

Молекулярная систематика робуроидных дубов (*Quercus* L. секция *Quercus*, Fagaceae) Кавказа и прилегающих регионов: сравнение данных по изменчивости ядерного генома с морфологическими данными

Molecular systematics of roburoid oaks (*Quercus* L. sect. *Quercus*, Fagaceae) in the Caucasus and adjacent regions: comparison of data on nuclear genome variability with morphological data

Семерикова С. А., Семериков В. Л.

Semerikova S. A., Semerikov V. L.

Институт экологии растений и животных УРО РАН, Екатеринбург, Россия

E-mail: s.a.semerikova@ipae.uran.ru, semerikov@ipae.uran.ru

Institute of Plant and Animal Ecology, Ural Branch of Russian Academy of Science, Ekaterinburg, Russia

Реферат. Сложности в изучении таксономической структуры кавказских дубов при высоком морфологическом разнообразии и распространенной гибридизации определяют важность молекулярно-генетических исследований видов *Quercus* в регионе. Межвидовая и внутривидовая структура генетической изменчивости была впервые изучена у близкородственных робуроидных дубов крымско-кавказского региона с помощью 18 ядерных микросателлитных локусов (nSSR). Исследовались семь наиболее распространенных в регионе таксонов пяти видов (*Q. robur*, *Q. hartwissiana*, *Q. pubescens*, *Q. macranthera* и три подвида *Q. petraea*) из разных частей Северного Кавказа, Закавказья, Крыма и северо-восточной Европы. Проведен анализ 1240 образцов из 85 выборок. Большинство таксонов были впервые исследованы с помощью nSSR маркеров. Показана эффективность использования микросателлитных локусов для идентификации робуроидных дубов крымско-кавказского региона и исследования процессов гибридизации. Генетическая кластеризация образцов соответствовала таксономической идентификации на основе морфологических признаков. Впервые на основе генетических данных предполагается видовой статус для дуба известнякового (*Q. petraea* subsp. *medwediewii* (A. Camus) Menitsky). При этом предположение о возможном гибридном происхождении дуба известнякового в результате гибридизации *Q. petraea* и *Q. pubescens* не подтверждается. Показана близость друг к другу «долгоплодоножковых» робуроидных дубов (*Q. robur*, *Q. hartwissiana*) при большей степени отличий от других видов. Исследовано распределение таксонов в крымско-кавказском регионе, доля разных таксонов и их гибридов в популяциях. Между двумя подвидами дуба скального *Q. petraea* subsp. *petraea* и *Q. petraea* subsp. *iberica* на Западном Кавказе наблюдается зона интрогрессии. В районах совместного произрастания нескольких видов выявлена определенная степень межвидовой гибридизации. Однако четкая дифференциация видов по ядерным маркерам даже в симпатрических популяциях показывает ограниченность интрогрессии близких видов дуба на Кавказе и в Крыму.

Ключевые слова. Идентификация таксонов, Кавказ, Крым, ядерные микросателлиты, nSSR, *Quercus*, STRUCTURE.

Summary. Difficulties in studying the taxonomic structure of Caucasian oaks with high morphological diversity and widespread hybridization determine the importance of molecular genetic studies of *Quercus* species in the region. The interspecific and intraspecific structure of genetic variation was first studied in closely related roburoid oaks of the Crimean-Caucasian region using 18 nuclear microsatellite loci (nSSRs). The seven most common taxa of five species in the region were studied (*Q. robur*, *Q. hartwissiana*, *Q. pubescens*, *Q. macranthera* and three subspecies of *Q. petraea*) from different parts of the North Caucasus, Transcaucasia, Crimea and northeastern Europe. 1240 samples from 85 populations were analyzed. Most taxa were first studied using nSSR markers. The effectiveness of microsatellite loci for identification of roburoid oaks in the Crimean-Caucasian region and studying hybridization processes has been demonstrated. Genetic clustering of samples was consistent with taxonomic identification based on morphological characters. The relatedness of the “long-pedunculated” roburoid oaks (*Q. robur*, *Q. hartwissiana*) to each other was shown, with a greater difference from other species. For the first time the species status of the limestone oak (*Q. petraea* ssp. *medwediewii*) was suggested based on genetic data. At the same time the possible hybrid origin of limestone oak as a result of hybridization of *Q. petraea* and *Q. pubescens* is not confirmed. The distribution of taxa in the Crimean-Caucasian region, the proportion of different taxa

and their hybrids in populations have been studied. An introgression zone between two subspecies of sessile oak *Q. petraea* ssp. *petraea* and *Q. petraea* ssp. *iberica* in the Western Caucasus was found. In areas where several species grow together, a certain degree of interspecific hybridization was revealed. However, clear differentiation of species by nuclear markers even in sympatric populations shows the limited introgression of closely related oak species in the Caucasus and Crimea.

Key words. Caucasus, Crimea, nuclear microsatellites, nSSR, *Quercus* spp., STRUCTURE, taxa assignment.

Введение. Эволюция европейской группы робуроидных дубов (Roburoids, секция *Quercus*) (Kremer, Hipp, 2020) во многом связана с горными системами Средиземноморья, среди которых Кавказ и Крым являются древними центрами флористического разнообразия и плейстоценовыми рефугиумами лесной, в том числе широколиственной растительности (Меницкий, 1984; Schmidt, 2004). Виды дуба крымско-кавказского региона характеризуются значительной изменчивостью. Их систематике и популяционной структуре неоднократно было уделено внимание отечественных исследователей (Троицкий, 1931; Малеев, 1935; Меницкий, 1968, 1971, 1984, 2012; Семерилов, 1986). В то же время общепризнанной таксономической схемы кавказских дубов до сих пор нет (Schmidt, 2004). Помимо высокой морфологической изменчивости, значительную проблему представляет гибридизация, которой способствует широкое перекрывание ареалов и обитание в симпатрических популяциях.

На Кавказе и в Крыму количество таксонов робуроидных дубов значительно различается в зависимости от классификации (Schmidt, 2004). В «Конспекте флоры Кавказа» (Меницкий, 2012) указывается шесть видов, которые относятся к робуроидным дубам, среди которых наиболее распространены европейские виды – дуб черешчатый (*Q. robur* L.) с двумя подвидами на Кавказе, и дуб скальный (*Q. petraea* (Matt.) Liebl.), с пятью подвидами. Дуб пушистый (*Q. pubescens* Willd.), средиземноморский ксерофитный вид, распространен в Крыму и на Кавказе, где его ареал ограничен приморскими районами Северо-Западного и Восточного Кавказа. Во влажных районах Западного Кавказа и Закавказья встречается дуб Гартвиса (*Q. hartwissiana* Steven) – восточноевропейско-малоазиатско-кавказский вид. В горных районах Восточного Кавказа и Закавказья, обычно выше 1700 м над ур. м., произрастает дуб крупнопыльниковый, или д. восточный (*Q. macranthera* Fisch. et C. A. Mey. ex Hohen.) – вид с западно-азиатским распространением.

Особого внимания заслуживают внутривидовые таксоны *Q. petraea*, систематика которых вызывает наибольшие разногласия (Schmidt, 2004). Ю. Л. Меницкий (1984, 2012) рассматривал несколько таксонов в ранге подвидов, из которых на Кавказе наиболее распространены типовой подвид *Q. petraea*, дуб грузинский (*Q. petraea* ssp. *iberica* (Steven ex Bieb.) Krassiln.) и д. известняковый (*Q. petraea* ssp. *medwediewii* (A. Camus) Menitsky). Подвиды дуба скального, при выраженной экологической дифференциации, занимают на Кавказе не совпадающие, хотя и перекрывающиеся ареалы: *Q. petraea* subsp. *medwediewii* преобладает на северном макросклоне Большого Кавказа и в Предкавказье, *Q. petraea* subsp. *iberica* – в Закавказье и в Дагестане, *Q. petraea* subsp. *petraea* – в Крыму и в Западном Предкавказье (Меницкий, 1984), при этом в ряде областей образуются обширные области «интерградации» (Меницкий, 1971), или интрогрессивной гибридизации между подвидами, а также с другими близкородственными видами: это в первую очередь районы Западного Кавказа и Западного Закавказья, а также Восточный Кавказ и Крым. Отдельный предмет дискуссии составляет интерпретация таксона «дуб известняковый» *Q. petraea* subsp. *medwediewii* (Syn.: *Q. calcarea* Troitsky, *Q. dalechampii* Ten. (?)), отличающегося морфологически и экологически от других сидячецветных дубов (Троицкий, 1931; Меницкий, 1968, 1971). В различных таксономических классификациях этот дуб рассматривался как: 1) самостоятельный вид; 2) подвид дуба пушистого; 3) подвид д. скального; 4) таксон гибридного происхождения; 5) экологическая раса, или же 6) не признавался как отдельный таксон (Schmidt, 2004).

Хотя виды и подвиды робуроидных дубов различаются по экологическим требованиям и репродуктивной стратегии, их ареалы на Кавказе в значительной степени совпадают, и между ними часто наблюдается существенное перекрывание таксономических диагностических признаков. Сложности в изучении таксономической структуры кавказских дубов определяют важность молекулярно-генетических исследований видов *Quercus* в регионе.

При исследовании изменчивости хлоропластной ДНК (хпДНК) видов рода дуб на Кавказе и в Крыму (Семерилова и др., 2023а, б) была обнаружена выраженная географическая структура при отсутствии понятного таксономического положения, что объясняется наличием генетического потока между родственными видами и пониженной подвижностью хпДНК между поколениями благодаря её

материнскому наследованию. В отличие от хпДНК, маркеры ядерной ДНК передаются как по материнской, так и по отцовской линии. Это определяет их способность хорошо выявлять таксономическую структуру, связанную с ограничением генетического потока между репродуктивно почти изолированными таксонами. Ранее применение ядерных микросателлитных локусов (nSSR) позволило разделить *Q. robur* и *Q. petraea* s. l. в соответствии с видовой принадлежностью во всех исследованных областях восточной части ареала и в симпатрических популяциях (Semerikova et al., 2023).

Целью работы являлось исследование таксономической структуры робуроидных дубов Крыма и Кавказа с помощью ядерных маркеров (nSSR). В задачи входило выявление основных генетических кластеров и сопоставление их с таксономическим положением, предложенным ранее на основе морфологических данных (Троицкий, 1931; Меницкий, 1984). Кроме разграничения таксонов на основе генетических маркеров и уточнения таксономического статуса спорных таксонов, исследовались процессы гибридизации и генетического потока в симпатрических популяциях, филогенетические связи между таксонами и характер внутривидовой дифференциации.

Материалы и методы. Проведен анализ таксономической структуры 1240 образцов из 85 выборок пяти видов робуроидных дубов Крыма и Кавказа (семи таксонов, с учетом трех наиболее распространенных подвидов *Q. petraea*). В исследовании представлены разные регионы Северного Кавказа, Закавказья и Крыма. Для большинства таксонов для сравнения включены популяции из Восточной Европы и Балкан. Исследовались как морфологически чистые выборки из районов, где нет близкородственных таксонов, или в популяциях, где они не произрастают симпатрически, так и смешанные выборки из районов совместного произрастания близких видов и в зонах интерградации и предполагаемой гибридизации (Меницкий, 1984). Предварительную таксономическую принадлежность устанавливали по работам Ю. Л. Меницкого (Меницкий 1971, 1984). Анализ изменчивости 18 ядерных микросателлитных локусов (nSSR) из двух мультиплексов (Guichoux et al., 2011) проводился в соответствии с описанным нами ранее при исследовании популяционно-генетической структуры *Q. robur* и *Q. petraea* s. l. (Semerikova et al., 2023). Байесовскую кластеризацию генотипов проводили в программе STRUCTURE 2.3.4 (Pritchard et al., 2000). С помощью GenAlEx v. 6.5 (Peakall, Smouse, 2012) на основе генетических дистанций проведен анализ главных координат (PCoA), рассчитаны показатели изменчивости и подразделенности таксонов и популяций.

Результаты и обсуждение. Во всех таксонах, в том числе впервые исследованных с использованием маркеров nSSRs, наблюдалась достаточно высокая изменчивость во всех локусах. Выявлены значительные отличия по частотам аллелей между таксонами. В результате анализа STRUCTURE выделяются генетические кластеры, соответствующие всем семи таксонам: *Q. robur* s. l., *Q. hartwissiana*, *Q. pubescens*, *Q. macranthera*, *Q. petraea* subsp. *medwediewii*, *Q. petraea*, *Q. petraea* subsp. *iberica*. Используемые локусы хорошо диагностируют таксономическую принадлежность индивидуумов, доля соответствующего таксону кластера в «чистых» популяциях составляла более 85 % (в среднем 93 %). Выявленная генетическая кластеризация образцов соответствовала их таксономическому подразделению на основе морфологических признаков и распространению семи таксонов *Quercus* в исследуемых районах. В нескольких случаях был утонен таксономический статус собранных образцов. Исследовано распределение таксонов в Крыму и на Кавказе, доля разных таксонов и их гибридов в популяциях. Внутри *Q. robur*, *Q. hartwissiana*, *Q. pubescens* и *Q. petraea* subsp. *petraea* выявлена географическая структура как внутри крымско-кавказского региона, так и между Кавказом и Балканами.

По уровню дифференциации исследуемые виды разделились на две дивергентные группы: «длинноплодоножковых» робуроидных дубов (*Q. robur*, *Q. hartwissiana*) и группу «сидячецветных» таксонов, что не соответствует распределению видов по трем подсекциям (Меницкий, 1984), а также другим недавним классификациям европейских дубов секции *Quercus* (Vázquez et al., 2023).

Выявлена значительная дифференциация *Q. petraea* subsp. *medwediewii* как от двух других подвидов дуба скального, так и от *Q. pubescens* и *Q. macranthera*, что подтверждает трактовку данного таксона в ранге вида (Троицкий, 1931). Уточнена область распространения дуба известнякового, которая оказалась весьма обширной и в целом соответствует указанному в литературных источниках (Троицкий, 1931; Меницкий, 1984, 2012). Предположение Ю. Л. Меницкого о возможном гибридном происхождении данного таксона в ходе исторической гибридизации *Q. petraea* и *Q. pubescens*, высказанное на основании наличия переходных морфологических признаков (Меницкий, 1971), генетическим анализом не подтверждается. Индивидуумы *Q. petraea* subsp. *medwediewii* сохраняют свою генетическую

идентичность не только в областях произрастания отдельно от других подвидов *Q. petraea* и остальных сидячецветных дубов (Центральный Кавказ и Предкавказье), но и в районах, где дуб известняковый указывается вместе с другими близкородственными таксонами (Крым, Западный и Восточный (Дагестан) Кавказ).

Синонимом *Q. petraea* subsp. *medwediewii* часто рассматривается европейский вид *Q. dalechampii* Ten., систематическое положение и трактовка которого, в свою очередь, остаются весьма неопределёнными (Schmidt, 2004), особенно после недавнего пересмотра в объеме и составе *Q. dalechampii* и разделении его на две части, относящиеся к системам *Q. petraea* и *Q. pubescens* (Di Pietro et al., 2012). При этом для Центральной Европы было предложено новое название *Quercus banatus* P. Kucera (Kučera, 2018, 2019). Расширенного морфологического сравнения *Q. petraea* subsp. *medwediewii* с европейскими популяциями *Q. dalechampii* (или *Q. banatus*) ранее не проводилось, что требует генетического исследования предположительно родственных таксонов.

Два других исследованных подвида (*Q. petraea* subsp. *petraea* и *Q. petraea* subsp. *iberica*) дифференцированы в меньшей степени и родственны между собой, что подтверждает правомерность выделения двух географически обособленных таксонов в ранге подвидов. На Западном Кавказе наблюдается переходная зона смешения двух генетических кластеров, соответствующих этим видам.

Образцы с менее 80 % генетического кластера, соответствующего виду, считались гибридными. Гибриды наблюдались между многими таксонами в симпатрических популяциях (всего около 16 % индивидумов), но с разной частотой для разных видов. Наибольший процент гибридов был отмечен для *Q. pubescens*. В местах произрастания трех видов сидячецветных дубов доля гибридов была максимальной: на Западном Кавказе – 28,0 %, в Дагестане – 18,5 %, в Крыму – 17,0 %. Состав гибридов различается в зависимости от региона. Например, в Дагестане *Q. pubescens* произрастает симпатрически с *Q. petraea* subsp. *iberica* и *Q. robur*, в Крыму и на Западном Кавказе – совместно с *Q. petraea* subsp. *medwediewii* и *Q. petraea* subsp. *petraea*. Однако преобладание генетически «чистых» образцов при совместном обитании представителей нескольких таксонов подтверждает мнение, что гибридизация между видами робуроидных дубов затруднена, вероятно, вследствие экологической и фенологической изоляции (Семерилов, 1986).

Благодарности. Исследование выполнено при поддержке государственного задания Института экологии растений и животных УрО РАН, no. 122021000090-5. Сбор части образцов в 2022–2023 гг. проведен за счет гранта Российского научного фонда № 22-24-00667, <https://rscf.ru/project/22-24-00667/>. Авторы выражают благодарность Х. У. Алиеву, А. Н. Ташеву, И. Ю. Исакову, Н. В. Семерилову, Л. Ф. Агафонову, М. А. Полежаевой, Е. Г. Филлипову, С. А. Свиринову, Е. С. Кашириной за помощь в сборе образцов дуба.

ЛИТЕРАТУРА

- Малеев В. П.** Обзор дубов Кавказа в систематическом и географическом отношениях и в связи с эволюцией группы *Robur* // Бот. журн., 1935. – Т. 20, №2 – С. 156–177; – Т. 20, №3. – С. 292–321.
- Меницкий Ю. Л.** Обзор робуроидных и галлиферных дубов Кавказа // Новости систематики высших растений, 1968. – С. 81–94.
- Меницкий Ю. Л.** Дубы Кавказа. Обзор кавказских представителей секции *Quercus*. – Л.: Наука, 1971. – 196 с.
- Меницкий Ю. Л.** Дубы Азии. – Л.: Наука, 1984. – 315 с.
- Меницкий Ю. Л.** Семейство Fagaceae // Конспект флоры Кавказа. – СПб.; М.: Тов-во науч. изд. КМК, 2012. – Т. 3, ч. 2. – С. 286–292.
- Семерилов Л. Ф.** Популяционная структура древесных растений (на примере видов дуба европейской части СССР и Кавказа). – М.: Наука, 1986. – 140 с.
- Семерикова С. А., Алиев Х. У., Семерилов Н. В., Семерилов В. Л.** Филогеография видов дуба на Кавказе по результатам анализа хлоропластной ДНК // Генетика, 2023а. – Т. 59, № 7. – С. 772–788. DOI: 10.31857/S001667582307010X
- Семерикова С. А., Подергина С. М., Ташев А. Н., Семерилов В. Л.** Филогеография видов дуба в Крыму выявляет плейстоценовые рефугиумы и пути миграций // Экология, 2023б. – Т. 54, № 3. – С. 188–203. DOI: 10.31857/S0367059723030058
- Троицкий Н. Д.** Предварительные итоги изучения дубов Крымского государственного заповедника и прилегающего района южного берега Крыма (систематика в связи с условиями произрастания) // Журнал РБО, 1931. – Т. 16, № 4. – С. 313–354.
- Guichoux E., Lagache L., Wagner S., Leger P., Petit R. J.** Two highly validated multiplexes (12-plex and 8-plex) for species delimitation and parentage analysis in oaks (*Quercus* spp.) // Mol. Ecol. Resour., 2011. – Vol. 11. – P. 578–585. DOI: 10.1111/j.1755-0998.2011.02983.x

- Di Pietro R., Viscosi V., Peruzzi L., Fortini P.** A review of the application of the name *Quercus dalechampii* // *Taxon*, 2012. – Vol. 61, № 6. – P. 1311–1316. DOI: 10.1002/tax.616012
- Kučera P.** New name for Central European oak formerly labelled as *Quercus dalechampii* // *Biologia*, 2018. – Vol. 73, № 4. – P. 313–317. DOI: 10.2478/s11756-018-0048-z
- Kučera P.** *Quercus banatus* grows in Slovenia // *Thaiszia – Journal of Botany*, 2019. – Vol. 29, № 1. – P. 61–69. DOI: 10.33542/TJB2019-1-04
- Kremer A., Hipp A. L.** Oaks: an evolutionary success story // *New Phytologist*, 2020. – Vol. 226, № 4. – P. 987–1011. DOI: 10.1111/nph.16274
- Schmidt P. A.** Oaks and oak forests in Caucasia // *Proceedings Fourth International oak conference (12-15 Sept. 2003, Winchester, England) – The Journal of the International Oak Society, Asheville, North Carolina, USA, 2004.* – № 15. – P. 9–29.
- Peakall R., Smouse P. E.** GenAEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update // *Bioinformatics*, 2012. – Vol. 28. – P. 2537–2539. DOI: 10.1093/bioinformatics/bts460
- Pritchard J. K., Stephens M., Donnelly P.** Inference of population structure using multilocus genotype data // *Genetics*, 2000. – Vol. 155. – P. 945–959.
- Semerikova S. A., Tashev A. N., Semerikov V. L.** Genetic diversity and history of pedunculate oak *Quercus robur* L. in the east of the range // *Russian J Ecology*, 2023. – Vol. 54, №. 5. – P. 423–438. DOI: 10.1134/S1067413623050089
- Vázquez F.M., García D., Márquez F., Vilaviçosa C. M.** Annotations to infrageneric nomenclature of *Quercus* L. (FAGACEAE) // *Fol. Bot. Extremadurensis*, 2023. – Vol. 17. – P. 7–64.