



Сравнительная филогеография двух видов ольхи (род *Alnus* L., *Betulaceae*) в восточной части ареала, исследованная генетическими маркерами

Штейнберг Ю.Д., Научный руководитель: Семерикова С.А
Институт Экологии Растений и Животных УрО РАН, г. Екатеринбург, Россия



Введение

Актуальность исследования обусловлена недостаточной изученностью генетической дифференциации и эволюции *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. и *Alnus incana* (L.) Moench. в восточной части ареала (Балканы, Причерноморье, Кавказ, Кольский п-в). Результаты исследования важны для понимания процессов видообразования, эволюции и разработки мер по сохранению видов в условиях изменяющегося климата.

Цель работы - оценить особенности популяционно-генетической структуры ольхи черной (*A. glutinosa*) и серой (*A. incana*) в некоторых районах восточной части ареала, с использованием двух типов генетических маркеров.

Задачи:

- Охарактеризовать изменчивость и дифференциацию популяций двух видов ольхи в Болгарии, в сравнении с популяциями северо-востока Европы и Кавказа.
- Оценить обоснованность выделения *A. kolaensis* Orlova (Кольский п-в) как самостоятельного морфовида, отличного от *A. incana*.
- Установить степень гибридности в смешанных популяциях ольхи на Кавказе и в Болгарии.

Материалы и методы

На Балканах (Болгария) исследовано 50 образцов из четырех выборок *A. glutinosa* и 38 образцов из двух выборок *A. incana* (Рис.1). Из пяти местоположений Кольского п-ва исследовано 47 особей, в сравнении с *A. incana* из других частей европейской России, от Калининградской обл. до Урала. Для оценки уровня гибридности было проанализировано 98 образцов двух видов из четырех выборок Кавказа и Балкан. Геномную ДНК выделяли методом СТАВ из высушенных в силикагеле листьев (Devey et al., 1996). В качестве ядерных маркеров использовано 19 ядерных микросателлитных локусов (nSSR) из двух мультиплексов: (Drasnarova et al., 2016) и (Lepais et al., 2011). Первичные данные, полученные на секвенаторе НАНОФОР 05, преобразовывали в генотипические данные с помощью программы GeneMapper 3.5. Байесовскую кластеризацию генотипов проводили с помощью программы STRUCTURE (Pritchard et al., 2000), объединение прогнозов осуществляли в программе Clumpak (Kopelman et al., 2015). В совместном анализе *A. glutinosa* и *A. incana* использовались 14 локусов, (так как у *A. incana* локусы *Ag23*, *Ag25* не амплифицировались, *A2* и *Ag30* были не изменчивы, а локусы *A10*, *A26* и *Ag27* имели четные и нечетные аллели у разных видов (особи ольхи черной имели четные аллели, а ольхи серой – нечетные)). В программе GenAIEХ (Peakall et al., 2012) проводился расчет параметров изменчивости nSSR локусов, анализ структуры изменчивости (AMOVA), на основе генетических дистанций проведена РСoA ординация популяций и индивидуумов. В качестве маркеров матерински наследуемой хлоропластной ДНК (хпДНК) использовали межгенные фрагменты *ndhF-rpl32*, *psbI-petA* и *3'rps16-5'trnK* (Shaw et al., 2007) (общая длина ~ 2900 п. н.). Получены нуклеотидные последовательности для 24 образцов из шести болгарских популяций. Филогенетические отношения хпДНК гаплотипов определяли с использованием байесовского подхода (BI) и метода максимальной экономии (MP) в программах MrBayes (Ronquist et al., 2003) и PAUP (Swofford, 2002), с привлечением данных предыдущих исследований.

Результаты и обсуждение

Ядерная изменчивость

При $K=2$ (максимальное ΔK) *A. glutinosa* четко делится на подвиды: типовой *A. glutinosa* ssp. *glutinosa* и ольха бородачатая *A. glutinosa* ssp. *barbata* С.А. Меу, характерный для Кавказа (Рис.3). Аналогичное разделение показывает ординация популяций (Рис.5). При $K=3$ и 4 выделяются крымский кластер (фиолетовый) и кластер, доля которого высока в крымских и балканских выборках (зеленый). Примесь кластера ольхи бородачатой присутствует в крымских выборках и в болгарской выборке №8 из массива Странджа. Болгарские выборки *A. glutinosa* занимают промежуточное положение между Крымом и северной частью ареала. При анализе nSSR изменчивости у *A. incana* было проанализировано 18 популяций. Подразделение популяций *A. incana* имеет сходную с *A. glutinosa* географическую структуру - максимально дифференцированы популяции основного ареала и Кавказа. При $K=3$ отдельный кластер образуют выборки Болгарии (Рис.2), которые на ординации отделяются по второй компоненте (Рис.4). Обособленность *A. kolaensis* микросателлитными данными не подтверждается (Рис.4 и 9), так как не происходит разделение на отдельные кластеры. Метод ординации демонстрирует схожую тенденцию.

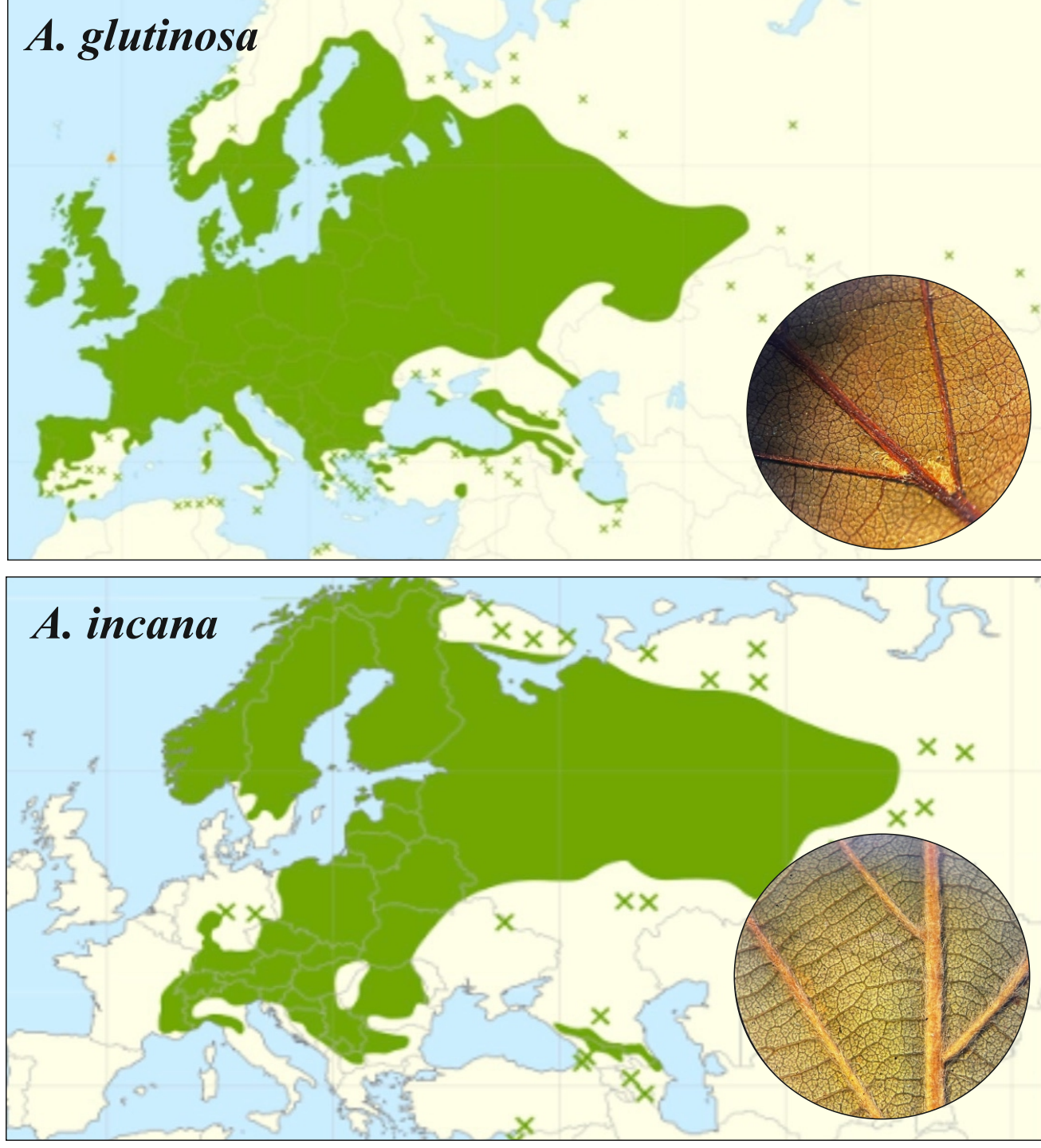


Рисунок 1 – Ареалы видов *Alnus* и фото опушения нижней поверхности листа.

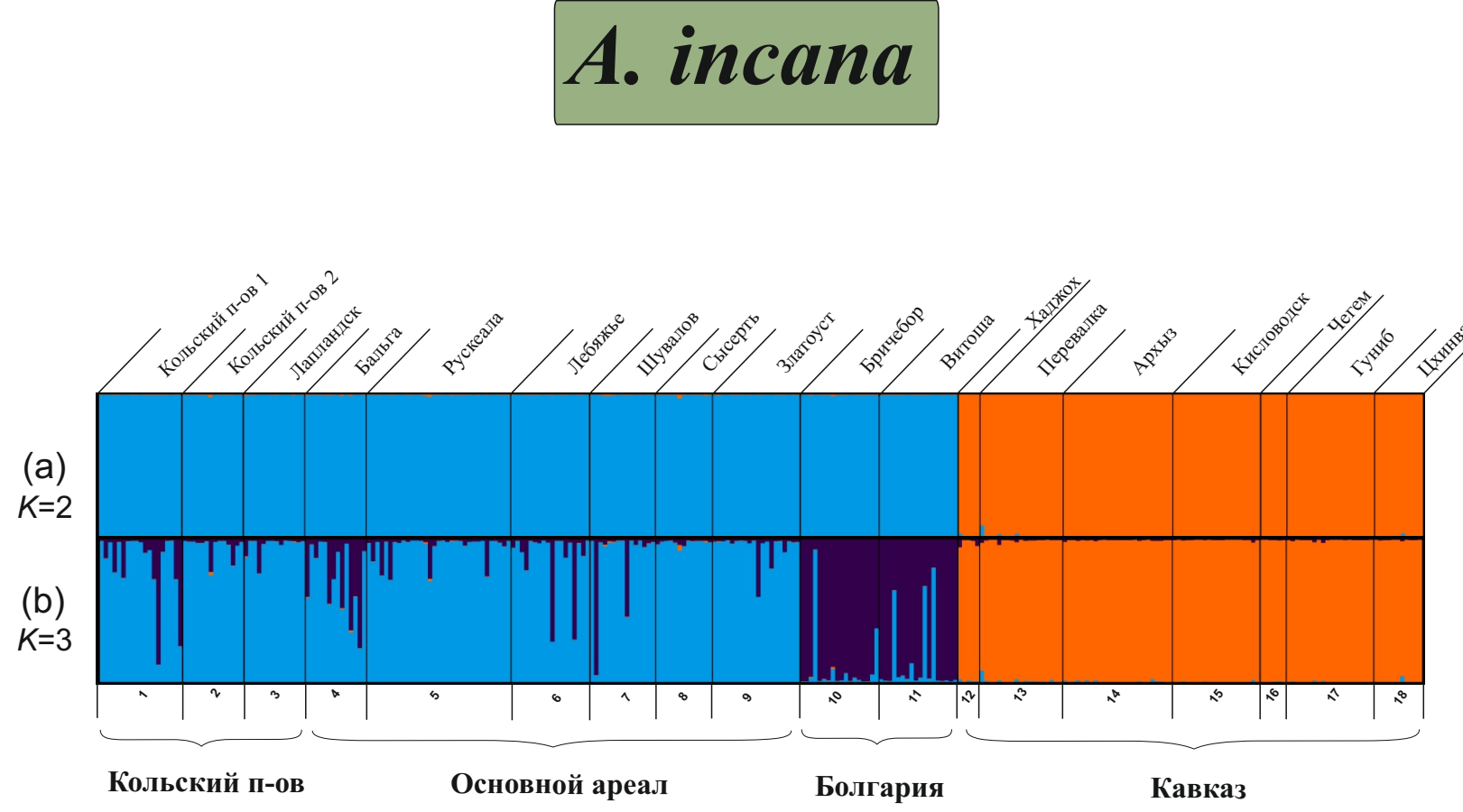


Рисунок 2 – Распределение 302 образцов 18 популяций *Alnus incana* на основе байесовского кластерного анализа, выполненного в STRUCTURE на основании частот 14 nSSR локусов а) при числе кластеров $K=2$; б) при числе кластеров $K=3$.

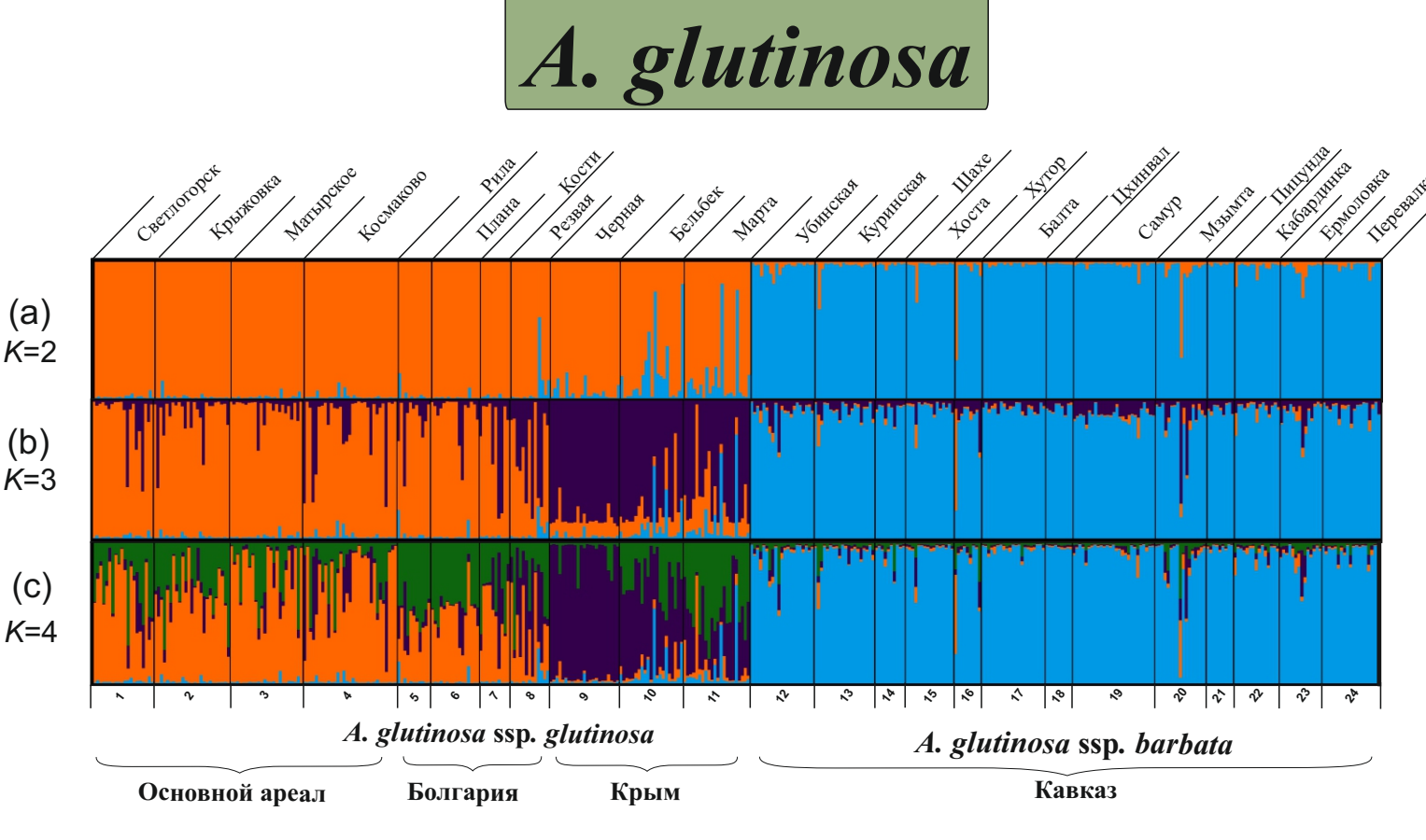


Рисунок 3 – Распределение 423 образцов 24 популяций *Alnus glutinosa* на основе байесовского кластерного анализа, выполненного в STRUCTURE на основании частот 19 nSSR локусов а) при числе кластеров $K=2$; б) при числе кластеров $K=3$; в) при числе кластеров $K=4$.



Рисунок 4 – РСoA ординация, основанная на изменчивости 14 nSSR локусов 18 популяций *A. incana*.

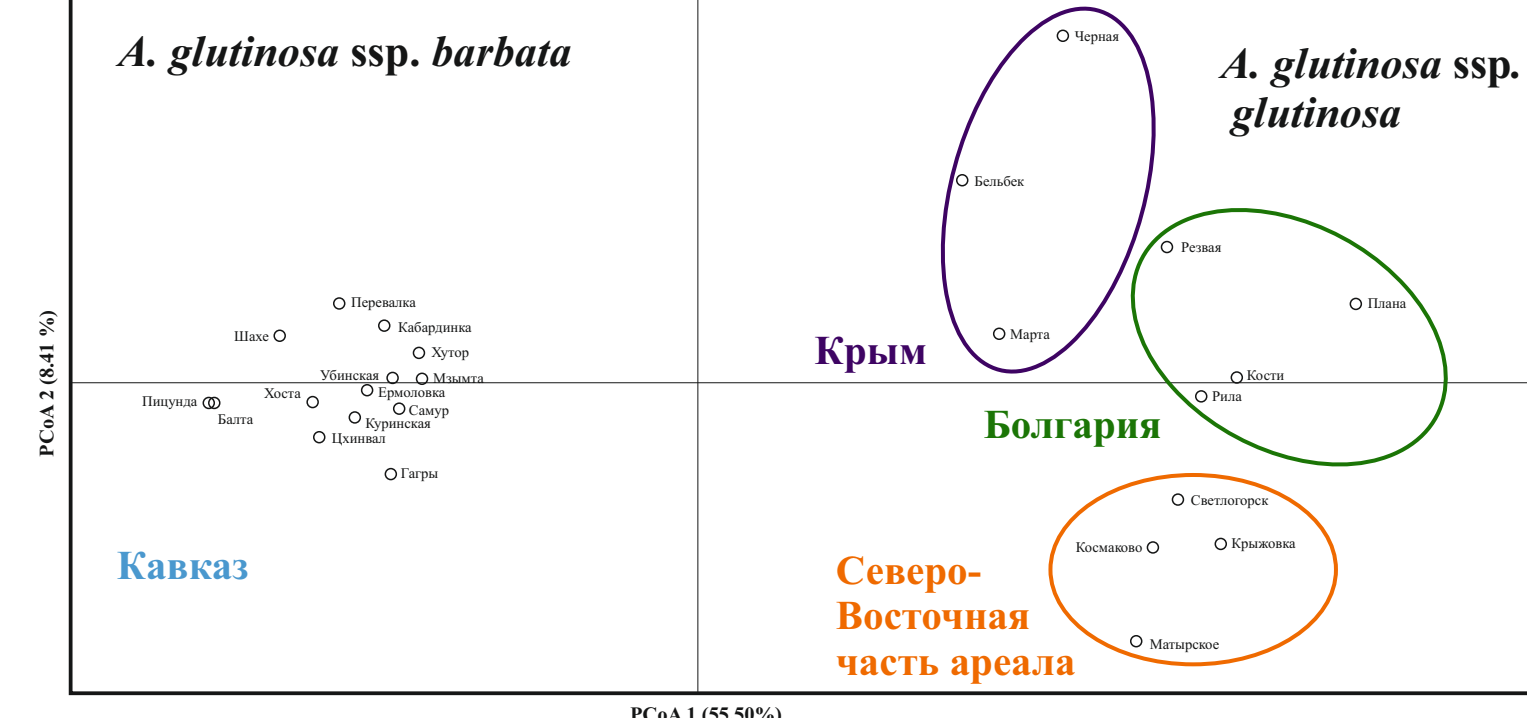


Рисунок 5 – РСoA ординация, основанная на изменчивости 19 nSSR локусов 24 популяций *A. glutinosa*.

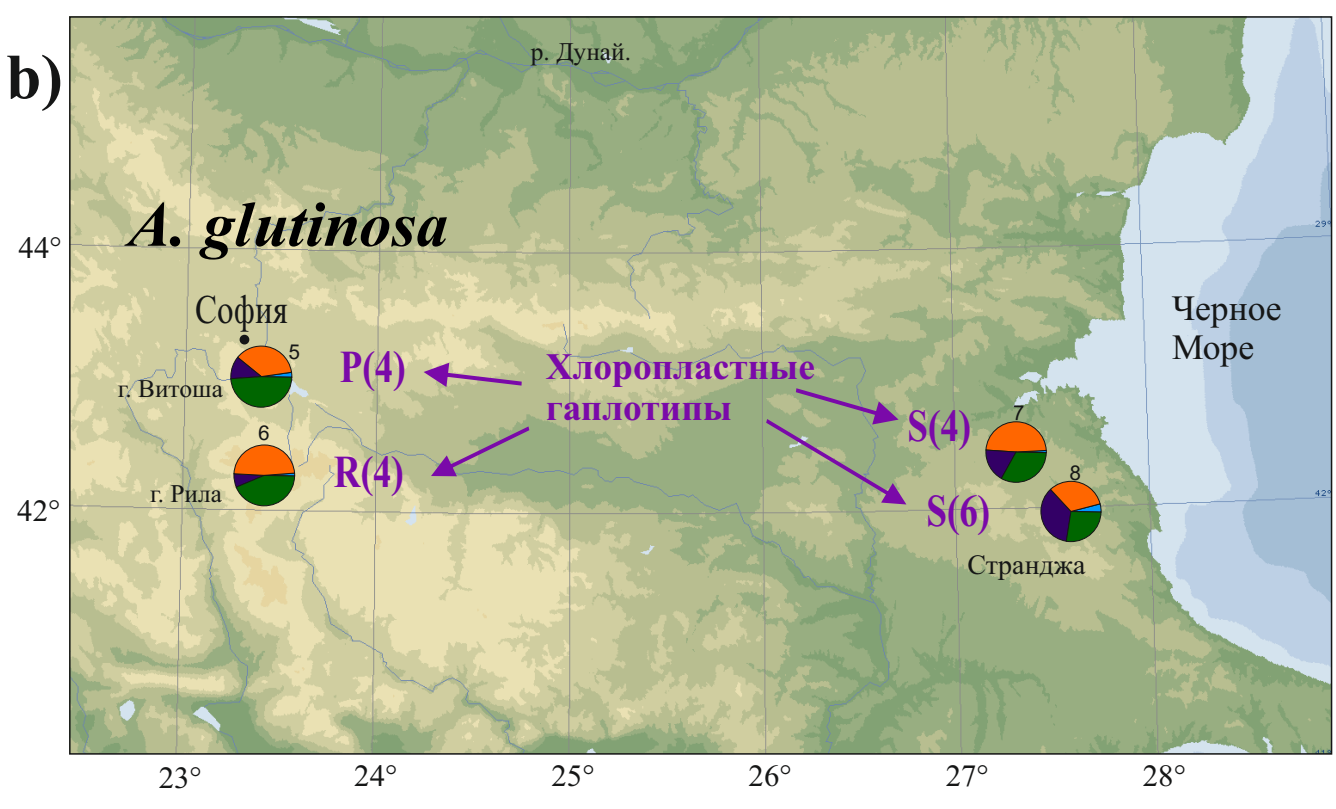
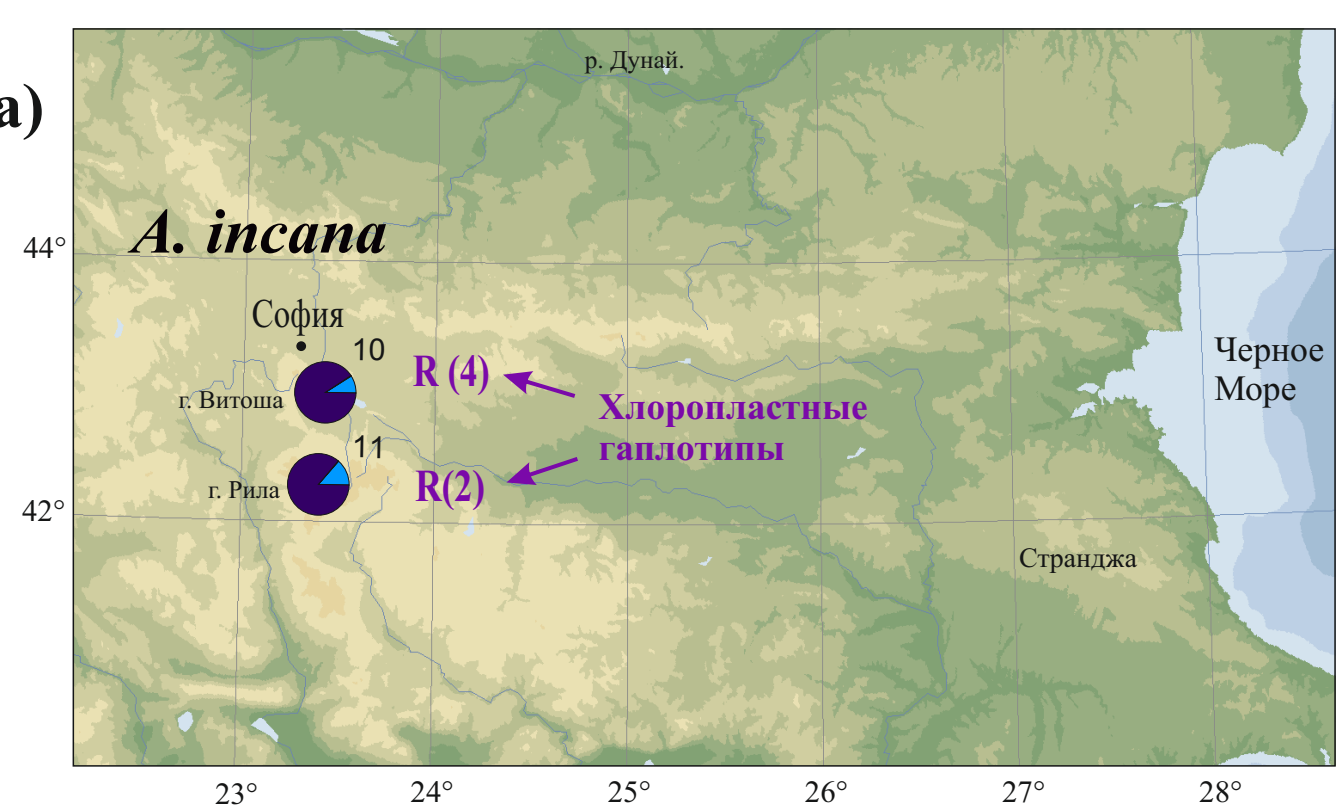


Рисунок 6 – Географическое распределение хлоропластных гаплотипов и результатов STRUCTURE а) при $K=3$ в популяциях *A. incana* (Рис.2) и б) при $K=4$ (Рис.3) *A. glutinosa* в Болгарии. Гаплотипы обозначены фиолетовым цветом.

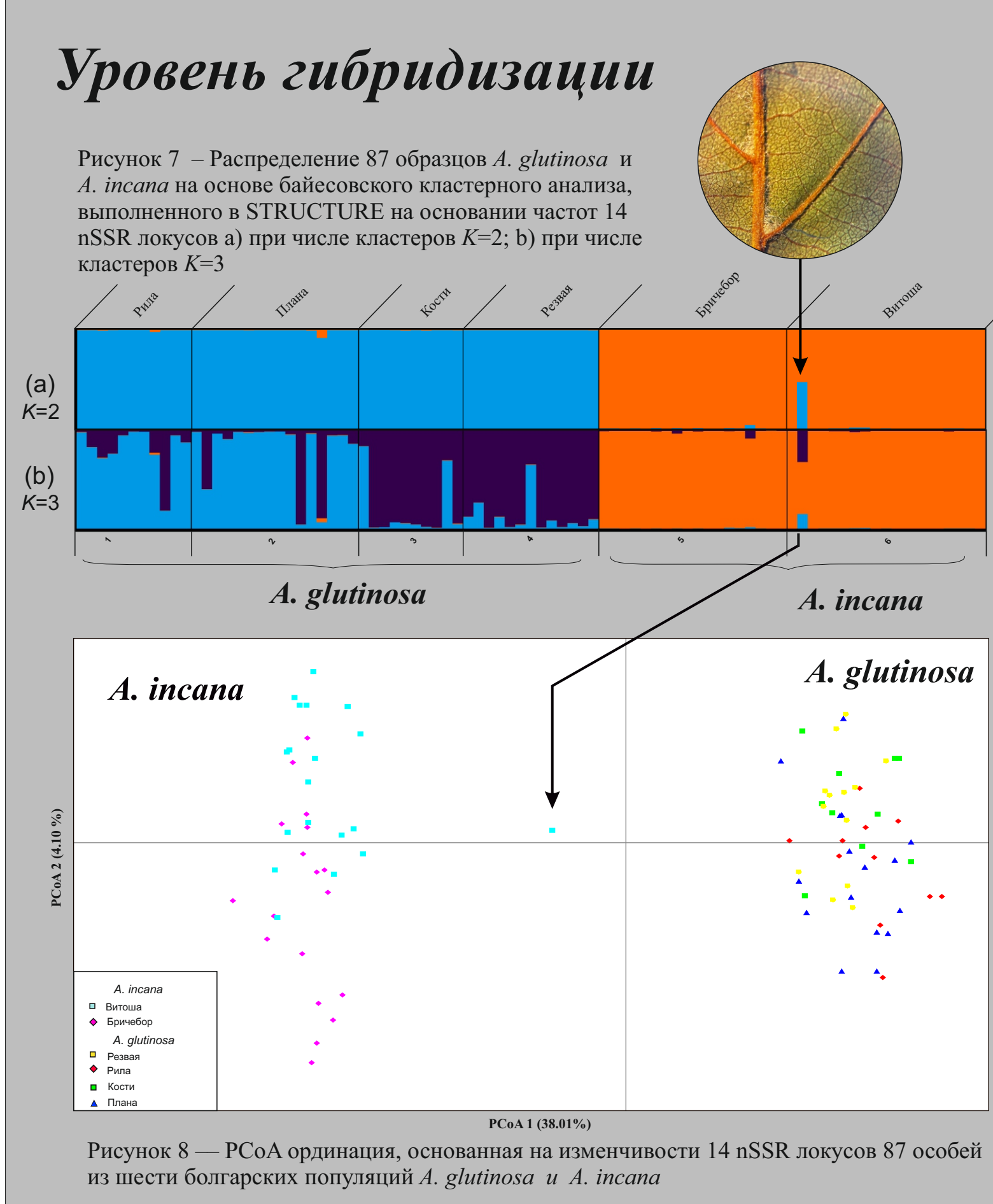


Рисунок 7 – Распределение 87 образцов *A. glutinosa* и *A. incana* на основе байесовского кластерного анализа, выполненного в STRUCTURE на основании частот 14 nSSR локусов а) при числе кластеров $K=2$; б) при числе кластеров $K=3$.

Уровень гибридности в смешанных популяциях видов *Alnus* низкий: 6,9 % особей с интрогрессией в Болгарии, 6,1 % в Северной части ареала и 4,3 % на Кавказе. В болгарской выборке ольхи серой был выявлен один гибрид предположительно первого поколения (F1): при сборе гибрид был определен по форме листа как *A. incana*, однако характер опушения листа оказался типичным для *A. glutinosa* (Рис.7 и 8). У остальных особей с интрогрессией уровень примеси был ниже 10%.

Средняя ожидаемая гетерозиготность (H_e) в Болгарских популяциях *A. glutinosa* по 14 nSSR локусам 0,573 (0,525 – 0,613), а среднее число аллелей на локус (N_e) составило 5,263 (5,000 – 5,632). В то время как у ольхи серой среднее H_e 0,499 (0,491 – 0,507), а среднее N_e составило 4,071 (3,923 – 4,214). Следовательно, показатели ядерной изменчивости и гетерозиготность у *A. incana* ниже чем у *A. glutinosa*, но выше показатели дифференциации.

Хлоропластная изменчивость

Получены последовательности для 24 особей из шести болгарских популяций двух видов. Выявлено три гаплотипа, два из которых не были описаны ранее. Наблюдалась резкая географическая неоднородность популяций в распределении гаплотипов (Рис.10). В выборке г. Витоша у двух видов были разные гаплотипы (3P и 4R), а в горном массиве Рила у двух видов гаплотип совпадает (4R и 2R) (Рис.6). На основе последовательностей трех фрагментов нами было построено филогенетическое древо 67 хлоропластных гаплотипов европейско-западноазиатских видов *Alnus* (Рис.), с использованием наших предыдущих данных и данных из GenBank для нескольких видов ольхи из работ (Havrdova et al., 2015), (Mandak et al., 2016) и (Gryta et al., 2017). Гаплотипы географически совпадают у разных видов, что говорит о генетическом потоке между видами. Распространенные на Балканах гаплотипы относятся к трем дивергентным филогенетическим линиям: гаплотип из Странджи (S) близок к гаплотипам Малой Азии (*AG21*, *AG22*, *AG23*, *AG24* и *A. subcordata*). Гаплотип из горного массива Рила (R) является сестринским по отношению северной кладе. Гаплотип (P) совпал с ранее обнаруженными в Болгарии (AG32), входит в балканскую кладу, наиболее распространенную в Болгарии и родственную кавказской ветви. Полученными дивергентные гаплотипы выявлены в районах - возможных рефугиумах лесной флоры: (массив Странджа – Причерноморье, Эвксинская флористическая область) (горный рефугиум Рила и Витоша), и показывает наличие древних филогенетических связей между Балканами, Малой Азией и Кавказом.

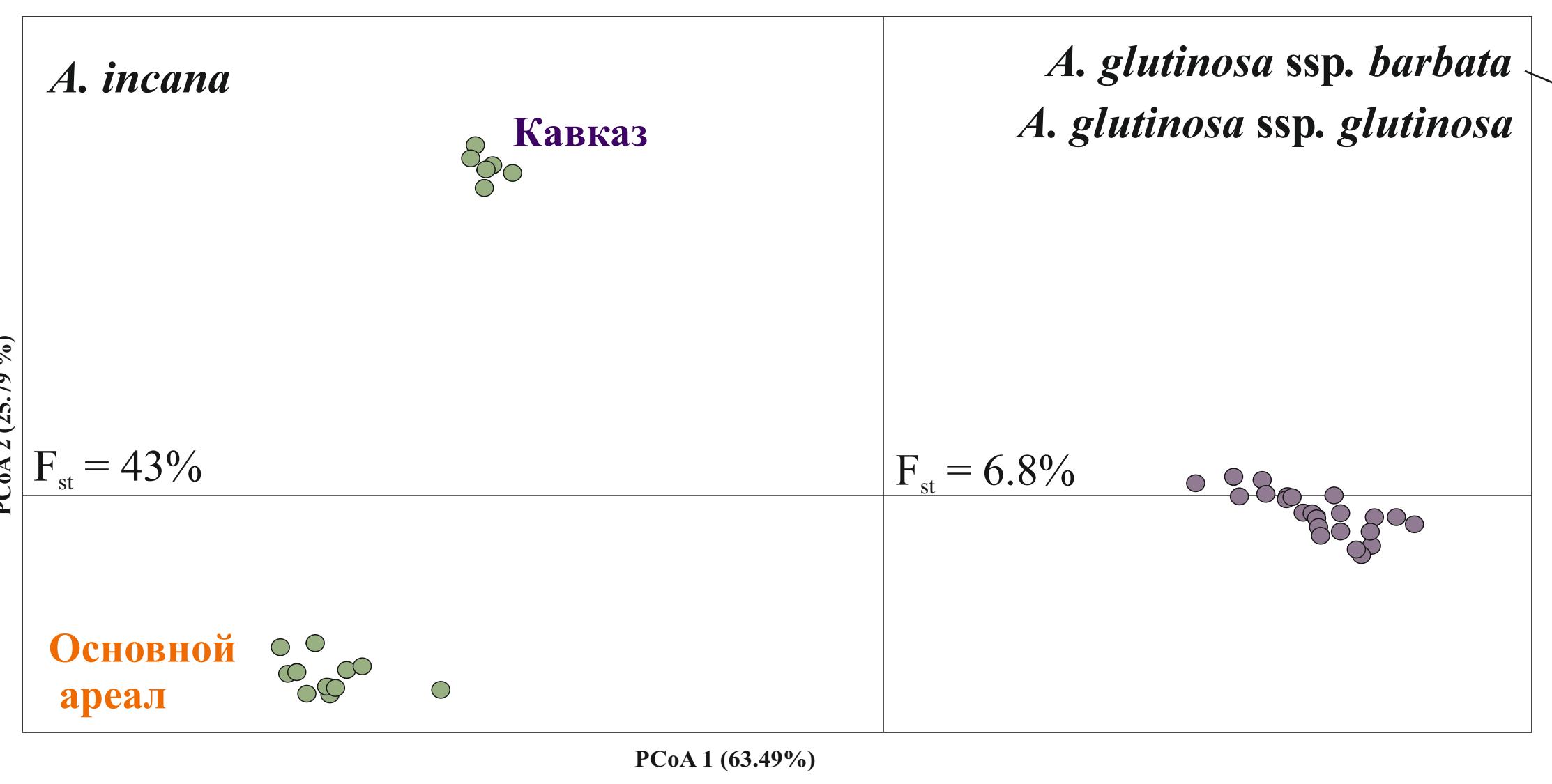


Рисунок 9 – РСoA ординация, основанная на изменчивости 14 nSSR локусов 676 особей из 41 популяций *A. glutinosa* и *A. incana* в Болгарии

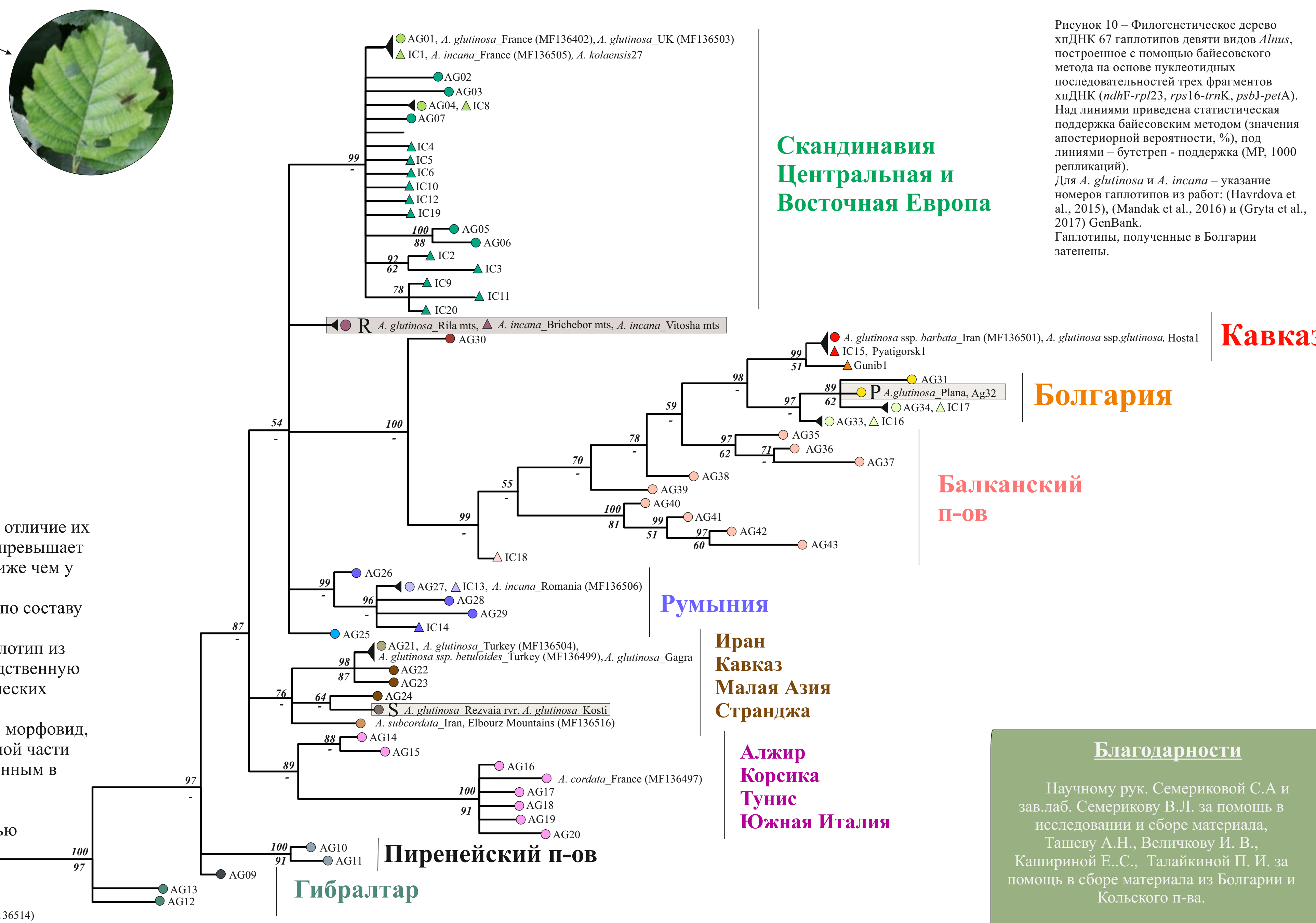
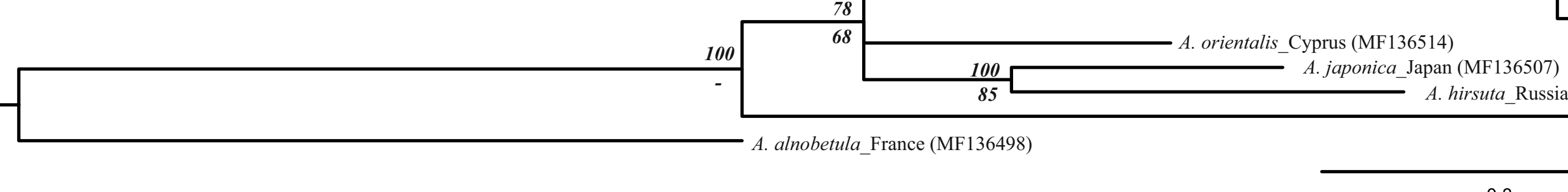


Рисунок 10 – Филогенетическое древо хпДНК 67 гаплотипов шести видов *Alnus*, построенное с помощью байесовского метода на основе нуклеотидных последовательностей трех фрагментов хпДНК (*ndhF-rpl23*, *rps16-trnK*, *psbI-petA*). Над линиями приведена статистическая поддержка байесовским методом (значения апостериорной вероятности, %), под линиями – бутстреп – поддержка (MP, 1000 репликаций). Для *A. glutinosa* и *A. incana* – указание номеров гаплотипов из работ: (Havrdova et al., 2015), (Mandak et al., 2016) и (Gryta et al., 2017) GenBank. Гаплотипы, полученные в Болгарии затенены.

Выводы

- Выявлена высокая дифференциация болгарских популяций видов *Alnus* по ядерным маркерам, и отличие их от популяций северо-восточной части ареала и кавказских выборок. Дифференциация ольхи серой превышает дифференциацию групп популяций ольхи черной. Внутрипопуляционная изменчивость *A. incana* ниже чем у *A. glutinosa*, но показатели дифференциации выше.
- В популяциях ольхи Болгарии обнаружена высокая географическая дифференциация популяций по составу хпДНК гаплотипов. Распространенные на Балканах гаплотипы относятся к трем дивергентным филогенетическим линиям: гаплотип из Странджи (S) близок к гаплотипам клады Малой Азии, гаплотип из горного массива Рила (R) – сестринский северной кладе, гаплотип P входит в балканскую кладу, родственную кавказской ветви, что выявляет возможные рефугиумы и показывает наличие древних филогенетических связей между Балканами, Малой Азией и Кавказом.
- Полученные генетические данные не подтверждают выделение *A. kolaensis* как самостоятельного морфовида, популяции и индивидуумы ольхи Кольского п-ва не дифференцируются от *A. incana* северо-восточной части ареала (от Калининграда до Урала). Хлоропластные гаплотипы совпадают с наиболее распространенным в северо-восточном ареале (*Ic1* и *AG01*).
- Уровень гибридности в смешанных популяциях видов *Alnus* низкий. Обнаружен один гибрид предположительно первого поколения (F1) в болгарской выборке *A. incana* и пять особей со степенью интрогрессии менее 10 %



Благодарности
Научному рук. Семериковой С.А и зав.лаб. Семериковой В.Л. за помощь в исследовании и сборе материала, Ташеву А.Н., Величковой И. В., Кашириной Е.С., Талайковой П.И. за помощь в сборе материала из Болгарии и Кольского п-ва.

Исследование выполнено в рамках Госзадания ИЭРиЖ УрО РАН №122021000090-5.