

Удивительное генетическое разнообразие шиповников (*Rosa*) Узбекистана**Extraordinary genetic diversity in Uzbekistan wild roses (*Rosa*)**

Шанцер И. А., Федорова А. В.

Schanzer I. A., Fedorova A. V.

Главный ботанический сад им. Н. В. Цицина РАН, г. Москва, Россия. E-mail: ischanzer@gmail.com; alina77777@mail.ru
Tsitsin Main Botanical Garden of RAS, Moscow, Russia.

Реферат. Исследована популяция *Rosa kokanica* на склонах горы Большой Чимган (Узбекистан, Ташкентская область). Методом статистической парсимонии реконструирована сеть гаплотипов хлоропластного межгенного спейсера *ndhC-trnV* для 34 образцов из трех субпопуляций из долин с северного, юго-западного и южного макросклонов горы. Выявлено 19 гаплотипов, из которых базальный и наиболее часто встречающийся внутренний гаплотип 1 обнаружен в северной и южной субпопуляциях, в то время как в юго-западной субпопуляции выявлено 13 уникальных для этой субпопуляции гаплотипов. Предполагается, что возникновение подобной генетической структуры связано с длительной изоляцией субпопуляций в ледниковое время.

Ключевые слова. г. Большой Чимган, сеть гаплотипов, Узбекистан, *Rosa kokanica*, *ndhC-trnV*, TCS.

Summary. We have studied a population of *Rosa kokanica* from slopes of the Greater Chimgan Mt. in Tashkent Region of Uzbekistan. We reconstructed a statistical parsimony network of *ndhC-trnV* chloroplast intergenic spacer for 34 samples from three subpopulations found in valleys of the northern, southern and south-western macro slopes of the mountain. The study revealed 19 haplotypes, one of which, the basal internal haplotype 1, was shared between the northern and southern subpopulations, while 13 unique haplotypes were found in the south-western subpopulation. We suppose that such a kind of genetic structure could arise during long lasting isolation of the subpopulations in glacial times.

Key words. Greater Chimgan Mt., haplotype network, *ndhC-trnV*, *Rosa kokanica*, TCS, Uzbekistan.

Шиповники (*Rosa* L.) представляют собой весьма сложную таксономическую группу, представления о числе видов в которой до сих пор весьма далеки от того, чтобы считаться устоявшимися. Традиционное деление рода на 2–3 подрода и 10 секций в пределах типового подрода *Rosa*, хотя и было несколько уточнено молекулярно-филогенетическими исследованиями последних десятилетий (Fougère-Danezan et al., 2015), все же до сих пор основывается на системе рода, разработанной еще в первой половине XX века. Секция *Pimpinellifoliae*, в частности, остается пока весьма слабо изученной группой, с не вполне установленной монофилетичностью, границами видов, представлениями об их родстве и разграничении с типовой секцией *Rosa*. Наибольшее видовое разнообразие секции наблюдается в Средней и Центральной Азии и Китае. В частности, здесь выделяется весьма своеобразная группа желтоцветковых роз. Во время полевых исследований в Узбекистане в 2017 г. нам удалось собрать довольно значительную выборку образцов желтоцветковых шиповников, варьировавших по окраске венчиков от бледно-желтых до желто-розовых и оранжевых. Задачей нашего предварительного исследования было попытаться сравнить морфологическое и генетическое разнообразие в этой группе и оценить степень внутри- и межгруппового полиморфизма на выборке, собранной со сравнительно небольшой территории.

Материал и методы. Материалом для исследования послужили собранные нами 34 образца *Rosa* из 9 местонахождений на трех (северном, южном и юго-западном) макросклонах горы Большой Чимган (юго-западная оконечность Чаткальского хребта) близ Ташкента в долинах рек Чирчик, Ахангаран и Аксагата, соответственно. Еще два образца роз, собранных в западных предгорьях Зеравшанского хребта, также были включены в данное исследование. Определение таксономической принадлежности собранных образцов проводили по ключам во «Флоре Узбекистана» (Введенский, Пазий, 1955), «Флоре Казахстана» (Фисюн, 1961) и «Flora of China» (Cui, Robertson, 2003). В первой из указанных работ авторами обработки была принята весьма широкая концепция вида, во второй, напротив, весьма узкая, но еще более узкие представления о виде были приняты в третьей обработке для флоры Китая.

В качестве молекулярно-генетического маркера после предварительного испытания нескольких хлоропластных участков на вариабельность в пределах исследуемой группы был использован хлоропластный межгенный спейсер *ndhC-trnV*. Этот участок оказался не только весьма вариабельным в наших предшествующих исследованиях, но одним из трех самых вариабельных в хлоропластном геноме *Rosa* в целом (Zhang et al., 2022). Анализировались два выравнивания: без внешней группы (36 последовательностей) и с множественной внешней группой (67 последовательностей).

Тотальную геномную ДНК извлекали из высушенных в силикагеле листьев с использованием коммерческого набора NucleoSpin Plant II DNA extraction kit (Macherey-Nagel, Germany) в соответствии с инструкциями производителя. Участок *ndhC-trnV* амплифицировали с праймерами *ndhC* (ATTAGAAATGYCCARAAAATATCAT) и *trnV*(UAC)x2 (GTCTACGGTTCGARTCCGTA) (Shaw et al., 2007). Праймеры были синтезированы и очищены в ПААГ компанией ООО «Синтол» (Москва, Россия). Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили в объеме 20 мкл, содержащем 4 мкл готового микса Ready-to-Use PCR MasterMIX на основе “hot-start” SmarTaq ДНК полимеразы (ООО «Диалат», Москва, Россия), 13 мкл деионизированной воды, 3,2 пмоль каждого праймера и около 1,5–2 нг исследуемой ДНК в амплификаторе MJ Research PTC-220 DNA Engine Dyad Thermal Cycler (БиоРад, США) при следующих условиях: 95 °С – 180 с; 95 °С – 60 с, 57 °С – 40 с, 60 °С – 80 с (35 циклов); 57 °С – 40 с, 60 °С – 80 с (2 цикла). Продукты амплификации проверяли в 1%-м агарозном геле в 0,5×ТВЕ буфере с окрашиванием бромидом этидия. Очистку продуктов ПЦР проводили переосаждением в 0,125 моль/л растворе ацетата аммония в 70%-м этаноле. Очищенные продукты ПЦР секвенировали в обоих направлениях с использованием коммерческого набора ABI PRISM © BigDye™ Terminator v. 3. kit (Applied Biosystems, США) и анализировали на автоматическом секвенаторе ABI PRISM 3730 (Applied Biosystems, США) на базе ООО «Синтол» (Москва, Россия). Все секвенированные последовательности были опубликованы в базе данных GenBank (Nucleotide. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>), номера последовательностей MT279140–MT279146, MT279151–MT279152, MT279154–MT279155, MT279157–MT279160, MT279162–MT279169, MT279172–MT279174, MT279177, MT279183–MT279185, MT279190–MT279191.

Последовательности *ndhC-trnV* были выравнены в программе MAFFT v. 7.147b (Katoh et al., 2002; Katoh, Standley, 2013) с использованием алгоритма L-INS-i с последующим ручным редактированием в программе BioEdit v. 7.0.8.0 (Hall, 1999). Так как выравнивание участка *ndhC-trnV* содержало многочисленные индели, мы оценили его на содержание неинформативных и сомнительно выравненных участков и провели их удаление в программе BMGE v. 1.12 (Criscuolo, Gribaldo, 2010). Оставшиеся индели были кодированы как единичные мутационные события (Simmons, Ochoterena, 2000) в программе FastGap v. 1.2 (Borchsenius, 2009) и добавлены в конец выравнивания.

Обработанное таким образом выравнивание анализировали с использованием алгоритма статистической парсимонии, описанного в работе Темплтона с соавт. (Templeton et al., 1992) и реализованного в программе TCS v. 1.21 (Clement et al., 2000). Для установления вероятного корня сети гаплотипов, полученной в программе TCS, в выравнивание включили последовательности внешней группы: *R. persica* (3 образца из Узбекистана MT279153, MT279188–MT279189) и ряд последовательностей видов секций *Pimpinellifoliae* (*R. spinosissima* HQ404992–HQ404994, *R. koreana* MK848166) и *Rosa* (*R. rugosa* MK848167, *R. fedtschenkoana* MT279175, MT279181, *R. davurica* MK848168–MK848171, *R. amblyotis* MK848155, MK848156, MK848157, *R. marettii* MK848159–MK848163, *R. cinnamomea* 3MT302299, MT302323, *R. acicularis* MT302309), полученных аналогичным образом из образцов с Дальнего Востока и Восточной Европы.

Результаты. Определение таксономической принадлежности желтоцветковых роз по ключам во всех трех «Флорах» позволило установить, что все 34 образца с горы Чимган относятся к морфологически весьма изменчивой *R. kokanica*. Два образца из предгорий Зеравшанского хребта однозначно определить не удалось. По «Флоре Узбекистана» они были идентифицированы как *R. marakandica*, по «Флоре Казахстана» – как *R. hissarica* или *R. turkestanica*, а по «Flora of China» – как *R. calyptopoda*. Сравнив их описания, мы предварительно приняли для этих образцов название *R. turkestanica*.

Итоговое выравнивание участка *ndhC-trnV* составило 599 позиций. Анализ выравнивания 36 последовательностей без внешней группы в программе TCS объединил последовательности в 21 гаплотип, связав все гаплотипы в одну сеть (рис. 1). Из них двумя гаплотипами (20 и 21) обладали два образца *R. turkestanica*, а остальные 19 гаплотипов распределились среди 34 образцов *R. kokanica*. Вклю-

чение внешней группы позволило укоренить сеть на гаплотипе 1, которым обладали 14 растений из популяций в долинах р. Чирчик (северный макросклон Большого Чимгана) и Ахангаран (южный макросклон). В первой из них были встречены также два минорных гаплотипа 2 и 3, а во второй – три (4, 5 и 6). В двух локальных популяциях юго-западного макросклона в долине р. Аксагата среди 14 исследованных образцов гаплотип 1 встречен не был, но были встречены 13 гаплотипов, не обнаруженных в двух первых группах локальных популяций. При этом никакой закономерности в их территориальном распределении в самой локальной популяции обнаружить не удалось.

Характер распределения гаплотипов, большинство из которых (за исключением наиболее распространенного гаплотипа 1) уникальны для каждой локальной популяции, указывает на их значительную генетическую дифференциацию. Анализ молекулярной изменчивости AMOVA, проведенный в программе Arlequin v.3.5.2.2, показал, что это действительно так. Рассчитанные попарные значения F_{st} показали отсутствие достоверных отличий между северной и южной субпопуляциями *R. kokanica*, обладающими общим гаплотипом 1 ($F_{st} = 0,14$; $p = 0,08$). Однако отличия юго-западной популяции от северной и южной оказались статистически достоверными и очень высокими – $F_{st} = 0,58$ и $0,67$, соответственно.

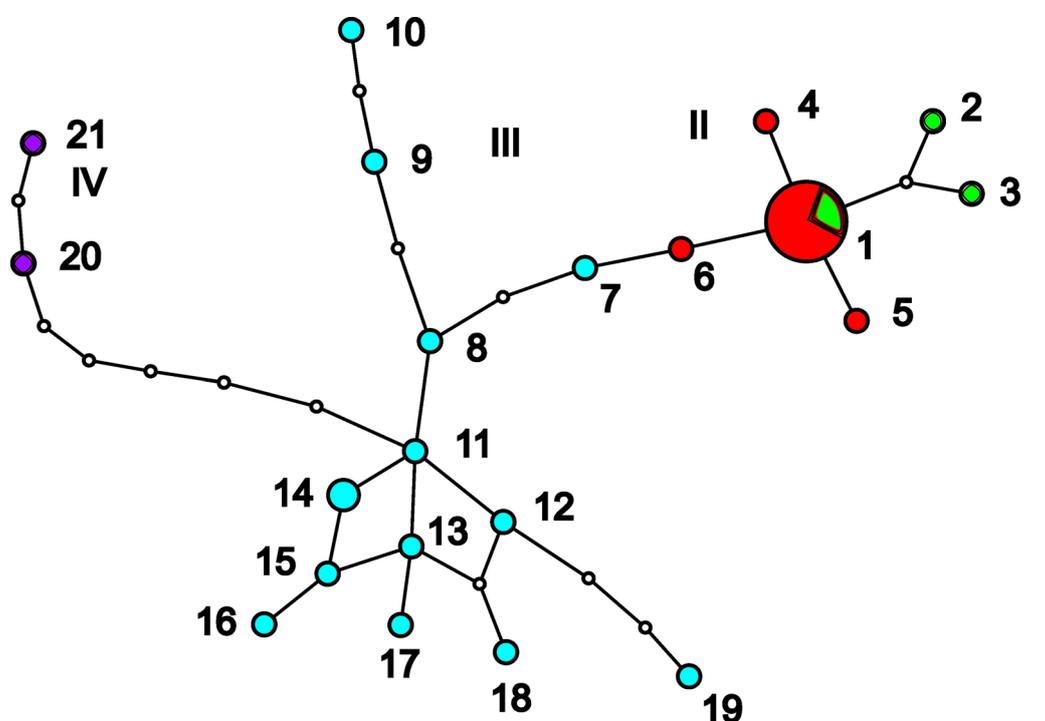


Рис. 1. Сеть гаплотипов *ndhC-trnV* *Rosa kokanica* и *R. turkestanica*. Размер кругов пропорционален числу образцов, обладающих данным гаплотипом. Маленькими кружками обозначены гипотетические гаплотипы, отсутствующие в выборке. Субпопуляции *R. kokanica* и *R. turkestanica* обозначены цветом и римскими цифрами: I – северная субпопуляция; II – южная субпопуляция; III – юго-западная субпопуляция *R. kokanica*; IV – *R. turkestanica*.

Обсуждение. Число хлоропластных гаплотипов, обнаруженных в популяциях *R. kokanica*, удивительно велико. Насколько нам известно, ничего подобного не было обнаружено у других видов *Rosa*, тем более на столь незначительной по площади территории. Сам характер сети гаплотипов не позволяет выделить каких-либо отграниченных друг от друга групп гаплотипов, что косвенно подтверждает правильность рассмотрения *R. kokanica* в качестве одного вида, несмотря на наличие изменчивости ряда морфологических признаков. Следует отметить, что хотя в использованных нами сводках наличие железистого опушения листьев считается диагностическим признаком этого вида, наши наблюдения показывают, что оно может варьировать, вплоть до полного отсутствия. Варьируют также размеры шипов и присутствие железистого опушения на цветоножках и гипантиях. Однозначного соответствия между морфологической и генетической изменчивостью установить не удалось, хотя гаплотипы 9 и 10, образующие отдельную небольшую линию в юго-западной субпопуляции из долины р. Аксагата, коррелируют с присутствием железистого опушения на цветоножках и гипантиях у их носителей.

В детальном исследовании филогеографии комплекса *R. sericea* (секция *Pimpinellifoliae*) в Тибете и юго-восточном Китае, проведенном Y.-D. Gao с соавторами (Gao et al., 2015), было выделено 37 хлоропластных гаплотипов. Однако эти гаплотипы были обнаружены на всей огромной территории распространения этого комплекса горных видов, в локальных же популяциях число гаплотипов не превышало 1–4. Кроме того, сами гаплотипы были выявлены при анализе трех межгенных спейсеров общей длиной более 2000 п. н., а не одного участка длиной 599 п. н., как в нашем случае. Авторы не сделали в своей работе таксономических выводов, так что остается не вполне ясным, сколькими видами представлен этот морфологически изменчивый комплекс, или же его следует рассматривать как один таксономический вид.

Сходная ситуация наблюдается и в секции *Rosa*. В исследовании T. Fér с соавторами (Fér et al., 2007) при изучении филогеографии европейского горного вида *R. pendulina* на всем протяжении ее ареала в Пиренеях, Альпах, Карпатах и Балканах было обнаружено только 5 гаплотипов хлоропластного региона *trnL-trnF*, закономерно распределенных по изучаемой территории в соответствии с существующими ледниковыми рефугиумами. Мы расширили диапазон этого исследования, включив в него горную северокавказскую *R. oxyodon* и равнинную восточноевропейско-сибирскую *R. cinnamomea* (Шанцер и др., неопубл. данные). Число гаплотипов возросло до 11, однако они закономерно распределились в соответствии с видовой принадлежностью образцов, и в локальных популяциях их число не превышало 1–2.

Таким образом, обнаруженный нами необычайный полиморфизм *R. kokanica* по хлоропластным маркерам в популяциях с горы Большой Чимган представляет собой уникальное явление. Причиной такого высокого полиморфизма, равно как и значительной генетической дифференциации популяций из разных долин, вероятно, следует считать их длительную изоляцию в ледниковое время. В то же время полиморфизм по окраске венчика может быть связан с современной гибридизацией с розовоцветковыми шиповниками секции *Caninae*, растущими симпатрично с растениями *R. kokanica* в юго-западной популяции в долине р. Аксагата. Мы не исследовали эту проблему, но даже если такое наше предположение верно, гибридизация происходила только в одном направлении, причем растения *R. kokanica* неизменно выступали в роли материнских.

Благодарности. Авторы благодарны проф. МГУ им. М. В. Ломоносова М. Г. Пименову, пригласившему нас в эту поездку; директору Института ботаники АН Узбекистана акад. К. Тоджибаеву и всем сотрудникам Института ботаники, принимавшим участие в организации и проведении экспедиционных поездок.

Финансирование. Исследование было выполнено в рамках государственного задания Главного ботанического сада им. Н. В. Цицина РАН № 122042700002-6. Авторы также благодарны Министерству науки и высшего образования РФ за финансовую поддержку Центра коллективного пользования «Гербарий ГБС РАН», грант № 075-15-2021-678.

ЛИТЕРАТУРА

- Введенский А. И., Пазуй В. К.** *Rosa* L. – Шиповник // Флора Узбекистана. – Ташкент: Изд-во АН Узб. ССР, 1955. – Т. 3. – С. 343–355.
- Фисюн В. В.** Шиповник, Роза – *Rosa* L. // Флора Казахстана. – Алма-Ата: Изд-во АН Каз. ССР, 1961. – Т. 4. – С. 485–502.
- Borchsenius F.** FastGap 1.2. Department of Biosciences. – Denmark: Aarhus University, 2009. URL: http://www.aubot.dk/FastGap_home.htm
- Clement M., Posada D., Crandall K. A.** TCS: a computer program to estimate gene genealogies // *Molec. Ecol.*, 2000. – Vol. 9. – P. 1657–1659. DOI: 10.1046/j.1365-294x.2000.01020.x
- Criscuolo A., Gribaldo S.** BMGE (block mapping and gathering with entropy): a new software for selection of phylogenetic informative regions from multiple sequence alignments // *B.M.C. Evol. Biol.*, 2010. – Vol. 10. – P. 210. DOI: 10.1186/1471-2148-10-210
- Cui G., Robertson K. R.** *Rosa* L. // *Flora of China*. – Beijing: Science Press, St. Louis: Missouri Botanical Garden Press, 2003. – Vol. 9. – P. 339–381.
- Fér T., Vašák P., Vojta J., Marhold K.** Out of the Alps or Carpathians? Origin of Central European populations of *Rosa pendulina* // *Preslia*, 2007. – Vol. 79. – P. 367–376.
- Fougère-Danezan M., Joly S., Bruneau A., Gao X. F., Zhang L. B.** Phylogeny and biogeography of wild roses with specific attention to polyploids // *Ann. Bot. (Oxford)*, 2015. – Vol. 115. – P. 275–291. DOI: 10.1093/aob/mcu245
- Gao Y.-D., Zhang Y., Gao X.-F., Zhu Z.-M.** Pleistocene glaciations, demographic expansion and subsequent isolation promoted morphological heterogeneity: A phylogeographic study of the alpine *Rosa sericea* complex (Rosaceae) // *Sci. Rep.*, 2015. – Vol. 5. – 11698. DOI: 10.1038/srep11698

Hall T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT // Nucleic Acids Symposium Series, 1999. – Vol. 41. – P. 95–98.

Katoh K., Misawa K., Kuma K., Miyata T. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform // Nucl. Acids Res., 2002. – Vol. 30. – P. 3059–3066. DOI: 10.1093/nar/gkf436

Katoh K., Standley D. M. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability // Molec. Biol. Evol., 2013. – Vol. 30. – P. 772–780. DOI: 10.1093/molbev/mst010

Nucleotide. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/> (Accessed 15.05.2023).

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. – Vol. 94(3). – P. 275–288. DOI:10.3732/ajb.94.3.275

Simmons M. P., Ochoterena H. Gaps as characters in sequence-based phylogenetic analyses // Syst. Biol., 2000. – Vol. 49(2). – P. 369–381. DOI: 10.1093/sysbio/49.2.369

Templeton A. R., Crandall K. A., Sing C. F. A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence data. III. Cladogram estimation // Genetics, 1992. – Vol. 132. – P. 619–633.

Zhang C., Li S.-Q., Xie H.-H., Liu J.-Q., Gao X.-F. Comparative plastid genome analyses of *Rosa*: Insights into the phylogeny and gene divergence // Tree Genet. Genomes, 2022. – Vol. 18. – P. 20. DOI: 10.1007/s11295-022-01549-8