

ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ И ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ СЕВЕРНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ ДУБА ЧЕРЕШЧАТОГО РОССИИ ПО РЕЗУЛЬТАТАМ АНАЛИЗА НОВЫХ МАРКЕРОВ SNP

© 2021 г. Б. Деген¹, Ю. А. Янбаев^{2, *}, Р. Ю. Янбаев^{2, 3}, С. Ю. Бахтина²,
А. А. Габитова^{2, 3}, А. А. Тагирова^{2, 3}

¹Институт лесной генетики, Гроссгансдорф, 22927 Германия

²Башкирский государственный аграрный университет, Уфа, 450001 Россия

³Башкирский государственный университет, Уфа, 450076 Россия

*e-mail: Yanbaev_ua@mail.ru

Поступила в редакцию 20.04.2020 г.

После доработки 27.07.2020 г.

Принята к публикации 25.08.2020 г.

Изучен генофонд популяций дуба черешчатого (*Quercus robur* L.) из севера российской части ареала вида с использованием набора из 94-х SNP-локусов, разработанных по технологии секвенирования ДНК нового поколения ddRAD. Обнаружен близкий уровень генетического разнообразия в изолированных насаждениях с малой численностью деревьев (наблюдаемая гетерозиготность $H_O = 0.334 \pm 0.004$, ожидаемая гетерозиготность $H_E = 0.313 \pm 0.011$, аллельное разнообразие $v_a = 1.540 \pm 0.021$, коэффициент инбридинга $F_{IS} = -0.067$) и в сравнительно больших по объему популяциях ($H_O = 0.318 \pm 0.012$, $H_E = 0.306 \pm 0.010$, $v_a = 1.53 \pm 0.021$, $F_{IS} = -0.039$). Выявлен статистически достоверный уровень генетической дифференциации и фиксации популяций ($\Delta T = 0.0993$, генетические расстояния Грегориуса $d_0 = 0.104-0.144$, $F_{ST} = 0.0725$). Байесовский кластерный анализ позволил идентифицировать генетически своеобразные популяции. Полученные результаты обсуждены с учетом истории распространения дуба черешчатого на севере ареала.

Ключевые слова: дуб черешчатый, SNP, генофонд, популяция.

DOI: 10.31857/S001667582103005X

Глобальное изменение климата вызывает изменение ареалов многих видов, что обуславливает интерес к изучению генетической основы этого явления [1, 2]. Формирование генофондов географически краевых популяций происходит в условиях ограничения генетического потока, уменьшения популяционной плотности и численности, вследствие чего на границах ареалов смещается баланс векторов естественного отбора, более выраженной становится роль дрейфа генов [3]. Эти процессы являются мощным драйвером динамики генетического разнообразия популяций — важного ресурса, необходимого для выживания видов в экологически неблагоприятной среде [4]. Применение молекулярно-генетических маркеров позволило выявить, что на границах ареалов генетическое разнообразие чаще понижается на фоне повышения межпопуляционной подразделенности. Это в свою очередь подтверждает так называемую “центрально-маргинальную” гипотезу [5]. Данный феномен в целом подтверждается и для дуба черешчатого [3, 6] — экологически и эконо-

мически важного вида с широким континентальным ареалом. Появление технологий секвенирования ДНК нового поколения [7] позволяет разрабатывать большие наборы локусов SNP (Single Nucleotide Polymorphism). Это дает возможность возвращения к изучению генофондов краевых популяций на границах ареалов на новом уровне [8, 9]. В обширной российской части ареала генетические ресурсы дуба черешчатого изучены в целом фрагментарно [10]. Необходимость восполнения этого пробела диктуется также массовой деградацией дубрав — лишь за последние полвека площадь дубрав в России уменьшилась почти на четверть [11]. Этот негативный процесс серьезно затронул насаждения на границах ареала, особенно на севере.

Цель работы — исследование генетического разнообразия и дифференциации северных популяций дуба черешчатого в российской части ареала вида на основе анализа разработанных нами 94-х локусов SNP.

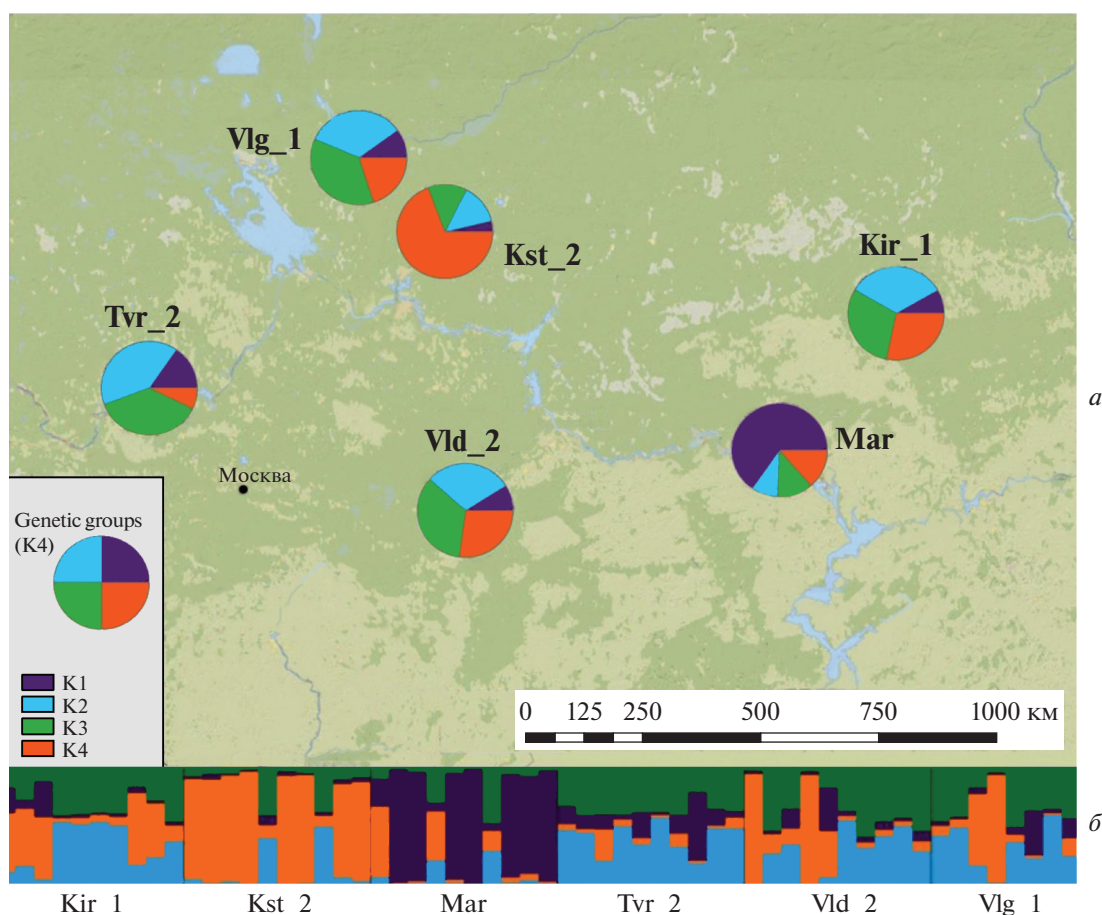


Рис. 1. Карта расположения (а) и кластеризация выборок (б) дуба черешчатого.

Для разработки SNP-маркеров использована технология секвенирования ДНК нового поколения ddRAD (Double Digest Restriction Site Associated DNA) [7]. В целях поиска маркеров с наибольшим “географическим сигналом” компанией Floragenex (Портланд, США) по нашему заказу секвенированы образцы ДНК 95 деревьев *Q. robur* и *Q. petraea* Liebl. из Австрии, Белоруссии, Бельгии, Венгрии, Великобритании, Германии, Дании, Польши, Словакии, Турции, Украины и России. Обнаруженные 26074 локусов SNP прошли процедуру оптимизации [12]. В этой работе использован набор из наиболее информативных 94-х локусов.

Информация по площадям широколиственных лесов и дубрав в северной части ареала дуба черешчатого получена из базы данных “Леса России” ФГБУ “РОСЛЕСИНФОРГ” (<http://178.176.30.40:8282/#/>). Исследования проведены на базе двух групп насаждений дуба черешчатого лесной зоны (рис. 1, табл. 1). Первая из них (группа 1) представлена сравнительно большими по площадям дубравами из Владимирской и Кировской обл., Республики Марий Эл (пробные пло-

щади Vld_2, Kir_1 и Mar). Вторая группа (2) пробных площадей (Kst_2, Tvr_2, Vlg_1) заложена в географически изолированных фрагментах широколиственных лесов в Костромской, Тверской и Вологодской обл. на крайнем северном пределе распространения этой формации. На этой территории дуб черешчатый встречается в составе насаждений в основном в виде небольших изолированных древостоев и групп деревьев. В отличие от насаждений группы 1 здесь сравнительно мало широколиственных лесов (табл. 1, показатель S2), в составе которых обычно встречается дуб черешчатый. На всех пробных площадях случайным образом отобраны по десять деревьев репродуктивного возраста. Показано, что применение сравнительно большого числа локусов SNP дает возможность корректного определения показателей генетического разнообразия популяций и уровня их генетической подразделенности в выборках даже меньшего объема. Деревья располагались друг от друга на расстоянии не менее 50 м для минимизации возможной семейной генетической кластеризации [13].

Таблица 1. Площади насаждений, уровни генетической изменчивости и дифференциации популяций дуба черешчатого

Параметр	Группа 1			Группа 2			X_{cp}
	Vld_2	Kir_1	Mar	Kst_2	Tvr_2	Vlg_1	
S1	104601	93359	131171	157434	187064	225126	149792
S2	6069 (5.80)	1865 (2.00)	6729 (5.13)	333 (0.22)	79 (0.04)	72 (0.03)	1730
S3	2772 (2.65)	567 (0.61)	1262 (0.96)	150 (0.10)	14 (0.01)	—	794
P	91.5	83.0	91.5	85.1	90.4	92.6	89.0
H_O	0.339 (0.026)	0.298 (0.025)	0.318 (0.025)	0.336 (0.027)	0.326 (0.023)	0.339 (0.025)	0.326 (0.007)
H_E	0.322 (0.017)	0.310 (0.019)	0.287 (0.018)	0.290 (0.019)	0.321 (0.017)	0.327 (0.017)	0.310 (0.007)
v_a	1.56 (0.04)	1.54 (0.04)	1.49 (0.04)	1.50 (0.04)	1.55 (0.0344)	1.57 (0.04)	1.53 (0.01)
F_{IS}	−0.035	0.060	−0.096	−0.122	−0.010	−0.034	−0.052

Примечание. X_{cp} — среднее значение, S1 — лесопокрытая площадь лесничеств, в которых отобраны выборки, S2 — площадь широколиственных лесов, S3 — площадь насаждений с преобладанием дуба черешчатого (в скобках для S2 и S3 приведены доли от S1 в %); P — доля полиморфных локусов в %, H_O — наблюдаемая гетерозиготность, H_E — ожидаемая гетерозиготность, v_a — аллельное разнообразие (в скобках приведены ошибки средних H_O , H_E и v_a), F_{IS} — коэффициент инбридинга.

ДНК для лабораторных анализов выделялась из камбия модельных деревьев согласно модифицированного протокола [14]. Генотипирование проведено на платформе MassARRAY®iPLEX™ (Agena Bioscience™) с использованием технологии iPLEX™GOLD chemistry. Интерпретация спектров осуществлялась на устройстве Typer Viewer v. 4.0.24.71 (Agena Bioscience™). Результаты обрабатывались с применением программ PAST [15] и GDA_NT (Б. Деген, неопубл.). Вычислялись аллельное разнообразие v_a [16], наблюдаемая гетерозиготность H_O , ожидаемая гетерозиготность H_E , параметры F -статистики Райта F_{IS} и F_{ST} [17], показатели дифференциации популяций δ_{ST} и δ_T , генетическое расстояние d_0 [16, 18]. Визуализация генетических различий популяций обеспечивалась построением дендрограммы на основе генетических расстояний d_0 с применением программы PAST [15] и метода UPGMA. Для определения числа генетических групп в изученных шести локальностях использованы байесовский метод кластеризации и программа STRUCTURE v. 2.3.4 [19]. Оптимальное число генетических кластеров оценивалось методом ΔK [20]. Полученные результаты проанализированы и графически

представлены с помощью программы CLUMPAK [21].

Изученные выборки представляют две группы популяций, контрастно отличающиеся объемами и по эффективной численности особей (табл. 1). Но их генетические параметры не подтверждают однозначно “центрально-маргинальную” гипотезу [5]. В относительно больших популяциях (в среднем $H_O = 0.318 \pm 0.012$, $H_E = 0.306 \pm 0.010$, $v_a = 1.530 \pm 0.021$, $F_{IS} = -0.067$) и в изолированных малых насаждениях (группа 2: $H_O = 0.334 \pm 0.004$, $H_E = 0.313 \pm 0.011$, $v_a = 1.540 \pm 0.021$, $F_{IS} = -0.039$) выявлены близкие величины генетического разнообразия. Похожий феномен выявлен нами [22] при использовании предположительно селективно нейтральных микросателлитных локусов в географически изолированной зауральской популяции дуба черешчатого. Гетерозиготность в имеющихся 27 деревьях репродуктивного возраста была даже выше, чем в популяциях из центра ареала в Германии. Реконструкция возможных родительских пар аллелей в зародышах показала, что в популяции по крайней мере 35% опыления осуществлялось за счет “чужеродной” пыльцы (восточная граница ареала расположена западнее, в десятках километров). По этой причине ведущим факто-

ром поддержания сравнительно высокой генетической изменчивости в зауральской популяции признан генетически эффективно реализованный поток пыльцы на дальние расстояния. Возможно этот же сценарий реализован и в краевых популяциях дуба черешчатого на северной границе ареала дуба черешчатого в Костромской, Тверской и Вологодской обл. Еще одной причиной сравнительно высокого генетического разнообразия в северных дубравах может быть то, что снижение эффективной численности популяций могло произойти здесь лишь в исторически недавнее время. По данным палеогеографических исследований граница широколиственных лесов ранее располагалась севернее и сместилась из-за климатических изменений на юг на 300–700 км до современного предела только в позднем голоцене [23]. Сокращение площадей дубовых насаждений стало существенным лишь в прошлом тысячелетии из-за все возрастающего хозяйственного освоения территорий [24], а в XX в. из-за комплекса факторов — аномально холодных зим, сопровождающихся вспышками энтомофагов и фитопатогенов [11]. Возможно поэтому, с учетом долголетия дуба черешчатого, феномен снижения генетического разнообразия в малых изолированных краевых популяциях [5] в северных дубравах еще не наблюдается.

В исследованных популяциях выявлен сравнительно небольшой, но статистически достоверный уровень межпопуляционной дифференциации ($\delta_T = 0.0993$, $F_{ST} = 0.0725$). Генетические расстояния d_0 между популяциями варьируют в пределах 0.104–0.144 (в среднем $d_0 = 0.125 \pm 0.003$). Они были статистически недостоверными лишь для пар выборок Kir_1/Vlg_1 ($d_0 = 0.104$), Tvr_2/Vlg_1 ($d_0 = 0.112$) и Vld_2/Vlg_1 ($d_0 = 0.104$). Наибольший вклад в общую межпопуляционную дифференциацию вносят дубравы из Республики Марий Эл и Костромской обл. Генетические расстояния в парах с участием выборок Mar и Kst_2 составили значения $d_0 = 0.134 \pm 0.004$ и $d_0 = 0.131 \pm 0.005$ соответственно. Между остальными парами популяций величина показателя снижается до $d_0 = 0.120 \pm 0.003$. Показатель дифференциации популяций (в среднем $\delta_T = 0.099 \pm 0.005$) в выборках Vld_2, Kir_1, Tvr_2 и Vlg_1 составляет значения 0.094 ± 0.009 , 0.094 ± 0.008 , 0.096 ± 0.010 и 0.084 ± 0.007 соответственно. У выборок Mar ($\delta_T = 0.116 \pm 0.010$) и Kst_2 ($\delta_T = 0.111 \pm 0.010$) они выше на 26.1 и 20.7%. Сравнительная высокая генетическая подразделенность некоторых соседствующих популяций (выборки Vlg_1 и Kst_2, Mar и Kir_1) и относительная близость генофондов в географически удаленных насаждениях (Vld_2,

Vlg_1, Kir_1) противоречат модели “изоляции расстоянием”, связь географических и генетических расстояний отсутствуют. Наглядно этот феномен демонстрирует кластеризация выборок (рис. 1,б). Анализ в программе STRUCTURE 2.3.4 показывает выраженные различия популяций, особенно Mar и Kst_2.

В работе [24] проведен анализ информации о содержании пыльцы древесных растений в Восточной Европе за последние 12500 лет. На территории от Приволжской возвышенности до запада Украины выявлены семь основных рефугиумов, где дуб черешчатый присутствовал за весь анализируемый период и в зависимости от состояния климата периодически осуществлял экспансию на север. Динамика популяционных волн не происходила исключительно фронтально, распространение вида часто осуществлялось по поймам разветвленной сети рек из-за большей экологической благоприятности речных экосистем для сезонного размножения и сохранности вида [25].

В настоящей работе по локусам SNP на исследованной территории выявлено отсутствие закономерной популяционно-генетической структуры дуба черешчатого на северной части ареала, существование генетически своеобразных популяций. Возможно этот феномен вызван множественностью и разновозрастностью рефугиумов [24, 26], сложностью путей миграции дуба черешчатого из ледниковых убежищ на север [27]. Наше исследование доказывает необходимость аналогичных исследований в других частях ареала, что позволит сложить “пазл” генофондов локальных популяций дуба черешчатого в России в единую геногеографическую картину. Кроме несомненной научной значимости таких работ, они актуальны в интересах лесного хозяйства — для научно обоснованного ведения лесосеменного и лесокультурного дела, создания и эксплуатации объектов Единого генетико-селекционного комплекса и др.

Исследование проведено за счет гранта Российского научного фонда № 19-16-00084.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием в качестве объекта животных.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием в качестве объекта людей.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Alberto F.G., Aitken S.N., Alia R. et al. Potential for evolutionary responses to climate change — evidence from

- tree populations // *Global Change Biol.* 2013. V. 19(6). P. 1645–1661.
<https://doi.org/10.1111/gcb.12181>
2. *Parmesan C.* Ecological and evolutionary responses to recent climate change // *Ann. Rev. Ecol. Evol. and Systematics.* 2006. V. 37. P. 637–666.
<https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.37.091305.110100>
 3. *Pohjanmies T., Elshibli S., Pulkkinen P. et al.* Fragmentation-related patterns of genetic differentiation in pedunculate oak (*Quercus robur*) at two hierarchical scales // *Silva Fennica.* 2015. V. 50(2).
<https://doi.org/10.14214/sf.1510>
 4. *Aitken S.N., Yeaman S., Holliday J.A. et al.* Adaptation, migration or extirpation, climate change outcomes for tree populations // *Evol. Applications.* 2008. V. 1. P. 95–111.
<https://doi.org/10.1111/j.1752-4571.2007.00013.x>
 5. *Eckert C.G., Samis K.E., Loughheed S.C.* Genetic variation across species' geographical ranges, the central-marginal hypothesis and beyond // *Mol. Ecol.* 2008. V. 17. P. 1170–1188.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2007.03659.x>
 6. *Petit R.J., Csai U.M., Bordacs S. et al.* Chloroplast DNA variation in European white oaks – phylogeography and patterns of diversity based on data from over 2600 populations // *Forest Ecol. and Management.* 2002. V. 156. P. 5–26.
[https://doi.org/10.1016/S0378-1127\(01\)00645-4](https://doi.org/10.1016/S0378-1127(01)00645-4)
 7. *Peterson B.K., Weber J.N., Kay E.H. et al.* Double Digest RADseq: An inexpensive method for de novo SNP discovery and genotyping in model and non-model species // *PLoS One.* 2012. V. 7.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037135>
 8. *Ahrens C.W., Byrne M., Rymer P.D.* Standing genomic variation within coding and regulatory regions contributes to the adaptive capacity to climate in a foundation tree species // *Molecular Ecology.* 2019. V. 28(10). P. 2502–2516.
<https://doi.org/10.1111/mec.15092>
 9. *Leroy T., Louvet J.M., Lalanne C. et al.* Adaptive introgression as a driver of local adaptation to climate in European white oaks // *New Phytologist.* 2019.
<https://doi.org/10.1111/nph.16095>
 10. *Degen B., Yanbaev R., Yanbaev Y.* Genetic differentiation of *Quercus robur* in the South-Ural // *Silvae Genetica.* 2019. V. 68(1). P. 111–115.
<https://doi.org/10.2478/sg-2019-0019>
 11. *Царалунга В.В., Фурменкова Е.С., Крюкова А.А.* Внешние признаки патологии дуба черешчатого. Воронеж: ВГЛУ, 2015. 231 с.
 12. *Blanc-Jolivet C., Bakhtina S., Yanbaev R. et al.* Development of new SNPs loci on *Quercus robur* and *Quercus petraea* for genetic studies covering the whole species' distribution range // *Conservation Genet. Res.* 2020.
<https://doi.org/10.1007/s12686-020-01141-z>
 13. *Willing E.-M., Dreyer C., van Oosterhout C.* Estimates of genetic differentiation measured by FST do not necessarily require large sample sizes when using many SNP markers // *PLoS One.* 2012. V. 7(8).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042649>
 14. *Dumolin S., Demesure B., Petit R.J.* Inheritance of chloroplast and mitochondrial genomes in pedunculate oak investigated with an efficient PCR method // *Theoretical Applied Genetics.* 1995. V. 91. P. 1253–1256.
 15. *Hammer O., Harper D., Ryan P.* PAST: Paleontological Statistics Software Package for education and data analysis // *Palaeontologia Electronica.* 2001. V. 4. P. 1–9.
 16. *Gregorius H.R.* The relationship between the concepts of genetic diversity and differentiation // *Theor. Applied Genetics.* 1987. V. 74. P. 397–401.
 17. *Weir B.S., Cockerham C.C.* Estimating F-statistics for the analysis of population structure // *Evolution.* 1984. V. 38. P. 1358–1370.
 18. *Gregorius H.R.* A unique genetic distance // *Biometrical J.* 1984. V. 26(1). P. 13.
 19. *Pritchard J.K., Stephens M., Donnelly P.* Inference of population structure using multilocus genotype data // *Genetics.* 2000. V. 155(2). P. 945–959.
 20. *Evanno G., Regnaut S., Goudet J.* Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUSTRUCTURE: A simulation study // *Molecular Ecology.* 2005. V. 14. P. 2611–2620.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x>
 21. *Kopelman N.M., Mayzel J., Jakobsson M. et al.* Clumpak: a program for identifying clustering modes and packaging population structure inferences across K // *Molecular Ecology Res.* 2015. V. 15(5). P. 1179–1191.
<https://doi.org/10.1111/1755-0998.12387>
 22. *Bushbom J., Yanbaev Y., Degen B.* Efficient long-distance gene flow into an isolated relict oak stand // *J. Heredity.* 2011. V. 102(4). P. 464–472.
<https://doi.org/10.1093/jhered/esr023>
 23. *Нейштадт М.И.* История лесов и палеогеография СССР в голоцене. М.: Изд-во АН СССР. 1957. 403 с.
 24. *Кожаринов А.В., Борисов П.В.* Распространение дубовых лесов на территории Восточной Европы за последние 13 тысяч лет // *Лесоведение.* 2012. № 5. С. 22–28.
 25. *Денисов А.К.* Последледниковая динамика северной границы ареала дуба черешчатого в СССР и филогенез дубрав севера // *Лесоведение.* 1980. № 1. С. 3–11.
 26. *Горчаковский П.Л.* Растения европейских широколиственных лесов на восточном пределе их ареала // *Тр. Ин-та экологии растений и животных.* Вып. 59. Свердловск, 1968. 208 с.
 27. *Семериков Л.Ф.* Популяционная структура древесных растений (на примере дуба Европейской части СССР и Кавказа). М.: Наука, 1986. 140 с.

Genetic Diversity and Differentiation of Northern Populations of Pedunculate OAK Based on Analysis of New SNP Markers

B. Degen^a, Y. A. Yanbaev^{b, *}, R. Y. Ianbaev^{b, c},
S. Y. Bakhtina^b, A. A. Gabitova^{b, c}, and A. A. Tagiriva^{b, c}

^a*Institute of Forest Genetics, Grosshansdorf, 22927 Germany*

^b*Bashkir State Agrarian University, Ufa, 450001 Russia*

^c*Bashkir State University, Ufa, 450076 Russia*

^{*}*e-mail: Yanbaev_ua@mail.ru*

The gene pool of populations of pedunculate oak (*Quercus robur* L.) from the North of the Russian part of the species' range was studied using a set of 94 SNP loci. They were developed using the new generation DNA sequencing technology (ddRAD). Similar levels of genetic diversity was found in isolated stands with a small number of trees (expected heterozygosity $H_E = 0.313 \pm 0.011$, observed heterozygosity $H_O = 0.334 \pm 0.004$, allelic diversity $v_a = 1.540 \pm 0.021$, coefficient of inbreeding $F_{IS} = -0.067$) and in relatively large populations ($H_E = 0.306 \pm 0.010$, $H_O = 0.318 \pm 0.012$, $v_a = 1.530 \pm 0.021$, $F_{IS} = -0.039$). Statistically significant levels of inter-population differentiation and population fixation ($\Delta T = 0.099$; $F_{ST} = 0.0725$) were detected. Bayesian cluster analysis allowed identifying genetically distinct genetic groups. The results obtained are discussed taking into account the history of the distribution of pedunculate oak in the North of its range.

Keywords: pedunculate oak, SNP, gene pool, population.