

УДК: 582.912.4:575.17(571.6+798)

## **ИЗМЕНЧИВОСТЬ ЯДЕРНОГО МАРКЕРА *RPB2* У ВИДОВ БАГУЛЬНИКОВ ЕВРАЗИИ И СЕВЕРНОЙ АМЕРИКИ**

**Юнусова Д. Р.** , **Полежаева М. А.** 

<sup>1</sup> *Институт экологии растений и животных Уральского отделения РАН, г. Екатеринбург*  
E-mail: polezhaevam@mail.ru

Проблема разграничения видов багульников (род *Rhododendron*, подрод *Rhododendron*, подсекция *Ledum*) на данный момент не разрешена. В настоящей работе проведен генетический анализ 89 образцов пяти видов багульников с территории Евразии и Северной Америки на основе изменчивости маркера ядерной ДНК – фрагмента интрона между вторым и третьим экзонами гена *RPB2*. Выявлен высокий межпопуляционный полиморфизм по исследуемому маркеру ( $F_{ST} = 0.852$ ,  $p < 0.001$ ), степень дифференциации между видами была ниже ( $F_{ST} = 0.42$ ,  $p < 0.001$ ). Филогенетический анализ показал, что все исследованные образцы багульников образуют монофилетичную кладу, обособившуюся от остальных рододендронов примерно 34 млн л. н., что соответствует началу похолодания в олигоцене. Внутри клады багульников нет четкого разделения на виды. Высокие поддержки имеют клады с образцами *R. groenlandicum* из Северной Америки и *R. subarcticum* (Чукотка, Камчатка, средний Сахалин). Остальные виды на территории Евразии (*R. tomentosum*, *R. hypoleucum*, *R. diversipilosum*) генетически слабо дифференцированы.

**Ключевые слова:** *Ledum*, Дальний Восток России, генетический полиморфизм, филогенетический анализ.

DOI: 10.34078/1814-0998-2024-4-40-50

### **ВВЕДЕНИЕ**

Род рододендрон – один из самых многочисленных родов цветковых растений, включающий около 1000 видов (Chamberlain et al., 1996). Филогении этого рода посвящено множество работ, и она продолжает уточняться в последние годы. Багульники, некогда самостоятельный род *Ledum* L., при очередной таксономической ревизии на основе морфологических (Kron and Judd, 1990) и молекулярно-генетических (Goetsch et al., 2005; Khan et al., 2021) данных вошли в род *Rhododendron* L., подрод *Rhododendron* в качестве подсекции *Ledum* (Chamberlain et al., 1996). Эта таксономическая группа объединяет виды, представляющие собой кустарнички и кустарники, распространенные в умеренном климате северного полушария на территории Евразии и Северной Америки, которые часто выступают эдификаторами субарктических, бореальных и болотных

растительных сообществ; служат закрепителями почвы в условиях вечной мерзлоты (Amada et al., 2023).

Систематика внутри подсекции *Ledum* спорная. Исторические трактовки разнятся от признающих один широко распространённый полиморфный вид – багульник болотный, *R. tomentosum* (syn. *Ledum palustre* L.) (Буш, 1915), до выделения четырёх видов только на территории Азии (Толмачев, 1953; Усенко, 2010), а также нескольких видов в Северной Америке (Savile, 1969; Hébert, Thiffault, 2011). Последние номенклатурные уточнения при переносе багульников в род рододендрон также не внесли ясности (Harmaja, 1991). Проблема видовой идентификации багульников обусловлена широкой вариабельностью морфологических признаков, диапазон изменчивости которых перекрывается для разных видов (Толмачев, 1953; Мазуренко, Хохряков 1987; Clausen, 2022) и в некоторой степени ставит под сомнение правомерность их выделения. В последние десятилетия для уточнения видовых границ и биогеографии рододендронов активно используются молекулярно-генетические

методы. Однако до недавнего времени была произведена лишь одна попытка прояснения филогенетических отношений внутри подсекции *Ledum* (Hart et al., 2017). На небольшой выборке гербарных образцов было выявлено, что по ядерным маркерам все виды багульников входят в единую монофилетическую кладу, в то время как по маркерам хлоропластной ДНК (хпДНК) распадаются на две клады, азиатскую и североамериканскую. Авторы делают заключение о необходимости изучения расширенной выборки различных видов багульников, чтобы охватить сложную генетическую и биогеографическую историю подсекции *Ledum*. Позже была проведена работа по анализу изменчивости маркеров хлоропластного генома у видов багульников на Сахалине (Iunusova et al., 2023). В ней были показаны высокая изменчивость и отсутствие видоспецифичных маркеров, что может свидетельствовать о генетическом обмене между популяциями разных видов. Таким образом, существует необходимость дальнейшего исследования филогенетических отношений в подсекции *Ledum*.

В настоящей работе проведен анализ изменчивости ядерного маркера – интрона между вторым и третьим экзонами гена *RPB2* у представителей багульников из Евразии и Северной Америки с целью выявления видовых границ и филогенетических отношений видов багульников. На основе этого маркера построена одна из ранних молекулярных филогений рода рододендрон (Goetsch et al., 2005).

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследовано 35 естественных популяций пяти видов багульников. Для каждого вида отобраны образцы из нескольких популяций. Всего 89 особей, из них 18 – *R. tomentosum* Harmaja, 10 – *R. diversipilosum* (Nakai) Harmaja, 23 – *R. subarcticum* Harmaja, 19 – *R. hypoleucum* (Kom.) Harmaja и 19 – *R. groenlandicum* (Oeder) Kron & Judd. Координаты сбора исследованных в нашей работе образцов указаны в таблице 1. Выборки в таблице перечислены по географическому принципу с востока на запад.

ДНК выделяли из высушенных в силикагеле листьев СТАВ-методом (Devey et al., 1996) с модификациями, которые заключались в двойной изоамил-хлороформной очистке и последующей очистке ацетатом аммония и поливинилпирролидоном. Амплификацию участка интрона между вторым и третьим экзонами *RPB2* проводили с использованием праймеров 2F GAA CCT GAC STA CTC ATC TCC ATT и 3R TCG GAT ACA TAA GCA TAG TTG TTG G при условиях,

рекомендованных авторами (Goetsch et al., 2005). Секвенирование методом Сэнгера проводили на приборе НАНОФОР 05 (Институт аналитического приборостроения РАН, Россия) в двух направлениях. Последовательности с плохим качеством прочтения и неоднозначным чтением пиков были исключены из анализа. Визуальную проверку секвенированных последовательностей и их выравнивание проводили в программе BioEdit v.7.0.9 (Hall, 1999). Конечная матрица для анализа включала 89 оригинальных последовательностей пяти видов багульников, а также одну последовательность *Rhododendron menziesii* Craven. Последовательности каждого гаплотипа, полученного в настоящей работе, помещены в базу данных GenBank под номерами (PQ421087–PQ421110).

Параметры генетического разнообразия, иерархическое распределение разнообразия между популяциями и видами оценивались с помощью анализа молекулярной дисперсии (AMOVA) и рассчитывались с использованием Arlequin version 3.5.1.2 (Excoffier, Lischer, 2010). Для каждого вида были оценены Theta(S) – показатель генетического разнообразия на основании числа сегрегирующих сайтов и Theta( $\pi$ ) – показатель генетического разнообразия на основании среднего числа попарных нуклеотидных различий. Для выявления географически близких групп с максимальной генетической дифференциацией использовали пространственный анализ молекулярной дисперсии (SAMOVA; Dupanloup et al., 2002).

Родственные отношения образцов выявляли байесовским методом с помощью программы MrBayes v. 3.2.3 (Ronquist, Huelsenbeck, 2003). Был также проведен дополнительный анализ филогенетических отношений и времени расхождения родственных групп образцов в программе BEAST v. 1.7.5 (Drummond, Rambaut, 2007). На основе предварительного анализа в модуле ModelTest наиболее вероятной мутационной моделью определена модель НКУ. Для оценки возрастной дивергенции в таксонах подсекции *Ledum* использовались ослабленные молекулярные часы с некоррелированными логнормально распределенными скоростями замен для каждой ветви филогенетического дерева. Приорам для самого последнего общего предка (MRCA) были установлены логнормальные распределения с  $\log\text{mean} = 1$ ,  $\log\text{normal s.d.} = 0.5$  и  $\text{offset} = 56$  млн л. для *Therorhodon camtschaticum* (Pall.) Small (syn. *Rhododendron camtschaticum* Pall.) (Xia et al., 2022). Для построения филогенетических деревьев дополнительно к *Rhododendron*

Рисунок. Филогенетическое древо на основе изменчивости ядерного маркера *RPB2* представителей подсекции *Ledum*, построенное байесовским методом, и шкала времени расхождения в группе, полученная в BEAST. В качестве аутгрупп использован образец *R. menziesii*, а также 17 видов рода *Rhododendron* и *T. camtschaticum* из работы (Goestch et al., 2005). Датировки клад указаны над ветвями. Апостериорные вероятности из байесовского анализа показаны ниже ветвей.

Figure. Phylogenetic tree based on the *RPB2* nuclear marker variability in the representatives of the subsection *Ledum*, constructed using the Bayesian method, and the divergence time scale in the group obtained in BEAST. The sample of *R. menziesii*, as well as 17 species of the genus *Rhododendron* and *T. camtschaticum* from the work (Goestch et al., 2005), were used as outgroups. The clade dates are indicated above the branches. The aposterior probabilities from the Bayesian analysis are shown below the branches.

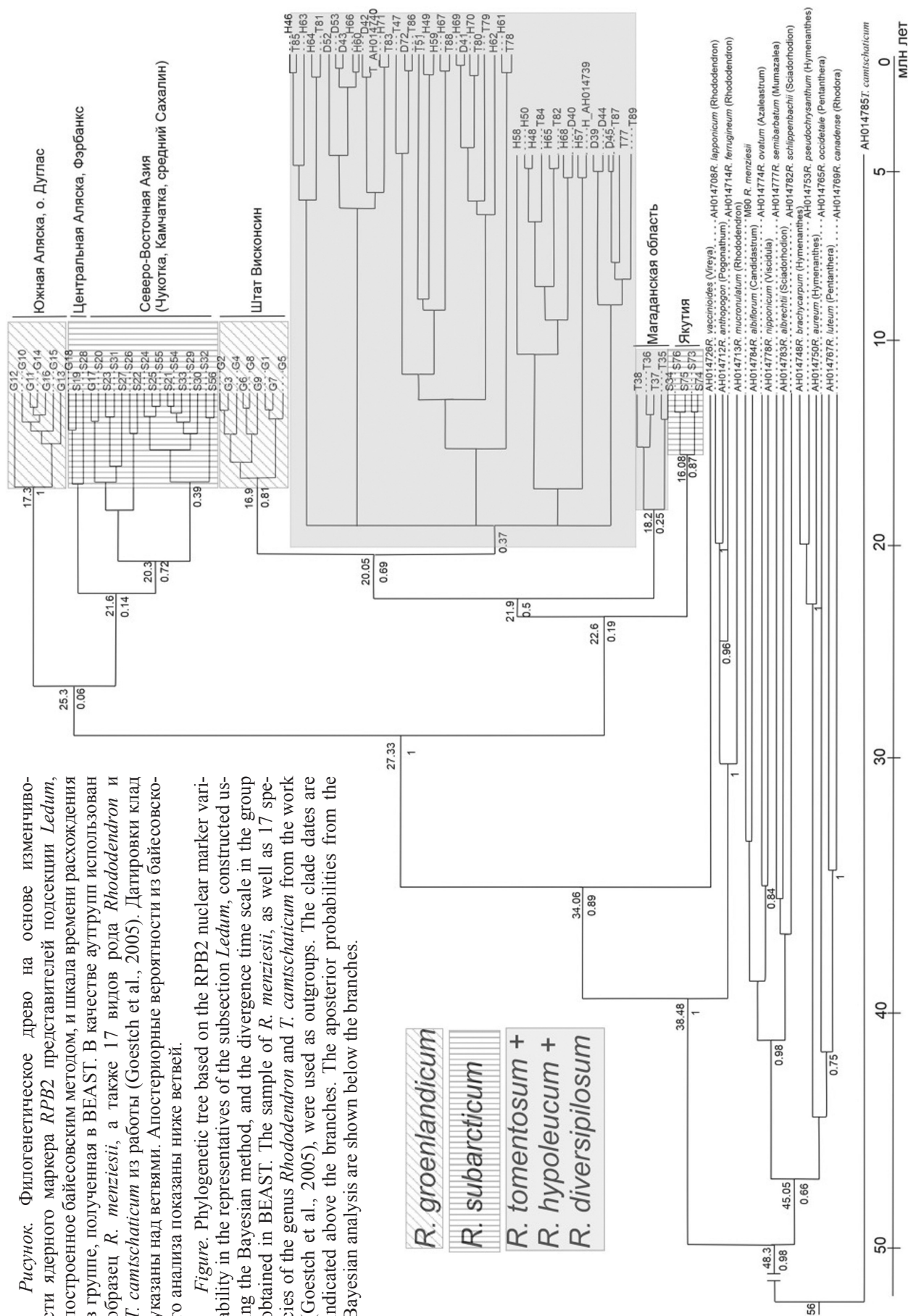


Таблица 1. Образцы пяти видов багульников, использованные в данной работе, с указанием мест сбора и распределением выявленных гаплотипов. Коды видов: *groen* – *R. groenlandicum*, *sub* – *R. subarcticum*, *tom* – *R. tomentosum*, *div* – *R. diversipilosum*, *hyp* – *R. hypoleucum*, *menz* – *R. menziesii*

Table 1. Samples of five species of subsection *Ledum* used in this work, with collection locations and distribution of the identified haplotypes. Species codes: *groen* – *R. groenlandicum*, *sub* – *R. subarcticum*, *tom* – *R. tomentosum*, *div* – *R. diversipilosum*, *hyp* – *R. hypoleucum*, *menz* – *R. menziesii*

| Номер образца | Код вида     | Место сбора                                                                    | Шир.   | Долг.    | Кол-во особей | Гапл.: число особей              |
|---------------|--------------|--------------------------------------------------------------------------------|--------|----------|---------------|----------------------------------|
| 1G–5G         | <i>groen</i> | округ Тейлор, Висконсин, США                                                   | 45.278 | –90.441  | 6             | h1:2<br>h2:4                     |
| 6G–9G         | <i>groen</i> | округ Чиппева, Висконсин, США                                                  | 45.189 | –91.32   | 4             | h3:1<br>h4:3                     |
| 10G–16G       | <i>groen</i> | Джуно, Аляска, о-в Дуглас, США                                                 | 58.299 | –134.674 | 7             | h12:7                            |
| 17G–18G       | <i>groen</i> | Фэрбанкс, Аляска, США                                                          | 65.05  | –146.05  | 2             | h13:1<br>h15:1                   |
| 19S           | <i>sub</i>   | Фэрбанкс, Аляска, США                                                          | 65.05  | –146.05  | 1             | h14:1                            |
| 20S–26S       | <i>sub</i>   | Ново-Чаплино, Провиденский район, Чукотка                                      | 64.497 | –172.894 | 7             | h16:1<br>h17:1<br>h18:3<br>h19:2 |
| 27S           | <i>sub</i>   | Пинакуль, Чукотский район, Чукотка                                             | 65.718 | –171.144 | 1             | h20:1                            |
| 28S           | <i>sub</i>   | Авача, Налычевский парк, Камчатка                                              | 53.272 | 158.839  | 1             | h22:1                            |
| 29S–33S       | <i>sub</i>   | Эссо, Камчатка                                                                 | 55.769 | 158.713  | 5             | h18:3<br>h20:1<br>h21:1          |
| 34S           | <i>sub</i>   | Талая, Хасанский район, Магаданская область                                    | 61.112 | 152.265  | 1             | h11:1                            |
| 35T–38T       | <i>tom</i>   | Магадан, Магаданская область                                                   | 59.556 | 150.808  | 4             | h9:2<br>h10:2                    |
| 39D–42D       | <i>div</i>   | Залив Дельфин, Шикотан, Курильские острова                                     | 43.845 | 146.694  | 4             | h6:3<br>h9:1                     |
| 43D–44D       | <i>div</i>   | Вулкан Менделеева, Кунашир, Курильские острова                                 | 43.979 | 145.732  | 2             | h5:2                             |
| 45D           | <i>div</i>   | Вулкан Головина, Кунашир, Курильские острова                                   | 43.843 | 145.504  | 1             | h6:1                             |
| 46H           | <i>hyp</i>   | Ноглики, Сахалин                                                               | 51.796 | 143.120  | 1             | h5:1                             |
| 47T           | <i>tom</i>   | Сабо, Охинский район, Сахалин                                                  | 53.133 | 142.933  | 1             | h5:1                             |
| 48H–50H       | <i>hyp</i>   | Майское (Леонидово), Поронайский район, Сахалин                                | 49.291 | 142.877  | 3             | h5:3                             |
| 51T           | <i>tom</i>   | Пик Чехова, Южно-Сахалинск, Сахалин                                            | 47.005 | 142.840  | 1             | h7:1                             |
| 52D           | <i>div</i>   | Жданко, Макаровский район, Сахалин                                             | 48.240 | 142.573  | 1             | h5:1                             |
| 53D           | <i>div</i>   | Цапко, Макровский район, Сахалин                                               | 48.099 | 142.510  | 1             | h5:1                             |
| 54S–56S       | <i>sub</i>   | Гора Краснова, Углегорский район, Сахалин                                      | 48.735 | 142.113  | 3             | h19:2<br>h20:1                   |
| 57H–58H       | <i>hyp</i>   | Мыс Орлова, Де-Кастри, Хабаровский край                                        | 51.425 | 140.885  | 2             | h5:2                             |
| 59H–63H       | <i>hyp</i>   | Николаевск-на-Амуре, Хабаровский край                                          | 53.148 | 140.741  | 5             | h5:1<br>h6:1<br>h8:2<br>h9:1     |
| 64H–69H       | <i>hyp</i>   | Гора Кекурная, Советская Гавань, Хабаровский край                              | 49.01  | 140.15   | 6             | h6:2<br>h8:2<br>h9:2             |
| 70H           | <i>hyp</i>   | Бикин Бикинского района Хабаровского края                                      | 47.066 | 137.133  | 1             | h5:1                             |
| 71H           | <i>hyp</i>   | Гора Брусничная, Сихотэ-Алинский заповедник, Тернейский район, Приморский край | 45.809 | 136.604  | 1             | h5:1                             |
| 72D           | <i>div</i>   | Анисимовка, Ливадийский хребет, Приморский край                                | 43.098 | 132.765  | 1             | h5:1                             |



Окончание таблицы 1

| Номер образца | Код вида    | Место сбора                                                 | Шир.   | Долг.    | Кол-во особей | Гапл.: число особей          |
|---------------|-------------|-------------------------------------------------------------|--------|----------|---------------|------------------------------|
| 73S-76S       | <i>sub</i>  | Река Лена, Якутия                                           | 72.365 | 126.456  | 4             | h23:2<br>h24:2               |
| 77T           | <i>tom</i>  | Новая Чара, Забайкальский край                              | 56.783 | 118.266  | 1             | h5:1                         |
| 78T           | <i>tom</i>  | Путорана, озеро Лама, Красноярский край                     | 69.550 | 89.859   | 1             | h6:1                         |
| 79T           | <i>tom</i>  | Сургут, Ханты-Мансийский автономный округ                   | 61.777 | 72.386   | 1             | h6:1                         |
| 80T-82T       | <i>tom</i>  | Космаково, Свердловская область                             | 56.333 | 60.85    | 2             | h5:1<br>h6:1                 |
| 83T-86T       | <i>tom</i>  | Сандармох, Медвежьегорск, Карелия                           | 62.886 | 34.633   | 4             | h5:1<br>h6:1<br>h8:1<br>h9:1 |
| 87T           | <i>tom</i>  | Апатиты, Мурманская область, Кольский полуостров            | 67.563 | 33.450   | 1             | h6:1                         |
| 88T-89T       | <i>tom</i>  | Болото Швендлундское, Зеленоградск, Калининградская область | 54.966 | 20.5     | 2             | h6:1<br>h9:1                 |
| 90M           | <i>menz</i> | Джуно, Аляска, о-в Дуглас, США                              | 58.299 | -134.674 | 1             |                              |

*menziesii* Craven (syn. *Menziesia ferruginea* Sm.) в качестве внешних групп были привлечены последовательности 17 видов рододендронов из базы данных GenBank. Были выбраны виды, представляющие основные подроды и секции, последовательности которых были получены ранее для филогении всего рода с использованием маркера *RBP2* (Goetsch et al., 2005). Номера привлеченных из GenBank последовательностей и принадлежность к секциям указаны на рисунке.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

После удаления начальных и конечных участков секвенированных последовательностей с плохим качеством прочтения длина фрагмента для дальнейшего анализа составила 687 нуклеотидов. Полиморфизм между образцами заключался в наличии однонуклеотидных замен, инсерции и делеции отсутствовали. В ряде случаев обнаружены гетерозиготы с равновысокими пиками в полиморфных сайтах. Такие сайты кодировались как R = A или G; K = G или T; W = A или T; M = A или C. В программах обработки данных соответственно устанавливали равновероятностный «вес» каждого нуклеотида. Все изученные образцы отличались по 20 полиморфным сайтам; выявленная изменчивость сгруппировалась в 24 гаплотипа.

Количество выявленных гаплотипов варьировало между видами. Так, у *R. groenlandicum* было обнаружено семь гаплотипов, все они видоспецифичны и уникальны для каждого из четырех

локалитетов. Гаплотип **h12**, характерный для образцов из южной Аляски (о-в Дуглас), отличается от других на девять замен. Гаплотипы h1–h4, встретившиеся у образцов из центральной части Северной Америки (выборки Тейлор и Чиппева), отличались между собой на одну-две замены. В центральной Аляске образцы *R. groenlandicum* имели гаплотипы h13 и h15, а у *R. subarcticum* – h14. Число гаплотипов у *R. subarcticum* составило одиннадцать, все также оказались уникальными для вида. Показатели Theta(S) и Theta(π) составили 2.861 и 4.982 для *R. groenlandicum*, 2.438 и 2.289 для *R. subarcticum*. Гаплотипы h5–h10 были общими для трех видов – *R. diversipilosum*, *R. hypoleucum*, *R. tomentosum*. Только для *R. tomentosum* выявлен один уникальный гаплотип h7. Для этих трех видов показатели Theta(S) и Theta(π), а также число гаплотипов составили соответственно: 0.353/0.756/3 для *R. diversipilosum*, 0.286/0.737/4 для *R. hypoleucum* и 0.581/1.046/6 для *R. tomentosum* (табл. 2).

Анализ молекулярной вариации (AMOVA) выявил высокую степень дифференциации между всеми выборками  $F_{ST} = 0.852$ ,  $p < 0.001$ , в то время как между пятью видами дифференциация была значительно ниже  $F_{CT} = 0.415$ ,  $p < 0.001$ . Анализ пространственного распределения молекулярной изменчивости (SAMOVA) показал значительную дифференциацию между шестью выделенными субрегионами: южная Аляска (Дуглас), центральная Аляска (Фэрбанкс), центральная Америка (Чиппева), крайний северо-восток Азии (Чукотка, Камчатка, средний Саха-

Таблица 2. Межвидовые расстояния  $F_{ST}$  на основании метода попарных различий и показатели генетического разнообразия для каждого вида

Table 2. Interspecies  $F_{ST}$  distances based on the pairwise difference method and the genetic diversity indices for each species

| Вид            | <i>groen</i> | <i>sub</i> | <i>div</i> | <i>hyp</i> | <i>tom</i> |
|----------------|--------------|------------|------------|------------|------------|
| <i>groen</i>   | 0.000        |            |            |            |            |
| <i>sub</i>     | 0.436        | 0.000      |            |            |            |
| <i>div</i>     | 0.288        | 0.680      | 0.000      |            |            |
| <i>hyp</i>     | 0.344        | 0.699      | -0.058     | 0.000      |            |
| <i>tom</i>     | 0.318        | 0.659      | 0.009      | -0.040     | 0.000      |
| Theta(S)       | 2.861        | 2.438      | 0.353      | 0.286      | 0.581      |
| Theta( $\pi$ ) | 4.982        | 2.289      | 0.756      | 0.737      | 1.046      |

Theta(S) – показатель разнообразия сегрегирующих сайтов, Theta( $\pi$ ) – показатель нуклеотидного разнообразия. Коды видов: *groen* – *R. groenlandicum*, *sub* – *R. subarcticum*, *tom* – *R. tomentosum*, *div* – *R. diversipilosum*, *hyp* – *R. hypoleucum*.

лин), Якутия и остальные евроазиатские выборки. Доля изменчивости между ними составила  $F_{ST} = 0.889$ ,  $p < 0.001$ .

Филогенетический анализ полученных нуклеотидных последовательностей, а также привлечённых из базы данных GenBank представлен на рисунке. При использовании байесовского подхода моделируется вероятность того или иного нуклеотида в гетерозиготных сайтах и на основе многочисленных реплик с разными вариантами выбирается некое средневзвешенное консенсусное древо. Все исследованные образцы пяти видов багульников образуют обособленную от остальных рододендронов, представляющих основные подрода и секции, кладу, т. е. монофилетичны (0.89). Однако в пределах подсекции *Ledum* с апостериорной вероятностью (1) формируются две группы гаплотипов, каждая из которых слабо дифференцирована на подгруппы. Первая группа, сформирована образцами *R. groenlandicum* из южной Аляски и центральной Аляски, а также *R. subarcticum* из северо-восточной Азии (Чукотка, Камчатка и средний Сахалин, гора Краснова). Во второй группе гаплотипов образцы *R. groenlandicum* из центральной части Северной Америки (штат Висконсин) обособились с умеренной поддержкой (0.69), со слабой поддержкой выделились образцы *R. tomentosum* из Магаданской области (0.5) и *R. subarcticum* из Якутии (0.19). Образцы *R. diversipilosum*, *R. hypoleucum*, *R. tomentosum* были практически не дифференцированы. Датировки в программе BEAST указывают на время отхождения ветви багульников от остальных рододендронов около 34 млн л. н., диверсификация внутри кладу начинается после 27 млн л. н. Однако следует отметить, что интервал ошибки оценки возраста дивергенции довольно большой. Так, оценка

узла отделения подсекции *Ledum* от рододендронов 34 млн, указывается с 95 % HPD (highest posterior density) от 39 млн до 5 млн. Такой интервал ошибки может быть связан с небольшим размером последовательности анализируемого маркера (всего 687 п. н.). Таким образом, оценка дивергенции в нашем случае весьма условная и может обсуждаться только с привлечением литературных данных.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Спорная таксономия багульников, в частности на территории Дальнего Востока России – центра их видового разнообразия, обусловлена значительной вариабельностью морфологических признаков. Традиционно для видовой идентификации используют такие характеристики, как размер и форма листа, степень закрученности края листовой пластинки; степень выраженности рыжего, белёсого или железистого опушения на обратной стороне листа и на побегах; в меньшей степени используют характеристики генеративных органов. Однако диапазон изменчивости данных признаков у одного вида сильно варьирует и перекрывается для разных видов. Так, для *R. tomentosum* (syn. *L. palustre*) показана зависимость размера вегетативных частей от экологической приуроченности (Крылова, Прокошева, 1980), таким образом, он может внешним видом напоминать *R. subarcticum* (Amada et al., 2024), а может приближаться к группе дальневосточных видов *R. diversipilosum* или *R. hypoleucum* (Мазуренко, Хохряков, 1987). Поэтому для разграничения видов используют также географическую локализацию. Во флоре СССР (Буш, 1952) и арктической флоре СССР (Толмачев, 1980) для основной части Евразии (Сибирь и европейская часть) указывается *L. palustre* (syn. *R. tomentosum*). Для северных территорий Сибири и евро-

пейской России указывается *L. palustre* subsp. *decumbens* (syn. *R. subarcticum*). На Дальнем Востоке начиная с Хабаровского края и южнее (включая о-в Сахалин и Курильские острова) кроме этих двух видов указывается наличие *L. hypoleucum* (syn. *R. hypoleucum*) и *L. macrophyllum* (syn. *R. diversipilosum*); за Верхоянским хребтом *L. palustre* (syn. *R. tomentosum*) и *L. palustre* subsp. *decumbens* (syn. *R. subarcticum*). В настоящее время согласно электронной базе гербария МГУ (<https://plant.depo.msu.ru/>), всё видовое многообразие багульников на территории России сведено к двум видам – *R. tomentosum* и *R. diversipilosum*. Многие авторы считают причиной высокого видового разнообразия и морфологического полиморфизма межвидовую гибридизацию в данной группе (Толмачев, 1953; Мазуренко, Хохряков, 1987; Kihlman, 2004; Hart et al., 2017; Shiotani, Kudo, 2023), а также полиплоидию (Wakui, 2021).

В пионерном исследовании, посвященном вопросам таксономии внутри подсекции *Ledum* (Hart et al., 2017), по двум ядерным маркерам (ITS и *Waxy*) образцы всех видов (всего 8 образцов, по одному на каждый вид) объединились в единую монофилетическую кладу. В нашем исследовании на расширенных выборках пяти видов (кроме багульника колумбийского, *R. columbianum* (Piper) Норманна), все представители *Ledum* также образовали монофилетическую кладу. Оценка возраста отделения ветви багульников от других рододендронов по маркеру *RPB2* составила около 34 млн л. н., что, несмотря на широкий диапазон ошибки, согласуется с датировкой 27.8 (95 % НРД: 33–24) млн л. н., полученной в одном из последних крупных исследований по филогении всего рода *Rhododendron* на основе 3437 ортологических ядерных генов (Xia et al., 2022). Данная оценка совпадает с общепринятым мнением о начале похолодания в олигоцене и миграцией элементов бореальной флоры между восточной Азией и Северной Америкой (Wen et al., 2016) и, в частности, представителей рода *Rhododendron* из умеренных широт в более южные области (Shrestha et al., 2018). Однако диапазон ошибки оценки времени дивергенции не позволяет определить очередность отделения даже хорошо поддерживаемых клад с образцами *R. groenlandicum* и *R. subarcticum*, и можно лишь сделать заключение о вероятно их более раннем обособлении по сравнению с комплексом евроазиатских видов *R. tomentosum*, *R. diversipilosum*, *R. hypoleucum*.

Формирование гаплотипами *R. subarcticum* и *R. groenlandicum* отдельных клад на древе (рис.) и высокие значения генетических дистанций этих видов друг от друга и от других видов (табл. 2)

свидетельствуют в пользу их видовой самостоятельности. Отсутствие поддерживаемых филогенетических групп на древе и низкие генетические дистанции между видами *R. tomentosum*, *R. diversipilosum* и *R. hypoleucum* (табл. 2) указывают на общность их происхождения и относительно недавнюю дивергенцию. Результаты о наличии общего генетического пула ранее нами были получены и на основании анализа изменчивости маркеров хпДНК у этих видов (за исключением *R. groenlandicum*) с территории о. Сахалин (Iunusova et al., 2023). По маркерам хпДНК также была выявлена высокая межпопуляционная изменчивость при низкой дифференциации видов. Межпопуляционная дифференциация всех изученных выборок составила 37 %, при этом на дифференциацию между четырьмя исследованными видами пришлось менее 1 %, а на дифференциацию между двумя географическими регионами – южным и северным Сахалином – 42 % (Iunusova et al., 2023). В настоящей работе анализ пространственной вариации SAMOVA выделил шесть географических групп, дифференциация между которыми составила 89 %. Три группы составили выборки из Северной Америки: первая группа – образцы из центральной Аляски (оба вида *R. groenlandicum* и *R. subarcticum*), вторая – образцы с о-ва Дуглас, третья – выборка Чиппева (центральная часть Северной Америки). Три евроазиатские группы включали обособленную группу с образцами из дельты р. Лена; группу, включающую большинство образцов *R. subarcticum* с территории Чукотки и Камчатки, и обширную группу со всеми оставшимися выборками Дальнего Востока, Сибири и европейской части России и выборкой Тейлор из Северной Америки. Таким образом, несмотря на разницу объема совокупной выборки образцов и число описываемых видов для Северной Америки (20 образцов, два вида) и Евразии (69 образцов, четыре вида), можно сделать заключение о сопоставимом генетическом разнообразии на обеих территориях. Интересно, что отдельные клад с высокой поддержкой образовали диплоидный вид *R. groenlandicum* ( $2n = 26$ ) и *R. subarcticum*, для которого указывают наличие как ди-, так и тетраплоидных рас ( $2n = 26, 52$ ) (Hart et al., 2017; Shiotani, Kudo, 2023; Amada et al., 2024). Остальные виды характеризуются как тетраплоиды ( $2n = 52$ ) и образуют слабо дифференцированную группу, что может быть обусловлено сниженными репродуктивными барьерами у полиплоидов и свидетельствовать в пользу мнения о распространении межвидовой гибридизации у представителей *Ledum*. По данным изменчивости ядерного маркера *RPB2*



можно сделать вывод о локализации гаплотипов, характерных для *R. subarcticum* только на северо-востоке России (в нашем исследовании это образцы с Чукотки, Камчатки и среднего Сахалина), гаплотипы, распространенные в образцах из дельты р. Лена и из Магаданской области (Магадан, Талая), очень близки и отличаются на 1–2 мутации. Генетическая обособленность популяций, распространенных к востоку от Верхоянского хребта, ставит под вопрос правомерность объединения *R. subarcticum* и *R. tomentosum*.

Таким образом, анализ ядерного маркера *RPB2* показал, что виды *R. tomentosum*, *R. diversipilosum* и *R. hypoleucum* на территории Евразии слабо дифференцированы и образуют единый генетический кластер. Виды *R. subarcticum* и *R. groenlandicum* обособлены генетически и географически. Для дальнейшего уточнения взаимоотношений видов подсекции *Ledum* требуется изучение дополнительного материала всех исследуемых в данной работе таксонов и увеличение числа молекулярных маркеров.

#### БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность за помощь в сборе образцов А. Н. Полежаеву, О.А. Мочаловой, Е. А. Марчук, Е. А. Петруненко, Е. Г. Сомовой, М. Н. Колдаевой, В. В. Кукарских, Е. В. Андышевой, С. А. Шенгальсу, О. С. Корчагиной, И. В. Фролову, В. В. Коцерубе, В. Л. Семерикову, Л. И. Агафонову, Д. Н. Шуваеву, Н. Н. Лашинскому, Е. В. Зиновьеву, Л. Э. Ялковской.

Работа по сбору образцов из европейской, уральской и сибирской частей России выполнена в рамках государственного задания Института экологии растений и животных УрО РАН, тема № 122021000090-5 «Анализ генетического разнообразия для исследования микроэволюционных процессов у представителей типичных растительных сообществ Северной Азии». Работа по сбору образцов на Дальнем Востоке России и молекулярно-генетический анализ выполнен в рамках проекта РНФ номер 23-24-00173, <https://rscf.ru/project/23-24-00173/>.

#### ЛИТЕРАТУРА

Буш Е. А. Вересковые // Флора Сибири и Дальнего Востока. Петроград: Ботанический музей Императорской Академии Наук, 1915. Вып. 2. С. 10–41.

Буш Е. А. Род *Ledum* L. // Флора СССР. Т.18. / Отв. ред. В. Л. Комаров. Москва; Ленинград: АН СССР, 1952. С. 27–30.

Крылова И. Я., Прокошева Л. И. Влияние экологического и географического факторов на анатомо-морфологические признаки листьев багульника болотного и связь этих признаков с химическим составом

листьев // Растительные ресурсы. 1980. Т. 16. № 4. С. 502–513.

Мазуренко М. Т., Хохряков Л. П. Эволюция биоморф и таксонообразование у дальневосточных багульников // Журнал общей биологии. 1987. Т. 48. № 2. С. 213–221.

Толмачев А. И. К познанию евроазиатских видов рода *Ledum* L. // Ботанические материалы гербария Ботанического института Т. 15. Москва: АН СССР, 1953. С. 197–207.

Толмачев А. И. Род *Ledum* L. // Арктическая флора СССР. Т. 8. / Отв. ред. А. И. Толмачев, Б. А. Юрцев. Ленинград: АН СССР, 1980. С. 108–112.

Усенко Н. В. Семейство Вересковые // Деревья, кустарники и лианы Дальнего Востока: справочная книга. Хабаровск: Приморские Ведомости, 2010. С. 185–203.

Цифровой гербарий МГУ / Ред. А. П. Серегин. Москва: МГУ, 2024. URL: <https://plant.depo.msu.ru/> (дата обращения 10.09.2024).

Amada G., Iwahana G., Noguchi K., Matsuura Y., Kim Y., Lee B. Y., Kobayashi H. Variations in permafrost environments determine populations and leaf traits of two closely related common shrub species (*Rhododendron* subsect. *Ledum*) in Interior Alaska // *Polar Biology*, in press, 2024. DOI: 10.21203/rs.3.rs-3581971/v1.

Chamberlain D. F., Hyam R., Argent G., Fairweather G., Walter K. S. The genus *Rhododendron*: Its classification and synonymy. Oxford: Royal Botanic Gardens Edinburgh, 1996. 181 p.

Clausen W. *Rhododendron* subsection *Ledum* // *Rhododendron Species*. 2022. Vol. 17. P. 64–90.

Devey M. E., Bell J. C., Smith D. N., Neale D. B., Moran G. F. A genetic linkage map for *Pinus radiata* based on RFLP, RAPD, and microsatellite markers // *Theoretical and Applied Genetics*. 1996. Vol. 92. P. 673–679.

Drummond A. J., Rambaut A. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees // *BMC Evolutionary Biology*, 2007. Vol. 7. P. 1–8. DOI: 10.1186/1471-2148-7-214.

Dupanloup I., Schneider S., Excoffier L. A simulated annealing approach to define the genetic structure of populations // *Molecular Ecology*. 2002. Vol. 11. P. 2571–2581. DOI: 10.1046/j.1365-294X.2002.01650.x.

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 // *Molecular Ecology Resources*, 2010. Vol. 10. P. 564–567. DOI: 10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x.

Goetsch L., Eckert A. J., Hall B. D. The molecular systematics of *Rhododendron* (Ericaceae): A phylogeny based upon *RPB2* gene sequences // *Systematic Botany*, 2005. Vol. 30. P. 616–626.

Hall T. A. Bioedit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows95/98/NT // *Nucleic Acids Symposium Series*, 1999. Vol. 41. P. 95–98. DOI: 10.1111/jbi.12867.

Harmaja H. Taxonomic notes on *Rhododendron* subsection *Ledum* (*Ledum*, Ericaceae), with a key to its species // *Annales Botanici Fennici*. 1991. Vol. 28 (2). P. 171–173.



Hart A., Kron K., Gillespie E. Molecular phylogenetic analysis of the North-Temperate Labrador Teas (Ericaceae: *Rhododendron* subsect. *Ledum*) suggests a complex genetic history // Journal of the Botanical Research Institute of Texas. 2017. Vol. 11. P. 53–65.

Hébert F., Thiffault N. The Biology of Canadian Weeds. 146. *Rhododendron groenlandicum* (Oeder) Kron and Judd. // Canadian Journal of Plant Science. 2011. Vol. 91. No. 4. P. 725–738. DOI: 10.4141/cjps2010-012.

Iunusova D. R., Polezhaeva M. A., Marchuk E. A. Genetic diversity of the *Rhododendron* subsection *Ledum* species in Sakhalin Island: Data from chloroplast DNA markers variability // Botanica Pacifica, 2023. Vol. 12. P. 155–162. DOI: 10.17581/bp.2023.12209.

Khan G., Nolzen J., Schepker H., Albach D. C. Incongruent phylogenies and their implications for the study of diversification, taxonomy, and genome size evolution of *Rhododendron* (Ericaceae) // American Journal of Botany. 2021. Vol. 108. P. 1957–1981. DOI: 10.1002/ajb2.1747.

Kihlman B. Hybrids between *Ledums* and lepidote *Rhododendrons* // Journal of American Rhododendron Society. 2004. Vol. 58. P. 74–81.

Kron K. A., Judd W. S. Phylogenetic Relationships within the *Rhodoreae* (Ericaceae) with Specific Comments on the Placement of *Ledum* // Systematic Botany. 1990. Vol. 15. P. 57.

Ronquist F., Huelsenbeck J. P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models // Bioinformatics. 2003. Vol. 19. P. 1572–1574. DOI: 10.1093/bioinformatics/btg180.

Savile D. B. Interrelationships of *Ledum* species and their rust parasites in western Canada and Alaska // Ca-

nadian Journal of Botany. 1969. Vol. 47. No. 7. P. 1085–1100.

Shiotani Y., Kudo G. Spatiotemporal niche overlap, asymmetric reproductive interference, and population genetics between the sympatric species, *Rhododendron diversipilosum* and *Rhododendron subarcticum*, in alpine fellfield habitat // Arctic, Antarctic, and Alpine Research. 2023. Vol. 55. P. 1–14. DOI: 10.1080/15230430.2023.2188716.

Shrestha N., Wang Z., Su X., Xu X., Lyu L., Liu Y., Dimitrov D., Kennedy J., Wang Q., Tang Z., Feng X. Global patterns of *Rhododendron* diversity: The role of evolutionary time and diversification rates // Global Ecology and Biogeography. 2018. Vol. 27. P. 913–924. DOI: 10.1111/geb.12750.

Wakui A. Ecotypic differentiation of northern plant species in mid-latitudes: The mechanisms of population maintenance in two ericaceous alpine species in northern Japan. A Dissertation for the Degree of Doctor. Graduate School of Environmental Science, Hokkaido University. 2021. 102 p.

Wen J., Nie Z. L., Ickert-Bond, S. M. Intercontinental disjunctions between eastern Asia and western North America in vascular plants highlight the biogeographic importance of the Bering land bridge from Late Cretaceous to Neogene. Journal of Systematics and Evolution. 2016. Vol. 54. P. 469–90. DOI: 10.1111/jse.12222.

Xia, X. M., Yang, M. Q., Li, C. L., Huang, S. X., Jin, W. T., Shen, T. T., Wang, F., Li, X. H., Yoichi, W., Zhang, L. H., Zheng, Y. R., Wang, X. Q. Spatiotemporal Evolution of the Global Species Diversity of *Rhododendron* // Molecular Biology and Evolution. 2022. Vol. 39. P. 1–15. DOI: 10.1093/molbev/msab314.

Поступила в редакцию 24.09.2024.

Поступила после доработки 15.11.2024.

## VARIABILITY OF NUCLEAR MARKER *RPB2* IN EURASIAN AND NORTH AMERICAN *LEDUM* SPECIES

**D. R. Iunusova, M. A. Polezhaeva**

*Institute of Plant and Animal Ecology, UrB RAS, Ekaterinburg, Russia*

An unambiguous delimitation of *Ledum* species (genus *Rhododendron*, subgenus *Rhododendron*, subsection *Ledum*) has not yet been established. In the present study, we genetically analyzed 89 specimens of five species of the subsection *Ledum* from Eurasia and North America, based on the variability of a nuclear DNA marker, an intron fragment between the second and the third exons of the *RPB2* gene. A high level of interpopulational polymorphism ( $F_{ST} = 0.8514$ ,  $p < 0.001$ ) was revealed by the marker under research, while the degree of interspecies differentiation was lower ( $F_{CT} = 0.42$ ,  $p < 0.001$ ). The phylogenetic analysis showed that all the studied *Ledum* samples form a monophyletic clade that had separated from other rhododendrons about 34 Mya, which corresponds to the beginning of the Oligocene cooling. No clear division into species is observed within the *Ledum* clade. The clades with *R. groenlandicum* specimens from North America and *R. subarcticum* (Chukotka, Kamchatka, central Sakhalin) are highly supported. The remaining species in Eurasia (*R. tomentosum*, *R. hypoleucum*, *R. diversipilosum*) are weakly differentiated on a genetic basis.

**Keywords:** *Ledum*, Russia's Far East, genetic polymorphism, phylogenetic analysis.

## REFERENCES

- Amada, G., Iwahana, G., Noguchi, K., Matsuura, Y., Kim, Y., Lee, B. Y., Kobayashi, H., 2024, Variations in Permafrost Environments Determine Populations and Leaf Traits of Two Closely Related Common Shrub Species (*Rhododendron* subsect. *Ledum*) in Interior Alaska, *Polar Biology*. In press. DOI: 10.21203/rs.3.rs-3581971/v1.
- Busch, E. A., 1915. Ericaceae, Flora Sibiriae et Orientis Extremi. Petrograd, Botanichesky Muzei Imperatorskoy Akademii Nauk, 2, 10–41 [In Russian].
- Bush, E. A., 1952. Genus *Ledum* L., *Flora of the USSR*. Moscow; Leningrad, USSR Academy of Sciences. 18, 27–30 [In Russian].
- Chamberlain, D. F., Hyam, R., Argent, G., Fairweather, G., Walter, K. S., 1996. The Genus *Rhododendron*: Its Classification and Synonymy. Oxford, Royal Botanic Gardens Edinburgh.
- Clausen, W., 2022. *Rhododendron* Subsection *Ledum*, *Rhododendron Species*. 17, 64–90.
- Devey, M. E., Bell, J. C., Smith, D. N., Neale, D. B., Moran, G. F., 1996. A Genetic Linkage Map for *Pinus radiata* Based on RFLP, RAPD, and Microsatellite Markers, *Theoretical and Applied Genetics*. 92, 673–679.
- Digital Herbarium of MSU, 2024. Ed. A. P. Seryogin. Moscow, MSU. URL: <https://plant.depo.msu.ru/> (accessed 10.09.2024) [In Russian].
- Drummond, A. J., Rambaut, A., 2007. BEAST: Bayesian Evolutionary Analysis by Sampling Trees, *BMC Evolutionary Biology*. 7, 1–8. DOI: 10.1186/1471-2148-7-214.
- Dupanloup, I., Schneider, S., Excoffier, L., 2002. A Simulated Annealing Approach to Define the Genetic Structure of Populations, *Molecular Ecology*. 11, 2571–2581. DOI: 10.1046/j.1365-294X.2002.01650.x.
- Excoffier, L., Lischer, H. E. L., 2010. Arlequin Suite ver 3.5: a New Series of Programs to Perform Population Genetics Analyses under Linux and Windows, *Molecular Ecology Resources*. 10, 564–567. DOI: 10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x.
- Goetsch, L., Eckert, A. J., Hall, B. D., 2005. The Molecular Systematics of *Rhododendron* (Ericaceae): A Phylogeny Based upon *RPB2* Gene Sequences, *Systematic Botany*. 30, 616–626.
- Hall, T. A., 1999. Bioedit: A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows95/98/NT, *Nucleic Acids Symposium Series*. 41, 95–98. DOI: 10.1111/jbi.12867.
- Harmaja, H., 1991. Taxonomic Notes on *Rhododendron* Subsection *Ledum* (*Ledum*, Ericaceae), with a Key to Its Species, *Annales Botanici Fennici*. 28, 2, 171–173.
- Hart, A., Kron, K., Gillespie, E., 2017. Molecular Phylogenetic Analysis of the North-Temperate Labrador Teas (Ericaceae: *Rhododendron* subsect. *Ledum*) Suggests a Complex Genetic History, *Journal of the Botanical Research Institute of Texas*. 11, 53–65.
- Hébert, F., Thiffault, N., 2011. The Biology of Canadian Weeds. 146. *Rhododendron groenlandicum* (Oeder) Kron and Judd., *Canadian Journal of Plant Science*. 91, 4, 725–738. DOI: 10.4141/cjps2010-012.
- Iunusova, D. R., Polezhaeva, M. A., Marchuk, E. A., 2023. Genetic Diversity of the *Rhododendron* Subsection *Ledum* Species in Sakhalin Island: Data from Chloroplast DNA Markers Variability, *Botanica Pacifica*. 12, 155–162. DOI: 10.17581/bp.2023.12209.
- Kihlman, B., 2004. Hybrids between *Ledums* and lepidote *Rhododendrons*, *Journal of American Rhododendron Society*. 58, 74–81.
- Khan, G., Nolzen, J., Schepker, H., Albach, D. C., 2021. Incongruent Phylogenies and Their Implications for the Study of Diversification, Taxonomy, and Genome Size Evolution of *Rhododendron* (Ericaceae), *American Journal of Botany*. 108, 1957–1981. DOI: 10.1002/ajb2.1747.
- Kron, K. A., Judd, W. S., 1990. Phylogenetic Relationships within the *Rhodoreae* (Ericaceae) with Specific Comments on the Placement of *Ledum*, *Systematic Botany*. 15, 57.
- Krylova, I. Ya., Prokosheva, L. I., 1980. Ecological and Geographical Factor Influence on Anatomo-Morphological Features of Labrador Tea Leaves and the Relationship of These Features with the Leaves Chemical Composition, *Rastitelnye Resursy*. 16 (4), 502–513 [In Russian].
- Mazurenko, M. T., Khokhryakov, L. P., 1987. Evolution of Biomorphs and Taxon Formation in Far East *Ledum*, *Biology Bulletin Review*. 48, 2, 213–221 [In Russian].
- Ronquist, F., Huelsenbeck, J. P., 2003. MrBayes 3: Bayesian Phylogenetic Inference under Mixed Models, *Bioinformatics*. 19, 1572–1574. DOI: 10.1093/bioinformatics/btg180.
- Savile, D. B., 1969. Interrelationships of *Ledum* Species and Their Rust Parasites in Western Canada and Alaska, *Canadian Journal of Botany*. 47, 7, 1085–1100.
- Shiotani, Y., Kudo, G., 2023. Spatiotemporal Niche Overlap, Asymmetric Reproductive Interference, and Population Genetics between the Sympatric Species, *Rhododendron diversipilosum* and *Rhododendron subarcticum*, in Alpine Fellfield Habitat, *Arctic, Antarctic, and Alpine Research*. 55, 1–14. DOI: 10.1080/15230430.2023.2188716.
- Shrestha, N., Wang, Z., Su, X., Xu, X., Lyu, L., Liu, Y., Dimitrov, D., Kennedy, J., Wang, Q., Tang, Z., Feng, X., 2018. Global patterns of *Rhododendron* diversity: The role of evolutionary time and diversification rates, *Global Ecology and Biogeography*, 27, 913–924. DOI: 10.1111/geb.12750.
- Tolmachov, A. I., 1980. Genus *Ledum* L., *Arctic Flora of the USSR*. Leningrad, AS USSR, 8, 108–112 [In Russian].
- Tolmachov, A. I., 1953. To Understanding Eurasian Species of the Genus *Ledum* L., *Botanical Materials from the Herbarium Russian Academy of Sciences – V. L. Komarov Botanical Institute*. Moscow, 15 [In Russian].

Usenko, N. V., 2010. Family *Ericaceae*, *Trees, Shrubs, and Lianas in the Far East: Reference Book*. Khabarovsk: Priamurskiye Vedomosti [In Russian].

Xia, X. M., Yang, M. Q., Li, C. L., Huang, S. X., Jin, W. T., Shen, T. T., Wang, F., Li, X. H., Yoichi, W., Zhang, L. H., Zheng, Y. R., Wang, X. Q., 2022. Spatiotemporal Evolution of the Global Species Diversity of *Rhododendron*, *Molecular Biology and Evolution*. 39, 1–15. DOI: 10.1093/molbev/msab314.

Wakui, A., 2021, Ecotypic Differentiation of Northern Plant Species in Mid-Latitudes: the Mechanisms of Popu-

lation Maintenance in Two Ericaceous Alpine Species in Northern Japan. A Dissertation for the Degree of Doctor, Graduate School of Environmental Science, Hokkaido University.

Wen, J., Nie, Z. L., Ickert-Bond, S. M., 2016. Intercontinental Disjunctions Between Eastern Asia and Western North America in Vascular Plants Highlight the Biogeographic Importance of the Bering Land Bridge from Late Cretaceous to Neogene, *Journal of Systematics and Evolution*. 54, 469–90. DOI: 10.1111/jse.12222.