каждом поколении частота гетерозигот уменьшается вдвое. В менее экстремальных случаях встречаемость гетерозигот в популяции убывает вследствие близкородственного скрещивания медленнее, но все равно инбридинг всегда приводит к постепенному уменьшению степени гетерозиготности. Подобная структурированность популяции приводит к очень интересным генетическим последствиям.

Sewall Wright (1968) предложил несколько взаимосвязанных парамет-

Таблица 2

Праймеры, использованные для RAPD-PCR

№	Название праймера	Последовательность	Кол-во амплифицированных фрагментов
1	B-06	5'- TGCTCTGCCC-3'	6
2	B-08	5'- GTCCACACGG-3'	18
3	B-10	5'- CTGCTGGGAC-3'	9
4	C-20	5'- ACTTCGCCAC-3'	13
5	D-02	5'- GGACCCAACC-3'	13
6	D-03	5'- GTCGCCGTCA-3'	12
7	D-10	5'- GGTCTACACC-3'	14

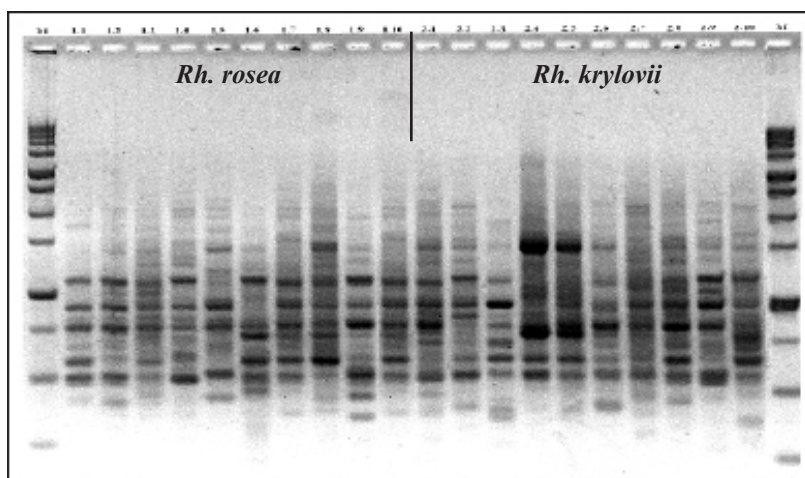


Рис. 1. Электрофореограмма RAPD-анализа. Образцы №№ 1.1–1.10 – *Rhodiola rosea* L. Образцы №№ 2.1–2.10 – *Rh. krylovii* Polozhij et Revjak. М – маркер молекулярного веса (100+2000 bp).

ров, позволяющих измерять и различать генетические последствия дрейфа и инбридинга в подразделенных популяциях. Два параметра, использованные нами и измеряющие степень гетерозиготности:

H_s – средняя ожидаемая частота гетерозиготных особей в деме. Ее вычисляют для каждого дема по формуле $2pq$ или же $2p(1-p)$, а затем усредняют для всех демов популяции (здесь p и q – частоты аллелей, наблюдающиеся в данном деме).

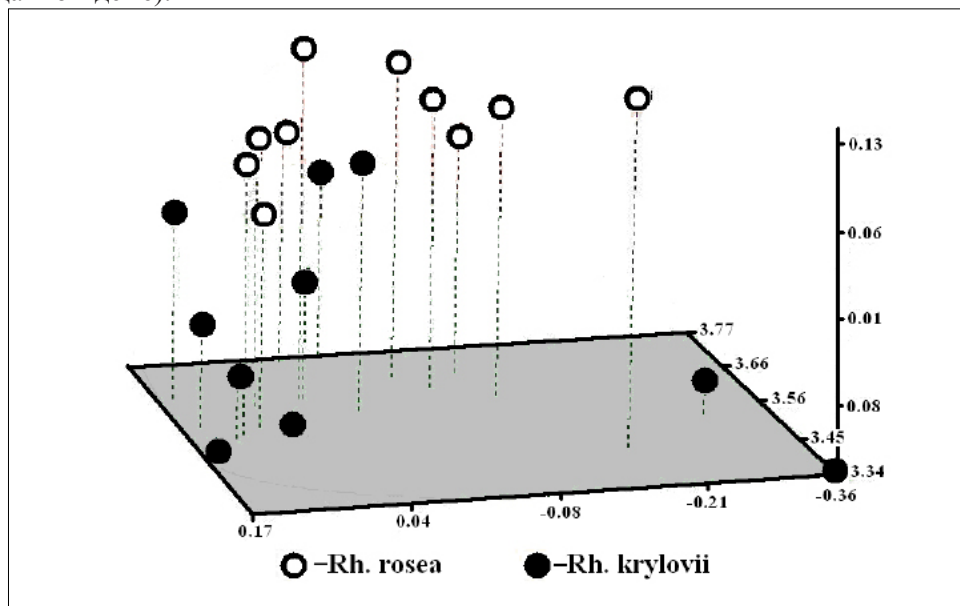


Рис. 2. Полиморфизм *Rhodiola rosea* и *Rh. krylovii* внутри популяций по данным RAPD-анализа.

Ht – ожидаемая частота гетерозигот во всей популяции, вычисляемая по формуле $2p(1-p)$, где p и q – частоты аллелей в популяции в целом. На основе этих показателей гетерозиготности можно рассчитать коэффициент дифференциации.

Коэффициент Fst оценивает нехватку гетерозигот, возникающую в результате подразделенности популяции и случайного дрейфа аллельных частот в каждом деме:

$Fst = (Ht-Hs)/Ht$ – рассчитав нехватку гетерозигот для n популяций, можно выявить степень их подразделенности и судить о самостоятельности. Статистическая обработка результатов произведена с помощью программы Structure 2.2.

Значение коэффициента дифференциации Fst (Cockerham, 1973; Weir, Cockerham, 1984) между популяциями *Rh. rosea* и *Rh. krylovii* изменялось в пределах от 0.0041 до 0.1671 (рис. 3) при различных коэффициентах (K) кластеризации (от 1 до 4 предполагаемых кластера).

Значение Fst при $K=1$ составляет 0.0041, что очень близко к нулю и свидетельствует об отсутствии генетической дифференциации популяций. При $K=2$ коэффициент дифференциации Fst несколько выше (0.167), но все равно не превышает 0.5 и находится на уровне, характерном для внутривидовой степени различия. Таким образом, достоверное подразделение популяций отсутствует, что свидетельствует о свободной гибридизации внутри популяций и общности генетического материала видов.

Анализ секвенированной полной последовательности фрагмента ITS1-5.8S-ITS2 (частично секвенированы прилежащие гены рибосомальной РНК 18S и 28S) позволил выявить полную гомологию исследованных нами образцов (рис. 4). При анализе данного участка ядерной ДНК такое явление характерно для экземпляров одного вида. На потенциально гипервариабельный участок

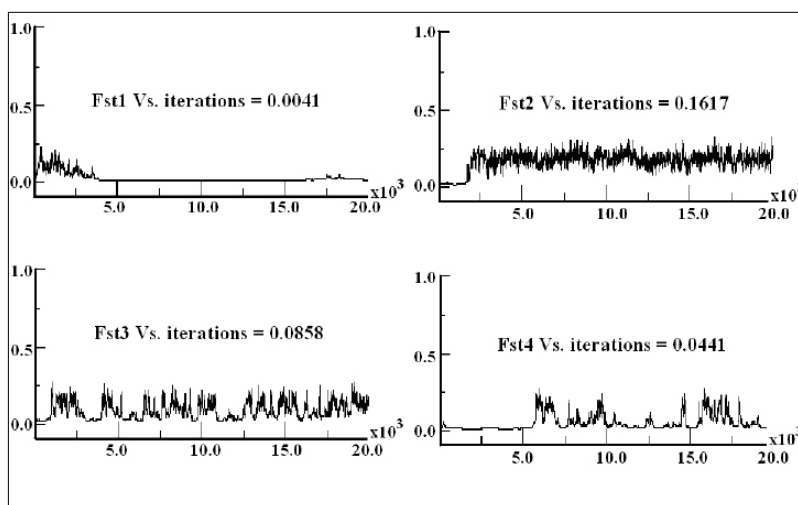


Рис. 3. Значение коэффициента дифференциации Fst в зависимости от предполагаемого количества подразделенных групп (ось X – количество моделей, ось Y – значение Fst).

R_rosea_1	AAGGTTCCG TAGGTGAACC TCGGGAAGGA TCATTGTCGA AGCCTAGAAA	[50]
R_rosea_2	[50]
R_krylovii_1	[50]
R_krylovii_2	[50]
R_rosea_AB088599	-----.....	[50]
R_rosea_FJ769167	-----..	[50]
R_rosea_1	GCATGACCGT GGACAAGTTG TTAATCGTGG ATGCACTTGG ATCCTTCGGG	[100]
R_rosea_2	[100]
R_krylovii_1	[100]
R_krylovii_2	[100]
R_rosea_AB088599	[100]
R_rosea_FJ769167	...C.....	[100]
R_rosea_1	TACTCCATTT GCCTTCCCTT CGGTCCGGTGA TGAGCCTTGC GCCCGTTGCT	[150]
R_rosea_2	[150]
R_krylovii_1	[150]
R_krylovii_2	[150]
R_rosea_AB088599	[150]
R_rosea_FJ769167T.....	[150]
R_rosea_1	TGGGGGTGAA GCTTGGCCTA CCGTGAGCCC AAACTCGGCG ATGGCTTAAA	[500]
R_rosea_2	[500]
R_krylovii_1	[500]
R_krylovii_2	[500]
R_rosea_AB088599	C.....	[500]
R_rosea_FJ769167	[500]
R_rosea_1	TCAGGCGGGA ATACCCGCTG AGTTTAAGAT AC	[682]
R_rosea_2	[682]
R_krylovii_1	[682]
R_krylovii_2	[682]
R_rosea_AB088599A.----	[682]
R_rosea_FJ769167A.-----	[682]

Рис. 4. Сравнение нуклеотидных последовательностей участка ITS1-2 (представлены только сайты, отличающиеся по структуре от опубликованных ранее в генбанке NCBI).

протяженностью 682 пары нуклеотидов приходится всего 5 нуклеотидных замен, причем замены в положениях 659 и 675, скорее всего, связаны с ошибками прочтения, обычно возникающими на концах секвенцев.

Между тем, различия между другими видами рода по данному участку существенны и используются при выявлении филогении группы (Гончарова, 2006). Вариабельность же данного фрагмента ядерной ДНК между другими видами р. *Rhodiola* составляет 5–7% .

Заключение.

На основании отсутствия генетической и географической изоляции вопрос о самостоятельности *Rhodiola krylovii* как вида ставится под сомнение – доказано ее близкое родство с *R. rosea*. Возможно, *R. krylovii* является одной из устойчивых генетически необособленных рас *R. rosea*. Также неправомерно отнесение *R. krylovii* к группе родства *R. pinnatifida* Boriss. ввиду достаточно резких габитуальных отличий, различных местообитаний видов (*R. rosea* и *R. krylovii* характерны для высокогорий, в то время как *R. pinnatifida* распространена только в лесном поясе гор) и изолированных ареалов. Для решения вопроса о положении *R. krylovii* и *R. rosea* в филогенетической схеме необходимо дополнительное исследование последовательностей ITS, а также вариабельных участков хлоропластной ДНК у всех видов рода.

Благодарности.

С.В. Смирнову за предоставленный материал и определение, Д.Н. Шауло – за ценные научные консультации.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 09-04-90737 моб_ст.

ЛИТЕРАТУРА

- Атлас ареалов и ресурсов лекарственных растений. – ГУГК, 1983. – С. 134–135.
- Гончарова С.Б.** Очитковые (*Sedoideae*, Crassulaceae) флоры российского Дальнего Востока. – Владивосток: Дальнаука, 2006. – 223 с.
- Гончарова С.Б.** Подсемейство *Sedoideae* (Crassulaceae) флоры Сибири и Дальнего Востока (систематика, биоморфология, филогения): Автореф. дисс. ... докт. биол. наук. – Владивосток, 2006. – 32 с.
- Куцев М.Г.** Популяционная изменчивость *Achnatherum splendens* (Trin.) Nevski, выявленная с помощью RAPD-маркеров // Turczaninowia, 2008. – 11(4). – С. 86–94.
- Ревякина Н.В.** Биология развития родиолы Крылова в Алтае-Саянской горной стране // Проблемы ботаники Южной Сибири и Монголии: Матер. V Междунар. науч.-практ. конф. (21–23 ноября 2006 г., Барнаул). – Барнаул: АзБука, 2006. – С. 196–198.
- Фризен Н.В.** Молекулярные методы, используемые в систематике растений. – Барнаул: АзБука, 2007. – 70 с.
- 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.
- Joliffe J.T.** Principal component analysis. – Springer-Verlag: New York. – 1986.
- Lynch M.** The similarity index and DNA fingerprint // Mol. Biol. Evol., 1990. – Vol. 7. – P. 478–484.
- Mayuzumi S., Ohba H.** The phylogenetic position of eastern Asian *Sedoideae* (Crassulaceae) inferred from chloroplast and nuclear DNA // Syst. Bot., 2004. – Vol. 29. – P. 587–598.
- Ohba H.** *Rhodiola*. Illustrated handbook of succulent plants: Crassulaceae. – Berlin; Heidelberg; New York: Springer, 2005. – P. 210–227.
- Pritchard J.K., Xiaoquan Wen, Falush D.** Documentation for structure software: Version 2.2 // Department of Human Genetics University of Chicago – Department of Statistics University of Oxford, 2007. – 37 p.
- Rohlf F.J.** NTSYS-pc. Numerical taxonomy and multivariate analysis systems // Exeter Software, Applied Biostatistics. – New York, 1992. – 225 p.