

УДК 630\*165.3:630\*17:582.632.2

**В. Е. Падутов**

Институт леса Национальной академии наук Беларуси

**ПРОЦЕССЫ ГИБРИДИЗАЦИИ ДУБА ЧЕРШЧАТОГО И ДУБА СКАЛЬНОГО  
ПО РЕЗУЛЬТАТАМ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА**

Проведен молекулярно-генетический анализ гибридов дуба черешчатого (*Quercus robur* L.) и дуба скального (*Q. petraea* [Matt.] Liebl.), а также потомства от скрещивания гибридов и родительских видов. Все особи были разделены на шесть групп, отражающих таксономическую принадлежность растений (на основании схем скрещиваний и исследования морфологических признаков): 1 – *Q. petraea* (P: *Q. petraea*); 2 – *Q. robur* (P: *Q. robur*); 3 – Гибрид (P: *Q. petraea*); 4 – Гибрид (P: *Q. robur*); 5 – *Q. petraea* (P: Гибрид); 6 – Гибрид (P: Гибрид). С использованием RAPD-маркеров (OP-R11, OP-R05, OP-R10, OP-G06) и SSR-маркеров (ssrQpZAG15, ssrQpZAG9, ssrQpZAG46, ssrQpZAG7) проведена оценка уровня генетического полиморфизма в каждой из шести групп и степень дифференциации между ними. Выявлены отклонения от равновесного состояния популяционно-генетических параметров, которые позволяют говорить об ассортативном скрещивании между двумя видами. Показано, что в ходе интрогрессии участвует ограниченное число вариантов генотипов. Это отражается на генетической структуре гибридного потомства в виде более низких значений показателей изменчивости и внутривидовой подразделенности по сравнению с насаждениями исходных видов.

**Ключевые слова:** полусибсовое потомство, межвидовые гибриды дуба, микросателлиты, SSRs, RAPD.

**Для цитирования:** Падутов В. Е. Процессы гибридизации дуба черешчатого и дуба скального по результатам молекулярно-генетического анализа // Труды БГТУ. Сер. 1. Лесное хоз-во, природопользование и перераб. возобновляемых ресурсов. 2021. № 2 (246). С. 93–102.

**V. E. Padutov**

Forest Institute of the National Academy of Sciences of Belarus

**PROCESSES OF HYBRIDIZATION IN SESSILE AND PEDUNCULATE OAK  
BY THE RESULTS OF MOLECULAR GENETIC ANALYSIS**

Molecular genetic analysis of hybrids of pedunculate oak (*Quercus robur* L.) and sessile oak (*Q. petraea* [Matt.] Liebl.), as well as offspring from crossing of hybrids and parental species was carried out. All individuals were divided into six following groups reflecting the taxonomic affiliation of plants (based on cross-breeding schemes and studies of morphological characters). They are 1 – *Q. petraea* (P: *Q. petraea*); 2 – *Q. robur* (P: *Q. robur*); 3 – Hybrid (P: *Q. petraea*); 4 – Hybrid (P: *Q. robur*); 5 – *Q. petraea* (P: Hybrid); 6 – Hybrid (P: Hybrid). The level of genetic polymorphism in each of the six groups and the degree of differentiation between them were assessed using RAPD markers (OP-R11, OP-R05, OP-R10, OP-G06) and SSR markers (ssrQpZAG15, ssrQpZAG9, ssrQpZAG46, ssrQpZAG7). Deviations from the equilibrium state of population genetic parameters were revealed, which allow us to speak about assortative mating between the two species. It is shown that a limited number of genotype variants are involved in the introgression process. Lower values of the variability indices and intrapopulation subdivision in genetic structure of hybrid offspring in comparison with the stands of the parental species reflect this tendency.

**Ключевые слова:** half-sib families, interspecific oak hybrids, microsatellites, simple sequence repeats (SSRs), randomly amplified polymorphic DNA (RAPD).

**For citation:** Padutov V. E. Processes of hybridization in sessile and pedunculate oak by the results of molecular genetics analysis. *Proceedings of BSTU, issue 1, Forestry. Nature Management. Processing of Renewable Resources*, 2021, no. 2 (246), pp. 93–102 (In Russian).

**Введение.** Среди лиственных древесных видов представители рода *Quercus* занимают особое место с экономической и экологической

точки зрения. Кроме того, дубы являются уникальным модельным объектом для изучения процессов адаптации к различным абиотическим

факторам окружающей среды, что связано с широким ареалом их распространения и разнообразием условий произрастания [1–3].

Род Дуб (*Quercus*) насчитывает около 600 видов, произрастающих в основном в умеренном и тропическом поясе Северного полушария, а также в северной части Южной Америки. В Европе наиболее распространенными видами являются дуб черешчатый (*Quercus robur* L.) и дуб скальный (*Quercus petraea* [Matt.] Liebl.), формирующие чистые и смешанные дубравы либо присутствующие в древостоях в виде сопутствующей породы [4]. Несмотря на различные требования к эдафическим условиям и гидрологическому режиму, данные виды способны произрастать совместно, однако распределение деревьев в смешанных древостоях в большинстве случаев соответствует градиенту влажности и плодородия почвы [5]. На территории Беларуси в естественных условиях произрастания встречаются оба указанных вида. Дуб скальный распространен на юго-западе Беларуси в островных участках леса на восточной границе своего ареала, а дуб черешчатый – практически повсеместно, при этом 63,5% общей площади дубрав страны находится на юге в Белорусском Полесье.

Необходимо отметить, что наряду с выраженной экологической дифференциацией дуба в местах контакта популяций различного генетического происхождения активно протекают процессы меж- и внутривидовой гибридизации, обеспечивающей возникновение новых комбинаций генов и генотипов. Отсутствие строгой репродуктивной изоляции между симпатрическими видами *Q. robur* и *Q. petraea* наряду с интенсивным пыльцевым потоком зачастую приводит к образованию фертильных межвидовых гибридов, а также появлению в ходе дальнейших скрещиваний различных вариантов гибридного потомства [6]. Локальный перенос генов между видами может обеспечить расширение ареалов и повысить их приспособляемость к новым лесорастительным условиям. Изучение различных аспектов, связанных с межвидовой гибридизацией дуба черешчатого и дуба скального, представляет собой особую ценность для оценки состояния генофондов видов, изучения механизмов формирования адаптивной изменчивости, получения новых данных о протекающих в популяциях микроэволюционных процессах [7]. Практической стороной данного вопроса является использование результатов исследований в ходе разработки и реализации селекционных мероприятий, связанных с получением высокопродуктивных и устойчивых к биотическим и абиотическим факторам среды генотипов. Особую актуальность исследования по гибридизации

приобретают в связи с усилением процессов массовой деградации и усыхания дубрав, снижением уровня плодоношения и отсутствием естественного возобновления на значительной части ареала дуба.

Несмотря на широкий спектр признаков, которые могут быть использованы для таксономии у рассматриваемых двух видов, многие из них характеризуются индивидуальной, географической, экологической, сезонной и другими типами изменчивости. Исходя из всего вышеперечисленного установление принадлежности деревьев к *Q. robur* или к *Q. petraea* до настоящего времени основано в большинстве случаев на анализе нескольких морфологических признаков, таких как форма листовой пластинки и почки, длина черешка, окраска и текстура желудей, форма кроны, распределение скелетных ветвей и др. [8]. Однако использование морфологического метода в качестве диагностического критерия для анализа процессов межвидовой гибридизации дубов имеет ряд ограничений как субъективного, так и объективного характера, в первую очередь связанного с наличием широкого спектра переходных форм гибридных генотипов *Q. robur* × *Q. petraea* и отсутствием четкой дискретности используемых морфологических признаков. Большой диапазон изменчивости и высокий уровень субъективизма делает затруднительным отнесение индивидуумов к тому или иному таксону [9].

Применение различных методов ДНК-анализа также не позволило выявить четкие генетические маркеры для диагностики симпатрических видов *Q. robur* и *Q. petraea*. Так, из 2800 изученных RAPD-локусов только около 54 показали достоверные различия в частотах встречаемости аллельных вариантов [10]. Аналогичные результаты были получены и при анализе AFLP-маркеров [11]. Проведенные исследования по более чем 30 изоферментным локусам выявили 3 гена, характеризовавшихся межвидовыми различиями. В качестве примера можно привести ген, детерминирующий изоцитратдегидрогеназу (IDH). Последующее секвенирование гена *Idh* позволило выявить значительное число SNPs, имеющих достоверную корреляцию с используемыми основными морфологическими признаками [12]. В то же время четкого видоспецифического нуклеотидного полиморфизма не было выявлено, что связано с наличием межпопуляционных различий для каждого изученного вида. Низкий уровень межвидовой дифференциации также получен и для других STS-маркеров [13]. Еще одним направлением в поиске межвидовых отличий явился анализ локусов, локализованных в геномах цитоплазматических

органоидов, – хлоропластах и митохондриях. Их преимуществом являются, во-первых, отсутствие видимой рекомбинации локусов хпДНК (хлоропластной) и мтДНК (митохондриальной), во-вторых, передача признаков по материнской линии, что в совокупности позволяет рассматривать цитоплазматические маркеры удобным инструментом для видовой идентификации [14]. Тем не менее первоначальный анализ европейских насаждений показал общность гаплотипических вариантов хпДНК для *Q. robur* и *Q. petraea* [15]. При этом, как было продемонстрировано в более поздних исследованиях, низкий уровень дифференциации хлоропластных геномов дубов наблюдался не только среди близкорасположенных насаждений, но и в местах перекрывания ареалов данных видов [7]. Сходные данные были получены и для локусов мтДНК [16]. Вследствие этого было сделано предположение об интенсивном обмене генетическим материалом между *Q. robur* и *Q. petraea* в эпоху последнего оледенения или в ходе постледникового расселения данных видов на территории Европы [9].

Наличие постоянных интенсивных процессов гибридизации при совместном произрастании дуба черешчатого и дуба скального, по всей вероятности, должны оказывать влияние на популяционно-генетическую структуру древостоев: увеличение уровня наблюдаемой гетерозиготности (вследствие наличия гибридного потомства), степени генотипического разнообразия, внутривидовой подразделенности и дифференциации. Проведенный анализ системы скрещиваний в смешанных дубовых насаждениях выявил дисбаланс в частотах встречаемости генотипических вариантов [17]. Избирательный характер скрещивания может быть объяснен наличием репродуктивной изоляции: предзиготической (различием в сроках цветения, конкуренцией при прорастании пыльцевых зерен и оплодотворении) и постзиготической (пониженной жизнеспособностью или гибелью гибридов на разных стадиях онтогенеза). Как было показано в последующих исследованиях (при проведении серии искусственных скрещиваний и последующей оценки гибридного потомства), наибольший вклад в репродуктивную изоляцию вносит предзиготической барьер [18]. Так, например, яйцеклетки *Q. petraea* оплодотворяются в основном спермиями этого же вида, в отличие от *Q. robur* [9].

Несмотря на проведенные широкомасштабные молекулярно-генетические исследования, ряд аспектов остается актуальным, в том числе анализ генетической структуры гибридного потомства от различного типа возвратных скрещиваний. Целью данной работы явилось изучение особенностей генетической структуры

гибридного потомства *Q. robur* × *Q. petraea* различного типа происхождения.

**Основная часть.** Объектом исследования являлись 40 полусибсовых семей *Quercus*, которые были разделены на шесть групп, отражающих таксономическую принадлежность (на основании схем скрещиваний и исследования морфологических признаков): 1 – *Q. petraea* (P: *Q. petraea*); 2 – *Q. robur* (P: *Q. robur*); 3 – Гибрид (P: *Q. petraea*); 4 – Гибрид (P: *Q. robur*); 5 – *Q. petraea* (P: Гибрид); 6 – Гибрид (P: Гибрид).

Препараты суммарной ДНК были получены из листовых пластинок на основании использования модифицированного СТАВ-протокола [19]. Молекулярно-генетический анализ был выполнен на базе использования двух типов маркеров:

а) SSR-локусы, каждый из которых характеризуется большим аллельным разнообразием (мультиаллельная система);

б) RAPD-локусы, которые отличаются низким аллельным разнообразием, но большим числом локусов, дисперсно расположенных в геноме (диаллельная система).

Для получения достоверных результатов RAPD-анализа в ходе исследований выполнялись следующие требования: использование только яркоокрашенных специфических фракций, трехкратная повторность амплификации каждого образца, предварительный анализ препаратов суммарной ДНК на отсутствие грибной и бактериальной инфекции с помощью универсальных праймеров [20, 21].

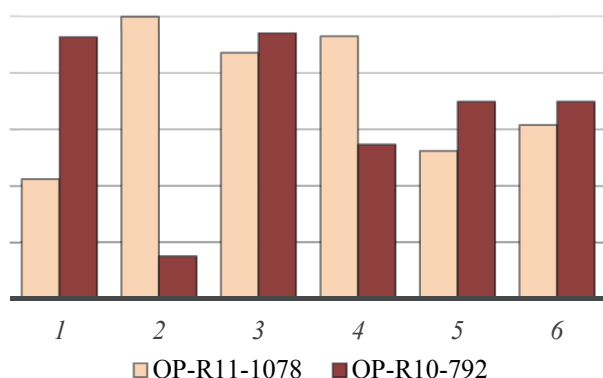
Для проведения ПЦР-амплификации был использован High-Fidelity DNA Polymerase (5Taq:1Pfu) Master mix (Праймтех, Беларусь). Условия проведения ПЦР-реакции соответствовали рекомендуемому протоколу фирмы-производителя. В качестве SSR- и RAPD-праймеров были использованы наборы олигонуклеотидных последовательностей, ранее показавших свою эффективность [22, 23].

Электрофоретический анализ ампликонов SSR-локусов был выполнен с помощью генетического анализатора ABI PRISM 310 (Life-Technologies, USA) согласно инструкции компании-изготовителя. RAPD-фрагменты были проанализированы в 1,4%-ном агарозном геле с применением 1,5×TBE буфера по стандартной методике, с последующим окрашиванием бромистым этидием и визуализацией в УФ-свете [19].

Интерпретация результатов, генотипирование образцов, статистическая обработка и расчет основных популяционно-генетических параметров были осуществлены согласно общепринятой системе [24].

В ходе предварительного тестирования набора микросателлитных локусов было отобрано четыре SSR-маркера: *ssrQpZAG15*, *ssrQpZAG9*, *ssrQpZAG46* и *ssrQpZAG7*, показавших статистически достоверные различия в аллельном или генотипическом разнообразии между *Q. robur* и *Q. petraea*. Среди RAPD-праймеров наиболее информативными оказались OP-R11, OP-R05, OP-R10 и OP-G06, в ПЦР-спектрах которых были выявлены диагностически значимые зоны.

Доля полиморфных RAPD-локусов (по 99%-ному критерию) варьировала от 79% для Гибрид (P: *Q. robur*) до 100% у *Q. robur* (P: *Q. robur*) и *Q. petraea* (P: *Q. petraea*). Аналогично для этих групп изменялась величина такого параметра, как среднее число аллелей на locus – от 1,790 до 2,000. Уровень генетического разнообразия Неи для исследованных групп варьировал от 0,277 для Гибрид (P: *Q. robur*) до 0,324 у *Q. robur* (P: *Q. robur*) и в целом составлял 0,331. Детальный анализ параметров генетического полиморфизма среди отдельных локусов выявил закономерности в распределении показателя генетического разнообразия Неи в зависимости от диагностической значимости маркеров. В качестве примера на рис. 1 приведены результаты анализа по двум локусам OP-R11<sup>1078</sup> и OP-R10<sup>792</sup>. Как видно, на диаграмме видоспецифические локусы имеют наибольший уровень генетического разнообразия в одной из групп семей, представленных негибридными генотипами. При этом в альтернативной группе данный locus характеризуется наименьшим уровнем генетического полиморфизма, а гибридные генотипы занимают промежуточное положение, что соответствует методологии анализа признаков с доминантным характером проявления [24].

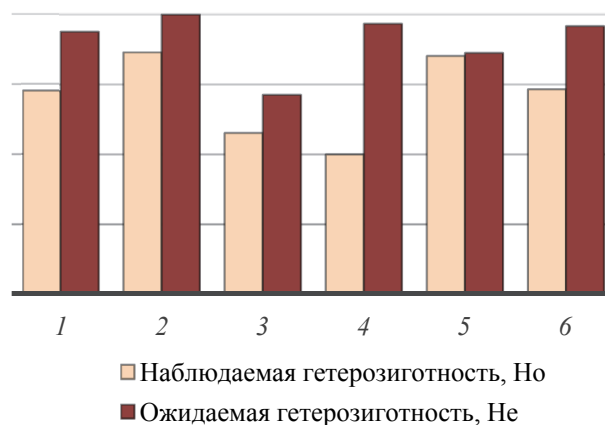


1 – *Q. petraea* (P: *Q. petraea*); 2 – *Q. robur* (P: *Q. robur*); 3 – Гибрид (P: *Q. petraea*); 4 – Гибрид (P: *Q. robur*); 5 – *Q. petraea* (P: Гибрид); 6 – Гибрид (P: Гибрид)

Рис. 1. Уровень генетического разнообразия Неи RAPD-локусов OP-R11<sup>1078</sup> и OP-R10<sup>792</sup> в исследуемых группах семей *Quercus*

В ходе SSRP-анализа ядерной ДНК исследуемых групп рода *Quercus* установлено, что аллельное разнообразие среди изученных микросателлитных локусов было неодинаковым, варьируя от низкого у *ssrQpZAG15* (9 аллелей) до высокого у *ssrQpZAG46* (32). Среднее число вариантов выявлено для *ssrQpZAG9* (23) и *ssrQpZAG7* (20). При этом следует отметить, что большинство найденных аллельных вариантов для каждого микросателлитного локуса имели низкую частоту встречаемости или были представлены в единичных случаях. С одной стороны, данные варианты отражают локальную географическую изменчивость и могут быть использованы для оценки величины генного потока между популяциями; с другой – увеличивают степень внутривидовой подразделенности, что снижает диагностическую ценность маркера для выявления межвидовых различий *Q. robur* и *Q. petraea*. Кроме того, повышенная мутабельность генетического маркера увеличивает вероятность появления гомоплазии аллельных вариантов, и, как следствие, ложного занижения уровня межвидовой дифференциации.

При оценке уровня генетического полиморфизма исследованных групп семей по SSR-локусам обращает на себя внимание то, что, как видно из диаграммы (рис. 2), наименьшими значениями наблюдаемой гетерозиготности характеризуется гибридное потомство, происходящее от исходных видов – *Q. robur* и *Q. petraea*.



1 – *Q. petraea* (P: *Q. petraea*); 2 – *Q. robur* (P: *Q. robur*); 3 – Гибрид (P: *Q. petraea*); 4 – Гибрид (P: *Q. robur*); 5 – *Q. petraea* (P: Гибрид); 6 – Гибрид (P: Гибрид)

Рис. 2. Уровень гетерозиготности изученных групп семей на основании анализа SSR-локусов

Это противоречит биологической концепции процесса гибридизации, однако может быть объяснено ограниченным числом индивидов, участвующих в скрещивании вследствие

наличия репродуктивного барьера – несовпадение сроков цветения, прогамная несовместимость и др. [25]. При этом уровень ожидаемой гетерозиготности был выше в случае материнских растений *Q. robur* по сравнению с *Q. petraea*, что указывает на избирательный характер опыления.

Исходя из данных, представленных на диаграмме, высоким уровнем наблюдаемой гетерозиготности среди гибридного потомства характеризуются полусибсовыи семьи, происходящие от гибридных материнских растений. Увеличение доли гетерозиготных деревьев может быть обусловлено большим количеством вариантов генотипов, участвующих в скрещивании, и высокой репродуктивной пластичностью всей группы в целом. Группа полусибсовых семей дуба скального, полученных от гибридных материнских растений, была наиболее однородна по генетической структуре, что и обусловило сходство значений параметров ожидаемой и наблюдаемой гетерозиготности. Для групп семей, представленных видами *Q. robur* и *Q. petraea*, уровень наблюдаемой гетерозиготности был несколько ниже ожидаемого, указывая на наличие инбредных процессов, происходящих при естественном опылении.

Использование набора RAPD-локусов в качестве генетических маркеров позволило для семей дуба разного происхождения выявить отличия в генетической структуре, связанные с представленностью и частотой встречаемости аллельных вариантов в той или иной группе. При этом достоверные различия среди групп семей были установлены у локусов, имеющих коэффициент генетической подразделенности  $G_{st}$ , превышающий 0,09. В то же время RAPD-маркеры с низким значением параметров подразделенности также характеризовались и незначительным уровнем дифференциации между группами, а полученные на основании их анализа результаты кластеризации на дендрограмме являлись статистически недостоверными и варьировали в широкой степени между локусами.

Направленность кластеризации с использованием локусов с  $G_{st} > 0,09$  (57% от общего числа) в большинстве случаев носила сходный характер, что позволило использовать только данный набор маркеров для изучения степени генетической дифференциации изученных семей. Как видно из структуры дендрограммы (рис. 3), все исследованные группы разделяются на два отдельных кластера, один из которых включает семьи, представленные семенным потомством дуба черешчатого, другой характеризуется смешанным происхождением генотипов – от *Q. petraea* и гибридных материнских растений. Это указывает на то, что у большинства групп гибридных семей вклад дуба скального в их генетическую структуру превышает влияние дуба черешчатого, при этом следует добавить, что не удалось сформировать группу семей гибридного происхождения, имеющих фенотипические признаки дуба черешчатого.

Ранее в ходе анализа результатов искусственного опыления было показано, что материнские деревья *Q. robur* могут быть оплодотворены пыльцой обоих видов, а материнские деревья *Q. petraea* опыляются предпочтительней мужскими гаметами своего вида и гибридное потомство *Q. petraea* × *Q. robur* образуется в незначительном количестве [25]. Одним из возможных объяснений всего вышесказанного является наличие определенных репродуктивных преград, в результате действия которых происходит преимущественное опыление гибридов пыльцой *Q. petraea* или гибридов, по сравнению с *Q. robur*. Интересным моментом является большая близость к чистому дубу скальному потомства, имеющего те же видовые признаки, хотя и полученного от гибридного материнского дерева, по сравнению с потомством, обладающим гибридными чертами, но происходящим от материнского дерева дуба скального. Данный факт позволяет предположить особое значение отцовского пула генов на формирование видоспецифических признаков.

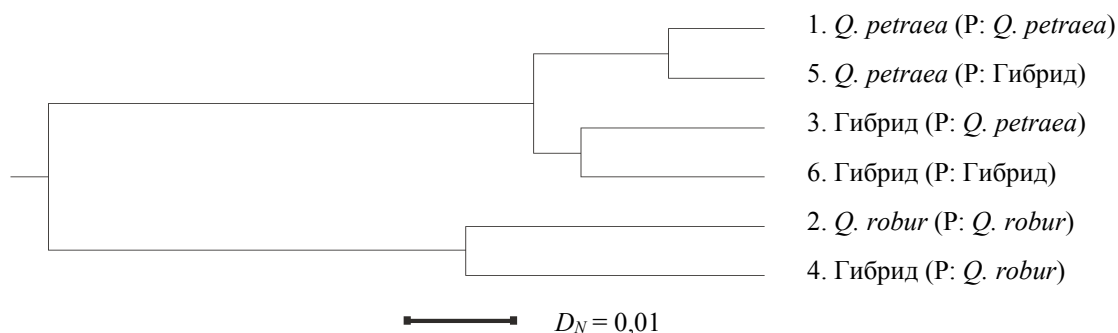


Рис. 3. Уровень генетической дифференциации изученных групп на основании анализа RAPD-локусов

Указанные выше объяснения можно рассматривать только как предположения, а не окончательно установленные факты, поскольку, проводя сравнительный анализ результатов исследования, необходимо учитывать доминантный характер RAPD-локусов, не позволяющий напрямую оперировать генотипами и частотами аллелей (они являются теоретически рассчитанными величинами). Это может вносить некоторые погрешности при определении параметров генетического полиморфизма, подразделенности и дифференциации, особенно в случае выборки с несбалансированной генотипической структурой. В то же время межвидовая гибридизация из-за наличия и степени проявления тех или иных типов репродуктивной изоляции практически всегда приводит к дисбалансу генотипической структуры внутри потомства.

Наряду с этим диаллельная система RAPD-маркеров для оценки процессов межвидовой гибридизации характеризуется своими преимуществами: межвидовые различия по частоте встречаемости амплифицируемых аллельных вариантов RAPD-локусов достаточно велики; вероятность возникновения гомоплазии доминантного аллеля в RAPD-анализе является крайне низкой; гибриды по диагностически значимым RAPD-локусам характеризуются наличием доминантного аллеля одного из родительских таксонов, что напрямую свидетельствует о видовых составляющих в генотипе гибридного потомства. Также следует добавить, что в последнее время выявление и изучение локусов, фланкируемых инвертированными повторами (в том числе и RAPD), приобретает особый интерес, что связано со сходством структурной организации или их принадлежностью к мигрирующим генетическим элементам (транспозонам, ретротранспозонам и др.), широко представленных в геноме большинства растений и определяющих формирование и проявление многих морфофизиологических признаков [26].

По частотам встречаемости аллелей микросателлитных локусов также были рассчитаны коэффициенты генетической дистанции между группами, на основании которых построена дендрограмма (рис. 4), отражающая степень генетико-таксономических взаимоотношений *Q. robur*, *Q. petraea* и гибридных генотипов различного происхождения. Наибольшими генетическими различиями характеризуются семьи, представленные генотипами, относящимися по морфологическим признакам к *Q. robur* и *Q. petraea*. Как видно из структуры дендрограммы, основанной на использовании SSR-локусов, кластеризация групп по уровню генетического сходства совпадает с результатами RAPD-анализа, за исключением расположения группы

гибридных семей, происходящих от материнских деревьев *Q. robur*.

Наиболее близкими генетическими структурами характеризуется потомство, отнесенное по морфологическим признакам к *Q. petraea*, несмотря на различное происхождение. Данное явление может объясняться особенностями возвратного скрещивания межвидовых гибридов дуба [9]. Исходя из результатов изучения генетической структуры смешанных популяций предложена модель восстановления («resurrection») *Q. petraea* путем насыщающего скрещивания межвидовых гибридов с деревьями дуба скального. В поддержку данной модели выступают следующие биологические особенности *Q. petraea* и *Q. robur*: наличие ассиметричного потока генов вследствие ассортативного скрещивания гибридов из-за сроков цветения и предпочтительности оплодотворения межвидовых гибридов дуба пыльцой *Q. petraea* (на стадии прорастания пыльцевых трубок и образования зиготы). Также в пользу избирательного характера оплодотворения в нашем исследовании выступает и отсутствие в потомстве, полученном от гибридных материнских растений, индивидуумов с морфологическими признаками *Q. robur*. Кроме того, следует отметить существование ограниченного количества морфофизиологических признаков, видоспецифичных для дуба скального и дуба черешчатого, которые локализованы в нескольких группах сцепления, что позволяет восстанавливать исходные морфотипы в ходе незначительного числа поколений. Данная модель также подтверждается отсутствием большого числа промежуточных морфологических форм *Q. robur* и *Q. petraea* при совместном произрастании в смешанных популяциях [8].

Второй кластер (рис. 4) представлен гибридами, происходящими от гибридных материнских деревьев и *Q. robur*, в то же время гибриды, полученные от *Q. petraea*, на дендрограмме обособились отдельно. Общая близость гибридов различного происхождения к дубу скальному совпадает с данными, полученными по RAPD-локусам (рис. 3), и с результатами исследований, проведенных ранее разными авторами. В то же время отдельного рассмотрения требует расположение группы 4 (гибридные растения, происходящие от материнского растения *Q. robur*).

Ранее отмечалось [25], что для оплодотворения необходима генетическая совместимость, т. е. к скрещиванию предрасположены определенные варианты генотипов *Q. robur* × *Q. petraea*. Дополнительным подтверждением этому является высокое положительное значение индекса фиксации  $F_{is}$ , полученное в настоящем исследовании на основании использования микросателлитных маркеров – 19,4% (варьируя среди локусов от 14 до 25%, среди семей внутри групп от 0,1 до 43%).

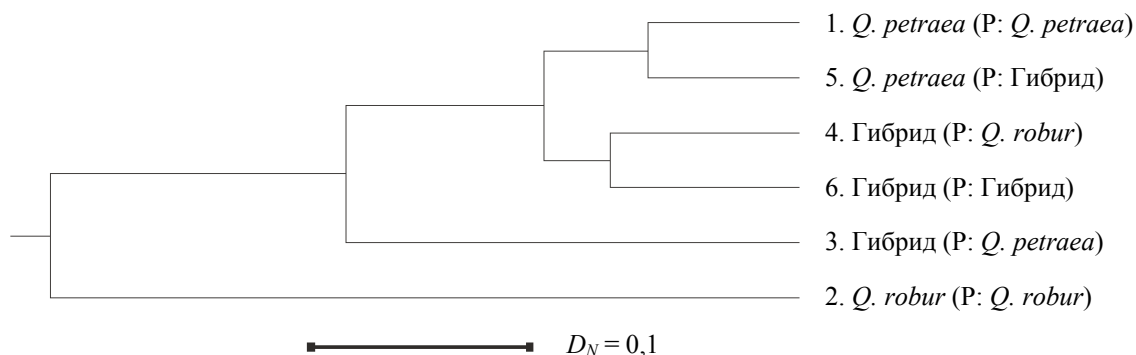


Рис. 4. Уровень генетической дифференциации изученных групп на основании анализа SSR-локусов

При этом максимальная величина  $F_{is}$  (в данном случае она указывает на недостаток гетерозиготных деревьев, поскольку имела положительное значение, а не отрицательное) была получена именно для семей группы 4, что, по-видимому, объясняет ее расположение на дендрограмме. В случае RAPD-маркеров вследствие методологических особенностей этого метода выявить такой дисбаланс затруднительно и дендрограмма строится на основании наличия видоспецифических вариантов, а не частоты их встречаемости.

Один из результатов нарушения панмиктического скрещивания в естественных древостоях выражается в формировании у потомства генотипической структуры, отличающейся от исходной материнской популяции. Дополнительным фактором гибридизации, обуславливающим трансформацию генотипической структуры популяций, является появление новых аллельных и локусных комбинаций [9]. С этим утверждением согласуется то, что в настоящем исследовании доля редких и уникальных вариантов генотипов достигает 40%, хотя это не компенсирует недостаток гетерозиготных генотипов по доминирующим аллельным вариантам. Анализ генотипической структуры по микросателлитным локусам показывает, что наименьшим дисбалансом характеризуются семьи *Q. petraea* (P: *Q. petraea*) и *Q. robur* (P: *Q. robur*), поскольку отклонения в частоте встречаемости от расчетных для большинства генотипов не превышает

0,5% и 1,5% соответственно. Для остальных исследованных групп отклонения в частотах встречаемости генотипических вариантов являются более значимыми, что указывает на ассортативный характер скрещиваний и доминирования группы определенных комбинаций аллелей в потомстве.

**Заключение.** Результаты анализа генетической структуры гибридного потомства показывают наличие ассортативного скрещивания между *Q. robur* и *Q. petraea* вследствие частичного репродуктивного барьера, обусловленного фенологическими, физиологическими и другими различиями. Исходя из ассиметричного характера скрещивания, недостатка гетерозиготных генотипов по сравнению с расчетными значениями, низкими величинами показателей изменчивости и внутривидовой подразделенности (по сравнению с популяциями исходных видов) в гибридизационных процессах участвует ограниченное число особей. В переносе генов между *Q. robur* и *Q. petraea* и их дальнейшей интрогрессией в видовой генофонд особое значение имеют возвратные скрещивания гибридов с исходными видами, в первую очередь с *Q. petraea*. Процессы гибридизации обеспечивают возникновение новых внутри- и межгенных аллельных комбинаций, которые могут характеризоваться более высокой биологической устойчивостью в условиях изменяющегося климата.

#### Список литературы

1. Gailing O., Vornam B., Leinemann L., Finkeldey R. Genetic and genomic approaches to assess adaptive genetic variation in plants: forest trees as a model // *Physiologia Plantarum*. 2009. Vol. 137. P. 509–519.
2. Ковалевич О. А., Каган Д. И., Падутов В. Е. Геногеографические особенности распространения популяций дуба черешчатого в Беларуси // Современное состояние, тенденции развития, рациональное использование и сохранение биологического разнообразия растительного мира: материалы Междунар. науч. конф., Минск – Нарочь, 23–26 сент. 2014 г. Минск, 2014. С. 328–332.
3. Кавендер-Бэрес Д., Манос П., Хипп Э. Расцвет дубов // *В мире науки*. 2020. № 10. С. 6–13.

4. Kleinschmit J, Kleinschmit J. G. R. *Quercus robur* – *Quercus petraea*: a critical review of the species concept // Glasnik za Šumske Pokuse. 2000. Vol. 37. P. 441–452.
5. Lévy G., Becker M., Duhamel D. A comparison of the ecology of pedunculate and sessile oaks: radial growth in the central and northwest of France // For. Ecol. Manage. 1992. Vol. 55. P. 51–63.
6. Bacilieri R., Ducouso A., Petit R. J., Kremer A. Mating system and asymmetric hybridization in a mixed stand of European oaks // Evolution. 1996. Vol. 50. P. 900–908.
7. Petit R. J., Pineau E., Demesure B., Bacilieri R., Ducouso A., Kremer A. Chloroplast DNA footprints of postglacial recolonization by oaks // PNAS. 1997. Vol. 94. No. 18. P. 9996–10001.
8. Kremer A., Dupouey J. L., Deans J. D., Cottrell J., Csaikl U., Finkeldey R., Espinel S., Jensen J., Kleinschmit J., van Dam B., Ducouso A., Forrest I., de Heredia U. L., Lowe A. J., Tutkova M., Munro R. C., Steinhoff S., Badaeu V. Leaf morphological differentiation between *Quercus robur* and *Quercus petraea* is stable across Western European mixed oak stands // Ann. For. Sci. 2002. Vol. 59. No. 7. P. 777–787.
9. Petit R. J., Bodénès C., Ducouso A., Roussel G., Kremer A. Hybridization as a mechanism of invasion in oaks // New Phytologist. 2003. Vol. 161. P. 151–164.
10. Bodénès C., Joandet S., Laigret F., Kremer A. Detection of genomic regions differentiating two closely related oak species *Quercus petraea* (Matt.) Liebl. and *Quercus robur* L. // Heredity. 1997. Vol. 78. P. 433–444.
11. Mariette S., Cottrell J., Csaikl U. M., Goikoechea P., König A., Lowe A. J., van Dam B. C., Barreneche T., Bodénès C., Streiff R., Burg K., Groppe K., Munro R. C., Tabbener H., Kremer A. Comparison of levels of genetic diversity detected AFLP and microsatellite markers within and among mixed *Q. petraea* (Matt.) Liebl. and *Q. robur* L. stands // Silvae Genet. 2002. Vol. 51. No. 2. P. 72–79.
12. Vidalis A., Curtu A. L., Finkeldey R. Novel SNP development and analysis at a NADP<sup>+</sup>-specific IDH enzyme gene in a four species mixed oak forest // Plant Biology. 2013. Vol. 15. P. 126–137.
13. Paran I., Michelmore R. W. Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew in resistance genes in lettuce // Theor. Appl. Genet. 1993. Vol. 85. P. 985–993.
14. Kremer A., Petit R. J., Zanetto A., Fougère V., Ducouso A., Wagner D. B., Chauvin C. Nuclear and organelle diversity in *Quercus robur* and *Q. petraea* // Genetic variation in European populations of forest trees (M. Muller-Starck, M. Ziehe eds.). Frankfurt, Germany: Sauerländer, 1991. P. 141–166.
15. Petit R. J. Polymorphisme de l'ADN chloroplastique dans un complexe d'espèces: les chênes blancs européens: thesis. Orsay, France: University of Paris XI-Orsay, 1992.
16. Dumolin-Lapègue S., Pemonge M.-H., Petit R. J. Association between chloroplast and mitochondrial lineages in oaks // Molecular Biology and Evolution. 1998. Vol. 15. P. 1321–1331.
17. 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. Manage. 2010. Vol. 259. P. 2026–2035.
18. Lepais O., Gerber S. Reproductive patterns shape introgression dynamics and species succession within the European white oak species complex // Evolution. 2011. Vol. 65. P. 156–170.
19. Падутов В. Е., Баранов О. Ю., Воропаев Е. В. Методы молекулярно-генетического анализа. Минск: Юнипол, 2007. 176 с.
20. White T. J., Bruns T. D., Lee S. B., Taylor J. W., Innis M. A., Gelfand D. H., Sninsky J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics // PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky and T. J. White eds.). New York: Academic Press Inc., 1990. P. 315–322.
21. Lu J.-J., Perng C. L., Lee S. Y., Wan C. C. Use of PCR with universal primers and restriction endonuclease digestions for detection and identification of common bacterial pathogens in cerebrospinal fluid // J. Clin. Microbiol. 2000. Vol. 38. No. 6. P. 2076–2080.
22. Steinkellner H., Lexer C., Turetschek E., Glössl J. Conservation of (GA)<sub>n</sub> microsatellite loci between *Quercus* species // Molecular Ecology. 1997. Vol. 6. P. 1189–1194.
23. Moreau F., Kleinschmit J., Kremer A. Molecular differentiation between *Q. petraea* and *Q. robur* by RAPD // Forest Genetics. 1994. Vol. 1. No. 1. P. 51–64.
24. Which DNA Marker for Which Purpose. Final Compendium of the Research Project “Development, optimization and validation of molecular tools for assessment of biodiversity in forest trees” in the European Union DGXII Biotechnology FW IV Research Programme “Molecular Tools for Biodiversity” / E. M. Gillet (lead.). Frankfurt, 1999. 253 p.
25. Abadie P., Roussel G., Dencausse B., Bonnet C., Bertocchi E., Louvet J.-M., Kremer A., Garnier-Géré P. Strength, diversity and plasticity of postmating reproductive barriers between two hybridizing oak



species (*Quercus robur* L. and *Quercus petraea* (Matt) Liebl.) // Journal of Evolutionary Biology. 2012. Vol. 25. No. 1. P. 157–173.

26. Kumar A., Bennetzen J. L. Plant retrotransposons // Ann. Rev Genet. 1999. Vol. 33. P. 479–532.

### References

1. Gailing O., Vornam B., Leinemann L., Finkeldey R. Genetic and genomic approaches to assess adaptive genetic variation in plants: forest trees as a model. *Physiologia Plantarum*, 2009, vol. 137, pp. 509–519 (In English).

2. Kovalevich O. A., Kagan D. I., Padutov V. E. Genogeographic features of pedunculate oak population distribution in Belarus. *Materialy Mezhdunar. nauch. konf. "Sovremennoye sostoyaniye, tendentsii razvitiya, ratsional'noye ispol'zovaniye i sokhraneniye biologicheskogo raznoobraziya rastitel'nogo mira"* [Materials of the International scientific Conference "The current state, development trends, rational use and conservation of biological diversity of the plant world"]. Minsk, 2014, pp. 328–332 (In Russian).

3. Cavender-Bares J., Manos P. S., Hipp A. L. The Blossom of Oaks. *V mire nauki* [In the world of science], 2020, no. 10, pp. 6–13 (In Russian).

4. Kleinschmit J., Kleinschmit J. G. R. *Quercus robur* – *Quercus petraea*: a critical review of the species concept. *Glasnik za Šumske Pokuse*, 2000, vol. 37, pp. 441–452 (In English).

5. Lévy G., Becker M., Duhamel D. A comparison of the ecology of pedunculate and sessile oaks: radial growth in the central and northwest of France. *For. Ecol. Manage*, 1992, vol. 55, pp. 51–63 (In English).

6. Bacilieri R., Ducouso A., Petit R. J., Kremer A. Mating system and asymmetric hybridization in a mixed stand of European oaks. *Evolution*, 1996, vol. 50, pp. 900–908 (In English).

7. Petit R. J., Pineau E., Demesure B., Bacilieri R., Ducouso A., Kremer A. Chloroplast DNA footprints of postglacial recolonization by oaks. *PNAS*, 1997, vol. 94, no. 18, pp. 9996–10001 (In English).

8. Kremer A., Dupouey J. L., Deans J. D., Cottrell J., Csaikl U., Finkeldey R., Espinel S., Jensen J., Kleinschmit J., van Dam B. C., Ducouso A., Forrest I., de Heredia U. L., Lowe A. J., Tutkova M., Munro R. C., Steinhoff S., Badaeu V. Leaf morphological differentiation between *Quercus robur* and *Quercus petraea* is stable across Western European mixed oak stands. *Ann. For. Sci.*, 2002, vol. 59, no. 7, pp. 777–787 (In English).

9. Petit R. J., Bodénès C., Ducouso A., Roussel G., Kremer A. Hybridization as a mechanism of invasion in oaks. *New Phytologist*, 2003, vol. 161, pp. 151–164 (In English).

10. Bodénès C., Joandet S., Laigret F., Kremer A. Detection of genomic regions differentiating two closely related oak species *Quercus petraea* (Matt.) Liebl. and *Quercus robur* L. *Heredity*, 1997, vol. 78, pp. 433–444 (In English).

11. Mariette S., Cottrell J., Csaikl U. M., Goikoechea P. G., König A. O., Lowe A. J., van Dam B. C., Barreneche T., Bodénès C., Streiff R., Burg K., Groppe K., Munro R. C., Tabbener H., Kremer A. Comparison of levels of genetic diversity detected AFLP and microsatellite markers within and among mixed *Q. petraea* (Matt.) Liebl. and *Q. robur* L. stands. *Silvae Genet.*, 2002, vol. 51, no. 2, pp. 72–79 (In English).

12. Vidalis A., Curtu A. L., Finkeldey R. Novel SNP development and analysis at a NADP<sup>+</sup>-specific IDH enzyme gene in a four species mixed oak forest. *Plant Biology*, 2013, vol. 15, pp. 126–137 (In English).

13. Paran I., Michelmore R. W. Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew in resistance genes in lettuce. *Theor. Appl. Genet.*, 1993, vol. 85, pp. 985–993 (In English).

14. Kremer A., Petit R. J., Zanetto A., Fougère V., Ducouso A., Wagner D. B., Chauvin C. Nuclear and organelle diversity in *Quercus robur* and *Q. petraea*. In: *Genetic variation in European populations of forest trees* (M. Muller-Starck, M. Ziehe eds.). Frankfurt, Germany, Sauerländer, 1991, pp. 141–166 (In English).

15. Petit R. J. *Polymorphisme de l'ADN chloroplastique dans un complexe d'espèces: les chênes blancs européens*. Thesis, Orsay, France, University of Paris XI-Orsay, 1992.

16. Dumolin-Lapègue S., Pemonge M.-H., Petit R. J. Association between chloroplast and mitochondrial lineages in oaks. *Molecular Biology and Evolution*, 1998, vol. 15, pp. 1321–1331 (In English).

17. 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. Management*, 2010, vol. 259, pp. 2026–2035 (In English).

18. Lepais O., Gerber S. Reproductive patterns shape introgression dynamics and species succession within the European white oak species complex. *Evolution*, 2011, vol. 65, pp. 156–170 (In English).

19. Padutov V. E., Baranov O. Yu., Voropaev E. V. *Metody molekulyarno-geneticheskogo analiza* [Methods of molecular and genetic analysis]. Minsk, Yunipol Publ., 2007. 176 p.

20. White T. J., Bruns T. D., Lee S. B., Taylor J. W., Innis M. A., Gelfand D. H., Sninsky J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky and T. J. White eds.). New York, Academic Press Inc., 1990, pp. 315–322 (In English).

21. Lu J.-J., Peng C. L., Lee S. Y., Wan C. C. Use of PCR with universal primers and restriction endonuclease digestions for detection and identification of common bacterial pathogens in cerebrospinal fluid. *J. Clin. Microbiol.*, 2000, vol. 38, no. 6, pp. 2076–2080 (In English).

22. Steinkellner H., Lexer C., Turetschek E., Glössl J. Conservation of (GA)(n) microsatellite loci between *Quercus* species. *Molecular Ecology*, 1997, vol. 6, pp. 1189–1194 (In English).

23. Moreau F., Kleinschmit J., Kremer A. Molecular differentiation between *Q. petraea* and *Q. robur* by RAPD. *Forest Genetics*, 1994, vol. 1, no. 1, pp. 51–64 (In English).

24. Which DNA Marker for Which Purpose. Final Compendium of the Research Project “*Development, optimization and validation of molecular tools for assessment of biodiversity in forest trees*” in the European Union DGXII Biotechnology FW IV Research Programme “*Molecular Tools for Biodiversity*” (E. M. Gillet lead.). Frankfurt, 1999. 253 p.

25. Abadie P., Roussel G., Dencausse B., Bonnet C., Bertocchi E., Louvet J.-M., Kremer A., Garnier-Géré P. Strength, diversity and plasticity of postmating reproductive barriers between two hybridizing oak species (*Quercus robur* L. and *Quercus petraea* (Matt) Liebl.). *Journal of Evolutionary Biology*, 2012, vol. 25, no. 1, pp. 157–173 (In English).

26. Kumar A., Bennetzen J. L. Plant retrotransposons. *Ann. Rev. Genet.*, 1999, vol. 33, pp. 479–532 (In English).

#### Информация об авторе

**Падутов Владимир Евгеньевич** – доктор биологических наук, член-корреспондент НАН Беларуси, заведующий научно-исследовательским отделом генетики, селекции и биотехнологии. Институт леса Национальной академии наук Беларуси (246001, г. Гомель, ул. Пролетарская, 71, Республика Беларусь). E-mail: forestgen@mail.ru

#### Information about the author

**Padutov Vladimir Evgen'yevich** – DSc (Biology), Corresponding Member of the National Academy of Sciences of Belarus, Head of the Research Department of Genetics, Breeding and Biotechnology. Forest Institute of the National Academy of Sciences of Belarus (71, Proletarskaya str., Gomel', 246001, Belarus). E-mail: forestgen@mail.ru

Поступила 15.03.2021