**ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОЛИМОРФИЗМ ВОСКОВНИКА БОЛОТНОГО (КРАСНАЯ КНИГА РФ) НА СЕВЕРО-ЗАПАДЕ РОССИИ**

Восковник болотный (*Myrica gale* L.) – охраняемый вид растений, встречающийся в Российской Федерации только в Ленинградской области и в Карелии. С генетической точки зрения практически не изучен. Предположительно гексаплоиден, размножается главным образом вегетативно, роль полового размножения в воспроизведении восковника не ясна. Все популяции этого вида на территории РФ малочисленны и относятся к периферическим (занимают в ареале крайнее восточное положение). **Цель работы** – исследовать полиморфизм геномной ДНК в популяциях восковника на территории РФ, оценить роль полового размножения в воспроизведении и расселении данного вида. **Материалы и методы.** AFLP-анализ геномной ДНК восковника из 6 природных популяций (5 популяций в Ленинградской области, 1 в Карелии). Используя 3 пары праймеров, мы исследовали генетический полиморфизм восковника по 22 фрагментам ДНК. **Результаты.** Каждая из исследованных популяций восковника генетически полиморфна. Среди 182 проанализированных растений мы выявили 27 AFLP-генотипов, два из которых обычны для всех шести популяций. Большинство остальных AFLP-генотипов (20) обнаружены всего у одного или двух растений. Некоторые из этих редких AFLP-генотипов, по-видимому, являются результатами мутационных и/или рекомбинационных процессов на основе обычных AFLP-генотипов. Наличие потенциально рекомбинантных AFLP-генотипов позволяет предположить, что в воспроизведении восковника роль полового размножения хотя и минорна, но все же заметна.

Ключевые слова: восковник, *Myrica gale* L., периферические популяции, геномная ДНК, AFLP-анализ, генетический полиморфизм, Красная книга РФ.

**GENETIC POLYMORPHISM OF WAXWEED (THE RED BOOK OF RUSSIAN FEDERATION) IN NORTH-WEST RUSSIA**

**Background.** Waxweed (*Myrica gale* L.) is a protected plant species found in the Russian Federation only in the Leningrad District and Karelia. It is almost not studied from the genetic point of view. This species is presumably hexaploid; it propagates mainly vegetatively, and the role of sexual reproduction in the life cycle of waxweed is unclear. All waxweed populations in the Russian Federation are small and belong to the edge ones (occupy the easternmost positions in the range). **The aim** of the study: to investigate genomic DNA polymorphism in waxweed populations in the Russian Federation, and to evaluate the role of sexual reproduction in propagation and dispersal of this species. **Materials and methods**. AFLP-analysis of waxweed genomic DNA in 6 natural populations (5 populations in the Leningrad District, 1 in Karelia). Using 3 pairs of primers, we studied waxweed genomic polymorphism for 22 DNA fragments. **Results.** Each of the studied waxweed populations is genetically polymorphic. Among 182 analyzed plants we distinguished 27 different AFLP-genotypes, two of which were common in all populations studied. Most of others AFLP genotypes (20) were represented just by a single plant or a couple of plants. Some of these rare AFLP genotypes are likely the results of mutation and/or recombination processes affecting the common AFLP genotypes. **Conclusion.** The role of sexual reproduction in waxweed propagation, although minor, is noticeable.

Key words: waxweed, *Myrica gale* L., edge populations, genomic DNA, AFLP analysis, genetic polymorphism, The Red Book of Russian Federation.

**ВВЕДЕНИЕ**

Периферические популяции представляют собой обширный материал для изучения закономерностей, лежащих в основе внутривидового разнообразия. Именно такие популяции обычно играют ведущую роль в расширении или сокращении ареала вида: в первом случае они захватывают новые территории [1-2], во втором – не выдерживают экстремальных внешних условий [3]. По своей генетической структуре периферические популяции, как правило, существенно менее полиморфны по сравнению с популяциями в центральной области ареала [4-5]. Это связано как минимум с двумя причинами. Во-первых, большинство периферических популяций малочисленны и подвержены фрагментации [6-7], что обычно сопровождается интенсивным дрейфом генов и как следствие – случайной потерей некоторых генотипов [8-10]. Во-вторых, находясь на самом краю ареала, такие популяции нередко формируются на основе сравнительно небольшого числа особей с отчетливо выраженным эффектом основателя [5].

Роль этого эффекта особенно значима для видов, обладающих высокой способностью к вегетативному размножению. Теоретически, всего одна единственная особь, достаточно хорошо приспособленная к локальным условиям, может стать основателем вегетативного клона, воспринимаемого как изолированная периферическая популяция. Подобный сценарий вполне вероятен для многих растений. Действительно, более 65% видов цветковых растений, характерных для центральной Европы, относятся к клональным [11].

Ярко выраженным представителем клональных растений является восковник болотный (*Myrica gale* L.) – многолетний листопадный кустарник из семейства Myricaceae. Данный вид приурочен к умеренно-бореальным сильно увлажненным приатлантическим экотопам Северной Америки и Европы. В Европе он особенно обилен в Фенноскандии и на Британских островах. На территорию Российской Федерации заходит лишь самой восточной частью ареала: отмечен только в Ленинградской области и в Карелии [12-14]. Все популяции восковника в нашей стране сравнительно малочисленны (обычно состоят не более чем из 200-300 растений), причем некоторые находятся под угрозой исчезновения из-за сильных антропогенных воздействий. С учетом этой специфики восковник включен в Красную книгу РФ [15] со статусом редкий (категория 3).

Судя по литературным данным, в воспроизведении и расселении восковника отчетливо преобладает вегетативное размножение [16-17]. Этот вид относится к числу двудомных растений, однако соотношение полов в его природных популяциях всегда резко сдвинуто в сторону мужских особей. Более того, в некоторых популяциях восковника не было обнаружено ни одного женского растения [12, 14]. Но даже при наличии растений обоих полов вероятность семенного размножения невысока. Дело в том, что семена восковника имеют низкую всхожесть даже в наиболее оптимальных условиях среды [17-18], его проростки в природе встречаются очень редко [16], а их жизнеспособность зависит от множества факторов, в том числе от симбиотических отношений с различными азотфиксирующими актиномицетами из рода *Frankia* [18-21]. На основе перечисленных фактов принято считать, что половое размножение играет у восковника весьма незначительную роль [16-17].

В связи с этим, можно ожидать, что многие или хотя бы некоторые периферические популяции восковника имеют исключительно клональное происхождение, т.е. представлены растениями одинакового генотипа. Для проверки справедливости данной гипотезы следует провести молекулярно-генетический анализ нескольких достаточно крупных периферических популяций восковника, находящихся на значительном удалении друг от друга.

Ранее таких исследований не проводили. Более того, с генетической точки зрения о восковнике пока известно крайне мало. Этот вид является предположительно гексаплоидом: для него характерно 48 хромосом при базовом числе 8 для семейства Myricaceae [17, 22]. Все молекулярно-генетические сведения о восковнике ограничены лишь результатами штрих-кодирования [23-24] и несколькими геномными последовательностями в GeneBank.

В рамках выполнения гранта РНФ № 22-24-00138 мы разработали протокол выделения геномной ДНК восковника, пригодной для AFLP-анализа [25-26]. Используя этот протокол, мы показали, что одна из самых крупных популяций восковника в Ленинградской области (произрастает в государственном природном заказнике «Лебяжий», окрестности пос. Большая Ижора, южное побережье Финского залива) генетически полиморфна. Среди 42 исследованных растений мы выявили 14 разных AFLP-генотипов. Два из них оказались часто встречающимися (соответствующие растения составляли более 60% выборки), а остальные 12 – редкими (всего одно или два растения каждого генотипа) [26].

Полученные данные позволили предположить, что обнаруженные нами редкие AFLP-генотипы возникли на основе часто встречающихся в результате мутационных и/или рекомбинационных процессов. В свою очередь, наличие рекомбинантных AFLP-генотипов указывает на то, что в воспроизведении восковника задействовано не только вегетативное, но и половое размножение. Однако этот вывод нуждается в проверке на других природных популяциях восковника.

В настоящей работе проведен AFLP-анализ шести периферических популяций восковника, в достаточной степени изолированных друг от друга. Это первый случай подобных исследований для данного вида.

**МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

**Исследованные популяции восковника**. Сбор материала проводили в шести природных популяциях восковника на северо-западе России. Для пяти из них имелись предварительные сведения о достаточно обильном присутствии данного вида [12, 14].

Популяция 1. Произрастает в окрестностях пос. Большая Ижора (Ломоносовский р-н, Ленинградская обл., южное побережье Финского залива). Экотоп – песчаный участок вблизи уреза воды Финского залива за современным подвижным песчаным валом и расположенные за ним междюнные низинные болота. Заросли восковника разорваны на несколько фрагментов с варьирующим покрытием (от 5-10 до 80-90%), рост растений от 0,5 м до 1,4 м. Во фрагментах, наиболее близких к Финскому заливу, многие растения восковника мертвы. Эта популяция описана нами в [26]. Центральная точка сбора – N 59° 95’ 54.83”, E 29° 55’ 68.37”.

Популяция 2. Произрастает в лесопарке «Гагарка» (СПб, Курортный р-н, восточное побережье Финского залива). Экотоп – низинные болота, затопляемые в период наводнений. Мощность торфяной залежи не превышает 40–50 см. Верхний кустарниковый подъярус образован ивой (*Salix phylicifolia* и *S*. *pentandra*) с участием ольхи (*Alnus glutinosa*), нижний – восковником. В травяном ярусе преобладают сабельник (*Comarum palustre*) и осоки (*Carex nigra* и *C*. *rostrata*). В моховом ярусе присутствует *Calliergon cordifolium* и *Calliergonella cuspidata*. Восковник образует заросли со средним покрытием (20-40 %), высота растений до 0,8 м. Центральная точка сбора – N 60° 08’ 52.98”, E 29° 93’ 45.92”.

Популяция 3. Произрастает в окрестностях поселка Лисий Нос (СПб, Приморский р-н, восточное побережье Финского залива). Экотоп – заболоченные бывшие сельскохозяйственные угодья (сенокосы), зарастающие еловым лесом с осиной и ольхой черной. В почве под торфянистым горизонтом (мощность до 30 см) залегает гумусово-аккумулятивный горизонт мощностью до 20 см. В травянистом ярусе с небольшим покрытием произрастают горичник (*Thyselium palustre*)и таволга (*Filipendula ulmaria*), также присутствуют осоки (*Carex nigra* и *C*. *rostrata*), местами обильны тростник (*Phragmites australis*)и вейник (*Calamagrostis canescens*). В моховом ярусе доминирует *Sphagnum flexuosum.* Восковник образует заросли с высоким покрытием(50–90 %), высота растений до 1,20 м. Центральная точка сбора – N 60° 01’ 47.70”, E 29° 98’ 14.85”.

Популяция 4. До 2019 года произрастала на территории Юнтоловского лесопарка (СПб, Приморский р-н, восточное побережье Финского залива) и была самой крупной в Ленинградской области [14]. На момент обследования практически исчезла в результате расширения городской черты и строительства Западного скоростного диаметра с транспортными развязками. Нами выявлено всего 5 растений восковника (высота 70-90 см). Они обнаружены на заболоченных участках соснового и березово-соснового кустарничково-сфагнового леса. Высота древостоя около 15 м. В напочвенном покрове встречаются осоки (*Carex rostrata*, *C*. *paupercula*) и пушица (*Eriophorum vaginatum*), в моховом ярусе преобладают *Sphagnum girgensohnii* и *S. fallax*. Центральная точка сбора – N 60° 01’ 94.97”, E 30° 21’ 03.78”.

Популяция 5. Произрастает на затопляемом во время половодья участке берега реки Тулимайоки в зоне прохождения автотрассы № 121 (371-й км, Карелия). На этом участке недавно проводили интенсивные работы по замене дорожного полотна, обустройству обочин, укреплению откосов и водоотводных канав, что привело к значительному повреждению данной популяции. Если 10 лет назад здесь отмечали густые заросли восковника высотой до 1.5 м, сейчас это чахлые разреженные кустики не выше 70 см, с трудом обнаруживаемые среди молодых растений ольхи (*Alnus glutinosa*), вейника (*Calamagrostis arundinacea*), хвощей (*Equisetaceae fluviatile*, *E. sylvaticum*) и др. Центральная точка сбора – N 61.65° 49.01”, 32.16° 82.54”.

В 2021 году мы обнаружили новую, не описанную ранее крупную природную популяцию восковника:

Популяция 6. Фрагментирована по периодически затопляемым прибрежным участкам Беличьего залива, двух Беличьих проток, а также северной части Новинского залива (окрестности Выборга, северное побережье Финского залива). Восковник произрастает в расщелинах среди крупных валунов или на открытых гранитных монолитах с маломощным чехлом преимущественно песчаных осадочных образований. Почвенный слой из-за регулярного вымывания отсутствует. Фоновая растительность представлена сосновыми и еловыми лесами со значительной примесью березы, осины и ольхи. В напочвенном покрове господствуют влаголюбивые виды такие как калужница (*Caltha palustris*), осоки (*Carex acuta*, *C. vesicaria*), хвощ приречный (*Equisetum fluviatile*), ситники (*Juncus articulates*, *J. effuses*), дербенник (*Lythrum salicaria*), лютик длиннолистный (*Ranunculus lingua*), но встречаются и некоторые типично таежные – черника (*Vaccinium myrtillus*), седмичник (*Trientalis europaea*), золотарник (*Solidago virgaurea*) и др. Хотя заросли восковника разбиты на множество фрагментов, находящихся на некотором удалении друг от друга, они приурочены к береговой линии смежных водоемов и не имеют достаточно надежной изоляции. Обилие восковника в разных фрагментах популяции варьирует от единичных хилых кустов, не превышающих 0,7 м высотой, до густых зарослей, достигающих высоты 1.4 м. Центральная точка сбора в наиболее крупном фрагменте популяции – N 60° 79’ 31.40”, E 28° 75’ 69.84”.

**Сбор растительного материала**. Материал собирали в мае-июне 2022-2023 гг. Собранные в природе листья восковника даже в молодом состоянии содержат большое количество восков, эфирных масел и полифенолов [27-30], значительно затрудняющих выделение ДНК [25, 31]. В связи с этим, сбор растительного материала осуществляли по модифицированной нами схеме [25-26]. У растения на ранней стадии раскрытия почек отрезали верхнюю часть одного из побегов (с учетом охранного статуса данного вида старались наносить растению минимальный вред, ограничиваясь фрагментом всего с пятью-шестью почками), помещали ее в емкость с питьевой водой, а затем выдерживали в течение 5-7 дней при комнатной температуре. В результате на отрезанной части побега быстро развивались обильно облиственные, интенсивно растущие нежные боковые побеги, не имевшие заметных признаков накопления восков. С этих боковых побегов собирали достаточно сформированные листья восковника, немедленно замораживали их при –70°С и хранили при той же температуре.

Для получения рандомизированной выборки, равномерно охватывающей конкретную популяцию восковника c учетом его высокой склонности к вегетативному размножению, в работе использовали случайно выбранные растения, отстоявшие друг от друга приблизительно на 5 м.

**Выделение геномной ДНК восковника.** Использованный протокол описан нами в [26]. Он основан на максимально простом, дешевом и быстром протоколе, исходно разработанном для выделения геномной ДНК из листьев арабидопсиса [32]. Для восковника исходный протокол малопригоден, поэтому мы внесли в него ряд модификаций, адаптировав к используемому нами растительному материалу:

* 20-50 мг свежезамороженных листьев восковника быстро переносили в охлажденную на льду микроцентрифужную пробирку и тщательно гомогенизировали пластиковым пестиком.
* К гомогенату добавляли 800 мкл лизирующего раствора (0,5 М NaCl, 2% SDS, 1% поливинилпирролидон МВ 40 КДа), вортексировали 20 секунд, инкубировали с перемешиванием при комнатной температуре (10 минут) и оставляли на льду (10 минут). Полученную смесь центрифугировали при 13000 об/мин (4 минуты при комнатной температуре).
* Надосадочную жидкость (около 400 мкл) переносили в чистую микроцентрифужную пробирку, добавляли равный объем холодного изопропанола и, переворачивая пробирку, аккуратно перемешивали (2 минуты). Полученную смесь центрифиугировали при 13000 об/мин (30 минут при комнатной температуре).
* Удаляли надосадочную жидкость, к осадку добавляли 500 мкл отмывочного раствора (1 М гуанидин изотиоцианат, 50% изопропанол), вортексировали 20 секунд и инкубировали в шейкере при 500 об/мин (5 минут при комнатной температуре). Полученную смесь центрифиугировали при 13000 об/мин (10 минут при комнатной температуре).
* Удаляли надосадочную жидкость, к осадку добавляли 500 мкл холодного 70% этанола, вортексировали 30 секунд и инкубировали 2 минуты при комнатной температуре. Полученную смесь центрифиугировали при 13000 об/мин (10 минут при комнатной температуре).
* Удаляли надосадочную жидкость, выдерживали пробирку открытой до полного испарения этанола, после чего добавляли 100 мкл деионизированной воды и аккуратно перемешивали до растворения осадка. Полученный раствор геномной ДНК хранили при температуре –20°С для последующего использования.

Качество выделенной геномной ДНК проверяли методом электрофореза в 1% агарозном геле при окрашивании бромистым этидием (маркером длин фрагментов служил «ДНК маркер Sky-High», Биолабмикс, Россия). Количество выделенной ДНК измеряли на флуориметре Qubit-1 (Thermo Fisher Scientific, США) с помощью набора «QuDye dsDNA HS Assay Kit» (Lumiprobe, Россия), согласно инструкциям производителей.

**Получение флуоресцентно меченных фрагментов ДНК для AFLP-анализа**. За основу мы взяли протокол, описанный в [33]. В качестве реагентов использовали рестриктазы EcoR I и Tru9 I (СибЭнзайм, Россия), T4 ДНК лигазу (Евроген, Россия), мастер-микс для ПЦР (Биолабмикс, Россия) согласно инструкциям производителей. Названия и нуклеотидные последовательности олигонуклеотидов приведены в Таблице 1.

Реакция с рестриктазой EcoR I. К 200-300 нг выделенной геномной ДНК добавляли 5 е.а. EcoR I, 1х SE-буфер W и деионизированную воду до объема 30 мкл. Реакцию проводили в ПЦР амлификаторе при 37°С (4 часа). Для окончания реакции рестриктазу инактивировали при 65°С (20 минут). Качество реакции проверяли методом электрофореза в 1,5% агарозном геле при окрашивании бромистым этидием (10 мкл реакции на дорожку).

Реакция с рестриктазой Tru9 I. В пробирку с геномной ДНК, обработанной рестриктазой EcoR I (20 мкл), добавляли 5 е.а. рестриктазы Tru9 I, 1 мкл 10х SE-буфера W и деионизированную воду до объема 30 мкл. Реакцию проводили в ПЦР амлификаторе при 65°С (4 часа). Для окончания реакции рестриктазу инактивировали при 80°С (20 минут). Полученную смесь хранили при температуре –20°С до проведения реакции лигирования.

Создание адаптерных последовательностей из олигонуклеотидов. Непосредственно перед реакцией лигирования олигонуклеотиды EcoRI-AF (5 мкМ) и EcoRI-AR (5 мкМ) смешивали в пропорции 1:1 в пробирке, инкубировали при 95°С (5 минут), а затем охлаждали при комнатной температуре (10 минут). Аналогично, олигонуклеотиды Tru9I-AF (50 мкМ) и Tru9I-AR (50 мкМ) смешивали в пропорции 1:1 в пробирке, инкубировали при 95°С (5 минут) и охлаждали при комнатной температуре (10 минут).

Лигирование адаптеров с фрагментами рестрикции. В пробирку объемом 0,5 мл вносили 8 мкл рестрикционной смеси, 2 мкл 10х Overnight ligation buffer, 4 мкл адаптера EcoR I, 4 мкл адаптера Mse I и 2 мкл лигазы (конечный объем реакции 20 мкл), инкубировали при температуре 14°С (14-16 часов), после чего хранили при температуре –20°С до проведения реакции предамплификации.

* Реакция предамплификации. Аликвоту продуктов реакции лигирования разводили в 10 раз в деионизированной воде и переносили 5 мкл в 0,2 мл ПЦР пробирку. Затем в пробирку добавляли 5 пМ праймера EcoRI-PA, 5 пМ праймера Tru9I-PA, 12,5 мкл мастер-микса для ПЦР и деионизированную воду до 25 мкл. Реакцию проводили в ПЦР амплификаторе с нагреваемой крышкой по следующей программе: 1 цикл: денатурация 95°С – 5 мин; 25 циклов: денатурация 95°С – 20 сек, отжиг 56°С – 35 сек, элонгация 72°С – 30 сек; 1 цикл: 62°С – 30 мин.

Качество реакции проверяли методом электрофореза в 1,5% агарозном геле с окраской бромистым этидием (5 мкл реакции на дорожку). Пробирку с реакцией хранили при -20°С до проведения реакции селективной амплификации.

Реакция селективной амплификации. Аликвоту продуктов реакции предамплификации разводили в 20 раз в деионизированной воде и переносили по 5 мкл в три 0,2 мл ПЦР пробирки. В пробирки добавляли соответственно 5 пМ праймера F-EcoRI-CAT, или 5 пМ праймера F-EcoRI-ATG, или 5 пМ праймера F-EcoRI-AAT. В каждую пробирку добавляли по 20 пМ праймера Tru9I-CTT, 12,5 мкл мастер-микса для ПЦР и деионизированную воду до объема 25 мкл. Реакции проводили в ПЦР амплификаторе с нагреваемой крышкой по следующей программе: 1 цикл: денатурация 95°С – 5 мин; 30 циклов: денатурация 95°С – 20 сек, отжиг 56°С – 35 сек, элонгация 72°С – 30 сек; 1 цикл 62°С – 30 мин.

Качество реакции проверяли методом электрофореза в 1,5% агарозном геле с окраской бромистым этидием (5 мкл реакции на дорожку). Пробирки с результатами реакции хранили в светонепроницаемом контейнере при –20°С до проведения дальнейшего анализа.

Проведение фрагментного анализа (AFLP). 1 мкл каждого анализируемого ПЦР-продукта, содержащего флуоресцентную метку, разводили в 10 раз в деионизированной воде. К 1 мкл разведенного амплификата добавляли 10 мкл Hi-Di формамида (Applied Biosystems, США) и 1 мкл стандарта молекулярного веса CD-450 («Синтол», Россия). Затем образцы денатурировали при 95°С (5 минут) и помещали на лёд. Электрофорез образцов проводили с помощью генетического анализатора ABI3500xL (Applied Biosystems, США). Для анализа амплифицированных фрагментов использовали программное обеспечение Genemarker, Version 1.85 (SoftGenetics, LLC, США).

**Статистическая обработка результатов**. Соотношение обычных и редких AFLP-генотипов в популяциях сравнивали с использованием метода хи-квадрат [34].

**РЕЗУЛЬТАТЫ**

В шести обследованных природных популяциях восковника мы в общей сложности проанализировали 182 образца. Объемы выборок для разных популяций были разными (Таблица 2). Для четырех популяций (1, 2, 3 и 6) мы исследовали не менее чем по 40 образцов. Такие объемы выборок достаточны, чтобы выявить не менее 95% генетических различий между популяциями [35]. Для двух популяций (4 и 5), резко сокративших свою численность из-за антропогенных воздействий, объемы выборок были значительно меньше.

В ходе проведения AFLP-анализа мы использовали три следующие комбинации праймеров: F-EcoRI-AAT и Tru9I-CTT F-EcoRI-ATG и Tru9I-CTT, F-EcoRI-CAT и Tru9I-CTT. Для каждой из этих комбинаций мы выявили более сотни амплифицированных фрагментов ДНК, размер которых варьировал от 100 до 500 п.н. Однако подавляющее большинство из выявленных фрагментов были слабо различимы из-за множественности и близкого расположения друг к другу, а некоторые плохо воспроизводились при повторном анализе. Поэтому мы остановили свой выбор лишь на четко различимых, стабильно воспроизводимых фрагментах (рисунок 1). В общей сложности для AFLP-анализа восковника мы выбрали 22 амплифицированных фрагмента (таблица 3). Каждый образец был исследован в двух технических повторностях.

По семи фрагментам (437, 415, 309, 306, 303, 203 и 116 п.н.) все проанализированные образцы восковника были одинаковыми. По остальным пятнадцати фрагментам мы обнаружили полиморфизм, средний уровень которого был невысоким: он варьировал от 0,044 для популяции 3 до 0,099 для популяции 1.

Среди 182 образцов восковника мы выявили 27 AFLP-генотипов (таблица 4). Два из них (№1 и №3) присутствовали в каждой из исследованных нами популяций и суммарно составляли более половины всех образцов (53%). Три AFLP-генотипа (№2, №11 и № 14) тоже встречались достаточно часто, но присутствовали лишь в некоторых популяциях. Остальные обнаруженные AFLP-генотипы были редкими, причем подавляющее большинство из них (19 из 22) выявлены только в одной из популяций.

Даже в крайне малочисленной популяции 4 мы обнаружили 3 разных AFLP-генотипа, при этом наибольшее разнообразие AFLP-генотипов (14) было характерно для популяции 1. Таким образом, каждая из шести исследованных популяций восковника оказалась полиморфной.

Поскольку большинство обнаруженных AFLP-генотипов были представлены единичными растениями (чаще всего одним или двумя), мы не ставили перед собой задачу детально сравнить генетическую структуру исследованных популяций. Но некоторые предварительные замечания все же возможны. Во-первых, в популяциях 1, 2, 3 и 6 (в каждой проанализировано не менее 40 образцов) спектр редких AFLP-генотипов неодинаков. Во-вторых, соотношения между пятью наиболее часто встречающимися и всеми остальными (суммарно) AFLP-генотипами в этих популяциях статистически различаются (таблица 5; χ2 = 77.3, ν = 15, p = 0.000000000214). Сходный вывод получен и при всех попарных сравнениях. Наибольшие различия обнаружены при сравнении популяций 2 и 3 (χ2 = 37.5, ν = 5, p = 0.000000476409), наименьшие – при сравнении популяций 3 и 6 (χ2 = 12.9, ν = 4, p = 0.011774890157). Таким образом, мы вправе полагать, что каждая из четырех указанных популяций восковника имеет свою генетическую специфику.

**ОБСУЖДЕНИЕ**

Восковник относится к числу растений, крайне слабо изученных с генетической точки зрения. Этот вид активно использовали для молекулярно-генетической идентификации взаимодействующих с ним азотфиксирующих эндосимбионтов [36-39], но сам восковник оставался при этом неисследованным. В литературе имелись лишь сведения о числе хромосом (2n = 48 [17, 22]) и результатах штрих-кодирования данного вида [23]. Кроме того, в информационной базе GeneBank присутствовали его единичные геномные последовательности.

Судя по литературным источникам, вклад полового размножения в естественное воспроизведение и расселение восковника незначителен, а главную роль играет вегетативное размножение [13-14, 16-17]. Если такая точка зрения, действительно, справедлива, хотя бы некоторые периферические популяции восковника должны иметь сугубо клональное происхождение, где все растения имеют один и тот же генотип.

В настоящей работе мы проверили справедливость данной гипотезы. С помощью AFLP-анализа мы исследовали генетический полиморфизм шести удаленных друг от друга природных периферических популяций восковника. Пять из них находятся в Ленинградской области, на разных побережьях Финского залива (одна – на южном, три – на восточном, одна – на северном), шестая – в южной Карелии. Каждая из исследованных популяций оказалась полиморфной. Таким образом, ни одна из них, даже состоящая всего из пяти растений (популяция 4, Юнтоловский лесопарк) не имеет сугубо клонального происхождения.

Используя три комбинации праймеров, мы выявили 22 четко различимых и хорошо воспроизводимых фрагмента ДНК. Это число сравнительно невелико: обычно в работах по AFLP-анализу задействуют около сотни и более фрагментов [35, 40-43]. В частности, для надежного сравнения генетической структуры разных популяций число анализируемых фрагментов ДНК должно быть как минимум около 150 [35]. Однако в задачи нашего исследования подобного рода анализ не входил: нас интересовало, полиморфны ли изучаемые популяции и присутствуют ли в них рекомбинантные AFLP-генотипы. Наличие таких генотипов свидетельствовало бы о том, что некую заметную роль в воспроизведении восковника играет половое размножение, хотя бы и редкое. Здесь достаточно и существенно меньшего числа фрагментов.

Для каждой использованной нами комбинации праймеров мы тоже получили множество фрагментов амплификации, но большинство из них не поддавалось четкому вычленению из-за слишком близкого расположения друг к другу. Такие ситуации описаны в литературе, например, для некоторых видов рода *Lolium* [44]. Возможно, обилие выявленных нами фрагментов непосредственно связано с полиплоидностью восковника: при наличии значительного межгеномного полиморфизма каждый геном дает серию фрагментов и разные серии накладываются друг на друга. Полиплоидная природа восковника может быть причиной и широкого разброса по высоте наблюдаемых пиков: вполне возможно, что высота конкретного пика, а значит, и степень надежности его вычленения зависит от того, в скольких из имеющихся геномов присутствует соответствующая доминантная аллель.

Анализируя 22 фрагмента амплификации в суммарной выборке из 182 растений, мы выявили 27 AFLP-генотипов. Два из них (№1 и №3, таблица 4) присутствовали в каждой из шести исследованных популяций и в общей сложности составляли более половины всех образцов. Мы полагаем, что растения этих AFLP-генотипов являются раметами двух соответствующих клонов, имеющих очень широкое распространение по берегам Балтийского моря и в Карелии. В пользу такого предположения свидетельствует тот факт, что восковник эффективно размножается корневыми отпрысками, способными преодолевать по воде значительные расстояния [13-14, 16-17].

Три из выявленных нами AFLP-генотипов (№2, №11 и № 14) тоже оказались достаточно распространенными, но присутствовали только в некоторых популяциях. Возможно, растения с указанными AFLP-генотипами имеют в разных условиях неодинаковую жизнеспособность и в каких-то популяциях отбраковываются естественным отбором. Или же речь идет о трех крупных клонах, случайно охвативших лишь некоторые из исследованных популяций.

Остальные 22 AFLP-генотипа относятся к редким. Подавляющее большинство из них (20) представлены в суммарной выборке всего лишь одним или двумя растениями. Возможно, такие растения являются мутантами, возникшими на основе часто встречающихся AFLP-генотипов, характерных для данной популяции. Однако более предпочтительно другое объяснение. Дело в том, что среди редких AFLP-генотипов заметную долю составляют такие варианты, у которых отсутствуют сразу несколько амплифицированных фрагментов (например, №26 и №27). Представляется крайне маловероятным, чтобы в основе подобного AFLP-генотипа лежала серия из нескольких независимо возникших мутаций. Скорее всего, упомянутые AFLP-генотипы возникают в результате выхода в гомозиготу сразу нескольких рецессивных аллелей, находившихся в гетерозиготном состоянии у представителей часто встречающихся AFLP-генотипов.

Выход рецессивных аллелей в гомозиготу возможен за счет разных генетических процессов, но чаще всего он связан с мейотической рекомбинацией [45]. В свою очередь, мейотическая рекомбинация у цветковых растений приурочена обычно к половому размножению [46]. Таким образом, полученные данные позволяют предположить, что генетическая структура природных популяций восковника обусловлена не только эффектами основателей и протекающими в клонах мутационными процессами, но и хотя бы отчасти половым размножением и связанной с ним мейотической рекомбинацией.

С таким предположением хорошо согласуется тот факт, что некоторые из AFLP-генотипов восковника можно рассматривать в качестве рекомбинантных. Например, это касается AFLP-генотипов №1 (все фрагменты), №3 (все фрагменты, кроме 103 п.н.), №7 (все фрагменты, кроме 313 п.н.) и №14 (все фрагменты, кроме 103 и 313 п.н.) в популяциях 1 и 2: мы наблюдаем здесь отчетливую рекомбинацию по наличию/отсутствию фрагментов ДНК длиной 103 и 313 п.н. Сходная логика применима к AFLP-генотипам №1, №3, №4 и №11 в популяциях 3, 5 и 6: здесь мы имеем результаты рекомбинации по наличию/отсутствию фрагментов ДНК длиной 103 и 117 п.н.

Итак, каждая из шести проанализированных нами популяций восковника генетически полиморфна, т.е. не является клоном одного основателя. У каждой из них как минимум два основателя (AFLP-генотипы №1 и №3) с возможным участием и некоторых других (AFLP-генотипы №2, №11 и №14). По-видимому, в пределах каждой популяции имели место мутационные и/или рекомбинационные процессы, приведшие к возникновению редких AFLP-генотипов. Их спектр у разных популяций неодинаков. Судя по тому, что в популяциях 1, 2, 3, 5 и 6 присутствуют рекомбинантные AFLP-генотипы, в естественном воспроизведении восковника помимо вегетативного задействовано и половое размножение, но роль его, скорее всего, минорна.

**Литература**

1. *Grayson K.L., Johnson D.M.* Novel insights on population and range edge dynamics using an unparalleled spatiotemporal record of species invasion. // J Anim Ecol. 2018. Vol. 87. P. 581–593. doi: [10.1111/1365-2656.12755](https://doi.org/10.1111/1365-2656.12755)
2. *Bondareva O., Genelt–Yanovskiy E., Abramson N.* Copse snail *Arianta arbustorum* (Linnaeus, 1758) (Gastropoda: Helicidae) in the Baltic Sea region: Invasion or range extension? Insights from phylogeographic analysis and climate niche modeling. // J Zool Syst Evol Res. 2020. Vol. 58. P. 221–229. doi: [10.1111/jzs.12350](https://doi.org/10.1111/jzs.12350)
3. *Rehm E.M., Olivas P., Stroud J., Feeley K.J.* Losing your edge: climate change and the conservation value of range‐edge populations. // Ecol Evol. 2015. Vol. 5. P. 4315-4326. doi: [10.1002/ece3.1645](https://doi.org/10.1002/ece3.1645)
4. *Вавилов Н.И.* Центры происхождения культурных растений. Труды по прикладной ботанике и селекции. Т. 16. Л.: ВИР, 1926.
5. *Eckert C.G., Samis K.E., Lougheed S.C.* Genetic variation across species’ geographical ranges: the central–marginal hypothesis and beyond. // Mol Ecol. 2008. Vol. 17. P. 1170–1188. doi: [10.1111/j.1365-294x.2007.03659.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-294x.2007.03659.x)
6. *Brown J.H., Stevens G.C., Kaufman D.M.* The geographic range: size, shape, boundaries, and internal structure. // Annu Rev Ecol Syst. 1996. Vol. 27. P. 597–623. doi: [10.1146/annurev.ecolsys.27.1.597](https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.27.1.597)
7. *Pulliam R.H.* On the relationship between niche and distribution. // Ecol Lett. 2000. Vol. 3. P. 349–361. doi: [10.1046/j.1461-0248.2000.00143.x](https://doi.org/10.1046/j.1461-0248.2000.00143.x)
8. *Wright S.* Evolution in Mendelian populations. // Genetics. 1931. Vol. 16. P. 97–159.
9. *Кайданов Л.З.* Генетика популяций. М.: Высшая школа,1996. 319 с.
10. *Masel J.* Genetic drift. // Curr. Biol. 2011. Vol. 21: R837–R838. doi: [10.1016/j.cub.2011.08.007](https://doi.org/10.1016/j.cub.2011.08.007)
11. *Klimes L., Klimesova J., Hendriks R., van Groenendael J.* Clonal plant architecture: a comparative analysis of form and function. // In: H. De Kroon and J. van Groenendael (eds.) The Ecology and Evolution of Clonal Plants. Leiden, Backhys Publishers, 1997. pp. 1–29.
12. *Ивантер Э.В., Кузнецов О.Л.* (ред.) 2007. Красная книга Республики Карелия. // Петрозаводск: Карелия, 364 с.
13. *Комаров В.Л.* (ред.) 1936. Восковник болотный. // В кн.: Флора СССР. Т. 5. М.-Л.: Изд-во АН СССР. С. 243-244.
14. *Волкова Е.А., Смагин В.А., Храмцов В.Н.* Сообщества с *Myrica gale* L. на болотах побережья Финского залива (Санкт-Петербург и Ленинградская область). // Растительность России. 2021. Т. 41. С. 58–74.
15. Красная книга Российской Федерации (растения и грибы). М.: Министерство природных ресурсов и экологии РФ и Росприроднадзор, 2008. 885 с.
16. *Poore M.E.D.* The ecology of Woodwalton Fen. // J. Ecol. 1956. Vol. 44. P. 455–492.
17. *Skene K.R., Sprent J.I., Raven J.A., Herdman L.* Myrica gale L. // J. Ecol. 2000. Vol. 88. P. 1079–1094. doi: [10.1046/j.1365-2745.2000.00522.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-2745.2000.00522.x)
18. *Schwintzer C.R., Ostrofsky A.* Factors affecting germination of Myrica gale seeds.// Can. J. Forest. Res. 1989. Vol. 19. P. 1105–1109. doi: [10.1139/x89-167](http://dx.doi.org/10.1139/x89-167)
19. *Bond G.* The fixation of nitrogen associated with the root nodules of Myrica gale L., with special reference to its pH relation and ecological significance. // Ann. Bot. 1951. Vol. 15. No. 4. P. 447–459. doi: [10.1093/oxfordjournals.aob.a083291](https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aob.a083291)
20. *Schwintzer C.R., Lancelle S.A.* Effect of water table depth on shoot growth, root growth and nodulation of Myrica gale seedlings. // J. Ecol. 1983. Vol. 71. P. 489–501. doi: [10.2307/2259730](https://doi.org/10.2307/2259730)
21. *Crocker L.J., Schwintzer C.R.* Factors affecting formation of cluster roots in Myrica gale seedlings in water culture. // Plant Soil. 1993. Vol. 152. P. 287–298. doi: [10.1007/BF00029099](https://doi.org/10.1007/BF00029099)
22. *MacDonald A.D.* The morphology and relationships of the Myricaceae. // In: P.R. Crane & S. Blackmore (eds). Evolution, Systematics and Fossil History of the Hamamelidae, Vol. 2: Higher Hamamelidae. Oxford, UK: Clarendon Press, 1989. pp. 147–165.
23. *de Vere N., Rich T. C., Ford C. R., et al.* DNA barcoding the native flowering plants and conifers of Wales. // PloS One. 2012. Vol. 7. e37945. doi: [10.1371/journal.pone.0037945](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037945)
24. *Kuzmina M. L., Braukman T. W. A., Fazecas A. J., et al.* Using herbarium-derived DNAs to assemble a largescale DNA barcode library for the vascular plants of Canada. // Appl. Plant Sci. 2017. Vol. 5. 1700079. doi: [10.3732/apps.1700079](https://doi.org/10.3732/apps.1700079)
25. *Галактионова У.А., Большаков В.Н., Тиходеева М.Ю., Тиходеев О.Н.* Специфические проблемы при выделении геномной ДНК из растений. // Ботанический журнал. 2023. Т. 108. С. 603–614. doi: [10.31857/S0006813623060030](https://doi.org/10.31857/S0006813623060030)
26. *Семичева О.А., Галактионова У.А., Большаков В.Н., и др.* Полиморфизм геномной ДНК *Myrica gale* L. на территории государственного природного заказника «Лебяжий» (южное побережье Финского залива). // Ботанический журнал. 2024. (принята к публикации)
27. *Svoboda K.P., Inglis A., Hampson J., et al.* Biomass production, essential oil yield and composition of *Myrica gale* L. harvested from wild populations in Scotland and Finland. // Flavour Frag. J. 1998. Vol. 13. P. 367–372. doi: [10.1002/(SICI)1099-1026(199811/12)13:6%3C367::AID-FFJ724%3E3.0.CO;2-M](https://doi.org/10.1002/%28SICI%291099-1026%28199811/12%2913%3A6%3C367%3A%3AAID-FFJ724%3E3.0.CO;2-M)
28. *Sylvestre M., Legault J., Dufour D., Pichette A.* Chemical composition and anticancer activity of leaf essential oil of *Myrica gale* L. // Phytomedicine. 2005. Vol. 12. P. 299–304. doi: [10.1016/j.phymed.2003.12.004](https://doi.org/10.1016/j.phymed.2003.12.004)
29. *Popovici J., Bertrand C., Bagnarol E., et al.* Chemical composition of essential oil and headspace-solid microextracts from fruits of *Myrica gale* L. and antifungal activity. // Nat. Product Res. 2008. Vol. 22. P. 1024–1032. doi: [10.1080/14786410802055568](https://doi.org/10.1080/14786410802055568)
30. *Rosa G.P., Silva B.J., Seca A.M., et al.* Phytochemicals with added value from *Morella* and *Myrica* species. // Molecules. 2020. Vol. 25. 6052. doi: [10.3390%2Fmolecules25246052](https://doi.org/10.3390/molecules25246052)
31. *Aggarwal G., Edhigalla P., Walia P.* A comprehensive review of high-quality plant DNA isolation. // The Pharma Innovation Journal. 2022. Vol. SP-11. No. 6. P. 171–176. doi: [10.3390/plants11030242](https://doi.org/10.3390/plants11030242)
32. *Kotchoni S.O., Gachomo E.W.* A rapid and hazardous reagent free protocol for genomic DNA extraction suitable for genetic studies in plants. // Mol. Biol. Reports. 2009. Vol. 36. P. 1633–1636. doi: [10.1007/s11033-008-9362-9](https://doi.org/10.1007/s11033-008-9362-9)
33. *Blignaut M., Ellis A.G., Le Roux J.J.* Towards a transferable and cost-effective plant AFLP protocol. // PloS One. 2013. Vol. 8. e61704. doi: [10.1371%2Fjournal.pone.0061704](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061704)
34. *Глотов Н.В., Животовский Л.А., Хованов Н.В., Хромов-Борисов Н.Н.* Биометрия. Л*.:* Изд-во Ленингр. ун-та, 1982.
35. *Leipold M., Tausch S., Hirtreiter M., et al.* Sampling for conservation genetics: how many loci and individuals are needed to determine the genetic diversity of plant populations using AFLP? // Conserv. Genet. Resour. 2020. Vol. 12. P. 99–108. doi: [10.1007/s12686-018-1069-1](https://doi.org/10.1007/s12686-018-1069-1)
36. *Huguet V., Batzli J.M., Zimpfer J.F. et al.* Diversity and specificity of *Frankia* strains in nodules of sympatric *Myrica gale*, *Alnus incana*, and *Shepherdia canadensis* determined by *rrs* gene polymorphism. // Applied and Environ. Microbiol. 2001. Vol. 67. P. 2116–2122. doi: [10.1128%2FAEM.67.5.2116-2122.2001](https://doi.org/10.1128/AEM.67.5.2116-2122.2001)
37. *Huguet V., Mergeay M., Cervantes E., Fernandez M.* Diversity of *Frankia* strains associated to *Myrica gale* in Western Europe: impact of host plant (*Myrica* vs. *Alnus*) and of edaphic factors. // Environ. Microbiol. 2004. Vol. 6. P. 1032–1041. doi: [10.1111/j.1462-2920.2004.00625.x](https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2004.00625.x)
38. *Popovici J., Comte G., Bagnarol E., et al.* Differential effects of rare specific flavonoids on compatible and incompatible strains in the *Myrica gale-Frankia* actinorhizal symbiosis. // Appl. Environ. Microb. 2010. Vol. 76. P. 2451–2460. doi: [10.1128/aem.02667-09](https://doi.org/10.1128/aem.02667-09)
39. *Popovici J., Walker V., Bertrand C., et al.* Strain specificity in the Myricaceae–Frankia symbiosis is correlated to plant root phenolics. // Funct. Plant Biol. 2011. Vol. 38. P. 682–689. doi: [10.1071/fp11144](https://doi.org/10.1071/fp11144)
40. *Saunders J.A., Pedroni M.J., Penrose L.D., Fist A.J.* AFLP analysis of opium poppy. // Crop Sci. 2001. Vol. 41. P. 1596–1601. doi: [10.2135/cropsci2001.4151596x](https://doi.org/10.2135/cropsci2001.4151596x)
41. *Nguyen T.T., Taylor P.W.J., Redden R.J., Ford R.* Genetic diversity estimates in Cicer using AFLP analysis. // Plant Breed. 2004. Vol. 123. P. 173–179. doi: [10.1046/j.1439-0523.2003.00942.x](https://doi.org/10.1046/j.1439-0523.2003.00942.x)
42. *Gil-Vega K., Díaz C., Nava-Cedillo A., Simpson J.* AFLP analysis of *Agave tequilana* varieties. // Plant Sci. 2006. Vol. 170. P. 904–909. doi: [10.1016/j.plantsci.2005.12.014](https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2005.12.014)
43. *Patsias K., Bruelheide H.* Is the degree of clonality of forest herbs dependent on gap age? Using fingerprinting approaches to assess optimum successional stages for montane forest herbs. // Ecol. Evol. 2011. Vol. 1. P. 290–305. doi: [10.1002/ece3.23](https://doi.org/10.1002/ece3.23)
44. *Roldan-Ruiz I., Dendauw J., Van Bockstaele E., et al.* AFLP markers reveal high polymorphic rates in ryegrasses (*Lolium spp.*). // Mol. Breed. 2000. Vol. 6. P. 125–134. doi: [10.1023/A%3A1009680614564](https://doi.org/10.1023/A%3A1009680614564)
45. *Инге-Вечтомов С.Г.* Генетика с основами селекции. 2-е изд. СПб.: Изд-во Н-Л, 2010.
46. *Батыгина Т.Б.* (ред.). Эмбриология цветковых растений. Терминология и концепции. (В трёх томах). Т. 3: Системы репродукции. М.: Мир и семья, 2000. 640 с.

**References**

1. Grayson KL, Johnson DM. Novel insights on population and range edge dynamics using an unparalleled spatiotemporal record of species invasion. *J Anim Ecol*. 2018;87:581–593. doi: [10.1111/1365-2656.12755](https://doi.org/10.1111/1365-2656.12755)
2. Bondareva O, Genelt–Yanovskiy E, Abramson N. Copse snail *Arianta arbustorum* (Linnaeus, 1758) (Gastropoda: Helicidae) in the Baltic Sea region: Invasion or range extension? Insights from phylogeographic analysis and climate niche modeling. *J Zool Syst Evol Res*. 2020;58:221–229. doi: [10.1111/jzs.12350](https://doi.org/10.1111/jzs.12350)
3. Rehm EM, Olivas P, Stroud J, Feeley KJ. Losing your edge: climate change and the conservation value of range‐edge populations. *Ecol Evol*. 2015;5:4315-4326. doi: [10.1002/ece3.1645](https://doi.org/10.1002/ece3.1645)
4. Vavilov NI. Centers of origin of cultivated plants. *Bulletin of Applied Botany and Plant Breeding*. 1926;16(2). (in Russ.).
5. Eckert CG, Samis KE, Lougheed SC. Genetic variation across species’ geographical ranges: the central–marginal hypothesis and beyond. *Mol Ecol.* 2008;17:1170–1188. doi: [10.1111/j.1365-294x.2007.03659.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-294x.2007.03659.x)
6. Brown JH, Stevens GC, Kaufman DM. The geographic range: size, shape, boundaries, and internal structure. *Annu Rev Ecol Syst.* 1996;27:597–623. doi: [10.1146/annurev.ecolsys.27.1.597](https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.27.1.597)
7. Pulliam RH. On the relationship between niche and distribution. *Ecol Lett.* 2000;3:349–361. doi: [10.1046/j.1461-0248.2000.00143.x](https://doi.org/10.1046/j.1461-0248.2000.00143.x)
8. Wright S. Evolution in Mendelian populations. *Genetics*. 1931;16:97–159.
9. Kaidanov LZ. *Genetics of Populations*. Moscow: Vysshaya Shkola: 1996. (in Russ.)
10. Masel J. Genetic drift. *Curr Biol.* 2011;21:R837–R838. doi: [/10.1016/j.cub.2011.08.007](https://doi.org/10.1016/j.cub.2011.08.007)
11. Klimes L, Klimesova J, Hendriks R, van Groenendael J. Clonal plant architecture: a comparative analysis of form and function. In: H. De Kroon and J. van Groenendael (eds.) *The Ecology and Evolution of Clonal Plants*. Leiden, Backhys Publishers, 1997. pp. 1–29.
12. Ivanter EV, Kuznetsov OL (eds) *The Red Book of the Karelia Republic*. Petrozavdsk: Kareliya, 2007. (in Russ.)
13. Komarov VL (ed) Waxweed. In: *Flora of USSR. Vol. 5.* Moscow-Liningrad: Publishers of the USSR Academy of Sciences. 1936. P. 243-244. (in Russ.)
14. Volkova EA, Smagin VA, Khramtsov VN. Societies with *Myrica gale* L. in the bogs of the Gulf of Finland edges (Saint Petersburg and Leningrad District). *Rastitel'nost' Rossii*. 2021;41:58–74. (in Russ.)
15. *The Red Book of the Russian Federation (Plants and Fungi)*. Moscow: The Ministry of Nature Resources and Ecology of Russian Federation, and Rosprirodnadzor: 2008. (in Russ.)
16. Poore MED. The ecology of Woodwalton Fen. *J Ecol*. 1956;44:455–492.
17. Skene KR, Sprent JI, Raven JA, Herdman L. Myrica gale L. *J Ecol.* 2000;88:1079–1094. doi: [10.1046/j.1365-2745.2000.00522.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-2745.2000.00522.x)
18. Schwintzer CR, Ostrofsky A. Factors affecting germination of Myrica gale seeds. *Can. J. Forest. Res.* 1989;19:1105–1109. doi: [10.1139/x89-167](http://dx.doi.org/10.1139/x89-167)
19. Bond G. The fixation of nitrogen associated with the root nodules of Myrica gale L., with special reference to its pH relation and ecological significance. *Ann. Bot.* 1951;15(4):447–459. doi: [10.1093/oxfordjournals.aob.a083291](https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aob.a083291)
20. Schwintzer CR, Lancelle SA. Effect of water table depth on shoot growth, root growth and nodulation of Myrica gale seedlings. *J Ecol.* 1983;71:489–501. doi: [10.2307/2259730](https://doi.org/10.2307/2259730)
21. Crocker LJ, Schwintzer CR. Factors affecting formation of cluster roots in Myrica gale seedlings in water culture. *Plant Soil.* 1993;152:287–298. doi: [10.1007/BF00029099](https://doi.org/10.1007/BF00029099)
22. MacDonald AD. The morphology and relationships of the Myricaceae. In: P.R. Crane, S. Blackmore (eds). *Evolution, Systematics and Fossil History of the Hamamelidae, Vol. 2: Higher Hamamelidae*. Oxford, UK: Clarendon Press; 1989. pp. 147–165.
23. de Vere N, Rich TC, Ford CR, et al. DNA barcoding the native flowering plants and conifers of Wales. *PloS One*. 2012;7:e37945. doi: [10.1371/journal.pone.0037945](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037945)
24. Kuzmina ML, Braukman TWA, Fazecas AJ, et al. Using herbarium-derived DNAs to assemble a largescale DNA barcode library for the vascular plants of Canada. *Appl. Plant Sci.* 2017;5:1700079. doi: [10.3732/apps.1700079](https://doi.org/10.3732/apps.1700079)
25. Galaktionova UA, Bolshakov VN, Tikhodeeva MYu, Tikhodeyev ON. Specific problems of genomic DNA extraction from plants: ways for solution. *Botanicheskii zhurnal.* 2023;108:603–614. (in Russian) doi: [10.31857/S0006813623060030](https://doi.org/10.31857/S0006813623060030)
26. Semicheva OA, Galaktionova UA, Bolshakov VN, et al. Polymorphism of *Myrica gale* L. genomic DNA in the Lebyazhiy State Nature Reserve (the southern coast of the Gulf of Finland). *Botanicheskii zhournal*. 2024. (accepted for publication) (in Russ.)
27. Svoboda KP, Inglis A, Hampson J, et al. Biomass production, essential oil yield and composition of *Myrica gale* L. harvested from wild populations in Scotland and Finland. *Flavour Frag. J.* 1998;13:367–372. doi: [10.1002/(SICI)1099-1026(199811/12)13:6%3C367::AID-FFJ724%3E3.0.CO;2-M](https://doi.org/10.1002/%28SICI%291099-1026%28199811/12%2913%3A6%3C367%3A%3AAID-FFJ724%3E3.0.CO;2-M)
28. Sylvestre M, Legault J, Dufour D, Pichette A. Chemical composition and anticancer activity of leaf essential oil of *Myrica gale* L. *Phytomedicine*. 2005;12:299–304. doi: [10.1016/j.phymed.2003.12.004](https://doi.org/10.1016/j.phymed.2003.12.004)
29. Popovici J, Bertrand C, Bagnarol E, et al. Chemical composition of essential oil and headspace-solid microextracts from fruits of *Myrica gale* L. and antifungal activity. *Nat. Product Res.* 2008;22:1024–1032. doi: [10.1080/14786410802055568](https://doi.org/10.1080/14786410802055568)
30. Rosa GP, Silva BJ, Seca AM, et al. Phytochemicals with added value from *Morella* and *Myrica* species. *Molecules*. 2020;25:6052. doi: [10.3390%2Fmolecules25246052](https://doi.org/10.3390/molecules25246052)
31. Aggarwal G, Edhigalla P, Walia P. A comprehensive review of high-quality plant DNA isolation. *The Pharma Innovation Journal*. 2022;SP-11(6):171–176. doi: [10.3390/plants11030242](https://doi.org/10.3390/plants11030242)
32. Kotchoni SO, Gachomo EW. A rapid and hazardous reagent free protocol for genomic DNA extraction suitable for genetic studies in plants. *Mol. Biol. Reports.* 2009;36:1633–1636. doi: [10.1007/s11033-008-9362-9](https://doi.org/10.1007/s11033-008-9362-9)
33. Blignaut M, Ellis AG, Le Roux JJ. Towards a transferable and cost-effective plant AFLP protocol. *PloS One*. 2013;8:e61704. doi: [10.1371%2Fjournal.pone.0061704](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061704)
34. Glotov NV, Zhivotovskiy LA, Khovanov NV, Khromov-Borisov NN. *Biometry*. Leningrad: Publishers of the Leningrad University, 1982.
35. Leipold M, Tausch S, Hirtreiter M, et al. Sampling for conservation genetics: how many loci and individuals are needed to determine the genetic diversity of plant populations using AFLP? Conserv. Genet. Resour. 2020;12:99–108. doi: [10.1007/s12686-018-1069-1](https://doi.org/10.1007/s12686-018-1069-1)
36. Huguet V, Batzli JM, Zimpfer JF, et al. Diversity and specificity of *Frankia* strains in nodules of sympatric *Myrica gale*, *Alnus incana*, and *Shepherdia canadensis* determined by *rrs* gene polymorphism. *Applied Environ. Microbiol.* 2001;67:2116–2122. doi: [10.1128%2FAEM.67.5.2116-2122.2001](https://doi.org/10.1128/AEM.67.5.2116-2122.2001)
37. Huguet V, Mergeay M, Cervantes E, Fernandez M. Diversity of *Frankia* strains associated to *Myrica gale* in Western Europe: impact of host plant (*Myrica* vs. *Alnus*) and of edaphic factors. *Environ. Microbiol.* 2004;6:1032–1041. doi: [10.1111/j.1462-2920.2004.00625.x](https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2004.00625.x)
38. Popovici J, Comte G, Bagnarol E, et al. Differential effects of rare specific flavonoids on compatible and incompatible strains in the *Myrica gale-Frankia* actinorhizal symbiosis. *Appl. Environ. Microb.* 2010;76:2451–2460. doi: [10.1128/aem.02667-09](https://doi.org/10.1128/aem.02667-09)
39. Popovici J, Walker V, Bertrand C, et al. Strain specificity in the Myricaceae–Frankia symbiosis is correlated to plant root phenolics. *Funct. Plant Biol.* 2011;38:682–689. doi: [10.1071/fp11144](https://doi.org/10.1071/fp11144)
40. Saunders JA, Pedroni MJ, Penrose LD, Fist AJ. AFLP analysis of opium poppy. *Crop Sci.* 2001;41:1596–1601. doi: [10.2135/cropsci2001.4151596x](https://doi.org/10.2135/cropsci2001.4151596x)
41. Nguyen TT., Taylor PWJ, Redden RJ, Ford R. Genetic diversity estimates in Cicer using AFLP analysis. *Plant Breed*. 2004;123:173–179. doi: [10.1046/j.1439-0523.2003.00942.x](https://doi.org/10.1046/j.1439-0523.2003.00942.x)
42. Gil-Vega K, Díaz C, Nava-Cedillo A, Simpson J. AFLP analysis of *Agave tequilana* varieties. *Plant Sci*. 2006;170:904–909. doi: [10.1016/j.plantsci.2005.12.014](https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2005.12.014)
43. Patsias K, Bruelheide H. Is the degree of clonality of forest herbs dependent on gap age? Using fingerprinting approaches to assess optimum successional stages for montane forest herbs. *Ecol. Evol.* 2011;1:290–305. doi: [10.1002/ece3.23](https://doi.org/10.1002/ece3.23)
44. Roldan-Ruiz I, Dendauw J, Van Bockstaele E, et al. AFLP markers reveal high polymorphic rates in ryegrasses (*Lolium spp.*). *Mol Breed.* 2000;6:125–134. doi: [10.1023/A%3A1009680614564](https://doi.org/10.1023/A%3A1009680614564)
45. Inge-Vechtomov SG. *Genetics with the Basics of Breeding. 2nd Edition*. Saint Petersburg: N-L Publishers, 2010. (in Russ.)
46. Batygina TB. (ed). *Embryology of Flowering Plants. Terminology and Concepts (in 3 volumes). Vol. 3. Reproduction Systems*. Moscow: Mir i Sem’ya; 2000. (in Russ.)

**Таблица 1.** Названия и последовательности олигонуклеотидов, использованных в работе.

|  |  |
| --- | --- |
| Название олигонуклеотида | Нуклеотидная последовательность (5' → 3') |
| Адаптеры для реакции лигирования с фрагментами рестрикции |
| EcoRI-AR | AATTGGTACGCAGTCTAC |
| EcoRI-AF | CTCGTAGACTGCGTACC |
| Tru9I-AR | TACTCAGGACTCA |
| Tru9I-AF | GACGATGAGTCCTGAG |
| Праймеры для реакции предамплификации  |
| EcoRI-PA | GACTGCGTACCAATTC |
| Tru9I-PA | GATGAGTCCTGAGTAA |
| Праймеры для реакции селективной амплификации |
| F-EcoRI-AAT | FAM-GACTGCGTACCAATTCAAT |
| F-EcoRI-ATG | FAM-GACTGCGTACCAATTCATG |
| F-EcoRI-CAT | FAM-GACTGCGTACCAATTCCAT |
| Tru9I-CTT | GATGAGTCCTGAGTAACTT |

Примечание: FAM – флуорофор флуоресцеин.

**Таблица 2.** Объемы использованных выборок.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Объем выборки | Исследованные популяции восковника  | Итого |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| 42 | 40 | 41 | 5 | 13 | 41 | 182 |

**Таблица 3.** Выбранные для анализа амплифицированные фрагменты геномной ДНК восковника

|  |  |
| --- | --- |
| Использованные комбинации праймеров | Размер выбранных фрагментов ДНК (н.п.) |
| F-EcoRI-AAT и Tru9I-CTT | 116, 125, 165, 203, 239, 280, 309, 313, 317, 363 |
| F-EcoRI-ATG и Tru9I-CTT | 101, 118, 121, 128, 267, 415  |
| F-EcoRI-CAT и Tru9I-CTT | 103, 117, 133, 303, 306, 437  |

 **Таблица 4.** Соотношение между разными AFLP-генотипами в исследованных популяциях восковника

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| AFLP-генотип  | Популяция | Итого |
| 1  | 2  | 3  | 4  | 5  | 6  |
| 1 | Все фрагменты | 8 | 3 | 14 | 2 | 2 | 6 | 35 |
|  Все фрагменты, кроме одного  |  |
| 2 | Все, кроме 101 п.н. | 0 | 7 | 0 | 0 | 5 | 9 | 21 |
| 3 | Все, кроме 103 п.н. | 18 | 10 | 16 | 2 | 2 | 14 | 62 |
| 4 | Все, кроме 117 п.н. | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 2 | 4 |
| 5 | Все, кроме 121 п.н. | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 2 |
| 6 | Все, кроме 165 п.н. | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| 7 | Все, кроме 313 п.н. | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 |
|  Все фрагменты, кроме двух  |  |
| 8 | Все, кроме 101 и 117 п.н. | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 2 |
| 9 | Все, кроме 101 и 121 п.н. | 1 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 |
| 10 | Все, кроме 101 и 267 п.н. | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| 11 | Все, кроме 103 и 117 п.н. | 0 | 0 | 8 | 0 | 0 | 7 | 15 |
| 12 | Все, кроме 103 и 118 п.н. | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 13 | Все, кроме 103 и 125 п.н. | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| 14 | Все, кроме 103 и 313 п.н. | 2 | 11 | 0 | 0 | 0 | 0 | 13 |
| 15 | Все, кроме 117 и 165 п.н. | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| 16 | Все, кроме 165 и 313 п.н. | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| 17 | Все, кроме 239 и 317 п.н. | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
|  Все фрагменты, кроме трех  |  |
| 18 | Все, кроме 101, 103 и 267 п.н. | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 19 | Все, кроме 101, 118 и 280 п.н. | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| 20 | Все, кроме 103, 117 и 133 п.н. | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| 21 | Все, кроме 103, 117 и 313 п.н.  | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| 22 | Все, кроме 103, 118 и 121 п.н.  | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
|  Все фрагменты, кроме четырех  |  |
| 23 | Все, кроме 103, 117, 125 и 313 п.н.  | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 24 | Все, кроме 117, 121, 128 и 165 п.н.  | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
|  Все фрагменты, кроме пяти  |  |
| 25 | Все, кроме 165, 239, 313, 317 и 363 п.н. | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
|  Все фрагменты, кроме шести |  |
| 26 | Все, кроме 103, 117, 118, 121, 125 и 133 п.н.  | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 27 | Все, кроме 117, 239, 280, 313, 317 и 363 п.н.  | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| Итого  | 42 | 40 | 41 | 5 | 13 | 41 | 182 |
| Количество разных AFLP-генотипов | 14 | 10 | 5 | 3 | 6 | 7 | 27 |

**Таблица 5.** Соотношение между часто встречающимися и прочими AFLP-генотипами в исследованных популяциях восковника.

|  |  |
| --- | --- |
| AFLP-генотип  | Популяция\*  |
| 1 | 2 | 3 | 6 |
| №1 (все фрагменты) | 8 | 3 | 14 | 6 |
| №2 (все, кроме 101 п.н.) | 0 | 7 | 0 | 9 |
| №3 (все, кроме 103 п.н.)  | 18 | 10 | 16 | 14 |
| №11 (все, кроме 103 и 117 п.н.) | 0 | 0 | 8 | 7 |
| №14 (все, кроме 103 и 313 п.н.) | 2 | 11 | 0 | 0 |
| Все остальные | 14 | 9 | 3 | 5 |
| Итого  | 42 | 40 | 41 | 41 |

 \* Учтены только популяции с объемом выборки не менее 40



**Рисунок 1.** Пример фрагментов ДНК, выбранных для AFLP-анализа восковника при использовании пары праймеров F-EcoRI-AAT и Tru9I-CTT. Число над пиком означает размер выбранного фрагмента (п.н.). Фрагменты, соответствующие другим пикам на этой хроматограмме, не были выбраны для анализа, поскольку либо недостаточно четко идентифицировались, либо не всегда воспроизводились в независимых технических повторностях. Оранжевым цветом показаны маркеры длин фрагментов.