

ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ И ТАКСОНОМИЧЕСКАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ РОБУРОИДНЫХ ДУБОВ КРЫМСКО-КАВКАЗСКОГО РЕГИОНА ПО ЯДЕРНЫМ МИКРОСАТЕЛЛИТНЫМ МАРКЕРАМ

© 2024 г. С. А. Семерикова¹, *, Х. У. Алиев², В. Л. Семериков¹

¹Институт экологии растений и животных Уральского отделения Российской академии наук, Екатеринбург, 620144 Россия

²Горный ботанический сад Дагестанского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Махачкала, 367000 Россия

*e-mail: s.a.semerikova@ipae.uran.ru

Поступила в редакцию 20.02.2024 г.

После доработки 13.03.2024 г.

Принята к публикации 25.03.2024 г.

Межвидовая и внутривидовая структура генетической изменчивости была изучена с помощью 18 микросателлитных локусов (nSSR) у близкородственных робуроидных дубов крымско-кавказского региона (секция *Quercus*). Исследовались семь наиболее распространенных в регионе таксонов из 29 морфологически чистых популяций в пределах разных частей Северного Кавказа, Закавказья, Крыма и северо-восточной Европы. Большинство таксонов были впервые исследованы с помощью nSSR-маркеров. Среди 492 изученных деревьев метод байесовской кластеризации STRUCTURE выделил кластеры, соответствующие дубу черешчатому *Quercus robur*, дубу Гартвиса *Q. hartwissiana*, дубу крупнопольниковому *Q. macranthera*, дубу пушистому *Q. pubescens* и трем подвидам дуба скального: *Q. petraea* ssp. *petraea*, *Q. petraea* ssp. *iberica*, *Q. petraea* ssp. *medwediewii*. Географическая структура была выявлена внутри *Q. robur*, *Q. pubescens* и *Q. p.* ssp. *petraea*. Используемые nSSR-локусы хорошо диагностируют таксономическую принадлежность индивидуумов, выявляя при этом гибридные образцы. Показана близость друг к другу «длинноплодоножковых» робуроидных дубов (*Q. robur*, *Q. hartwissiana*) при большей степени отличий от других видов. У одного из подвигов дуба скального, широко распространенного на Северном Кавказе и в Крыму, — дуба известнякового *Q. petraea* ssp. *medwediewii* (syn. *Q. calcarea*) — обнаружены значительные отличия от других таксонов, достигающие видового уровня. Предположение о возможном гибридном происхождении дуба известнякового в результате гибридизации *Q. petraea* и *Q. pubescens* генетическим анализом не подтверждается. Два других подвида *Q. petraea* (типовой *Q. p.* ssp. *petraea* и дуб грузинский *Q. p.* ssp. *iberica*) дифференцированы в меньшей степени и родственны между собой, что подтверждает правомерность выделения двух географически обособленных таксонов в ранге подвигов. Наиболее высокая изменчивость наблюдалась в популяциях *Q. pubescens* ($H_e = 0.777$). У *Q. p.* ssp. *medwediewii* показатели изменчивости были ниже, чем у других широко распространенных таксонов ($H_e = 0.652$), и находились примерно на уровне изменчивости *Q. hartwissiana* ($H_e = 0.633$) и *Q. macranthera* ($H_e = 0.659$). Четкая дифференциация таксонов по ядерным маркерам показывает ограниченность интрогрессии близких видов дуба на Кавказе и в Крыму. Выделенные генетические кластеры могут быть использованы как референсные группы для дальнейших популяционно-генетических исследований дубов крымско-кавказского региона.

Ключевые слова: *Quercus* spp., ядерные микросателлиты, Кавказ, Крым, nSSR, STRUCTURE, генетическая дифференциация, идентификация таксонов.

DOI: 10.31857/S0016675824080035 **EDN:** BGCLLP

Европейские робуроидные дубы (*Quercus* L., секция *Quercus*, Fagaceae) являются важнейшими элементами умеренных лесов с центрами разнообразия, расположенными в юго-восточных областях Западной Евразии, включая Причерноморский регион, Кавказ и Западную Азию [1–3]. Это

молодая группа [4, 5], содержащая большое число морфологически слабо дифференцированных и способных к гибридизации видов со сложной систематикой. На Кавказе и в Крыму количество таксонов этой группы значительно различается в зависимости от классификации [1–3, 6–10]. В

настоящее время в Конспекте флоры Кавказа [6] указываются шесть видов, которые относятся к робуроидным дубам, среди которых наиболее распространены европейские виды – дуб черешчатый (*Q. robur* L.) и дуб скальный (*Q. petraea* (Matt.) Liebl.). На Западном Кавказе и в Закавказье встречается дуб Гартвиса (*Q. hartwissiana* Steven). В горных районах Восточного Кавказа и Закавказья произрастает дуб крупнопольниковый (*Q. macranthera* Fisch. et C. A. Mey. ex Hohen). Дуб пушистый *Q. pubescens* Willd., средиземноморский ксерофитный вид, широко распространен в Крыму. На Кавказе его ареал ограничен приморскими районами Северо-Западного и Восточного Кавказа.

Кроме общепризнанных видов, среди произрастающих на Кавказе дубов особого внимания заслуживают внутривидовые таксоны *Q. petraea*, систематика которых вызывает наибольшее разногласия [7, обзор]. Монограф рода Ю. Л. Меницкий [1–3, 6] рассматривал несколько таксонов *Q. petraea* в ранге подвидов, из которых в регионе наиболее распространены типовой подвид (*Q. petraea* L. ex Liebl. ssp. *petraea*), дуб грузинский (*Q. petraea* ssp. *iberica* (Steven ex Bieb.) Krassiln.) и дуб известняковый (*Q. petraea* ssp. *medwediewii* (A. Camus) Menitsky). Последний был определен в систему дуба скального, но с указанием о промежуточности морфологических признаков между *Q. petraea* и *Q. pubescens*, что предполагает, по мнению Ю. Л. Меницкого, его гибридное происхождение [1–3]. В то же время Н. Д. Троицкий [9] ранее описал этот таксон в Крыму в ранге отдельного вида (*Q. calcarea* Troitsky).

Подвиды дуба скального при выраженной экологической дифференциации занимают на Кавказе несовпадающие, хотя и перекрывающиеся ареалы: *Q. p. ssp. medwediewii* преобладает на северном макросклоне Большого Кавказа и в Предкавказье, *Q. p. ssp. iberica* – в Закавказье и в Дагестане, *Q. p. ssp. petraea* – в Крыму и в Западном Предкавказье [3], при этом в ряде областей образуются обширные области “интерградации” [1, 8], 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.

Исследователи систематики дубов констатируют сложность разграничения таксонов ввиду значительного перекрывания диагностических черт и необходимости различать таксоны с помощью множества признаков, включая структуру опушения, что трудоемко и не всегда доступно [1, 11–18]. Даже при этом для уверенной диагностики необходимо знать происхождение образца [1]. Помимо высокой морфологической изменчивости, значительную проблему представляет гибридизация, чему способствует широкое перекрывание ареалов и обитание в симпатрических популяциях. Все

это означает важность использования молекулярных маркеров для исследования таксономической структуры и демографических процессов в популяциях дубов.

Взаимоотношение наиболее распространенных видов европейских робуроидных дубов ранее широко исследовалось с помощью ядерных микросателлитных локусов (nSSRs) [11–29]. С помощью различных наборов nSSRs была показана возможность разграничения отдельных таксонов (*Q. robur*, *Q. petraea*, *Q. pubescens*, *Q. frainetto*, *Q. pyrenaica*). В смешанных сообществах были обнаружены значительные различия по уровню гибридизации между популяциями, в зависимости от состава [11, 13–16, 24–26]. В то же время не удалось разделить несколько видов, близких дубу пушистому [18, 30–32]. Для более точной таксономической идентификации необходимы учет всех таксонов, присутствующих в регионах [24, 28], использование “чистых” референсных групп при исследовании гибридизации и состава насаждений [18, 23, 24, 30] и сбалансированное количество образцов и популяций разных таксонов, включенных в анализ [33].

В наших недавних исследованиях пяти видов робуроидных дубов в Крыму и на Кавказе матерински наследуемыми маркерами хлоропластной ДНК [34, 35] была выявлена отчетливая географическая структура при отсутствии таксономической подразделенности, что объясняется наличием генетического потока между родственными видами. В то же время 14 nSSR-локусов хорошо разделили *Q. robur* и *Q. petraea* s. l. в соответствии с видовой принадлежностью во всех исследованных областях восточной части ареала и в симпатрических популяциях [36].

Изменчивость других видов *Quercus* крымско-кавказского региона и их таксономическая структура с помощью ядерных маркеров ранее не изучались. В настоящей работе мы впервые анализируем структуру изменчивости ядерных мультилокусовых маркеров (nSSR) всех наиболее распространенных таксонов робуроидных дубов на Кавказе и в Крыму с целью выявления основных генетических кластеров и сопоставления их с таксономическим подразделением, предложенным ранее на основе морфологических данных [1, 2, 6]. Предполагается решение следующих задач: 1) изучение возможности надежного разграничения видов на основе nSSR; 2) исследование филогенетических связей между таксонами и характера внутривидовой дифференциации; 3) уточнение таксономического статуса спорных таксонов. Для этого были выбраны морфологически чистые популяции семи исследуемых видов и подвидов, включая три подвида *Q. petraea*, из географически удаленных регионов Северного Кавказа, Закавказья, Крыма и Северо-Восточной Европы, в которых изучалась изменчивость 18 nSSR локусов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследовано семь наиболее распространенных в крымско-кавказском регионе таксонов *Quercus*, с учетом трех подвидов дуба скального *Q. petraea*, определяемых согласно Ю. Л. Меницкому [3, 6]. У дуба скального *Q. petraea* s. l. изучено 215 образцов из 12 популяций, в том числе 71 образец *Q. petraea* ssp. *petraea* (две популяции из Калининградской области и две из Крыма), 64 образца из выборки, относимых к дубу грузинскому *Q. petraea* ssp. *iberica* (три выборки из Закавказья, одна – из Дагестана), и 80 образцов из четырех выборок дуба известнякового *Q. petraea* ssp. *medwediewii* из Предкавказья, Центрального Кавказа и Крыма (табл. 1; рис. 1, а). Часть образцов из трех выборок *Q. petraea* s. l. (№ 1, 5, 8) ранее были использованы в исследовании с помощью 14 nSSR-локусов изменчивости *Q. robur* [36]. Дуб пушистый *Q. pubescens* (99 образцов) был исследован в двух географически удаленных регионах: три выборки из Крыма (59 шт.) и две – из Восточного Кавказа (Дагестан) (40 шт.). У дуба крупнопыльничкового *Q. macranthera* исследовано 50 деревьев из двух выборок Предгорного и Внутреннего Дагестана и двух локалитетов Малого Кавказа (Армения). У дуба черешчатого *Q. robur* в анализ было включено пять выборок из разных ботанико-географических районов Северного Кавказа, ранее исследованных по 14 локусам и принадлежащих разным генетическим кластерам *Q. robur* [36]. В настоящем исследовании в анализ были взяты образцы с имеющимися данными по 18 локусам, что несколько уменьшило размер выборок по сравнению с предыдущей работой [36]. У дуба Гартвиса *Q. hartwissiana* изучено 33 дерева из трех выборок Западного Кавказа, две из которых расположены на южном макросклоне и одна – на северном (табл. 1; рис. 1, а). Таким образом, количество образцов на таксон составляло от 33 (*Q. hartwissiana*) до 99 (*Q. pubescens*), в среднем 70.3 образцов.

Для исследования мы руководствовались целью сбора “чистых” таксонов, не затронутых гибридизацией, в первую очередь из районов, где нет близкородственных видов, или в популяциях, где они не произрастают симпатрически. При этом учитывались области распространения исследуемых таксонов на Кавказе и в Крыму, согласно данным Ю. Л. Меницкого [3] и Н. Д. Троицкого [9]. Выборки *Q. pubescens* были взяты из популяций с отсутствием *Q. petraea*. Материал собирался в естественных местообитаниях при расстоянии между деревьями не менее 50 м. Выборка составляла в среднем 17 особей, в большинстве случаев более 15 деревьев. В некоторых случаях размер выборки в труднодоступных районах (Грузия, Армения) или у редко встречающихся видов (*Q. hartwissiana*) был меньше. Предварительную таксономическую принадлежность устанавливали по описаниям [3, 6], учитывая морфологические признаки: длину плодоножки,

форму листа и длину черешка, характер опушения листа и побегов. Ваучерные образцы хранятся в лаборатории молекулярной экологии растений ИЭРиЖ УрО РАН. Названия таксонов (в ранге видов или подвидов) приводятся по Конспекту флоры Кавказа 2012 г. [6]. Выделение геномной ДНК проводили с помощью метода СТАВ [37] из высушенных в силикагеле листьев. Также были использованы образцы ДНК из наших предыдущих исследований хлоропластной ДНК [34, 35].

Анализ изменчивости 18 nSSR-локусов проводился в соответствии с описанным ранее [36] (табл. S1, Приложение), с использованием двух мультиплексов [20], за исключением из них локусов PIE223 и PIE258, так как при исследовании нами *Q. robur* и *Q. petraea* [36] в этих локусах наблюдались неспецифичные продукты амплификации. Хроматограммы преобразовывали в генотипические данные с помощью программы GeneMapper 3.5 (Applied Biosystems). Образцы с пропущенными данными в более чем четырех локусах были исключены из дальнейшего анализа. Следует отметить, что при смене марки размерного стандарта в некоторых локусах происходило существенное смешение определяемых размеров аллелей (от 1 до 4 пн). Смещение выявлялось и корректировалось с использованием реперных образцов с известными размерами аллелей, с включением в каждый анализируемый 96-луночный ПЦР планшет 2–4 реперных образцов. Также по сравнению с предыдущим исследованием был оптимизирован состав мультиплекса kit-1: для локуса PIE215 флуоресцентная метка TAMRA была заменена на FAM (табл. S1, Приложение), что улучшило его амплификацию и исключило смешение сигналов TAMRA и R6G. Замена флуоресцентной метки привела к занижению размеров аллелей на 5 пн, что также было скорректировано с помощью реперных образцов и повторным анализом части ранее анализированных образцов с новой меткой. Результирующие данные (размеры аллелей) были приведены в соответствие с набором данных, полученных для *Q. robur* и *Q. petraea* в работе [36].

Байесовскую кластеризацию генотипов проводили с помощью программы STRUCTURE 2.3.4 [38] с использованием модели “admixture”, коррелированных частот аллелей и без использования информации о таксономической или географической принадлежности. Значение K устанавливалось от 1 до 12 или от 1 до 10 в зависимости от набора образцов (см. Результаты). Было выполнено 10 прогонов программы STRUCTURE для каждого значения K . Каждый прогон включал 50000 шагов в качестве “отжига” и 100000 шагов для накопления данных. Оценку оптимального количества кластеров методом ΔK [39] и методом $LnP(D)$ [38] выполняли с помощью программы StructureSelector [40].

Таблица 1. Характеристика исследованных популяций видов *Quercus*

№	Популяция	с. ш.	в. д.	h, м над ур. морья	n	N _a	N _c	H _o	H _e	F (18 локусов)	P-value (18 локусов)	F (15 локусов)	P-value (15 локусов)
	<i>Q. petraea ssp. petraea</i>												
1	Светлогорск	54°55'56"	20°08'35"	50	15	7.278	4.499	0.769	0.725	-0.062	0.7741	-0.070	0.5927
2	Скрытное	54°45'24"	20°14'24"	64	18	8.278	4.923	0.719	0.722	0.031*	0.2129	-0.023	0.7832
3	г. Кагель	44°38'52"	34°23'40"	120	18	8.444	4.749	0.719	0.725	0.019*	<0.001	-0.061	0.4008
4	г. Сераус	44°38'38"	34°22'09"	395	20	8.500	4.650	0.706	0.727	0.039*	0.0338	0.007	0.1757
	Среднее				17.8	8.125	4.705	0.728	0.725	0.007	<0.001	-0.037	0.4911
	SE					0.409	0.276	0.025	0.018	0.025		0.017	
	<i>Q. petraea ssp. iberica</i>												
5	Цхинвал	42°14'57"	43°59'47"	1200	24	8.889	4.799	0.679	0.697	0.019*	0.0830	0.008	0.9104
6	Орбели	42°38'51"	42°48'52"	951	8	5.444	3.768	0.660	0.651	-0.015	0.5540	-0.036	0.6414
7	Боржоми	41°46'18"	43°28'22"	1473	8	6.111	4.110	0.688	0.683	-0.021	0.8621	-0.030	0.9158
8	Эрпели (Pt)	42°47'21"	46°58'40"	946	24 ^a	9.944	5.366	0.771	0.757	-0.009	0.0022	-0.045	0.2895
	Среднее				16	7.597	4.511	0.699	0.697	-0.007	0.0433	-0.026	0.9089
	SE					0.405	0.268	0.025	0.024	0.016		0.016	
	<i>Q. macrocarpa</i>												
9	Терменлик	42°44'59"	46°59'70"	1400	23	8.389	4.487	0.669	0.670	-0.011	0.0558	-0.011	0.5213
10	Росноб	42°02'44"	46°25'08"	1710	17	7.000	4.167	0.689	0.671	-0.034	0.5014	-0.038	0.6214
11	Дилижан	40°42'04"	44°50'49"	1587	6 ^a	5.500	3.852	0.654	0.638	-0.030	0.6156	-0.034	0.5736
12	Вайк ^b	39°41'42"	45°34'25"	1391	4 ^b	—	—	—	—	—	—	—	—
	Среднее				12.5	6.963	4.169	0.671	0.659	-0.025	0.2273	-0.028	0.7384
	SE					0.513	0.350	0.030	0.029	0.020		0.022	
	<i>Q. petraea ssp. medwedievii</i>												
13	Русск. лесная дача	45°02'13"	41°52'10"	671	17	6.944	3.905	0.654	0.640	-0.016	0.3964	-0.026	0.5586
14	Балта	42°55'12"	44°38'21"	1000	17 ^a	6.722	3.862	0.623	0.649	0.036	<0.013	0.004	0.6581
15	Бешгау	44°07'16"	43°03'44"	529	23	7.500	3.875	0.635	0.654	0.022	0.0478	-0.032	0.6294
16	г. Агармыш	45°01'10"	35°01'53"	350	23	8.278	3.949	0.638	0.662	0.038	0.0910	0.014*	0.0925

Таблица 1. Окончание

№	Популяция	с. ш.	в. д.	h, м над ур. морья	n	N _a	N _e	H ₀	H _e	F (18 локусов)	P-value (18)	F (15 локусов)	P-value (15)
	Среднее				20	7.361	3.898	0.637	0.652	0.020	0.0025	-0.010	0.4492
	SE					0.358	0.242	0.027	0.025	0.018		0.017	
	<i>Q. pubescens</i>												
17	Новый Свет	44°50'17"	34°55'03"	200	18	10.278	6.324	0.768	0.793	0.028*	<0.001	0.013	0.3621
18	Арпат	44°51'27"	34°43'16"	260	22	10.889	6.686	0.813	0.797	-0.017	0.4689	-0.047	0.7460
19	Корейская тропа	44°27'23"	34°04'18"	275	19	9.944	6.015	0.728	0.783	0.071*	<0.001	0.042*	0.0967
20	г. Чипчарак	43°07'29"	46°59'49"	290	16	8.500	4.604	0.764	0.755	-0.014	0.1633	-0.034	0.3348
21	Зидьян-Казмаляр	42°05'18"	48°09'30"	160	24	8.944	4.818	0.770	0.754	-0.021	0.6753	-0.055	0.9940
	Среднее				19.8	9.711	5.689	0.769	0.777	0.009	<0.001	-0.016	0.6261
	SE					0.357	0.266	0.016	0.014	0.013		0.011	
	<i>Q. robur</i>												
22	Самур	41°50'16"	48°31'19"	7	23	7.611	4.115	0.653	0.700	0.080*	<0.001	-0.010	0.0995
23	Эртели (Rb)	42°47'21"	46°58'40"	946	10	6.500	4.045	0.677	0.695	0.029*	0.0942	-0.068	0.9495
24	Буденновск	44°45'23"	44°09'55"	93	20	7.333	4.159	0.728	0.710	-0.030	0.2694	-0.063	0.6869
25	Семигорский	44°53'53"	37°36'10"	100	22	8.389	4.835	0.733	0.732	-0.005	0.3263	-0.032	0.7763
26	Убинская	44°42'20"	38°31'27"	133	20	8.222	4.471	0.673	0.713	0.051*	<0.001	-0.015	0.5671
	Среднее				19	7.611	4.325	0.693	0.710	0.025	<0.001	-0.038	0.7577
	SE					0.299	0.204	0.023	0.016	0.023		0.014	
	<i>Q. hartwissiana</i>												
27	Мзымта	43°29'00"	39°59'26"	80	8	5.000	3.393	0.639	0.627	-0.028	0.7018	-0.027	0.6856
28	Анастасиевка	44°09'55"	39°16'02"	120	7	4.722	3.327	0.634	0.646	0.029*	0.9048	0.034*	0.8795
29	Перевалка	44°02'27"	40°45'30"	700	18	6.500	3.626	0.633	0.626	-0.011	<0.065	-0.021	<0.878
	Среднее				11	5.407	3.448	0.635	0.633	-0.003	<0.541	-0.005	<0.538
	SE					0.339	0.234	0.033	0.027	0.029		0.034	
	Среднее, все виды					7.716	4.478	0.696	0.700	0.006	<0.001	-0.023	0.8785
	SE					0.152	0.103	0.010	0.008	0.008		0.007	

Примечание. n – размер выборки; N_a – среднее число аллелей; N_e – эффективное число аллелей; H₀ – наблюдаемая гетерозиготность; H_e – ожидаемая гетерозиготность; F – коэффициент инбридинга; P-value – результаты “Probability”-теста на отклонение от соотношения Харди–Вайнберга. * Отклонение от соотношения Харди–Вайнберга по результатам “Global”-теста (P < 0.05).

^a Показатели изменчивости вычислялись после удаления образца, не соответствующего таксону выборки (см. Результаты).

^b Выборка Вайк была объединена с выборкой Дилижан для подсчета параметров изменчивости из-за малого размера выборки.

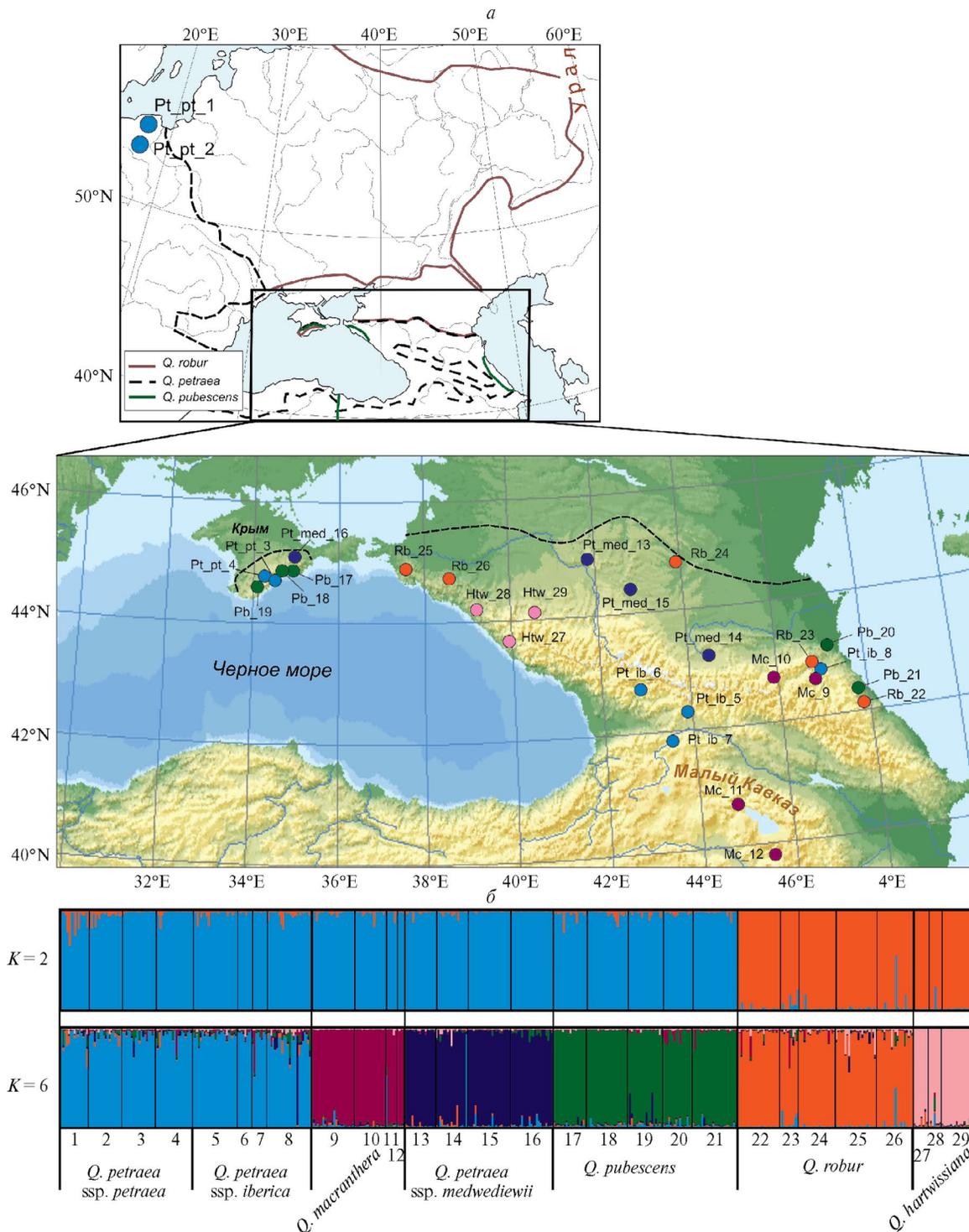


Рис. 1. а. Географическое распределение исследованных выборок семи таксонов робуроидных дубов в крымско-кавказской и северо-европейской частях ареала. Номера выборок соответствуют указанным в табл. 1. Обозначение таксонов: Rb – *Q. robur*, Pb – *Q. pubescens*, Mc – *Q. macranthera*, Htw – *Q. hartwissiana*, Pt_pt – *Q. petraea* ssp. *petraea*, Pt_ib – *Q. petraea* ssp. *iberica*, Pt_med – *Q. petraea* ssp. *medwediewii*. Цветовые обозначения выборок соответствуют преобладающим генетическим кластерам STRUSTRUCTURE при $K = 6$ (рис. 1, б). Пунктирной линией обозначена северная граница ареала дуба в регионе. **Рис. 1, б.** Распределение генетических кластеров, вычисленное с помощью STRUSTRUCTURE на основе 18 микросателлитных локусов для 29 популяции (492 особей) пяти видов *Quercus* при $K = 2, 6$. Каждый образец представлен вертикальным столбцом, разделенным на два или шесть цветных сегментов пропорционально участию каждого генетического кластера.

Объединение нескольких прогонов осуществляли с помощью программы Clumpak [41].

Анализ STRUCTURE был проведен для нескольких наборов данных. Набор 1 включал 492 образца из 29 популяций всех исследованных таксонов. Оптимальное число кластеров, согласно методу ΔK , в данном случае было равно двум (см. Результаты), при этом разделение на кластеры соответствовало разделению на две группы видов – “сидячецветные” (*Q. pubescens*, *Q. macranthera*, *Q. petraea* s. l.) и “длинноплодоножковые” (*Q. robur*, *Q. hartwissiana*). Набор 2 STRUCTURE включал сидячецветные дубы (364 образца, 21 популяция) и набор 3 STRUCTURE – длинноплодоножковые *Q. robur* и *Q. hartwissiana* (128 образцов, 8 популяций).

Известно, что низкая представленность в исследуемом с помощью STRUCTURE наборе данных отдельных таксонов или популяций приводит к ошибочному отнесению соответствующих особей к неправильному таксону или гибриду [42]. Для исследования важности присутствия в анализе STRUCTURE референсных групп, предположительно соответствующих всем представленным таксонам, нами были проведены варианты анализов, “моделирующих” возможный пропуск отдельных таксонов.

“Моделируемый” вариант 1 – отсутствие в STRUCTURE референсных групп *Q. p. ssp. medwediewii*: из анализа были удалены все выборки *Q. p. ssp. medwediewii*, но оставлено четыре образца с 90% кластера *Q. p. ssp. medwediewii*. “Моделируемый” вариант 2 – отсутствие референсной группы *Q. hartwissiana*: из анализа были удалены все выборки *Q. hartwissiana*, оставлено четыре образца с 90% кластера *Q. hartwissiana*.

Для исследования возможности дифференциации таксонов при меньшем числе локусов анализы STRUCTURE были проведены отдельно для двух мультиплексов: десять локусов (kit-1) и восемь локусов (kit-2) для всех 492 индивидуумов.

Выявленные по результатам STRUCTURE образцы (всего три индивидуума), не относящиеся к таксону, соответствующему выборке (см. Результаты), были исключены из анализа изменчивости и дифференциации таксонов. С помощью программы GenAlEx v 6.5 [43] были рассчитаны следующие показатели: общее количество аллелей (A), число аллелей на локус (N_a), эффективное число аллелей (N_e), наблюдаемая H_o и ожидаемая H_e гетерозиготность, коэффициент инбридинга F для каждой популяции, индексы фиксации (F_{IS} , F_{ST}) для каждого локуса (табл. 1, 2). Отклонения от равновесия Харди–Вайнберга по популяциям и локусам оценивали с помощью GENEPOP [44], с использованием “Probability”-теста, а также “Global”-теста с альтернативной гипотезой $H1$ = недостаток гетерозигот/избыток гетерозигот. Наличие нуль-аллелей

в локусах оценивали с помощью программы MICRO-CHECKER [45].

Посредством GenAlEx был выполнен иерархический анализ молекулярной изменчивости (AMOVA) для всех таксонов и популяций, вычислены парные межпопуляционные F_{ST} , проведен анализ главных координат (PCoA) на основе генетических расстояний [46]. Для визуализации степени генетических различий между популяциями и таксонами была построена дендрограмма на основе матрицы парных межпопуляционных F_{ST} с помощью метода невзвешенных парно-групповых средних (UPGMA) в программе NTSYS-pc [47].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Изменчивость микросателлитных локусов

Все исследованные таксоны *Quercus* показали успешную амплификацию во всех локусах. Суммарно в 29 популяциях по 18 локусам было обнаружено 389 аллелей. Их число на локус изменялось от 10 (PIE227) до 50 (QrZAG11), при среднем на локус – 21.6 (табл. 2). Эффективное число аллелей (N_e) варьировало от 2.038 (локус PIE239) до 7.906 (QrZAG7) при среднем на локус 4.478. Большинство локусов показали высокую изменчивость у всех видов, исключение составлял локус PIE239, который был почти неизменчив у *Q. macranthera* и *Q. hartwissiana*. Размеры фрагментов в локусах (табл. 2; табл. S2, Приложение) в целом соответствуют приводимым в работе [20] и нашему предыдущему исследованию *Q. robur* [36]. Однако следует отметить, что размеры аллелей в микросателлитных локусах, определенные с помощью капиллярного электрофореза (без секвенирования, только на основе размерного стандарта), могут значительно варьировать между исследованиями, в том числе в зависимости от использованного размерного стандарта и флуоресцентной метки данного локуса (см. Материалы и методы).

У отдельных локусов в небольшом количестве встречались аллели, не кратные длине мотива, больше всего таких наблюдалось у QrZAG11, что привело к большому количеству аллелей в данном локусе. У большинства локусов отсутствовали неспецифичные продукты и дополнительные аллели. Следует отметить, что в 90% образцов *Q. macranthera* в пределах диапазона локуса MsQ13 встречался продукт размером 192 пн, первоначально рассматриваемый как аллель, но поскольку продукт в большинстве случаев наблюдался в сочетании с гетерозиготой по двум другим аллелям, он был исключен из анализа как неспецифичный, после чего отклонений от соотношения Харди–Вайнберга у *Q. macranthera* по данному локусу не наблюдалось.

Таблица 2. Характеристика и параметры изменчивости 18 микросателлитных локусов

Локус	Размер, пн	A	N_a	N_e	H_o	H_e	F_{IS}	P -value	F_{ST}
kit-1									
PIE020	97–127	13	5.214	3.193	0.708	0.658	–0.076*	0.842	0.137
PIE152	233–281	31	10.571	6.197	0.846	0.827	–0.023	0.958	0.088
PIE242	107–135	15	8.571	5.644	0.821	0.817	–0.005*	0.174	0.082
PIE102	137–181	23	7.679	3.755	0.670	0.671	0.003	0.776	0.135
PIE243	201–241	21	6.964	3.389	0.690	0.657	–0.051	0.770	0.204
PIE267	90–120	15	6.071	3.816	0.723	0.715	–0.012	0.594	0.147
PIE215	192–225	13	6.571	4.299	0.740	0.733	–0.009	0.480	0.119
PIE239	86–104	16	3.964	2.038	0.270	0.405	0.334*	<0.001	0.303
PIE227	154–181	10	4.143	2.272	0.532	0.508	–0.047	0.812	0.275
PIE271	186–212	17	7.107	3.903	0.732	0.711	–0.030	0.676	0.110
Среднее		17.4	6.686	3.851	0.673	0.670	0.008		0.160
kit-2									
QrZAG7	116–162	24	11.786	7.906	0.893	0.853	–0.046	0.962	0.081
MsQ13	188–250	26	8.179	4.953	0.796	0.763	–0.043	0.612	0.135
QrZAG112	77–121	22	6.536	3.712	0.569	0.552	–0.030*	0.031	0.251
QrZAG20	157–197	23	9.250	5.791	0.808	0.803	–0.006*	0.159	0.093
QrZAG96	143–189	24	9.464	5.521	0.655	0.715	0.084*	<0.001	0.210
QrZAG11	231–285	50	11.071	6.102	0.689	0.813	0.153*	<0.001	0.139
QpZAG15	107–147	19	6.250	2.934	0.613	0.618	0.008	0.666	0.188
QpZAG110	202–256	27	9.500	5.173	0.770	0.781	0.014	0.257	0.084
Среднее		26.9	9.005	5.262	0.724	0.737	0.017		0.148
СРЕДНЕЕ		21.6	7.716	4.478	0.696	0.700	0.012	<0.001	0.155
SE			0.152	0.103	0.010	0.008	0.023		0.016
Всего		389							

Примечание. A – общее число аллелей; N_a – среднее число аллелей на популяцию; N_e – эффективное число аллелей; H_o – наблюдаемая, H_e – ожидаемая гетерозиготность; F_{IS} , F_{ST} – индексы фиксации; P -value – результаты “Probability”-теста на отклонение от соотношения Харди–Вайнберга.

* Отклонение от соотношения Харди–Вайнберга по результатам “Global”-теста ($P < 0.05$).

Присутствие нуль-аллелей выявлено в локусах QrZAG11, PIE239, QrZAG96 в десяти, девяти и пяти популяциях соответственно. Для локуса PIE242 определено наличие нуль-аллеля в двух выборках, еще для шести локусов – в одной выборке. Локусы QrZAG11, PIE239, QrZAG96 показали значимое отклонение от соотношения Харди–Вайнберга в сторону недостатка гетерозигот (табл. 2). При подсчете по отдельным таксонам эти локусы отклонялись от равновесия в большинстве случаев (табл. S2, Приложение). Кроме трех локусов с максимальным отклонением, при суммарном анализе всех популяций также отклонялся от равновесия

локус QrZAG112, но при подсчете по отдельным таксонам отклонение локуса QrZAG112 было значимым только для *Q. p. ssp. iberica* и *Q. hartwissiana*. В отдельных случаях “Probability”-тест показал значимое отклонение от соотношения Харди–Вайнберга: для *Q. p. ssp. medwediewii* – в локусах PIE242, QrZAG110, *Q. p. ssp. petraea* – в локусе PIE227, *Q. macranthera* – QrZAG20, *Q. pubescens* – MsQ13, *Q. hartwissiana* – PIE242 (табл. S2, Приложение). Суммарно по 18 локусам и по всем популяциям отклонение от равновесия было значимым как для общей совокупности популяций (табл. 1), так и для большинства таксонов (табл. S3, Приложение).

“Probability”-тест при подсчете по 18 локусам показал значимое отклонение для восьми выборок. При проведении “Global”-теста значимый недостаток гетерозигот обнаружен в 10 популяциях (табл. 1).

Повторный тест провели без трех локусов, в которых наблюдалось наибольшее отклонение от равновесия (PIE239, QrZAG96, QrZAG11). По 15 локусам “Probability”-тест не показал значимого отклонения ни в одной из популяций (табл. 1). “Global”-тест на дефицит гетерозигот был значим для трех выборок разных таксонов (№ 16, 19, 28). Суммарно по всем локусам и по всем популяциям значимого отклонения от равновесия не наблюдалось ($F = -0.023$, $P = 0.8785$) (табл. 1).

Таким образом, популяции исследуемых таксонов, как показано по 15 nSSR-локусам, находятся в равновесии, что свидетельствует об их таксономической однородности. Существенный недостаток гетерозигот в локусах PIE239, QrZAG96 и QrZAG11 предположительно вызван присутствием в этих локусах нуль-аллелей, что также было отмечено для этих локусов в других исследованиях [14, 23, 30, 32, 36]. Однако было показано [23], что наличие нуль-аллелей с незначительной частотой, в том числе для локусов QrZAG11 и QrZAG96, не влияет на точность таксономического определения. В нашем случае только небольшая часть популяций имела значимое содержание нуль-аллелей; кроме того, значение подразделенности F_{ST} было выше среднего значения у двух (PIE239, QrZAG96) из трех отклоняющихся локусов, т. е. они вносили существенный вклад в дифференциацию таксонов. В результате было решено оставить локусы PIE239, QrZAG96, QrZAG11 в дальнейшем анализе.

Показатели изменчивости в мультиплексе из десяти EST-SSR-локусов (kit-1) в среднем были ниже, чем у восьми геномных SSR-локусов (kit-2) (табл. 2), однако значение подразделенности F_{ST} в среднем совпадало между мультиплексами. При объединенном анализе всех популяций F_{ST} было значимым для всех локусов и варьировало от минимального $F_{ST} = 0.081$ (локус QrZAG7) до максимального $F_{ST} = 0.303$ (PIE239) при среднем по локусам $F_{ST} = 0.155$ (табл. 2). Значения F_{ST} выше среднего встречались в каждом из двух мультиплексов, у локусов PIE243 (0.204), PIE239 (0.303), PIE227 (0.275), QrZAG112 (0.251), QrZAG96 (0.210), QrZAG15 (0.188).

Средняя ожидаемая гетерозиготность изменялась между таксонами от $H_e = 0.633$ (*Q. hartwissiana*) до $H_e = 0.777$ (*Q. pubescens*) (табл. 1). Наиболее высокая изменчивость наблюдалась в выборках дуба пушистого, варьируя от 0.754 до 0.797 и достигая максимальных значений в крымских популяциях *Q. pubescens*. У типового подвида дуба скального *Q. p. ssp. petraea* также наблюдалась высокая изменчивость, мало меняющаяся между выборками

(от 0.722 до 0.727), которая была выше, чем у закавказского подвида *Q. p. ssp. iberica*. У последнего она значительно варьировала от высокой в Дагестане (0.757) до сниженной в Закавказье (0.697). У *Q. macranthera* по сравнению с дубом скальным изменчивость была снижена, $H_e = 0.659$ (0.638–0.671). У исследованных кавказских популяций *Q. robur* средняя ожидаемая гетерозиготность составляла $H_e = 0.710$ (0.695–0.732). У *Q. hartwissiana* изменчивость была ниже, чем у *Q. robur*, $H_e = 0.633$ (0.626–0.646). У *Q. p. ssp. medwediewii* показатели изменчивости были ниже, чем у других широко распространенных таксонов Кавказа, $H_e = 0.652$ (0.640–0.662), и находились примерно на уровне изменчивости дуба Гартвиса и дуба крупнопыльникового.

Таксономическая и географическая структура изменчивости

Наборы аллелей у разных таксонов существенно перекрываются (табл. S2, Приложение). Наиболее частые аллели в локусах встречаются обычно во всех таксонах, но с разной частотой. Мы не обнаружили диагностических аллелей и локусов, по которым однозначно можно было бы определить таксон или отделить один таксон от другого. Аллели, специфичные для таксонов, встречались с низкой частотой. Несколько локусов показывали преобладание одного аллеля и низкое разнообразие у отдельных видов, при этом они были высоко изменчивыми у других видов. Например, в локусе PIE239 (с максимальным значением F_{ST}) аллель “88” встречается во всех таксонах с частотой, варьирующей от 0.136 (*Q. pubescens*), 0.351 (*Q. robur*) и 0.411 (*Q. p. ssp. medwediewii*) до 0.980 и 0.970 у *Q. macranthera* и *Q. hartwissiana*. В локусе QrZAG96 частота “короткого” аллеля “143” варьировала от 0.601 (*Q. robur*) и 0.576 (*Q. hartwissiana*) до 0.127 (*Q. p. ssp. petraea*) и 0.123 (*Q. p. ssp. iberica*), достигая почти нулевых значений у *Q. p. ssp. medwediewii* (0.025), *Q. pubescens* (0.015) и *Q. macranthera* (0.0). Интересно, что у *Q. macranthera* в локусе QrZAG96 преобладает аллель “145” (частота 0.806), который является редким у других таксонов.

По результатам AMOVA, уровень генетической дифференциации между семью таксонами F_{RT} составлял 0.102 ($P = 0.001$), что в 3 раза выше, чем дифференциация внутри таксонов ($F_{SR} = 0.032$, $P = 0.001$). Внутри таксонов (табл. S2, Приложение) максимальная дифференциация между популяциями выявлена у *Q. robur*, $F_{ST} = 0.077$, значимая для 17 локусов. Также дифференцированы популяции *Q. pubescens* ($F_{ST} = 0.042$), *Q. p. ssp. petraea* ($F_{ST} = 0.051$), *Q. hartwissiana* ($F_{ST} = 0.059$), *Q. p. ssp. iberica* ($F_{ST} = 0.041$). Наименее подразделены выборки *Q. macranthera* ($F_{ST} = 0.031$) и *Q. p. ssp. medwediewii* ($F_{ST} = 0.032$), для которых по большинству локусов значения F_{ST} недостоверны между выборками.

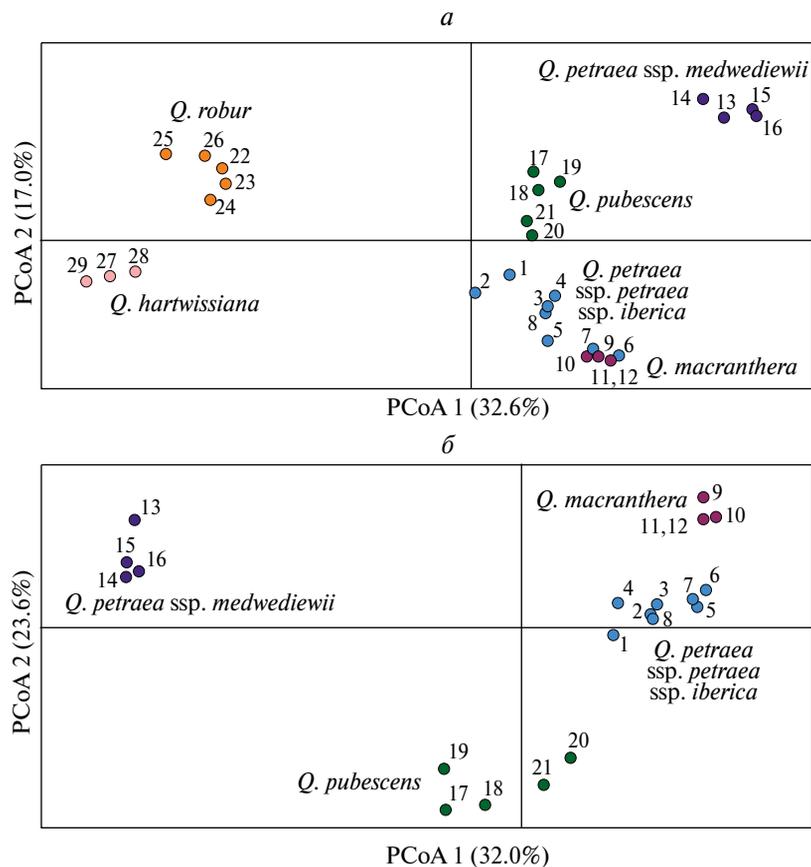


Рис. 2. PCoA-ординация, основанная на изменчивости 18 nSSR-локусов. *a* – популяции семи таксонов робуроидных дубов; *б* – популяции сидячецветных дубов *Q. petraea* s. l., *Q. macranthera*, *Q. pubescens*. Популяции обозначены цветом в соответствии с доминирующим кластером STRUCTURE при числе кластеров $K = 6$ при наборе 1 (см. рис. 1, б).

UPGMA-дендрограмма исследованных популяций (рис. S1, Приложение), построенная на основе парных F_{ST} , хорошо соответствует результатам анализа STRUCTURE, которые отражены в виде диаграмм частот соответствующих кластеров для каждой популяции (при $K = 6$, набор 1, см. далее). Наиболее глубокая дивергенция наблюдается между кладой I (*Q. robur* и *Q. hartwissiana*, цикл *Pedunculatae* Maleev [1], видов с длинной плодоножкой, далее в тексте – “длинноплодоножковые” таксоны) и кладой II (*Q. p. ssp. petraea-iberica*, *Q. p. ssp. medwediewii*, *Q. pubescens* цикла *Sessiliflorae* Maleev, а также *Q. macranthera*, видов с короткой плодоножкой, далее – “сидячецветные” таксоны) с последующим разделением на субклады отдельных таксонов. Усредненные значения парных F_{ST} между таксонами приведены в табл. S3 Приложения. Значения парных F_{ST} между таксонами клады II и *Q. robur* в среднем составляют 0.106, с *Q. hartwissiana* – 0.130. Внутри клады II значения парных F_{ST} между популяциями разных таксонов ниже: в среднем 0.081 (от 0.067 до 0.106). Внутри видов и подвидов

значения парных межпопуляционных F_{ST} были менее 0.05.

Различия между таксонами наглядно иллюстрируются ординацией популяций на основе генетических дистанций (рис. 2). По первой компоненте происходит дифференциация популяций “сидячецветных” от “длинноплодоножковых” таксонов, по второй компоненте подразделяются более близкие таксоны (рис. 2, *a*). При рассмотрении на PCoA только группы “сидячецветных” дубов (рис. 2, *б*) наиболее дифференцированной оказывается *Q. p. ssp. medwediewii*, также по первой компоненте отделяется *Q. pubescens*, далее *Q. macranthera* отделяется от *Q. petraea* и прослеживается дифференциация *Q. pubescens* на западную и восточную группы. При анализе PCoA, ограниченном только популяциями *Q. petraea* без *Q. p. ssp. medwediewii* (рис. S2, Приложение), по первой компоненте расходятся подвиды *Q. p. ssp. petraea* и *Q. p. ssp. iberica*, по второй компоненте *Q. p. ssp. petraea* разделяется на европейские и крымские популяции.

Анализ STRUCTURE по 18 nSSR-локусам всех исследуемых таксонов робуроидных дубов был проведен для 492 образцов (набор 1). При сложном таксономическом составе с различной степенью родства анализом STRUCTURE выявляется иерархическая структура: при числе кластеров $K = 2$ (максимальное значение ΔK , рис. S3a) исследуемые таксоны разделяются на две группы: объединенный кластер *Q. robur* и *Q. hartwissiana* (оранжевый) и объединенный кластер остальных таксонов (голубой) (рис. 1, б). При $K = 3, 4, 5$ разделение на кластеры между прогонами было неустойчивым, с поочередным отделением отдельных таксонов (*Q. p. ssp. medwediewii*, *Q. pubescens*, *Q. macranthera*) от остальных. Второй пик ΔK наблюдался при $K = 6$ (рис. S3a). При данном числе кластеров также достигалось высокое значение $LnP(K)$ (рис. S3б), и соответственно число кластеров, равное шести, было выбрано в качестве оптимального. На рис. 1, б представлены результаты анализа STRUCTURE для числа кластеров $K = 2$ и $K = 6$. При $K = 6$ выделяются генетические кластеры, соответствующие следующим видам, подвидам и группам: 1) кластер,

общий для двух подвигов *Q. petraea ssp. petraea* и *Q. p. ssp. iberica* (голубой кластер); 2) кластер *Q. macranthera* (пурпурный); 3) кластер *Q. petraea ssp. medwediewii* syn. *Q. calcarea* (темно-фиолетовый); 4) кластер *Q. pubescens* (зеленый); 5) кластер *Q. robur* (оранжевый); 6) кластер *Q. hartwissiana* (розовый). При $K = 6$ также выявляется минорная конфигурация (minor, 5/10, данные не приводятся), в которой голубой кластер разделяется на два в соответствии с подвидами – *Q. petraea ssp. petraea* и *Q. petraea ssp. iberica*, при этом *Q. robur* и *Q. hartwissiana* остаются в одном кластере.

При раздельном анализе двух основных групп (набор 2 – сидяцветные дубы и набор 3 – длинноплодоножковые дубы) прослеживается подразделение на таксоны аналогично набору 1, с дальнейшим разделением на географические группы популяций внутри таксонов при увеличении числа кластеров. На рис. 3 представлены результаты анализа STRUCTURE для набора 2 (сидяцветные таксоны) при числе кластеров $K = 4, 5, 6, 7$. Наибольшее значение ΔK было получено для $K = 4$, наибольшее значение $LnP(K)$ для $K = 6$ (рис. S4).

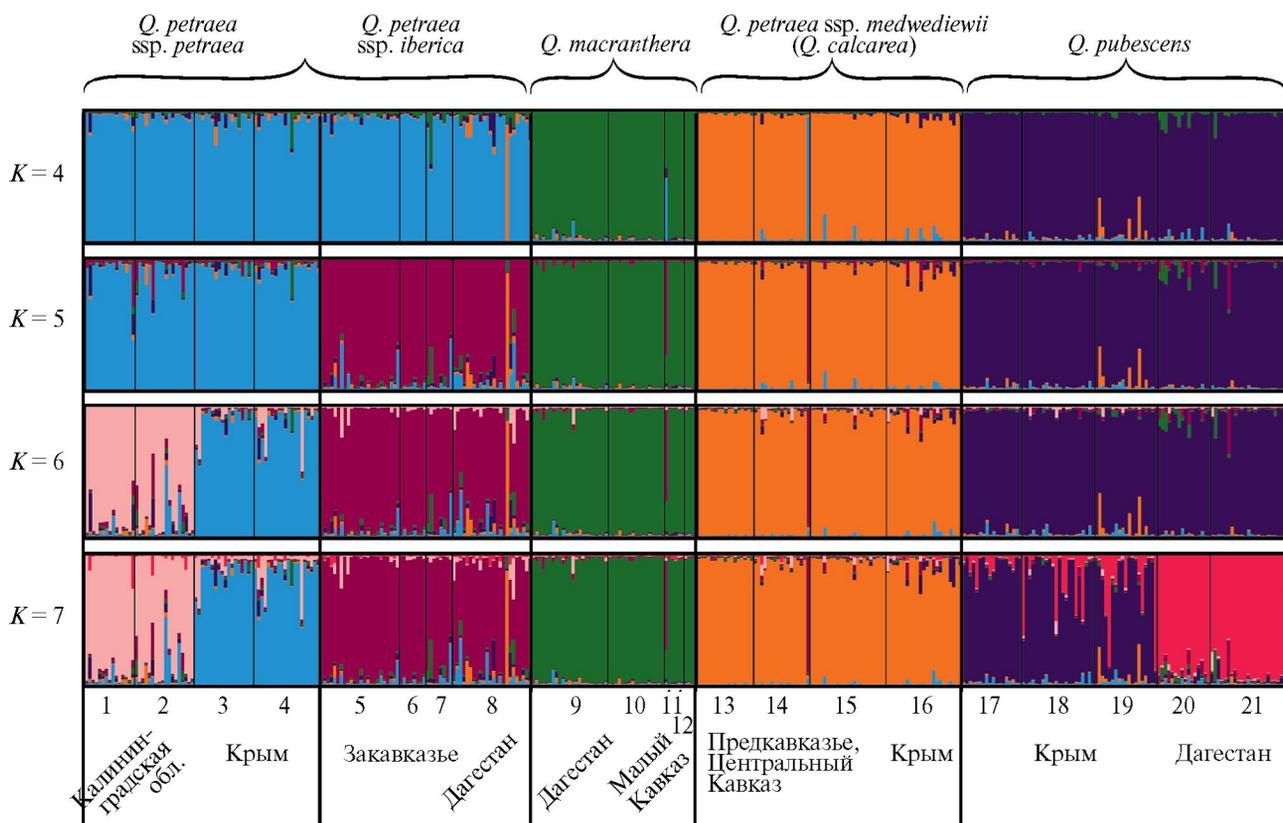


Рис. 3. Распределение генетических кластеров, вычисленное с помощью STRUCTURE на основе 18 микросателлитных локусов для 364 особей *Q. petraea* s. l., *Q. macranthera*, *Q. pubescens* (набор 2) при $K = 4, 5, 6, 7$. Каждый образец представлен вертикальным столбцом, разделенным на сегменты пропорционально участию каждого генетического кластера.

При наиболее вероятном числе кластеров $K = 4$ образцы разделяются на четыре группы, совпадающие с разделением при $K = 6$ для набора 1. Далее при $K = 5$ голубой кластер разделяется на два кластера в соответствии с подвидами *Q. p. ssp. petraea* и *Q. p. ssp. iberica*. При $K = 6$ *Q. p. ssp. petraea*, в свою очередь, разделяется на две группы: европейские выборки *Q. petraea* (№ 1, 2) и крымские выборки *Q. petraea* (№ 3, 4). При $K = 7$ *Q. pubescens* разделяется на два кластера – западный (Крым, № 17–19) и восточный (Дагестан, № 20, 21).

При отдельном анализе только образцов *Q. robur* и *Q. hartwissiana* (набор 3) максимальное значение ΔK было получено для $K = 2$ (рис. S5a), при котором индивидуумы разделяются в соответствии с видовой принадлежностью на *Q. robur* и *Q. hartwissiana*. Второй пик наблюдался при $K = 5$. Значение $\ln P(K)$ последовательно повышалось, достигая максимума при $K = 5$ (рис. S5б). На рис. S6 Приложения приведены результаты STRUCTURE для $K = 2, 3, 4, 5$. При увеличении числа K происходит разделение *Q. robur* на географические группы, чего не наблюдается для *Q. hartwissiana*. При $K = 3$ *Q. robur* разделяется на кластеры восточно-кавказских (№ 22–24) и западно-кавказских (№ 25, 26) популяций. Далее при $K = 4$ наблюдается дифференциация в западно-кавказском, а при $K = 5$ – в восточно-кавказском кластере.

Круговые диаграммы частот кластеров STRUCTURE по популяциям представлены на рис. S1. Содержание кластеров было вычислено для популяций при наборе 1 ($K = 6$), за исключением трех индивидуумов, которые не соответствовали таксономической принадлежности (см. далее). Доля соответствующего таксону кластера составляла во всех популяциях более 85% (в среднем 93%): в выборках *Q. robur* – 91% (от 85 до 95%), *Q. hartwissiana* – 94% (от 92 до 97%), *Q. p. ssp. petraea* – 92% (от 90 до 93%), *Q. p. ssp. iberica* – 91.5% (от 85 до 95%), *Q. pubescens* – 93% (от 85 до 95%), *Q. p. ssp. medwediewii* – 93% (от 91 до 96%), *Q. macranthera* – 95% (от 94 до 97%).

Особенности генотипирования при микросателлитном анализе

Обнаружено, что содержание кластера другого таксона в выборке может быть около 2% даже при невозможности современной гибридизации. Например, STRUCTURE показывает 2% кластера западно-кавказского вида *Q. hartwissiana* в выборке № 23 *Q. robur* и 3% в выборке № 14 *Q. p. ssp. medwediewii* в Восточном и Центральном Кавказе, 2.2% кластера восточно- и закавказского *Q. macranthera* в выборке № 4 *Q. petraea* в Крыму. То есть возможную гибридизацию можно предполагать, только если процент “чужого” кластера повышен до 4–5% в популяции и при потенциальной

возможности генетического потока благодаря перекрытию ареалов. Повышенное содержание кластера *Q. robur* наблюдается в выборках № 1 (4.2%) и № 27 (3.7%), кластера *Q. p. ssp. medwediewii* – в выборке № 19 (5.3%), кластера *Q. pubescens* – № 8 (4.3%), кластера *Q. hartwissiana* – № 25 (5.9%), кластера *Q. macranthera* – 5% в выборках № 20 и № 23. Все эти случаи совпадают с возможностью гибридизации благодаря симпатрии.

Поскольку видовая принадлежность образцов устанавливалась визуально в полевых условиях, в собранном материале встречались ошибочно определенные индивидуумы, что ожидаемо, учитывая значительное перекрытие у рассматриваемых таксонов диагностических признаков. В двух выборках (№ 8 и № 14) было выявлено по одному образцу, которые анализ STRUCTURE относил к кластеру другого подвида внутри *Q. petraea* (рис. 1, б, рис. 3), что соответствовало возможному географическому распространению подвидов при перекрытии ареалов (см. Обсуждение). В одной из выборок *Q. macranthera* (№ 11) был выявлен образец, у которого соотношение между кластерами, соответствующими *Q. p. ssp. iberica* и *Q. macranthera* согласно STRUCTURE, было примерно 65 : 35%, что вероятно указывает на гибрид с преобладанием *Q. p. ssp. iberica*. По гербарному материалу выяснилось, что у данного образца отсутствовало характерное для *Q. macranthera* опушение. Результаты микросателлитного анализа позволили правильно установить таксономическую принадлежность некоторых образцов, но, кроме того, встречено определенное количество, по-видимому, настоящих гибридов: один индивидуум в популяции *Q. p. ssp. iberica* № 7 имел 35% кластера *Q. macranthera*. В популяции *Q. pubescens* № 19 два образца имели по 25–30% кластера *Q. p. ssp. medwediewii*, в популяциях *Q. robur*: в выборке № 25 три образца имели 25–30% кластера *Q. hartwissiana*, в № 23 у одного образца – 35% кластера *Q. macranthera*, в № 26 у одного образца – 45% кластера *Q. petraea*.

Для исследования возможности выявления кластера таксона при его малой представленности в данных был проведен ряд экспериментов с использованием STRUCTURE (см. Материалы и методы). “Моделируемый” вариант 1 исключал из анализа *Q. p. ssp. medwediewii*, кроме четырех образцов. При наиболее вероятном числе кластеров $K = 4$ эти образцы были отнесены алгоритмом к кластеру *Q. pubescens*, далее при увеличении числа кластеров – к гибридным образцам нескольких таксонов, и только лишь при числе $K = 9$ выделился отдельный кластер четырех образцов *Q. p. ssp. medwediewii* (данные не приводятся). В “моделируемом” варианте 2, исключаящем из анализа референсные популяции *Q. hartwissiana*, четыре оставленных образца дуба Гартвиса были отнесены к *Q. robur* и не выделялись в отдельный кластер

ОБСУЖДЕНИЕ

*Дифференциация таксонов Quercus
крымско-кавказского региона
по микросателлитным данным*

до достижения $K = 12$. Таким образом, сниженное количество определенного таксона в анализе STRUCTURE, по сравнению с представленностью остальных групп, приводит к неверному определению образца при наиболее правдоподобном числе кластеров и выявляет видоспецифичный кластер только при значительном числе K (что обычно не отвечает критериям оптимальности и не рассматривается в исследованиях).

При выполнении анализа STRUCTURE с различными наборами видов (наборы 1, 2, 3) показано, что при отсутствии отдельных таксонов в анализе может быть неверная интерпретация гибридов: например, при наборе 3 (включающем только *Q. hartwissiana* и *Q. robur*) в выборке *Q. hartwissiana* № 28 один образец содержал 50% кластера *Q. robur* (рис. S6). При наборе 1 (рис. 1, б) данный индивидуум оказывается смешанным гибридом с вкладом *Q. petraea/Q. pubescens* без участия *Q. robur*. Некоторые гибриды вообще не выявляются при пропуске таксонов, например, в выборке *Q. robur* № 26 при наборе 1 выявился гибрид с 45% кластера *Q. petraea*, чего не показывал набор 3.

Для исследования возможности дифференциации таксонов при меньшем числе локусов анализа STRUCTURE были проведены отдельно для двух мультиплексов: десять локусов (kit-1) и восемь локусов (kit-2). Состав кластеров, на которые при этом подразделялись популяции, не изменился (данные не приводятся), что показывает возможность идентификации таксонов для относительно чистых популяций при меньшем наборе локусов. Однако отнесение отдельных индивидуумов к определенным таксонам может быть неверным: при малом числе локусов у индивидуумов возрастают частоты кластеров других видов, иногда до существенной величины, делая эти особи потенциально “гибридными”. Например, в выборках *Q. pubescens* из приморских выборок южного макросклона Главной гряды Крымских гор для трех особей показано участие генов кластера *Q. robur* в 60–80% (набор kit-2, восемь локусов), что является маловероятным при полном отсутствии *Q. robur* на южном макросклоне. При использовании обоих наборов локусов этого не наблюдается. Таким образом, для предварительной дифференциации таксонов можно использовать меньшее число локусов (например, только kit-2), что снижает затраты, но для более точного определения каждого индивидуума, особенно при исследовании процессов гибридизации в смешанных популяциях, необходим анализ большого числа локусов (в нашем случае – использование двух мультиплексов).

С помощью 18 nSSR-локусов было изучено генетическое разнообразие *Q. robur*, *Q. hartwissiana*, *Q. petraea* ssp. *petraea*, *Q. p.* ssp. *iberica*, *Q. p.* ssp. *medwediewii*, *Q. pubescens* и *Q. macranthera* в Крыму, на Кавказе и в северо-восточной Европе (рис. 1, а). Все таксоны, в том числе исследованные впервые с использованием nSSRs (*Q. hartwissiana*, *Q. macranthera*, *Q. p.* ssp. *iberica*, *Q. p.* ssp. *medwediewii*), показали стабильную амплификацию и достаточно высокую изменчивость во всех локусах. Наборы аллелей у видов во многом перекрываются, и виды в основном отличаются по частотам аллелей. Исползованные локусы хорошо диагностируют таксономическую принадлежность индивидуумов, выявляя при этом гибридные образцы. По результатам STRUCTURE (рис. 1, б, рис. 3) были выделены генетические кластеры, соответствующие всем семи таксонам.

При $K = 2$ (рис. 1, б) все образцы разделяются в соответствии с признаком соотношения длин плодоноса и черешка листа на группу длинноплодоножковых (*Q. robur*, *Q. hartwissiana*) и группу сидячецветных дубов (все остальные, включая *Q. macranthera*), что согласуется с результатами филогенетического исследования, основанного на RADseq маркерах [5], где дерево максимального правдоподобия содержало кладу *Q. robur*, *Q. hartwissiana* и *Q. canariensis*, сестринскую по отношению к кладе, включающей *Q. petraea*, *Q. pubescens* и *Q. macranthera*. Интересно, что родство *Q. robur*, *Q. hartwissiana* и *Q. canariensis* предполагалось ранее на основе морфологических признаков Ю. Л. Меницким [2]. Кроме того, в ранее проведенных исследованиях на основе nSSR-маркеров различия между *Q. robur* и сидячецветными дубами (*Q. pubescens*, *Q. petraea*, *Q. frainetto* и др.) были выше, чем между последними [12, 15, 16, 24, 29]. Вместе с тем разделение исследуемых нами таксонов на две группы не соответствует классификации Ю. Л. Меницкого, который распределил эти таксоны по трем подсекциям [6–9] (Subsect. *Quercus*, Subsect. *Macrantherae*, Subsect. *Galliferae*), а также другим недавним классификациям европейских дубов секции *Quercus* [48].

Все исследуемые таксоны сидячецветных дубов (*Q. pubescens*, *Q. macranthera* и три подвиды *Q. petraea*) дифференцированы друг от друга, что отражает STRUCTURE (рис. 3) и PoCA (рис. 2; рис. S2). По результатам AMOVA, уровень генетической дифференциации F_{RT} между пятью сидячецветными таксонами (включая подвиды) был достаточно высок и составлял 0.085 ($P = 0.001$), что в 4 раза

выше, чем дифференциация внутри таксонов ($F_{SR} = 0.022$, $P = 0.001$). Видовой уровень подтверждается у *Q. pubescens* и *Q. macranthera* и предполагается для одного из подвидов дуба скального (*Q. petraea* ssp. *medwediewii*), показавшего высокую дифференциацию от двух других подвидов *Q. petraea*.

Среди исследованных образцов при совместном обитании нескольких таксонов обнаружены гибридные особи, однако значительное преобладание «чистых» образцов подтверждает, что гибридизация между видами затруднена, вероятно, вследствие экологической и фенологической изоляции [8].

Дуб Гартвиса Q. hartwissiana
и дуб черешчатый *Q. robur*

Если дуб черешчатый ранее изучался с помощью nSSR-маркеров в кавказском регионе [36], то дуб Гартвиса *Q. hartwissiana* исследован впервые. В анализ *Q. hartwissiana* вошло 33 образца из трех локалитетов нескольких районов Кавказа (рис. 1). Обнаружены надежные отличия по микросателлитным маркерам дуба Гартвиса от других видов дубов, в том числе от ближайшего к нему *Q. robur* (рис. 1, 2; рис. S6), и подтвержден видовой статус этого морфологически хорошо отличающегося вида [1–3].

Внутри *Q. robur* на Кавказе при $K \geq 3$ наблюдается четкий географический паттерн, с последовательным разделением популяций согласно географическим группам, совпадающим с выявленными ранее на основе изменчивости 14 nSSR-локусов [36]. В отличие от *Q. robur* выборки *Q. hartwissiana* с северного (№ 29) и южного (№ 27, 28) макросклона Большого Кавказа по результатам STRUCTURE оказываются однородными. Однако подразделенность трех популяций дуба Гартвиса (парные $F_{ST} = 0.040–0.049$) была достаточно высокой, вероятно, благодаря значительной фрагментации популяций *Q. hartwissiana*, местообитания которого обычно ограничены долинами рек [3]. Между дубами черешчатым и Гартвиса, очевидно, сохраняется генетический поток. Так, например, в популяциях *Q. robur* по результатам STRUCTURE доля кластера *Q. hartwissiana* выше на Западном Кавказе (выборка № 25, рис. S6), где и распространен последний.

Внутрипопуляционная изменчивость у *Q. hartwissiana* по сравнению с *Q. robur* снижена во всех выборках. Вероятно, этот теплолюбивый, мезофильный вид испытывал особенно серьезные сокращения численности в неблагоприятные климатические эпохи. Большинство исследователей считают *Q. hartwissiana* близким наиболее древней форме третичных робуроидных дубов [1, 8]. Одновременно экологические свойства дуба Гартвиса — приуроченность к теплым и влажным биотопам и

принадлежность к ядру третичной флоры — указывают на реликтовый характер этого вида [8]. Ю.Л. Меницкий отмечает, что дуб Гартвиса по морфологии листа близок к дубу грузинскому *Q. petraea* ssp. *iberica* [1], но такие черты как цветение одновременно с распусканием листьев и длинный плодороднос отражают начавшуюся адаптацию к холодному климату и сближают дуб Гартвиса с дубом черешчатым, что свидетельствует об их общем происхождении [8].

Дифференциация дуба известнякового Q. petraea
ssp. *medwediewii* от дуба скального *Q. petraea*

В исследованных районах Кавказа и в Крыму, согласно таксономической системе Ю.Л. Меницкого [1, 3, 6], произрастают три широко распространенных подвида *Q. petraea*. Если типовой подвид *Q. p. ssp. petraea* был исследован во множестве работ в Западной, Центральной и Восточной Европе [15, 16, 19, 23, 24, 26, 28, 33], то два других, более восточных подвида дуба скального были впервые изучены с помощью ядерных маркеров. Наиболее неожиданным и важным результатом является то, что подвиды *Q. petraea* не формируют общей группы на РСoA-ординации и на дендрограмме UPGMA (рис. 2; рис. S1), а образуют два кластера, как и при анализе STRUCTURE (рис. 3). Один из кластеров по распространению и морфологическому описанию соответствует подвиду *Q. petraea* ssp. *medwediewii* (A. Camus) Menitsky (syn. *Q. calcarea* Troitsky). Степень отличий данного таксона по nSSRs как от двух других подвидов дуба скального, так и от *Q. pubescens* и *Q. macranthera* подтверждает трактовку данного таксона в ранге вида — *Q. calcarea* Troitsky [9].

Предположение Ю.Л. Меницкого о возможном гибридном происхождении *Q. p. ssp. medwediewii* [1–3] в ходе исторической гибридизации *Q. petraea* и *Q. pubescens*, высказанное на основании наличия переходных морфологических признаков, генетическим анализом не подтверждается. Популяции *Q. p. ssp. medwediewii* не являются промежуточными на РСoA-ординации (рис. 2), а индивидуумы не содержат смеси генетических пулов других видов по результатам STRUCTURE (рис. 3) и сохраняют свою генетическую идентичность не только в районах произрастания отдельно от других подвидов *Q. petraea* и остальных сидяцветных дубов (Центр. Кавказ и Предкавказье, рис. 1, а), но и в районах, где дуб известняковый произрастает вместе с другими близкородственными таксонами (например, № 16, Крым).

Существование и интерпретация таксона «дуб известняковый» *Q. p. ssp. medwediewii* (= *Q. calcarea*), отличающегося морфологически и экологически от других сидяцветных дубов и занимающего большой ареал на северном макросклоне Большого Кавказа, в Предкавказье и в Крыму, много

лет составляют предмет дискуссий [7]. В различных таксономических классификациях этот дуб [1, 7, 10] рассматривался как отдельный вид, подвид дуба пушистого, подвид дуба скального, или же не признавался как отдельный таксон. Синонимом *Q. p. ssp. medwediewii* Ю. Л. Меницкий считал *Q. dalechampii* Ten. – европейский вид [49], систематическое положение и трактовка которого, в свою очередь, остаются весьма неопределенными и до сих пор не получили должного разрешения [обзор 7, 49–52]. После недавнего пересмотра в объеме и составе таксона *Q. dalechampii* и разделения его на две части, относящиеся к системам *Q. petraea* и *Q. pubescens* [50], для Центральной Европы было предложено новое название – *Quercus banatus* P. Kusera [51].

Несоответствие таксономических классификаций объясняется не только морфологическим сходством и во многом перекрывающимися признаками между близкими таксонами, но и разной степенью изученности таксонов в регионах. Если в работах Ю. Л. Меницкого [1] и Н. Д. Троицкого [9] на большом материале была исследована морфологическая изменчивость кавказских и крымских популяций дуба известнякового, то расширенного сравнения с европейскими популяциями *Q. dalechampii* не проводилось, что, вероятно, обуславливает разное понимание объема видов (систем видов) дуба скального и дуба пушистого. Наше исследование показывает, что дуб известняковый (*Q. p. ssp. medwediewii* = *Q. calcarea*) ясно дифференцирован от всех исследованных нами таксонов и по уровню отличий может быть признан отдельным видом, так как отличия находят на уровне различий между дубами пушистым и скальным. В целом запутанность классификаций лишь увеличивает необходимость совместного исследования предположительно родственных таксонов и расширения географии с привлечением материала из Европы, в том числе *Q. dalechampii* (или *Q. banatus*).

Показатели изменчивости *Q. p. ssp. medwediewii* снижены по сравнению с другими распространенными видами, по-видимому, в результате уменьшенного эффективного размера популяции, а слабая дифференциация в пределах крымско-кавказского региона, вероятно, связана с недавним расселением из одного источника. Возможно, низкий эффективный размер популяций также является причиной увеличенных генетических различий *Q. p. ssp. medwediewii* с другими таксонами. Примерно равная дифференциация с близкородственными видами – дубом пушистым (средние парные $F_{ST} = 0.078$), дубом скальным (0.086) и дубом грузинским (0.089) делает неопределенными филогенетические связи *Q. p. ssp. medwediewii*.

Два других исследованных подвида *Q. petraea* (типовой подвид *Q. p. ssp. petraea* и дуб грузинский

Q. p. ssp. iberica) дифференцированы друг от друга в гораздо меньшей степени, чем от дуба известнякового и от других видов (рис. 2, б; рис. S1), однако географическое распределение популяций с заметным участием соответствующих кластеров STRUCTURE подтверждает правомерность выделения внутри *Q. petraea* подвида *Q. p. ssp. iberica* (рис. 3; рис. S2). Филогенетическое исследование на основе изменчивости ITS-последовательностей [53] также подтвердило различия двух таксонов, не исключая их видовой статус при выраженном родственном отношении между подвидами.

Интересно, что у типового подвида наблюдается географическая структура. Популяции Крыма отличаются от *Q. petraea* из Калининградской области (рис. 3; рис. S1), при этом не являясь переходными между дубом грузинским и дубом скальным (рис. S2). Генетические особенности *Q. petraea* из Крыма, возможно, объясняют отнесение по морфологическим признакам крымских популяций как к *Q. iberica* [9], так и к *Q. p. ssp. petraea* [1]. Для более полного выявления внутривидовой структуры *Q. petraea* необходимо исследование популяций Черноморского побережья Кавказа [1, 6], где отмечено произрастание как обоих подвигов, так и гибридов между ними, а также включение в анализ *Q. petraea* из Малой Азии и Балканского п-ова, где возможно могут произрастать оба таксона [54].

Обнаружение в популяции № 14 (Балта) среди выборки *Q. p. ssp. medwediewii* одного индивидуума, относящегося к *Q. p. ssp. iberica*, является важным подтверждением наблюдений Ю.Л. Меницкого, который в своих работах описывал ареал дуба грузинского как почти не заходящий севернее Главного Кавказского хребта, но отмечал его присутствие в Верхнеретском флористическом р-не (Центральный Кавказ) [6], в частности в Саургомском ущелье, вблизи п. Чми [1], т. е. в непосредственной близости к собранной нами выборке № 14.

Дуб пушистый *Q. pubescens*

По результатам нашего исследования показано, что *Q. pubescens* из крымско-кавказской части ареала относится к одному таксону. Выборки и индивидуумы *Q. pubescens* из Дагестана близки к популяциям *Q. pubescens* Крыма, образуют общий кластер при анализе STRUCTURE (рис. 1, б; рис. 3) и общую группу на PCoA-ординации (рис. 2). Систематически и географически (по распространению в Крыму и на Кавказе) выделенная группа в наибольшей степени совпадает с трактовкой Меницкого [1, 6].

Внутри группы из пяти выборок *Q. pubescens* F_{ST} составил 0.042 ($P = 0.001$). Среди них наибольшие отличия наблюдаются между восточными (Дагестан) и западными (Крым) выборками. Внутри этих регионов дифференциация была низкой. По

результатам STRUCTURE (рис. 3) при $K = 7$ (набор 2) дуб пушистый разделяется на два кластера – западный (Крым) и восточный (Дагестан). Такое же деление наблюдается на UPGMA-дендрограмме (рис. S1) и на PCoA (рис. 2). Кроме изоляции расстоянием, причина дифференциации *Q. pubescens*, возможно, связана с длительными процессами гибридизации при произрастании симпатрически с разными таксонами. В дагестанских выборках *Q. pubescens* содержит больше примеси *Q. macranthera* и *Q. p. ssp. iberica*, а в крымских выборках – *Q. p. ssp. medwediewii* и *Q. p. ssp. petraea*.

Повышенное, по сравнению со всеми изученными таксонами, генетическое разнообразие дуба пушистого соответствует отмечаемому в других работах [например, 14, 22, 23] и объясняется высокой способностью к гибридизации, по-видимому – исторической, поскольку в нашем случае *Q. pubescens* образует “чистый” кластер, без заметной доли других таксонов. Мы предлагаем также другое объяснение увеличенного аллельного разнообразия – высокий эффективный размер популяции вида, даже несмотря на ограниченное распространение на Кавказе. Возможно, это имеет исторические причины и связано с более широким распространением этого вида в прошлом [1].

Дуб крупнопольниковый, или восточный, Q. macranthera

Данный таксон впервые исследован микросателлитными маркерами, которые подтвердили видовой статус *Q. macranthera*. Выборки и почти все индивидуумы, предварительно отнесенные к *Q. macranthera*, по nSSR-маркером дифференцировались от образцов других видов в отдельный кластер STRUCTURE (рис. 1, б; рис. 3) и образовали отдельную кладу на UPGMA и группу на PCoA-ординации (рис. 2, б). Показатели изменчивости ($H_e = 0.659$) были несколько снижены, дифференциация популяций внутри таксона не выявлена, несмотря на включение в анализ выборок из географически удаленных регионов (Дагестан, Армянское нагорье). Обнаружен возможно гибридный индивидуум в выборке Дилижан (№ 11), с преобладанием кластера *Q. p. ssp. iberica* (рис. 3). При повторном рассмотрении гербария данного образца отмечено почти полное отсутствие характерного для *Q. macranthera* опушения.

Повышенное содержание кластера *Q. macranthera* отмечено в популяциях других видов, произрастающих вместе с ним в Дагестане и Закавказье (*Q. robur* – выборки № 22 и 23, *Q. p. ssp. iberica* – № 7 и 8, *Q. pubescens* – № 20 и 21). Интересно, что эти виды при этом практически не образуют с *Q. macranthera* смешанных популяций, обитая с ним на разных высотах. *Q. macranthera* генетически близок другим сидячецветным таксонам и входит

в кладу II (UPGMA). Согласно филогенетическим исследованиям на основе данных RADseq [5] и ITS-последовательностей [53], этот таксон родственен *Q. frainetto* и относится к кладе, содержащей *Q. pubescens* [5]. Дальнейшее исследование кавказских таксонов с привлечением в анализ близкородственных европейских видов и моделирование демографии на основе метода ABC могут более точно определить эволюцию данной группы видов.

Эффективность распознавания таксонов при разном составе локусов и референсных групп

Все примененные в нашем исследовании локусы имеют F_{ST} между таксонами не менее 0.081 (табл. 2). Внутри таксонов подразделенность между популяциями была значимой, однако выраженная географическая структура была выявлена только внутри *Q. p. ssp. petraea*, *Q. pubescens* и *Q. robur*. Применение для дискриминации таксонов только одного из мультиплексов (что сокращало время и затраты) показало аналогичное двум мультиплексам разделение популяций на таксоны, однако точность отнесения образцов к таксону снижалась (см. Результаты). Ранее было показано, что некоторые локусы лучше дискриминируют виды или группы видов, и их применение для установления видовой принадлежности дает результат не менее эффективный, чем использование большого набора локусов [19]. В некоторых исследованиях впоследствии применялся ограниченный набор локусов для дискриминации пары видов (например, в работе [55] отобрано четыре локуса для разделения *Q. robur* и *Q. petraea*). Однако во многих примерах было показано, что для других сочетаний видов дискриминирующими могут являться другие локусы [например, 13, 21, 22]. Анализ наших данных показал, что, хотя некоторые локусы более дифференцируют отдельные таксоны, наиболее целесообразно применение всех 18 локусов, поскольку для Кавказа и Крыма вполне обычно присутствие нескольких таксонов в смешанных насаждениях или же произрастание в непосредственной близости – до четырех таксонов в Крыму и в Закавказье, до пяти таксонов – на Западном и Восточном Кавказе.

Для одного из наиболее известных так называемого “outlier loci” QrZAG96 [19], описанного в ряде исследований как наиболее дискриминирующего *Q. petraea* и *Q. robur* и потенциально находящегося под действием отбора, в европейских популяциях *Q. robur* отмечалась тенденция к фиксации наиболее короткого аллеля, который ранее ассоциировался с морфологическим признаком относительной длины черешка листа. Однако в настоящей работе впервые показано, что повышенная частота этого аллеля наблюдалась не только для *Q. robur* (среднее 0.601), но и для *Q. hartwissiana* (0.576), что гораздо выше, чем у сидячецветных дубов (от 0 до

0.127). Вероятно, этот факт отражает общее происхождение *Q. robur* и *Q. hartwissiana* и не связан с длиной черешка, которая у *Q. hartwissiana* ближе к *Q. petraea*. Соответственно ассоциация локуса QrZAG96 с гипотетическим QTL, контролирующим длину черешка, не подтверждается. Кроме того, почти полная фиксация короткого аллеля у *Q. robur* в более западных европейских популяциях замещается гораздо более низкой частотой на Кавказе (меняясь от 0.342 до 0.909) и в Турции (0.210) [17].

Изучение возможности выявления генетической структуры с помощью метода байесовской кластеризации при низкой численности отдельных таксонов в анализируемых данных (“моделируемые” варианты 1 и 2) показало вероятность некорректной классификации чистых образцов и гибридов таксонов, недостаточно представленных в анализируемых данных. Эти результаты подтверждают вывод более ранних исследований [18, 23, 24] о необходимости включения в анализ значительного количества референсных особей каждого из таксонов, потенциально присутствующих в районе исследований. При достаточном объеме материала для всех произрастающих в исследованной части ареала таксонов, использованные нами 18 nSSR-локусов гораздо лучше дискриминировали их, чем значительное количество ядерных SNPs, проанализированных без учета всего разнообразия крымско-кавказских *Quercus* [56].

Выделенные в нашей работе генетические кластеры могут быть использованы как референсные для исследования процессов гибридизации в районах совместного произрастания близких таксонов, для установления таксономической принадлежности при отсутствии возможности определения на основе морфологии, для уточнения распространения таксонов и создания программ защиты генетических ресурсов в крымско-кавказском регионе.

Таким образом, наше исследование показывает эффективность использования имеющихся наборов микросателлитных локусов для идентификации робуроидных дубов крымско-кавказского региона. Выявленная генетическая кластеризация образцов соответствовала их таксономическому подразделению на основе морфологических признаков и распространению семи таксонов *Quercus* в исследуемых районах [1, 3, 6]. Видовой статус подтверждается у всех видов и, кроме того, предполагается для дуба известнякового *Q. petraea* ssp. *medwediewii*. Полученные результаты подтверждают мнение, что интрогрессия близких видов дуба в регионе сильно ограничена [8], поскольку не ведет к стиранию различий, нарушению целостности и эволюционной самостоятельности таксонов.

Авторы выражают благодарность Е. В. Зиновьеву, И. Ю. Исакову, Н. В. Семерикову, З. А.

Гусейновой, З. М. Асадулаеву за помощь в сборе образцов дуба и анонимному рецензенту за конструктивные замечания и предложения.

Исследование выполнено за счет Госзадания 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/>.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием в качестве объектов людей и животных.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Меницкий Ю.Л. Дубы Кавказа. Обзор кавказских представителей секции *Quercus*. Л.: Наука, 1971. 196 с.
2. Меницкий Ю.Л. Дубы (*Quercus* L.) Юго-Западной Азии // Новости систематики высших растений. Л.: Наука, 1972. Т. 9. С. 105–140.
3. Меницкий Ю.Л. Дубы Азии. Л.: Наука, 1984. 315 с.
4. Kremer A., Hipp A.L. Oaks: An evolutionary success story // *New Phytologist*. 2020. V. 226. № 4. P. 987–1011. <https://doi.org/10.1111/nph.16274>
5. Hipp A.L., Manos P.S., Hahn M. et al. Genomic landscape of the global oak phylogeny // *New Phytologist*. 2020. V. 226. № 4. P. 1198–1212. <https://doi.org/10.1111/nph.16162>
6. Конспект флоры Кавказа: в 3 томах / Под ред. Кудряшовой Г.Л., Татанова И.В. СПб.; М.: Тов-во науч. изд. КМК, 2012. Т. 3. Ч. 2. 623 с.
7. Schmidt P.A. Oaks and oak forests in Caucasia // *Proc. Fourth Intern. oak conf.* 2004. № 15. P. 9–29.
8. Семериков Л.Ф. Популяционная структура древесных растений (на примере видов дуба европейской части СССР и Кавказа). М.: Наука, 1986. 140 с.
9. 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.
10. Черепанов С.К. Сосудистые растения России и сопредельных государств. СПб., 1995. 990 с.
11. Valbuena-Carabana M., Gonzalez-Martinez S.C., Hardy O.J., Gil L. Fine-scale spatial genetic structure in mixed oak stands with different levels of hybridization // *Mol. Ecol.* 2007. V. 16. № 6. P. 1207–1219. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2007.03231.x>
12. Fortini P., Viscosi V., Maiuro L. et al. Comparative leaf surface morphology and molecular data of five oaks of subgenus *Quercus* Oerst. (Fagaceae) // *Pl. Biosyst.*

2009. V. 143. № 3. P. 543–554.
<https://doi.org/10.1080/11263500902722980>
13. *Salvini D., Bruschi P., Fineschi S. et al.* Natural hybridisation between *Quercus petraea* (Matt.) Liebl. and *Quercus pubescens* Willd. within an Italian stand as revealed by microsatellite fingerprinting // *Plant Biology*. 2009. V. 11. P. 758–765. <https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.2008.00158.x>
 14. *Antonecchia G., Fortini P., Lepais O. et al.* Genetic structure of a natural oak community in central Italy: Evidence of gene flow between three sympatric white oak species (*Quercus*, Fagaceae) // *Ann. For. Res.* 2015. V. 58. № 2. P. 205–216.
<https://doi.org/10.15287/afr.2015.415>
 15. *Rellstab C., Buhler A., Graf R. et al.* Using joint multivariate analyses of leaf morphology and molecular-genetic markers for taxon identification in three hybridizing European white oak species (*Quercus* spp.) // *Annals Forest Sci.* 2016. V. 73. № 3. P. 669–679.
<https://doi.org/10.1007/s13595-016-0552-7>
 16. *Mačejovský V., Schmidtová J., Hrivnák M. et al.* Interspecific differentiation and gene exchange among the Slovak *Quercus* sect. *Quercus* populations // *Dendrobiology*. 2020. V. 83. P. 20–29.
<https://doi.org/10.12657/denbio.083.002>
 17. *Yücedağ C., Gailing O.* Morphological and genetic variation within and among four *Quercus petraea* and *Q. robur* natural populations // *Turkish J. Bot.* 2013. V. 37. № 4. Article 2. P. 619–629.
<https://doi.org/10.3906/bot-1205-18>
 18. *Fortini P., Marzio P.D., Conte A.L. et al.* Morphological and molecular results from a geographical transect focusing on *Quercus pubescens*/*Q. virgiliana* ecological-altitudinal vicariance in peninsular Italy // *Pl. Biosyst.* 2022. T. 156. № 6. P. 1498–1511.
<https://doi.org/10.1080/11263504.2022.2131923>
 19. *Neophytou C., Aravanopoulos F.A., Fink S., Dounavi A.* Detecting interspecific and geographic differentiation patterns in two interfertile oak species (*Quercus petraea* (Matt.) Liebl. and *Q. robur* L.) using small sets of microsatellite markers // *For. Ecol. Manag.* 2010. V. 259. P. 2026–2035.
<https://doi.org/10.1016/j.forec.2010.02.013>
 20. *Guichoux E., Lagache L., Wagner S. et al.* Two highly validated multiplexes (12-plex and 8-plex) for species delimitation and parentage analysis in oaks (*Quercus* spp.) // *Mol. Ecol. Resour.* 2011. V. 11. P. 578–585.
<https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2011.02983.x>
 21. *Curtu A.L., Gailing O., Leinemann L., Finkeldey R.* Genetic variation and differentiation within a natural community of five oak species (*Quercus* spp.) // *Plant. Biol.* 2007. V. 9. P. 116–126.
<https://doi.org/10.1055/s-2006-924542>
 22. *Curtu A.L., Moldovan I.C., Enescu C.M. et al.* Genetic differentiation between *Quercus frainetto* Ten. and *Q. pubescens* Willd. in Romania // *Notulae Bot. Horti Agrobot. Cluj-Napoca*. 2011. V. 39. № 1. P. 275–282.
<https://doi.org/10.15835/nbha3915633>
 23. *Curtu A.L., Craciunescu I., Enescu C.M. et al.* Fine-scale spatial genetic structure in a multi-oak-species (*Quercus* spp.) forest // *iForest*. 2015. V. 8. № 3. P. 324–332.
<https://doi.org/10.3832/ifer1150-008>
 24. *Lepais O., Petit R.J., Guichoux E. et al.* Species relative abundance and direction of introgression in oaks // *Mol. Ecol.* 2009. V. 18. P. 2228–2242.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2009.04137.x>
 25. *Höltken A.M., Buschbom J., Kätzel R.* Species integrity of *Quercus robur* L., *Q. petraea* (Matt.) Liebl. and *Q. pubescens* Willd. from the genetic point of view // *Allgemeine Forst- und Jagdzeitung: Allg. F. u. J. Ztg.* 2012. V. 183. P. 100–110.
 26. *Gerber S., Chadoeuf J., Gugerli F. et al.* High rates of gene flow by pollen and seed in oak populations across Europe // *PLoS One*. 2014. V. 9. e85130.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091301>
 27. *Gugerli F., Brodbeck S., Holderegger R.* Utility of multilocus genotypes for taxon assignment in stands of closely related European White Oaks from Switzerland // *Annals Bot.* 2008. V. 102. P. 855–863. <https://doi.org/10.1093/aob/mcn164>
 28. *Sandurska E., Ulaszewski B., Burczyk J.* Genetic diversity and differentiation of coexisting populations of *Quercus robur* L. and *Q. petraea* (Matt.) Liebl. // *Acta Biol. Crac. Ser. Bot.* 2019. V. 61. № 1. P. 17–28.
<https://doi.org/10.24425/abcsb.2019.127739>
 29. *Neophytou C., Gärtner S.M., Vargas-Gaete R. et al.* Genetic variation of Central European oaks: shaped by evolutionary factors and human intervention? // *Tree Genet. Genom.* 2015. V. 11. № 79.
<https://doi.org/10.1007/s11295-015-0905-7>
 30. *Enescu C.M., Curtu A.L., Șofletea N.* Is *Quercus virgiliana* a distinct morphological and genetic entity among European white oaks? // *Turkish J. Agriculture and Forestry*. 2013. V. 37. № 5. Article 14.
<https://doi.org/10.3906/tar-1210-28>
 31. *Di Pietro R., Di Marzio P., Antonecchia G. et al.* Preliminary characterization of the *Quercus pubescens* complex in southern Italy using molecular markers // *Acta Bot. Croat.* 2020. V. 78. № 2. P. 107–115.
<https://doi.org/10.37427/botcro-2020-002>
 32. *Di Pietro R., Conte A.L., Di Marzio P. et al.* Does the genetic diversity among pubescent white oaks in southern Italy, Sicily and Sardinia islands support the current taxonomic classification? // *Eur. J. Forest Res.* 2021. V. 140. № 2. P. 1–17.
[doi:10.1007/s10342-020-01334-z](https://doi.org/10.1007/s10342-020-01334-z)
 33. *Neophytou C.* Bayesian clustering analyses for genetic assignment and study of hybridization in oaks: Effects of asymmetric phylogenies and asymmetric sampling schemes // *Tree Genet. Genom.* 2014. V. 10. P. 273–285.
<https://doi.org/10.1007/s11295-013-0680-2>

34. Семерикова С.А., Подергина С.М., Ташев А.Н., Семериков В.Л. Филогеография видов дуба в Крыму выявляет плейстоценовые рефугиумы и пути миграций // Экология. 2023. V. 54. № 3. С.188–203. <https://doi.org/10.31857/S0367059723030058>
35. Семерикова С.А., Алиев Х.У., Семериков Н.В., Семериков В.Л. Филогеография видов дуба на Кавказе по результатам анализа хлоропластной ДНК // Генетика. 2023. Т. 59. № 7. С. 772–788. <https://doi.org/10.31857/S001667582307010X>
36. 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 // Russ. J. Ecology. 2023. V. 54. №. 5. P. 423–438. <https://doi.org/10.1134/S1067413623050089>.
37. Devey M.E., Bell J.C., Smith D.N. et al. A genetic linkage map for *Pinus radiata* based on RFLP, RAPD and microsatellite markers // Theor. Appl. Genet. 1996. V. 92. № 6. P. 673–679. <https://doi.org/10.1007/BF00226088>
38. Pritchard J.K., Stephens M., Donnelly P. Inference of population structure using multilocus genotype data // Genetics. 2000. V. 155. P. 945–959.
39. 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. № 8. P. 2611–2620. doi:10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x
40. Li Y.L., Liu J.X. StructureSelector: A web-based software to select and visualize the optimal number of clusters using multiple methods // Mol. Ecol. Resour. 2018. V. 18. № 1. P. 176–177. doi:10.1111/1755-0998.12719.
41. Kopelman N.M., Mayzel J., Jakobsson M. et al. CLUMPAK: A program for identifying clustering modes and packaging population structure inferences across K // Mol. Ecol. Resour. 2015. V. 15. P. 1179–1191. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12387>
42. Puechmaille S.J. The program structure does not reliably recover the correct population structure when sampling is uneven: Subsampling and new estimators alleviate the problem // Mol. Ecol. Resour. 2016. V. 16. P. 608–627. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12512>
43. Peakall R., Smouse P.E. GenAlEx 6.5: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—an update // Bioinformatics. 2012. V. 28. P. 2537–2539. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts460>
44. Rousset F. GENEPOP' 007: A complete reimplementation of the GENEPOP software for Windows and Linux // Mol. Ecol. Resour. 2008. V. 8. P. 103–106. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2007.01931.x>
45. Van Oosterhout C., Hutchinson W.F., Wills D.P., Shipley P. MICRO-CHECKER: Software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data // Mol. Ecol. Notes. 2004. V. 4. P. 535–538. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2004.00684.x>.
46. Nei M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals // Genetics. 1978. V. 83. P. 583–590.
47. Rohlf E.J. NTSYS-pc: Numerical taxonomy and multivariate analysis system. Version 1.50. // Exeter Publ. and Applied Biostatistics. 1988.
48. Vázquez F.M., García D., Márquez F., Vilaviçosa C.M. Annotations to infrageneric nomenclatura of *Quercus* L. (FAGACEAE) // Fol. Bot. Extremadurensis. 2023. V. 17. P. 7–64.
49. Kučera P. *Quercus banatus* grows in Slovenia // Thaiszia – J. Botany. 2019. V. 29. № 1. P. 61–69. <https://doi.org/10.33542/TJB2019-1-04>
50. Di Pietro R., Viscosi V., Peruzzi L., Fortini P. A review of the application of the name *Quercus dalechampii* // Taxon. 2012. V. 61. № 6. P. 1311–1316. doi:10.1002/tax.616012
51. Kučera P. New name for Central European oak formerly labelled as *Quercus dalechampii* // Biologia. 2018. V. 73. № 4. P. 313–317. <https://doi.org/10.2478/s11756-018-0048-z>
52. Proietti E., Filesi L., Di Marzio P. et al. Morphology, geometric morphometrics, and taxonomy in relict deciduous oaks woods in northern Italy // Rend. Fis. Acc. Lincei. 2021. V. 32. P. 549–564. <https://doi.org/10.1007/s12210-021-01001-4>
53. Papini A., Simeone M.C., Bellarosa R. et al. *Quercus macranthera* Fisch. & Mey. ex Hohen. and *Quercus iberica* M. Bieb.: Taxonomic definition and systematic relationships with European oaks inferred from nuclear internal transcribed spacer (ITS) data // Plant Biosystems. 2011. V. 145. № 1. P. 37–49. <https://doi.org/10.1080/11263504.2010.502684>
54. Tóth E.G., Kőbölkuti Z.A., Cseke K. et al. A genomic dataset of single-nucleotide polymorphisms generated by ddRAD tag sequencing in *Q. petraea* (Matt.) Liebl. populations from Central-Eastern Europe and Balkan Peninsula // Annals Forest Sci. 2021. V. 78. № 43. <https://doi.org/10.1007/s13595-021-01051-6>
55. Jurkšienė G., Baranov O.Y., Kagan D.I. et al. Genetic diversity and differentiation of pedunculate (*Quercus robur*) and sessile (*Q. petraea*) oaks. // J. For. Res. 2020. V. 31. P. 2445–2452. <https://doi.org/10.1007/s11676-019-01043-3>
56. Degen B., Blanc-Jolivet C., Mader M. et al. Introgression as an important driver of geographic genetic differentiation within European white oaks // Forests. 2023. V. 14(12). <https://doi.org/10.3390/f14122279>

Differentiation and Taxonomic Identification of Roburoid Oaks in the Caucasian and Crimean Regions Using Nuclear Microsatellite Markers

S. A. Semerikova^{1, *}, Kh. U. Aliev², V. L. Semerikov¹

¹*Institute of Plant and Animal Ecology, Ural Branch of Russian Academy of Science, Ekaterinburg, 620144 Russia*

²*Mountain Botanical Garden of Dagestan Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Makhachkala, 367000 Russia*

*e-mail: s.a.semerikova@ipae.uran.ru

The inter- and intra-specific structure of genetic variability was studied using 18 microsatellite loci (nSSRs) in closely related roburoid oaks in the Crimean-Caucasian region. The seven most widespread *Quercus* taxa in the region were studied in 29 morphologically pure populations from different parts of the North Caucasus, Transcaucasia, Crimea and northeastern Europe. Most taxa were studied using nSSR markers for the first time. Among the 492 trees studied, Bayesian clustering method implemented in STRUCTURE identified clusters corresponding to the pedunculate oak *Quercus robur*, the Hartwiss oak *Q. hartwissiana*, the Caucasian oak *Q. macranthera*, the downy oak *Q. pubescens* and three subspecies of sessile oak: *Q. petraea* ssp. *petraea*, *Q. petraea* ssp. *iberica*, *Q. petraea* ssp. *medwediewii*. Geographic structure was identified within *Q. robur*, *Q. pubescens* and *Q. p.* ssp. *petraea*. The 18 nSSR loci used are efficient in the taxonomic assignment of individuals, and identifying hybrids. The close relationship between the “long-pedunculate” roburoid oaks (*Q. robur* and *Q. hartwissiana*) is shown, with a greater difference from other species. For one of the subspecies of sessile oak, widespread in the North Caucasus and Crimea *Q. petraea* ssp. *medwediewii* (syn. *Q. calcarea*), or limestone oak, significant differences from other taxa were found, reaching the species level. The assumption of a possible hybrid origin of this taxon as a result of hybridization of *Q. petraea* and *Q. pubescens* is not confirmed by genetic analysis. The other two subspecies of *Q. petraea* (*Q. p.* ssp. *petraea* and Georgian oak *Q. p.* ssp. *iberica*) are differentiated to a lesser extent and are related to each other, which confirms the legitimacy of distinguishing two geographically isolated taxa at the rank of subspecies. The highest variability was observed in *Q. pubescens* ($H_c = 0.777$). In *Q. p.* ssp. *medwediewii* variability was lower than in other widespread taxa ($H_c = 0.652$), and was approximately at the level of variability of *Q. hartwissiana* ($H_c = 0.633$) and *Q. macranthera* ($H_c = 0.659$). Clear differentiation of taxa by nuclear markers shows the limited introgression in closely related oak species in the Caucasus and Crimea. The identified genetic clusters can be used as reference groups for further population genetic studies of oaks in the Crimean-Caucasian region.

Keywords: *Quercus* spp., nuclear microsatellites, Caucasus, Crimea, nSSR, STRUCTURE, genetic differentiation, taxon assignment.