

ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОМНОЙ ДНК *MYRICA GALE* (MYRICACEAE) НА ТЕРРИТОРИИ ГОСУДАРСТВЕННОГО ПРИРОДНОГО ЗАКАЗНИКА “ЛЕБЯЖИЙ” (ЮЖНОЕ ПОБЕРЕЖЬЕ ФИНСКОГО ЗАЛИВА)

© 2024 г. О. А. Семичева^{1,2}, У. А. Галактионова^{1,2}, В. Н. Большаков¹, А. Э. Романович²,
М. Ю. Тиходеева², О. Н. Тиходеев^{2,*}

¹ООО “Вега” ГК “Алкор Био”

Железнодорожный пр., 40а, Санкт-Петербург, 192148, Россия

²Санкт-Петербургский государственный университет

Университетская наб., 7/9/11, Санкт-Петербург, 199034, Россия

*e-mail: tikhodeyev@mail.ru, o.tikhodeev@spbu.ru

Поступила в редакцию 24.11.2023 г.

После доработки 01.12.2023 г.

Принята к публикации 05.12.2023 г.

Анализ полиморфизма геномной ДНК – один из широко используемых подходов при изучении генетической структуры природных популяций. Его успешно применяют к различным видам растений. Но многие виды пока практически не исследованы, что в первую очередь связано с методическими сложностями при выделении хорошо очищенной геномной ДНК. Эти сложности связаны с тем, что для растений характерны многочисленные органические соединения (полисахариды, полифенолы, липиды и т.п.), загрязняющие ДНК и значительно снижающие ее качество. К числу таких видов относится восковник болотный (*Myrica gale* L.) – многолетний приатлантический кустарник, размножающийся главным образом вегетативно (проростки восковника встречаются в природе очень редко). Мы разработали простой протокол выделения высококачественной геномной ДНК из листьев восковника и провели AFLP-анализ 42 растений этого вида из трех субпопуляций на территории природного заказника “Лебяжий”. Используя три пары праймеров, вычленили 22 фрагмента амплификации, 8 из которых оказались мономорфными. По остальным 14 фрагментам средний уровень их полиморфизма был невысок: в зависимости от исследованной субпопуляции он варьировал от 0.079 до 0.129. Как показал проведенный нами анализ, все три исследованные субпопуляции восковника оказались полиморфными с преобладанием двух общих AFLP-генотипов. По-видимому, соответствующие растения являются вегетативными потомками основателей данной популяции. Обнаруженные редкие AFLP-генотипы (представлены всего одним или двумя растениями; в общей сложности таких генотипов выявлено 12), вероятно, возникли в результате мутационных и рекомбинационных процессов. Полученные данные свидетельствуют о том, что в воспроизведении и расселении восковника роль полового размножения тоже существенна.

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

DOI: 10.31857/S0006813624010053, **EDN:** EXQPZP

Myrica gale L. (восковник болотный) – многолетний двудомный листопадный кустарник из семейства Myricaceae. Приурочен к сильно увлажненным умеренно-бореальным приатлантическим экотопам Северного полушария. В Европе наиболее обилен на Британских островах и в Фенноскандии. На территории Российской Федерации встречается только в Карелии и Ленинградской области (Komarov, 1936; Ivanter, Kuznetsov, 2007; Volkova et al., 2021),

это самые восточные популяции в ареале вида. Как правило, они сравнительно малочисленны (обычно не более двухсот-трехсот растений), причем некоторые испытывают сильное антропогенное воздействие, что приводит к их сокращению и угрозе исчезновения. Соответственно, данный вид растений включен в Красную книгу РФ (The Red Book..., 2008) со статусом “редкий” (категория 3).

Одной из интересных биологических особенностей восковника является его преимущественно вегетативное размножение (Poore, 1956; Skene et al., 2000). Дело в том, что соотношение полов у данного вида резко сдвинуто в сторону мужских растений: женские обычно составляют абсолютное меньшинство, а в некоторых природных популяциях не отмечены вовсе (Ivanter, Kuznetsov, 2007; Volkova et al., 2021). Кроме того, даже в самых благоприятных условиях всхожесть семян восковника невысока (Schwintzer, Ostrofsky, 1989; Skene et al., 2000). Его проростки встречаются в природе редко (Poore, 1956), а их жизнеспособность зависит от многих факторов, в том числе от симбиотических отношений с азотфиксирующими актиномицетами из рода *Frankia* (Bond, 1951; Schwintzer, Lancelle, 1983; Schwintzer, Ostrofsky, 1989; Crocker, Schwintzer, 1993). Соответственно, принято считать, что у восковника роль полового размножения весьма невелика (Poore, 1956; Skene et al., 2000).

Перечисленные факты позволяют предположить, что многие популяции восковника, особенно периферические, имеют сугубо клональное происхождение, т.е. представлены ракетами одного и того же генотипа. Чтобы проверить справедливость этой гипотезы, необходимо провести молекулярно-генетический анализ растений восковника из достаточно крупной популяции, находящейся на краю ареала и в значительной степени изолированной от других популяций. Однако таких исследований не проводили.

Генетических данных о восковнике крайне мало. Предполагают, что он является гексаплоидом: для этого вида характерно 48 хромосом при $n = 8$ для семейства Mugiaceae (MacDonald, 1989; Skene et al., 2000). Молекулярно-генетические данные о восковнике сводятся к результатам штрих-кодирования (de Vere et al., 2012;

Kuzmina et al., 2017) и отдельным геномным последовательностям в GeneBank. В этих работах были использованы дорогостоящие методы на основе зарубежных коммерческих наборов реагентов (de Vere et al., 2012) или автоматизированных систем для выделения ДНК (Kuzmina et al., 2017). Наше исследование требовало более дешевых подходов.

Проблема осложняется тем, что для восковника характерен широкий спектр соединений, затрудняющих выделение высококачественной геномной ДНК. К подобным соединениям в первую очередь относятся полисахариды, липиды и полифенолы (Rogers, Bendich, 1985; 1989; Dairawan, Shetty, 2020; Ryabushkina et al., 2012; Aggarwal et al., 2022; Galaktionova et al., 2023). Между тем высокоточные молекулярно-генетические методы, в частности широко используемый AFLP-анализ (Amplified Fragment Length Polymorphism; Vos et al., 1995; Blears et al., 1998; Mueller, Wolfenbarger, 1999, требуют хорошего уровня очистки ДНК.

Показано, что стебли и листья *Myrica gale* покрыты многочисленными железистыми трихомами, выделяющими широкий спектр липидов, в том числе восков (Svoboda et al., 1998; Popovici et al., 2008). В экссудатах генеративных и вегетативных органов присутствуют разнообразные флавоноиды и эфирные масла (Malterud, 1992; Popovici et al., 2008; 2010; Rosa et al., 2020). Благодаря десяткам вариантов полифенолов восковник проявляет отчетливо выраженную лекарственную, фитотоксическую, репеллентную и антимикробную активность (Blackwell et al., 2003; Sylvestre et al., 2005; Popovici et al., 2008; 2011; Silva et al., 2015; Rosa et al., 2020). Таким образом, восковник является сложным объектом для выделения высококачественной геномной ДНК.

В настоящей работе предложен простой протокол, позволяющий выделять из восковника геномную ДНК, пригодную для последующего AFLP-анализа. Используя данный протокол, мы исследовали генетический полиморфизм восковника, произрастающего на территории государственного природного заказника “Лебяжий” (южное побережье Финского залива). Этот локус выбран нами по трем причинам. Во-первых, местная популяция восковника — одна из самых крупных в Ленинградской области. Во-вторых, она находится на значительном

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Место исследования. Растительный материал собирали в государственном природном заказнике регионального значения “Лебяжий” (Ломоносовский р-н, Ленинградская обл.), а также непосредственно прилегающих к нему территориях. Для данного заказника характерны эталонные приморские ландшафты южного берега Финского залива. К их числу относятся мелководная часть акватории и прибрежная зона, представленная вытянутыми вдоль берега дюнными песчаными грядами, чередующимися с межгрядовыми понижениями. Гряды заняты разреженными зеленомошными сосняками с брусникой, вороникой и вереском. Межгрядовые понижения заболочены. В экотонах болот с сосняками сформировались заросли черноольшаников. Местная популяция восковника представлена тремя субпопуляциями, удаленными на разное расстояние от Финского залива и отделенными друг от друга песчаными грядами с сосняками.

Субпопуляция А (рис. 1). Произрастает на песчаном участке, отделенном от Финского залива первой узкой дюнной грядой и сформировавшимися за ней зарослями тростника. При изменении уровня воды в заливе и во время весеннего снеготаянья регулярно затопляется. Испытывает интенсивную рекреационную нагрузку. Восковник произрастает узкой прерывистой полосой на границе между зарослями тростника и второй песчаной грядой с сосняком бруснично-вороничным. В полосе тростниковых зарослей (ширина 50–60 м) помимо *Phragmites australis* (проективное покрытие 80%) произрастает *Galium palustre* (5%), *Carex acuta* (3%), *C. elangata* (1%), *Sium latifolium* (1%) и мхи (10%): *Sphagnum squarosum*, *Sphagnum* sp., *Calliergon cuspidatum*. В древостое сосняка бруснично-вороничного кроме *Pinus sylvestris* (высотой 12–15 м) отмечена *Sorbus aucuparia* (2–4 м), а также единичные особи *Viburnum opulus* (0.6 м) и *Aronia melanocarpa* (0.7 м). В напочвенном покрове преобладает *Impetrum nigrum* (30%), *Vaccinium vitis-idaea* (20%), *V. myrtillus* (3%), *Deschampsia caespitosa* (7%), *Carex nigra* (2%), *Fragaria vesca* (5%) и *Melica nutans* (2%). Отмечены единичные экземпляры *Luzula pilosa* и *Hieracium umbellatum*. Из-за вытаптывания моховой покров практически отсутствует. В зоне произрастания

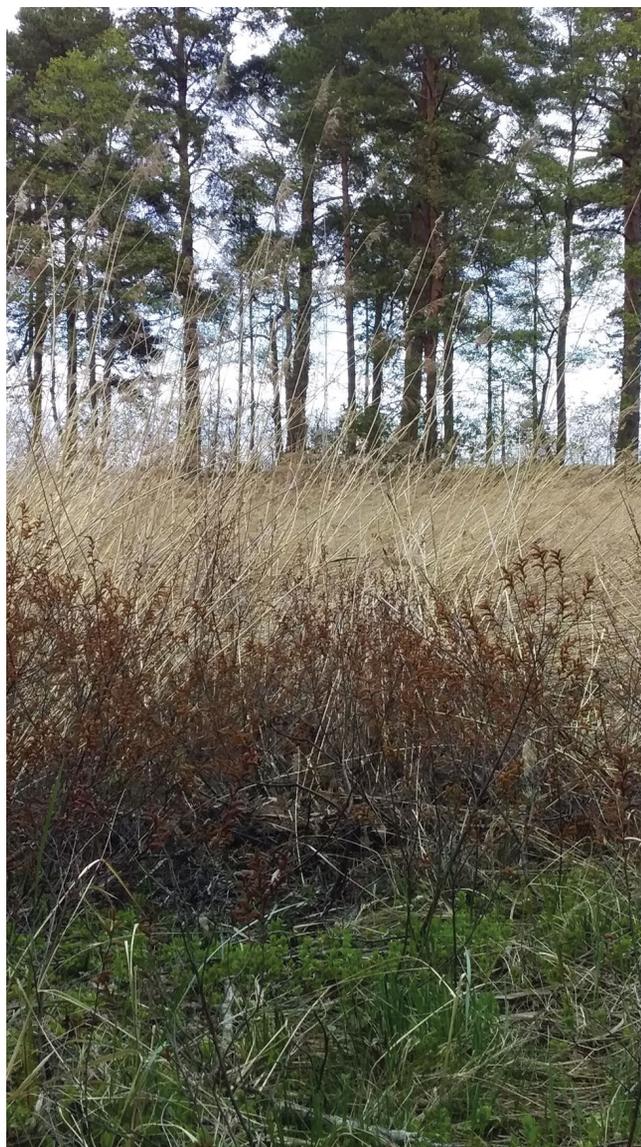


Рис. 1. Заросли восковника в субпопуляции А.

Fig. 1. *Myrica gale* thickets in subpopulation A.

удалении (более 25 км) от других известных популяций данного вида, т.е. в достаточно высокой степени изолирована от них. В-третьих, выбранный локус неоднороден, в результате чего исследованная нами популяция разделена на три обособленные субпопуляции в трактовке Беклемишева (Beklemishev, 2015). Анализируя генетический полиморфизм этих субпопуляций, мы проверяли справедливость гипотезы о том, что каждая из них имеет сугубо клональное происхождение, т.е. представлена ракетами одного и того же AFLP-генотипа.

восковника, достигающего покрытия до 60%, встречается *Alnus glutinosa* (10–12 м), *Frangula alnus* (1.5–3 м), *Salix cinerea* (2.5 м) и *S. starkeana* (3 м). Напочвенный покров состоит из *Chamaepericlymenum suecicum* (до 15%), *Phragmites australis* (10%), *Calamagrostis epigeios* (3%), *Sium latifolium* (2%), *Galium palustre* (1%), *Carex acuta* (1%), *C. elangata* (1%). Эта субпопуляция разбита на фрагменты, различающиеся по виталитету растений. В некоторых фрагментах высота восковника составляет 1.2 м, в других восковник активно усыхает, его высота не превышает 0.7 м. Обнаружены только мужские растения.

Субпопуляция Б (рис. 2). Произрастает в понижении за второй дюнной грядой в низинном мезо-евтрофном болоте, облесенном по краевым кочкам ольхой черной и березой пушистой. Восковник присутствует как в облесенной, так и в болотной зоне, частично заходя до центра последней. На освещенных участках он демонстрирует высокий виталитет (высота растений 1.0–1.4 м, покрытие 40%). Резко преобладают мужские растения, но встречаются и единичные женские. Среди травянистых растений наблюдается чередование доминирования *Phragmites australis* (10–40%) и *Eriophorum vaginatum* (5–30%), а также *Carex acuta* (5–20%), *C. elangata* (5%), *Viola epipsela* (5%), *Comarum palustre* (5%), *Menyanthes trifoliata* (2%), *Calla palustris* (2%), *Naumburgia thyrsofolia* (1%) и др. В облесенной части – *Alnus glutinosa* (4–6 м), *Betula pubescens* (до 8 м), *Pinus sylvestris* (7–8 м) и *Salix cinerea* (до 3 м). В напочвенном покрове произрастают *Phragmites australis* (40%), *Carex rostrata* (10%), *Carex elangata* (10%), *Eriophorum vaginatum* (3%), *Calla palustris* (2%), *Agrostis canina* (2%), *Dryopteris cartusiana* (2%), *Comarum palustre* (1%). Из мхов на обоих участках преобладает *Sphagnum squarrosum* и *Sphagnum centrale*.

Субпопуляция В (рис. 3) наиболее удалена от Финского залива. Отделена от субпопуляции Б широкой песчаной грядой с проложенной по ней дорогой, окруженной березо-сосняком восковниково-сфагновым. Восковник характеризуется высоким виталитетом, высота растений 1.0–1.2 м. Все растения мужские, но на одном зафиксирован небольшой женский побег. Древостой низкой сомкнутости (0.3–0.4) состоит из *Pinus sylvestris* (7–11 м), *Betula pubescens* (5–8 м), *Alnus glutinosa* (4–6 м), *Salix cinerea* (3 м).



Рис. 2. Заросли восковника в субпопуляции Б.

Fig. 2. *Myrica gale* thickets in subpopulation B.

В напочвенном покрове присутствуют *Carex rostrata* (10%), *Carex elangata* (10%), *Eriophorum vaginatum* (30%), *Calla palustris* (2%), *Comarum palustre* (2%), *Naumburgia thyrsofolia* (1%) и мхи: *Sphagnum centrale* (10%), *Sphagnum fallax* (10%), *S. squarrosum* (30%), *Polytrichum commune* (1%).

Несмотря на близкое расположение друг к другу и несомненное отсутствие строгой изоляции (особенно во время сильных наводнений), каждая из трех перечисленных субпопуляций заслуживает отдельного внимания в связи с разнородностью от Финского залива.

Сбор растительного материала. Материал собирали в мае – июне 2022–2023 гг. Как показали



Рис. 3. Заросли восковника в субпопуляции В.

Fig. 3. *Myrica gale* thickets in subpopulation C.

наши предыдущие исследования (Galaktionova et al., 2023), даже молодые листья восковника, собранные в природе, малопригодны для выделения высококачественной геномной ДНК из-за высокого содержания восков (неслучайно вид получил такое название). Поэтому мы модифицировали сбор растительного материала. Выбирали побег с неполностью раскрытыми почками, отрезали его верхнюю часть (5–6 почек), помещали отрезанную часть побега в бутылку с питьевой водой и выдерживали при комнатной температуре в течение недели. В этих условиях происходило интенсивное раскрытие вегетативных почек, в результате чего развивались обильно облиственные, быстро растущие боковые побеги без заметных признаков накопления восков. По мере формирования листовых пластинок восковника мы собирали их в пластиковые пробирки и немедленно замораживали в холодильнике при -70°C . Такой свежемороженый растительный материал, полученный из листьев с малым содержанием восков (в дальнейшем мы называем его “оптимизированным биоматериалом восковника”), длительное время хорошо сохраняет ДНК и легко гомогенизируется.

Выделение геномной ДНК из оптимизированного биоматериала восковника. За основу мы взяли максимально упрощенный протокол, разработанный для выделения геномной ДНК из свежих листьев резуховидки Таля (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.) (Kotchoni, Gachomo, 2009).

Адаптируя данный протокол к оптимизированному биоматериалу восковника, мы внесли в него несколько изменений, что позволило значительно повысить качество выделяемой геномной ДНК. Модифицированный протокол выглядит следующим образом:

20–50 мг оптимизированного биоматериала восковника быстро переносили в охлажденную на льду микроцентрифужную пробирку объемом 1.5 мл и тщательно гомогенизировали пластиковым пестиком;

к полученному гомогенату добавляли 800 мкл лизирующего раствора (0.5 М NaCl, 2%-й SDS, 1%-й поливинилпирролидон МВ 40 КДа), vortexировали в течение 20 с, инкубировали с перемешиванием при комнатной температуре в течение 10 мин, после чего оставляли на льду на 10 мин. Полученную смесь центрифугировали при 13000 об/мин 4 минуты при комнатной температуре;

надосадочную жидкость (около 400 мкл) аккуратно переносили в чистую микроцентрифужную пробирку, добавляли равный объем холодного изопропанола и аккуратно перемешивали, переворачивая пробирку в течение 2 минут. Полученную смесь центрифугировали при 13000 об/мин, 30 минут при комнатной температуре;

аккуратно удаляли надосадочную жидкость, к полученному осадку добавляли 500 мкл отмывочного раствора (1 М гуанидин изотиоцианат,

Таблица 1. Названия и последовательности олигонуклеотидов, использованных в работе
Table 1. Names and sequences of the oligonucleotides used

Название олигонуклеотида Oligonucleotide name	Нуклеотидная последовательность (5' → 3') Base sequence (5' → 3')
Адаптеры для реакции лигирования с фрагментами рестрикции Adapters for ligation with the restriction fragments	
EcoRI-AF	CTCGTAGACTGCGTACC
EcoRI-AR	AATTGGTACGCAGTCTAC
Tru9I-AF	GACGATGAGTCCTGAG
Tru9I-AR	TACTCAGGACTCA
Праймеры для реакции преамплификации Primers for preamplification	
EcoRI-PA	GACTGCGTACCAATTC
Tru9I-PA	GATGAGTCCTGAGTAA
Праймеры для реакции селективной амплификации Primers for selective amplification	
F-EcoRI-CAT	FAM-GACTGCGTACCAATTCCAT
F-EcoRI-ATG	FAM-GACTGCGTACCAATTTCATG
F-EcoRI-AAT	FAM-GACTGCGTACCAATTCAAT
Tru9I-CTT	GATGAGTCCTGAGTAACTT

Примечание. FAM – флуорофор флуоресцеин.

Note. FAM – fluorophore fluorescein.

50%-й изопропанол), вортексировали в течение 20 с и инкубировали в шейкере при 500 об/мин 5 мин при комнатной температуре. Полученную смесь центрифугировали при 13000 об/мин 10 минут при комнатной температуре;

аккуратно удаляли надосадочную жидкость, к полученному осадку добавляли 500 мкл холодного 70%-го этанола, вортексировали в течение 30 с и инкубировали 2 мин при комнатной температуре. Полученную смесь центрифугировали при 13000 об/мин 10 минут при комнатной температуре;

аккуратно удаляли надосадочную жидкость, держали пробирку открытой до полного испарения этанола, затем добавляли 100 мкл деионизированной воды и аккуратно перемешивали до растворения осадка. Полученный раствор геномной ДНК хранили при –20°C для последующего использования.

Качество выделенной ДНК проверяли методом электрофореза в 1%-м агарозном геле с окраской бромистым этидием (в качестве маркера длин фрагментов использовали ДНК-маркер Sky-High, “Биолабмикс”, Россия). Количество выделенной ДНК определяли на

флуориметре Qubit-1 (Thermo Fisher Scientific, США) набором QuDye dsDNA HS Assay Kit (Lumiprobe, Россия) согласно инструкциям производителей.

Получение флуоресцентно меченных фрагментов ДНК для AFLP-анализа. В качестве основы мы использовали протокол, описанный в статье (Blignaut et al., 2013). Мы оптимизировали данный протокол, используя в нем следующие реагенты:

эндонуклеаза рестрикции (рестриктаза) EcoRI с 10x SE-буфером EcoRI (ООО “СибЭнзайм”, Россия),

рестриктаза Tru9 I с 10x SE-буфером W (ООО “СибЭнзайм”, Россия) – изошизомер рестриктазы Mse I,

T4 ДНК лигаза с 10x Overnight ligation buffer (“Евроген”, Россия), мастер-микс для ПЦР БиоМастер LR HS-ПЦР (2×) (“Биолабмикс”, Россия),

мастер-микс для ПЦР БиоМастер LR HS-ПЦР (2×) (“Биолабмикс”, Россия).

Все необходимые олигонуклеотиды были заказаны и синтезированы в ООО “Вега” ГК “Алкор Био” (Россия). Названия и нуклеотидные

Таблица 2. Координаты проанализированных растений *Myrica gale*
Table 2. Coordinates of the analyzed *Myrica gale* plants

Субпопуляция А Subpopulation A		Субпопуляция Б Subpopulation B		Субпопуляция В Subpopulation C	
59°95'07.66"	29°56'79.95"	59°95'54.96"	29°55'70.20"	59°95'55.59"	29°55'60.14"
59°95'07.79"	29°56'79.97"	59°95'54.83"	29°55'68.37"	59°95'55.33"	29°55'61.67"
59°94'93.90"	29°57'22.05"	59°95'54.68"	29°55'67.19"	59°95'55.79"	29°55'41.88"
59°94'96.93"	29°57'24.57"	59°95'54.71"	29°55'67.18"	59°95'55.78"	29°55'41.98"
59°94'96.14"	29°57'25.57"	59°95'54.72"	29°55'67.39"	59°95'55.32"	29°55'41.86"
59°94'93.65"	29°57'29.05"	59°95'54.74"	29°55'67.44"	59°95'55.42"	29°55'40.63"
59°94'91.33"	29°57'31.30"	59°95'54.72"	29°55'67.41"	59°95'55.62"	29°55'40.70"
59°94'90.32"	29°57'32.46"	59°95'54.72"	29°55'67.41"	59°95'55.80"	29°55'42.11"
59°94'90.28"	29°57'33.27"	59°95'54.75"	29°55'67.39"	59°95'55.71"	29°55'42.02"
		59°95'54.75"	29°55'67.38"	59°95'55.58"	29°55'40.69"
		59°95'54.76"	29°55'67.18"	59°95'55.33"	29°55'39.29"
		59°95'54.75"	29°55'67.36"	59°95'55.25"	29°55'38.19"
		59°95'54.81"	29°55'66.05"	59°95'55.19"	29°55'37.98"
				59°95'55.02"	29°55'36.21"
				59°95'55.25"	29°55'34.02"
				59°95'55.38"	29°55'33.81"
				59°95'55.49"	29°55'33.60"
				59°95'55.63"	29°55'33.43"
				59°95'55.71"	29°55'33.05"
				59°95'55.86"	29°55'29.84"

последовательности олигонуклеотидов приведены в табл. 1.

Реакция с рестриктазой EcoR I. К 200–300 нг геномной ДНК добавляли 5 е.а. EcoR I, 1x SE-буфер W и деионизированную воду до объема 30 мкл. Реакцию проводили в ПЦР-амплификаторе при +37°C в течение 4 часов. Для окончания реакции рестриктазу инактивировали при +65°C в течение 20 мин. Качество реакции проверяли методом электрофореза в 1.5%-м агарозном геле с окраской 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. Tru9 I, 1 мкл 10x SE-буфера W и деионизированную воду до объема 30 мкл. Реакцию проводили в ПЦР-амплификаторе при +65°C в течение 4 часов. Для окончания реакции рестриктазу инактивировали при +80°C в течение 20 мин. Полученную смесь хранили при температуре –20°C до проведения реакции лигирования.

Подготовка адаптеров к лигированию. Непосредственно перед реакцией лигирования адаптеры EcoRI-AF (5 мкМ) и EcoRI-AR (5 мкМ) смешивали в пропорции 1 : 1 в пробирке, инкубировали при +95°C в течение 5 минут, а затем охлаждали при комнатной температуре в течение 10 мин. Аналогично адаптеры Tru9I-AF (50 мкМ) и Tru9I-AR (50 мкМ) смешивали в пропорции 1 : 1 в пробирке, инкубировали при +95°C в течение 5 мин и охлаждали при комнатной температуре в течение 10 мин.

Лигирование адаптеров с фрагментами рестрикции. В пробирку объемом 0.5 мл вносили 8 мкл рестрикционной смеси, 2 мкл 10x 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°C в течение 14–16 часов, после чего хранили при температуре –20°C до проведения реакции преамплификации.

Реакция преамплификации. Аликвоту реакции лигирования разводили в 10 раз в деионизированной воде и переносили 5 мкл в 0.2-мл

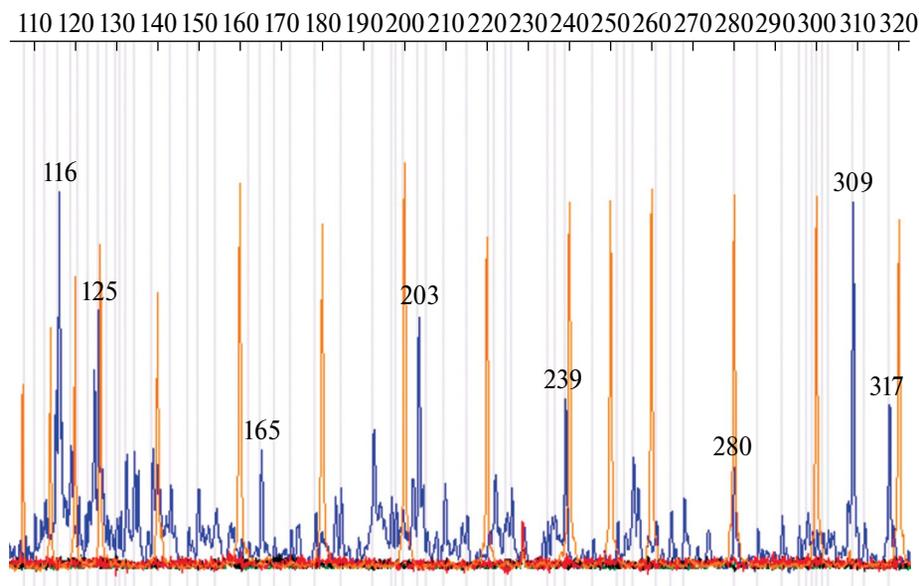


Рис. 4. Пример хроматограммы с выбранными для анализа амплифицированными фрагментами геномной ДНК *Myrica gale*. Использована пара праймеров F-EcoRI-AAT и Tru9I-CTT. Число над пиком означает размер выбранного фрагмента (п.н.). Фрагменты, соответствующие другим высоким пикам на этой хроматограмме, не были выбраны для анализа, поскольку не всегда воспроизводились в независимых технических повторностях. Оранжевым цветом показаны маркеры длин фрагментов.

Fig. 4. An example of a chromatogram with the amplified of *Myrica gale* genomic DNA fragments chosen for the analysis. The used pair of primers is F-EcoRI-AAT and Tru9I-CTT. The number above a peak indicates the size of the selected fragment (bp). Fragments corresponding to other high peaks in this chromatogram were not selected for analysis because they were not always reproducible in independent technical replicates. Fragment length markers are shown in orange.

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°C – 5 мин;
- 25 циклов: денатурация: +95°C – 20 с; отжиг: +56°C – 35 с; элонгация: +72°C – 30 с;
- 1 цикл: +62°C – 30 мин.

Качество реакции проверяли методом электрофореза в 1.5%-м агарозном геле с окраской бромистым этидием (5 мкл реакции на дорожку). Пробирку с реакцией хранили при –20°C до проведения реакции селективной амплификации.

Реакция селективной амплификации. Аликвоту реакции преамплификации 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°C – 5 мин;
- 30 циклов: денатурация: +95°C – 20 с; отжиг: +56°C – 35 с; элонгация: +72°C – 30 с;
- 1 цикл: +62°C – 30 мин.

Качество реакции проверяли методом электрофореза в 1.5%-м агарозном геле с окраской бромистым этидием (5 мкл реакции на дорожку). Пробирки с результатами реакции хранили в светонепроницаемом контейнере при –20°C до проведения дальнейшего анализа.

Проведение фрагментного анализа (AFLP). Один микролитр каждого анализируемого ПЦР-продукта, содержащего флуоресцентную метку, разводили в 10 раз в деионизированной воде. К 1 мкл разведенного амплификата добавляли 10 мкл Ni-Di формамида (Applied Biosystems, США) и 1 мкл стандарта молекулярного веса CD-450 (“Синтол”, Россия). Затем образцы денатурировали при +95°C в течение 5 мин

Таблица 3. Выбранные для AFLP-анализа амплифицированные фрагменты геномной ДНК *Myrica gale*
Table 3. The amplified genomic DNA fragments of *Myrica gale* chosen for AFLP analysis

Использованные пары праймеров Used pairs of primers	Размер выбранных фрагментов ДНК (п.н.) Size of chosen DNA fragments (bp)
F-EcoRI-CAT и Tru9I-CTT F-EcoRI-CAT and Tru9I-CTT	103, 117, 133, 303, 306, 437
F-EcoRI-ATG и Tru9I-CTT F-EcoRI-ATG and Tru9I-CTT	101, 118, 121, 128, 267, 415
F-EcoRI-AAT и Tru9I-CTT F-EcoRI-AAT and Tru9I-CTT	116, 125, 165, 203, 239, 280, 309, 313, 317, 363

Таблица 4. AFLP-генотипы исследованных растений *Myrica gale* в заказнике “Лебяжий”
Table 4. AFLP genotypes of the studied *Myrica gale* plants in the Lebyazhiy Reserve

AFLP-генотип AFLP genotype		Субпопуляция Subpopulation		
		A	B	C
1	Все фрагменты All fragments	2	3	3
2	Все, кроме 103 п.н. All fragments except 103 bp	6	3	9
3	Все, кроме 313 п.н. All fragments except 313 bp	–	1	–
4	Все, кроме 101 и 121 п.н. All fragments except 101 and 121 bp	–	1	–
5	Все, кроме 101 и 267 п.н. All fragments except 101 and 267 bp	–	2	–
6	Все, кроме 103 и 118 п.н. All fragments except 103 and 118 bp	–	1	–
7	Все, кроме 103 и 313 п.н. All fragments except 103 and 313 bp	–	2	–
8	Все, кроме 101, 103 и 267 п.н. All fragments except 101, 103, and 267 bp	–	–	1
9	Все, кроме 101, 118 и 280 п.н. All fragments except 101, 118, and 280 bp	–	–	2
10	Все, кроме 103, 117 и 313 п.н. All fragments except 103, 117, and 313 bp	–	–	2
11	Все, кроме 117, 121, 128 и 165 п.н. All fragments except 117, 121, 128, and 165 bp	1	–	–
12	Все, кроме 103, 117, 125 и 313 п.н. All fragments except 103, 117, 125, and 313 bp	–	–	1
13	Все, кроме 165, 239, 313, 317 и 363 п.н. All fragments except 165, 239, 313, 317, and 363 bp	–	–	1
14	Все, кроме 117, 239, 280, 313, 317 и 363 п.н. All fragments except 117, 239, 280, 313, 317, and 363 bp	–	–	1
Всего / Total		9	13	20

и помещали на лед. 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 субпопуляциях сравнивали с использованием метода хи-квадрат (Glotov et al., 1982).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Для анализа полиморфизма геномной ДНК восковника мы использовали оптимизированный биоматериал, полученный из 51 побега, собранного в государственном природном заказнике “Лебяжий”. Учитывая высокую склонность восковника к вегетативному размножению, мы собирали побеги, отстоящие друг от друга на расстояние около 5 м. При этом старались равномерно охватить всю территорию, занимаемую каждой из трех исследуемых субпопуляций. В субпопуляции А были собраны 14 побегов, в субпопуляции Б – 15, в субпопуляции В – 22.

Выделить достаточное количество высококачественной ДНК (не менее 1 мкг на образец), пригодной для использования в AFLP-анализе, удалось из 42 образцов оптимизированного биоматериала восковника. В результате мы проанализировали 9 растений из субпопуляции А, 13 из субпопуляции Б и 20 из субпопуляции В. Координаты этих растений представлены в табл. 2.

При проведении AFLP-анализа мы использовали три комбинации праймеров: F-EcoRI-CAT и Tru9I-CTT, F-EcoRI-ATG и Tru9I-CTT, F-EcoRI-AAT и Tru9I-CTT. В каждом случае мы выявили широкий спектр амплифицированных фрагментов ДНК размером от 100 до 450 п.н. Большинство из них были плохо вычленимы из-за множественности и близкого расположения друг к другу. Для каждой использованной пары праймеров мы выбрали хорошо вычленимые, четко выраженные фрагменты (рис. 4), стабильно воспроизводимые при повторном анализе. Каждый образец анализировали в двух технических повторностях. В общей сложности выбрали 22 амплифицированных фрагмента (табл. 3).

По восьми фрагментам (116, 133, 203, 303, 306, 309, 415 и 437 п.н.) все проанализированные растения были одинаковыми. По остальным фрагментам мы обнаружили полиморфизм, при этом средний уровень их полиморфности

составлял 0.079 для субпопуляции А, 0.088 для субпопуляции Б и 0.129 для субпопуляции В.

В исследованной выборке из 42 растений восковника мы выявили 14 разных AFLP-генотипов (табл. 4). Два из них присутствовали в каждой из субпопуляций и составляли более половины исследованной выборки (62%). По-видимому, это результат вегетативного размножения двух генетически разных растений восковника, когда-то послуживших основателями всей популяции.

Остальные обнаруженные нами AFLP-генотипы представлены в исследованной выборке единичными растениями (либо всего одним, либо двумя). Примечательно, что каждый из этих редких генотипов был выявлен только в одной из субпопуляций. Суммарная доля таких генотипов в субпопуляции А была ниже, чем в субпопуляциях Б и В (11, 54 и 40% соответственно). Этот вывод подтверждается критерием хи-квадрат ($p < 0.05$ при $v = 1$). Однако с учетом специфики сбора материала и ограниченной численности восковника в обследованном локусе объем использованной выборки весьма невелик, что не позволило провести детальный статистический анализ генетической структуры указанных субпопуляций. Для прояснения ситуации необходимы дополнительные исследования с использованием значительно более крупной выборки.

ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящей работе впервые проведен молекулярно-генетический анализ растений восковника. Данный вид многократно использовали в молекулярных исследованиях для выяснения спектра азотфиксирующих эндосимбионтов (Huguet et al., 2001, 2004; Popovici et al., 2010, 2011), но сам восковник оставался практически неизученным. Генетические сведения об этом объекте сводились к числу хромосом ($2n = 48$) (MacDonald, 1989; Skene et al., 2000), результатам штрих-кодирования (de Vere et al., 2012), а также единичным геномным последовательностям в GeneBank.

Мы разработали простой и сравнительно дешевый протокол выделения высококачественной геномной ДНК из этого вида. Взяв за основу максимально упрощенный протокол,

предложенный Kotchoni и Gachomo (2009) для выделения ДНК из свежих листьев резуховидки Таля, мы внесли в него ряд модификаций:

ДНК выделяли из оптимизированного биоматериала восковника (Galaktionova et al., 2023);

увеличили концентрацию NaCl и SDS в лизирующем буфере до 0.5 М и 2% соответственно;

ввели в состав лизирующего буфера 1%-й поливинилпирролидон МВ 40 КДа;

увеличили объем лизирующего буфера до 800 мкл;

увеличили время инкубации с лизирующим буфером до 10 мин;

после лизиса ввели дополнительную инкубацию на льду 10 мин;

изменили состав отмывочного буфера, введя в него 1 М гуанидин изотиоцианат;

изменили объем этанола для осаждения ДНК до количества, равного объему надосадочной жидкости, собранной после центрифугирования.

Перечисленные модификации позволили нам осуществить хорошую очистку геномной ДНК восковника от многочисленных липидов и полифенолов, характерных для данного вида растений.

Выделенная нами геномная ДНК восковника оказалась пригодной для проведения AFLP-анализа. Используя три пары праймеров (F-EcoRI-CAT и Tru9I-CTT, F-EcoRI-ATG и Tru9I-CTT, F-EcoRI-AAT и Tru9I-CTT), мы получили 22 четко вычлняемых и хорошо воспроизводимых амплифицированных фрагмента. Обычно при проведении AFLP-анализа количество вычлняемых фрагментов заметно выше и может исчисляться даже несколькими сотнями (Saunders et al., 2001; Nguyen et al., 2004; Gil-Vega et al., 2006; Patsias, Bruelheide, 2011; Leipold et al., 2020). В нашем случае фрагменты тоже были многочисленными, но большинство из них не поддавалось четкому вычлнению из-за близкого расположения друг к другу. Возможно, это связано с полиплоидной природой восковника при наличии существенного межгеномного полиморфизма: каждый геном дает множество фрагментов, накладывающихся друг на друга и затрудняющих анализ. Подобные ситуации описаны для *Lolium spp.* (Roldan-Ruiz et al., 2000). Тем не менее даже при использовании

двух десятков амплифицированных фрагментов мы обнаружили генетический полиморфизм изучаемого вида.

Принято считать, что в воспроизведении восковника однозначно преобладает вегетативное размножение (Poore, 1956; Skene et al., 2000; Volkova et al., 2021). В связи с этим казалось вполне логичным ожидать, что обследованная нами популяция восковника, будучи в достаточно высокой степени изолированной, является клоном, ведущим свое происхождение от некоего единичного растения-основателя. Если бы такое предположение было верным, все или почти все представители данной популяции имели бы один и тот же AFLP-генотип. Между тем исследованная выборка оказалась полиморфной.

Мы выявили в ней 14 AFLP-генотипов (табл. 4). Два из них (№ 1 и 2) – самые обильные во всех трех субпопуляциях: в общей сложности растения этих генотипов составляли более 60% всей выборки. По-видимому, они представляют собой два клона, возникших в результате вегетативного размножения двух разных основателей данной популяции.

Остальные AFLP-генотипы относятся к редким. Каждый из них представлен в исследованной выборке всего лишь одним или двумя растениями. Возможно, такие растения являются мутантами, возникшими на основе двух AFLP-генотипов, наиболее обильных в обследованной нами популяции. В частности, AFLP-генотип № 3 может быть мутантом на основе AFLP-генотипа № 1. Аналогично AFLP-генотип № 6 может быть производным AFLP-генотипа № 2.

Разнообразие редких AFLP-генотипов восковника, по-видимому, связано не только с мутационным процессом. В пользу такого предположения свидетельствует отсутствие одного и того же амплифицированного фрагмента сразу в нескольких разных AFLP-генотипах. Например, фрагмент длиной 117 п.н. отсутствует в AFLP-генотипах № 10, 11, 12 и 14. Маловероятно, чтобы такой эффект был обусловлен четырьмя независимо возникшими мутациями, приводящими к отсутствию одного и того же фрагмента. Более вероятно, что одна и та же мутация оказалась в четырех разных

AFLP-генотипах в результате неких рекомбинационных процессов.

Этот вывод хорошо согласуется с тем обстоятельством, что некоторые из выявленных нами AFLP-генотипов можно рассматривать в качестве рекомбинантных. В частности, это касается AFLP-генотипов № 1, 2, 3 и 7: здесь наблюдается отчетливая рекомбинация по наличию/отсутствию фрагментов длиной 103 и 313 п.н. Приведенные факты указывают на то, что в воспроизведении и расселении восковника заметную роль играет не только вегетативное, но и семенное (т.е. половое) размножение.

Наши данные не позволяют ответить на вопрос, где именно происходит половое размножение восковника. Возможно, оно осуществляется, хотя бы и редко, непосредственно в исследованных нами субпопуляциях. В пользу такой гипотезы свидетельствует тот факт, что среди проанализированных растений было несколько женских (этот вопрос будет рассмотрен в отдельной статье). Впрочем, вполне вероятно, что редкие генотипы поступают в обследованную нами популяцию извне — из других популяций с иной генетической структурой. Для ответа на этот вопрос необходимо исследовать как минимум несколько разных популяций восковника.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа поддержана грантом РФФ № 22-24-00138 «Анализ генетического полиморфизма периферических популяций на модели охраняемого вида растений *Myrica gale* (Красная книга РФ)» <https://rscf.ru/project/22-24-00138/>. Фрагментный анализ геномной ДНК *Myrica gale* осуществлен с использованием оборудования ресурсного центра «Развитие молекулярных и клеточных технологий» Научного парка СПбГУ. Настоящее исследование посвящается 300-летию Санкт-Петербургского государственного университета.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Aggarwal G., Edhigalla P., Walia P. 2022. A comprehensive review of high-quality plant DNA isolation. — *The Pharma Innovation Journal*. SP-11(6): 171–176. <https://doi.org/10.3390/plants11030242>
- [Beklemishev] Беклемишев В.Н. 2015. Пространственная и функциональная структура популяций. — *Русский орнитологический журнал*. 24 (1093): 87–100.
- Blackwell A., Stuart A.E., Estambale B.B. 2003. The repellent and antifeedant activity of *Myrica gale* oil against *Aedes aegypti* mosquitoes and its enhancement by the addition of salicylic acid. — *J. R. Coll. Physicians Edinb.* 33: 209–214.
- Blears M.J., De Grandis S.A., Lee H., Trevors J.T. 1998. Amplified fragment length polymorphism (AFLP): a review of the procedure and its applications. — *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 21: 99–114. <https://doi.org/10.1038/sj.jim.2900537>
- Blignaut M., Ellis A.G., Le Roux J.J. 2013. Towards a transferable and cost-effective plant AFLP protocol. — *PloS One*. 8 (4): e61704. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061704>
- Bond G. 1951. 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.* 15 (4): 447–459. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aob.a083291>
- Crocker L.J., Schwintzer C.R. 1993. Factors affecting formation of cluster roots in *Myrica gale* seedlings in water culture. — *Plant Soil*. 152: 287–298. <https://doi.org/10.1007/BF00029099>
- Dairawan M., Shetty P.J. 2020. The evolution of DNA extraction methods. — *Am. J. Biomed. Sci. Res.* 8: 39–45. <http://dx.doi.org/10.34297/AJBSR.2020.08.001234>
- de Vere N., Rich T.C., Ford C.R., Trinder S.A., Long C., Moore C.W., Satterthwaite D., Davies H., Allainguillaume J., Ronca S., Tatarinova T., Garbett H., Walker K., Wilkinson M.J. 2012. DNA barcoding the native flowering plants and conifers of Wales. — *PloS One*. 7 (6): e37945. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037945>
- [Galaktionova et al.] Галактионова У.А., Большаков В.Н., Тиходеева М.Ю., Тиходеев О.Н. 2023. Специфические проблемы при выделении геномной ДНК из растений: пути решения. — *Бот. журн.* 108 (6): 603–614.
- Gil-Vega K., Diaz C., Nava-Cedillo A., Simpson J. 2006. AFLP analysis of *Agave tequilana* varieties. — *Plant Sci.* 170 (4): 904–909. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2005.12.014>
- [Glotov et al.] Глотов Н.В., Животовский Л.А., Хованов Н.В., Хромов-Борисов Н.Н. 1982. Биометрия. Л. 264 с.
- Huguet V., Batzli J.M., Zimpfer J.F., Normand P., Dawson J.O., Fernandez M.P. 2001. Diversity and specificity of *Frankia* strains in nodules of sympatric *Myrica gale*, *Alnus incana*, and *Shepherdia canadensis* determined by *rrs* gene polymorphism. — *Appl. Environ. Microbiol.* 67 (5): 2116–2122. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.5.2116-2122.2001>
- Huguet V., Mergeay M., Cervantes E., Fernandez M.P. 2004. Diversity of *Frankia* strains associated to *Myrica gale* in Western Europe: impact of host plant (*Myrica* vs. *Alnus*) and of edaphic factors. — *Environ. Microbiol.* 6 (10): 1032–1041. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2004.00625.x>

- [Ivanter, Kuznetsov] Ивантер Э.В., Кузнецов О.Л. (ред.) 2007. Красная книга Республики Карелия. Петрозаводск. 364 с.
- [Комаров] Комаров В.Л. (ред.) 1936. Восковник болотный. — В кн.: Флора СССР. Т. 5. М.; Л. С. 243–244.
- Kotchoni S.O., Gachomo E.W. 2009. A rapid and hazardous reagent free protocol for genomic DNA extraction suitable for genetic studies in plants. — *Mol. Biol. Rep.* 36: 1633–1636. <https://doi.org/10.1007/s11033-008-9362-9>
- Kuzmina M.L., Braukman T.W.A., Fazecas A.J., Graham S.W., Dewaard S.L., Rodrigues A., Bennett B.A., Dickinson T.A., Saarela J.M., Catling P.M., Newmaster S.G., Percy D.M., Fenneman E., Lauron-Moreau A., Ford B., Gillespie L., Subramanyam R., Whitton J., Jennings M.L., Metsger D., Warne C.P., Brown A., Sears E., Dewaard J.R., Zakharov E.V., Hebert P.D.N. 2017. Using herbarium-derived DNAs to assemble a largescale DNA barcode library for the vascular plants of Canada. — *Appl. Plant Sci.* 5 (12): 1700079. <https://doi.org/10.3732/apps.1700079>
- Leipold M., Tausch S., Hirtreiter M., Poschlod P., Reisch C. 2020. Sampling for conservation genetics: how many loci and individuals are needed to determine the genetic diversity of plant populations using AFLP? — *Conserv. Genet. Res.* 12: 99–108. <https://doi.org/10.1007/s12686-018-1069-1>
- MacDonald A.D. 1989. The morphology and relationships of the Myricaceae. — In: *Evolution, Systematics and Fossil History of the Hamamelidae*. Vol. 2: Higher Hamamelidae. Oxford, UK. P. 147–165.
- Malterud K.E. 1992. C-methylated dihydrochalcones from *Myrica gale* fruit exudate. — *Acta Pharm. Nord.* 4: 65–68. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0773.1996.tb00190.x>
- Mueller U.G., Wolfenbarger L.L. 1999. AFLP genotyping and fingerprinting. — *Trends Ecol. Evol.* 14 (10): 389–394. [https://doi.org/10.1016/s0169-5347\(99\)01659-6](https://doi.org/10.1016/s0169-5347(99)01659-6)
- Nguyen T.T., Taylor P.W.J., Redden R.J., Ford R. 2004. Genetic diversity estimates in *Cicer* using AFLP analysis. — *Plant Breed.* 123 (2): 173–179. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0523.2003.00942.x>
- Patsias K., Bruelheide H. 2011. 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.* 1 (3): 290–305. <https://doi.org/10.1002/ece3.23>
- Poore M.E.D. 1956. The ecology of Woodwalton Fen. — *J. Ecol.* 44: 455–492.
- Popovici J., Bertrand C., Bagnarol E., Fernandez M.P., Comte G. 2008. Chemical composition of essential oil and headspace-solid microextracts from fruits of *Myrica gale* L. and antifungal activity. — *Nat. Prod. Res.* 22 (12): 1024–1032. <https://doi.org/10.1080/14786410802055568>
- Popovici J., Comte G., Bagnarol E., Alloisio N., Fournier P., Bellvert F., Bertrand C., Fernandez M.P. 2010. Differential effects of rare specific flavonoids on compatible and incompatible strains in the *Myrica gale*-*Frankia* actinorhizal symbiosis. — *Appl. Environ. Microbiol.* 76: 2451–2460. <https://doi.org/10.1128/aem.02667-09>
- Popovici J., Walker V., Bertrand C., Bellvert F., Fernandez M.P., Comte G. 2011. Strain specificity in the Myricaceae–*Frankia* symbiosis is correlated to plant root phenolics. — *Funct. Plant Biol.* 38 (9): 682–689. <https://doi.org/10.1071/fp11144>
- Rogers S., Bendich A. 1985. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues. — *Plant Mol. Biol.* 5 (2): 69–76. <https://doi.org/10.1007/BF00020088>
- Rogers S., Bendich A. 1989. Extraction of DNA from plant tissues. — In: *Plant Molecular Biology Manual*. Springer. P. 73–83. https://doi.org/10.1007/978-94-009-0951-9_6
- Roldan-Ruiz I., Dendauw J., Van Bockstaele E., Depicker A., De Loos M. 2000. AFLP markers reveal high polymorphic rates in ryegrasses (*Lolium* spp.). — *Mol. Breed.* 6: 125–134. <https://doi.org/10.1023/A%3A1009680614564>
- Rosa G.P., Silva B.J., Seca A.M., Moujir L.M., Barreto M.C. 2020. Phytochemicals with added value from *Morella* and *Myrica* species. — *Molecules.* 25 (24): 6052. <https://doi.org/10.3390%2Fmolecules25246052>
- [Ryabushkina et al.] Рябушкина Н.А., Омашева М.Е., Галиакпаров Н.Н. 2012. Специфика выделения ДНК из растительных объектов. — *Биотехнология. Теория и практика.* 2: 9–26.
- Saunders J.A., Pedroni M.J., Penrose L.D., Fist A.J. 2001. AFLP analysis of opium poppy. — *Crop Sci.* 41 (5): 1596–1601. <https://doi.org/10.2135/cropsci2001.4151596x>
- Schwintzer C.R., Lancelle S.A. 1983. Effect of water table depth on shoot growth, root growth and nodulation of *Myrica gale* seedlings. — *J. Ecol.* 71: 489–501. <https://doi.org/10.2307/2259730>
- Schwintzer C.R., Ostrofsky A. 1989. Factors affecting germination of *Myrica gale* seeds. — *Can. J. For. Res.* 19: 1105–1109. <http://dx.doi.org/10.1139/x89-167>
- Silva B.J., Seca A.M., Barreto M.D.C., Pinto D.C. 2015. Recent breakthroughs in the antioxidant and anti-inflammatory effects of *Morella* and *Myrica* species. — *Int. J. Mol. Sci.* 16 (8): 17160–17180. <https://doi.org/10.3390%2Fijms160817160>
- Skene K.R., Sprent J.I., Raven J.A., Herdman L. 2000. *Myrica gale* L. — *J. Ecol.* 88 (6): 1079–1094. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2745.2000.00522.x>
- Svoboda K.P., Inglis A., Hampson J., Galambosi B., Asakawa Y. 1998. Biomass production, essential oil yield and composition of *Myrica gale* L. harvested from wild populations in Scotland and Finland. — *Flavour Frag. J.* 13: 367–372. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1026\(199811/12\)13:6%3C367::AID-FFJ724%3E3.0.CO;2-M](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1026(199811/12)13:6%3C367::AID-FFJ724%3E3.0.CO;2-M)
- Sylvestre M., Legault J., Dufour D., Pichette A. 2005. Chemical composition and anticancer activity of leaf

- essential oil of *Myrica gale* L. – Phytomedicine. 12: 299–304. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2003.12.004>
- [The Red Book...] Красная книга Российской Федерации (растения и грибы). 2008. М. 885 с.
- [Volkova et al.] Волкова Е.А., Смагин В.А., Храмов В.Н. 2021. Сообщества с *Myrica gale* L. на болотах побережья Финского залива (Санкт-Петербург и Ленинградская область). – Растительность России. 41: 58–74.
- Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., Lee T.V.D., Hornes M., ... Zabeau M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. – Nucleic Acids Res. 23 (21): 4407–4414. <https://doi.org/10.1093%2Fnar%2F23.21.4407>

GENOMIC DNA POLYMORPHISM IN *MYRICA GALE* (MYRICACEAE) IN THE LEBYAZHIY STATE NATURE RESERVE (THE SOUTHERN COAST OF THE GULF OF FINLAND)

O. A. Semicheva^{a,b}, U. A. Galaktionova^{a,b}, V. N. Bolshakov^a, A. E. Romanovich^b, M. Yu. Tikhodeeva^b, O. N. Tikhodeyev^{b,#}

¹*Vega Ltd, Alkor Bio Group*
Zheleznodorozhny Ave., 40a, St. Petersburg, 192148, Russia
²*Saint-Petersburg State University*
University Emb., 7/9/11, St. Petersburg, 199034, Russia
[#]*e-mail: tikhodeyev@mail.ru, o.tikhodeev@spbu.ru*

The analysis of genomic DNA polymorphism is one of widely used approaches for studying the genetic structure of natural populations. It has been successfully applied to various plants. However, many species have not yet been studied, which is primarily due to methodological difficulties in isolating well-purified and non-degraded genomic DNA. These difficulties are due to the fact that plants possess numerous bioorganic compounds (polysaccharides, polyphenols, lipids, etc.) that contaminate DNA and significantly reduce its quality. Such species include marsh waxweed (*Myrica gale* L.), a perennial sub-Atlantic shrub with presumably vegetative propagation (in nature, waxweed seedlings are quite rare). We developed a simple protocol for isolation of high-quality genomic DNA from waxweed leaves and performed AFLP analysis of 42 plants of this species from three subpopulations in the Lebyazhiy Nature Reserve. Using three primer pairs, we isolated 22 amplification fragments, 8 of which were monomorphic. For the remaining 14 fragments, the average level of their polymorphism was low: depending on the subpopulation studied, it varied from 0.079 to 0.129. As shown by our analysis, all three studied subpopulations are polymorphic with a predominance of two common AFLP-genotypes. The corresponding plants are apparently the vegetative descendants of the founders. The rare AFLP-genotypes (represented by just one or two plants; a total of 12 such genotypes were identified) are likely the result of mutational and recombination processes. Our data give evidence that in the life cycle and dispersal of waxweed, the role of sexual reproduction is also noticeable.

Keywords: Red Data Book of Russian Federation, *Myrica gale*, edge populations, genomic DNA, AFLP-analysis, genetic polymorphism

ACKNOWLEDGEMENTS

The study was supported by grant No. 22-24-00138 of the Russian Science Foundation “Analysis of the genetic polymorphism of edge-populations of the protected plant species *Myrica gale* (Red Book of the Russian Federation) as a model” <https://rscf.ru/project/22-24-00138/>. Fragment analysis of the *Myrica gale* genomic DNA was performed using the equipment of the Resource Center “Development of Molecular and Cellular Technologies”

of the Science Park of Saint Petersburg State University. This study is dedicated to the 300th anniversary of Saint Petersburg State University.

REFERENCES

- Aggarwal G., Edhigalla P., Walia P. 2022. A comprehensive review of high-quality plant DNA isolation. – The Pharma Innovation Journal. SP-11 (6): 171–176. <https://doi.org/10.3390/plants11030242>

- Baydar N.G., Baydar H., Debener T. 2004. Analysis of genetic relationships among *Rosa damascena* plants grown in Turkey by using AFLP and microsatellite markers. – J. Biotechnol. 111 (3): 263–267. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2004.04.014>
- Beklemishev V.N. 2015. Prostranstvennaya i funktsional'naya struktura populyatsiy [Spatial and functional structure of populations]. – Russ. Ornithol. J. 24 (1093): 87–100 (In Russ.).
- Blackwell A., Stuart A.E., Estambale B.B. 2003. The repellent and antifeedant activity of *Myrica gale* oil against *Aedes aegypti* mosquitoes and its enhancement by the addition of salicylic acid. – J. R. Coll. Physicians Edinb. 33: 209–214.
- Bleas M.J., De Grandis S.A., Lee H., Trevors J.T. 1998. Amplified fragment length polymorphism (AFLP): a review of the procedure and its applications. – J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 21: 99–114. <https://doi.org/10.1038/sj.jim.2900537>
- Blignaut M., Ellis A.G., Le Roux J.J. 2013. Towards a transferable and cost-effective plant AFLP protocol. – PLoS One. 8 (4): e61704. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061704>
- Bond G. 1951. 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. 15 (4): 447–459. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aob.a083291>
- Crocker L.J., Schwintzer C.R. 1993. Factors affecting formation of cluster roots in *Myrica gale* seedlings in water culture. – Plant Soil. 152: 287–298. <https://doi.org/10.1007/BF00029099>
- Dairawan M., Shetty P.J. 2020. The evolution of DNA extraction methods. – Am. J. Biomed. Sci. Res. 8: 39–45. <http://dx.doi.org/10.34297/AJBSR.2020.08.001234>
- de Vere N., Rich T.C., Ford C.R., Trinder S.A., Long C., Moore C.W., Satterthwaite D., Davies H., Allainguillaume J., Ronca S., Tatarinova T., Garbett H., Walker K., Wilkinson M.J. 2012. DNA barcoding the native flowering plants and conifers of Wales. – PLoS One. 7 (6): e37945. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037945>
- Galaktionova U.A., Bolshakov V.N., Tikhodeeva M.Yu., Tikhodeyev O.N. 2023. Specific problems of genomic DNA extraction from plants: ways for solution. – Bot. Zhurn. 108 (6): 603–614 (In Russ.).
- Gil-Vega K., Díaz C., Nava-Cedillo A., Simpson J. 2006. AFLP analysis of *Agave tequilana* varieties. – Plant Sci. 170 (4): 904–909. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2005.12.014>
- Glotov N.V., Zhivotovskiy L.A., Khovanov N.V., Khromov-Borisov N.N. 1982. Biometriya [Biometry]. Leningrad. 264 p. (In Russ.).
- Huguet V., Batzli J.M., Zimpfer J.F., Normand P., Dawson J.O., Fernandez M.P. 2001. Diversity and specificity of *Frankia* strains in nodules of sympatric *Myrica gale*, *Alnus incana*, and *Shepherdia canadensis* determined by *rrs* gene polymorphism. – Appl. Environ. Microbiol. 67 (5): 2116–2122. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.5.2116-2122.2001>
- Huguet V., Mergeay M., Cervantes E., Fernandez M.P. 2004. Diversity of *Frankia* strains associated to *Myrica gale* in Western Europe: impact of host plant (*Myrica* vs. *Alnus*) and of edaphic factors. – Environ. Microbiol. 6 (10): 1032–1041. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2004.00625.x>
- Ivanter E.V., Kuznetsov O.L. (eds.). 2007. Krasnaya Kniga Respubliki Karelia [Red Book of the Republic of Karelia]. Petrozavodsk. 364 p. (In Russ.).
- Komarov V.L. (ed.). 1936. Voskovnik bolotnyi [Sweet gale]. – In: Flora of SSSR. Vol. 5. Moscow, Leningrad. P. 243–244 (In Russ.).
- Kotchoni S.O., Gachomo E.W. 2009. A rapid and hazardous reagent free protocol for genomic DNA extraction suitable for genetic studies in plants. – Mol. Biol. Rep. 36: 1633–1636. <https://doi.org/10.1007/s11033-008-9362-9>
- Kuzmina M.L., Braukman T.W.A., Fazecas A.J., Graham S.W., Dewaard S.L., Rodrigues A., Bennett B.A., Dickinson T.A., Saarela J.M., Catling P.M., Newmaster S.G., Percy D.M., Fenneman E., Lauron-Moreau A., Ford B., Gillespie L., Subramanyam R., Whitton J., Jennings L., Metsger D., Warne C.P., Brown A., Sears E., Dewaard J.R., Zakharov E.V., Hebert P.D.N. 2017. Using herbarium-derived DNAs to assemble a largescale DNA barcode library for the vascular plants of Canada. – Appl. Plant Sci. 5 (12): 1700079. <https://doi.org/10.3732/apps.1700079>
- Leipold M., Tausch S., Hirtreiter M., Poschlod P., Reisch C. 2020. Sampling for conservation genetics: how many loci and individuals are needed to determine the genetic diversity of plant populations using AFLP? – Conserv. Genet. Resour. 12: 99–108. <https://doi.org/10.1007/s12686-018-1069-1>
- MacDonald A.D. 1989. The morphology and relationships of the Myricaceae. – In: Evolution, Systematics and Fossil History of the Hamamelidae. Vol. 2: Higher Hamamelidae. Oxford, UK. P. 147–165.
- Malterud K.E. 1992. C-methylated dihydrochalcones from *Myrica gale* fruit exudate. – Acta Pharm. Nord. 4: 65–68. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0773.1996.tb00190.x>
- Mueller U.G., Wolfenbarger L.L. 1999. AFLP genotyping and fingerprinting. – Trends Ecol. Evol. 14 (10): 389–394. [https://doi.org/10.1016/s0169-5347\(99\)01659-6](https://doi.org/10.1016/s0169-5347(99)01659-6)
- Nguyen T.T., Taylor P.W.J., Redden R.J., Ford R. 2004. Genetic diversity estimates in *Cicer* using AFLP analysis. – Plant Breed. 123 (2): 173–179. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0523.2003.00942.x>
- Patsias K., Bruelheide H. 2011. 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. 1 (3): 290–305. <https://doi.org/10.1002/ece3.23>

- Poore M.E.D. 1956. The ecology of Woodwalton Fen. — *J. Ecol.* 44: 455–492.
- Popovici J., Bertrand C., Bagnarol E., Fernandez M.P., Comte G. 2008. Chemical composition of essential oil and headspace-solid microextracts from fruits of *Myrica gale* L. and antifungal activity. — *Nat. Prod. Res.* 22 (12): 1024–1032. <https://doi.org/10.1080/14786410802055568>
- Popovici J., Comte G., Bagnarol E., Alloisio N., Fournier P., Bellvert F., Bertrand C., Fernandez M.P. 2010. Differential effects of rare specific flavonoids on compatible and incompatible strains in the *Myrica gale*-*Frankia* actinorrhizal symbiosis. — *Appl. Environ. Microbiol.* 76: 2451–2460. <https://doi.org/10.1128/aem.02667-09>
- Popovici J., Walker V., Bertrand C., Bellvert F., Fernandez M.P., Comte G. 2011. Strain specificity in the Myricaceae–*Frankia* symbiosis is correlated to plant root phenolics. — *Funct. Plant Biol.* 38 (9): 682–689. <https://doi.org/10.1071/fp11144>
- Rogers S., Bendich A. 1985. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues. — *Plant Mol. Biol.* 5 (2): 69–76. <https://doi.org/10.1007/BF00020088>
- Rogers S., Bendich A. 1989. Extraction of DNA from plant tissues. — In: *Plant Molecular Biology Manual*. Springer. P. 73–83. https://doi.org/10.1007/978-94-009-0951-9_6
- Roldan-Ruiz I., Dendauw J., Van Bockstaele E., Depicker A., De Loos M. 2000. AFLP markers reveal high polymorphic rates in ryegrasses (*Lolium* spp.). — *Mol. Breeding.* 6: 125–134. <https://doi.org/10.1023/A%3A1009680614564>
- Rosa G.P., Silva B.J., Seca A.M., Moujir L.M., Barreto M.C. 2020. Phytochemicals with added value from *Morella* and *Myrica* species. — *Molecules.* 25 (24): 6052. <https://doi.org/10.3390%2Fmolecules25246052>
- Ryabushkina N.A., Omasheva M.E., Galiakparov N.N. 2012. Spetsifika vydeleniya DNK is rastitel'nykh ob'ektov [Specificity of DNA extraction from plants]. — *Biotekhnologia. Teoria i Praktika.* 2: 9–26 (In Russ.).
- Saunders J.A., Pedroni M.J., Penrose L.D., Fist A.J. 2001. AFLP analysis of opium poppy. — *Crop Sci.* 41 (5): 1596–1601. <https://doi.org/10.2135/cropsci2001.4151596x>
- Schwintzer C.R., Lancelle S.A. 1983. Effect of water table depth on shoot growth, root growth and nodulation of *Myrica gale* seedlings. — *J. Ecol.* 71: 489–501. <https://doi.org/10.2307/2259730>
- Schwintzer C.R., Ostrofsky A. 1989. Factors affecting germination of *Myrica gale* seeds. — *Can. J. For. Res.* 19: 1105–1109. <http://dx.doi.org/10.1139/x89-167>
- Silva B.J., Seca A.M., Barreto M.D.C., Pinto D.C. 2015. Recent breakthroughs in the antioxidant and anti-inflammatory effects of *Morella* and *Myrica* species. — *Int. J. Mol. Sci.* 16 (8): 17160–17180. <https://doi.org/10.3390%2Fijms160817160>
- Skene K.R., Sprent J.I., Raven J.A., Herdman L. 2000. *Myrica gale* L. — *J. Ecol.* 88 (6): 1079–1094. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2745.2000.00522.x>
- Svoboda K.P., Inglis A., Hampson J., Galambosi B., Asakawa Y. 1998. Biomass production, essential oil yield and composition of *Myrica gale* L. harvested from wild populations in Scotland and Finland. — *Flavour Frag. J.* 13: 367–372. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1026\(199811/12\)13:6%3C367::AID-FFJ724%3E3.0.CO;2-M](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1026(199811/12)13:6%3C367::AID-FFJ724%3E3.0.CO;2-M)
- Sylvestre M., Legault J., Dufour D., Pichette A. 2005. Chemical composition and anticancer activity of leaf essential oil of *Myrica gale* L. — *Phytomedicine.* 12: 299–304. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2003.12.004>
- The Red Book of the Russian Federation. 2008. *Krasnaya kniga Rossiyskoy Federatsii (rasteniya i griby)*. Moscow. 885 p. (In Russ.).
- Volkova E.A., Smagin V.A., Khramtsov V.N. 2021. Societies with *Myrica gale* L. in bogs on the edge of Finn Gulf (Saint-Petersburg and Leningrad District). — *Vegetation of Russia.* 41: 58–74 (In Russ.).
- Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., Lee T.V.D., Hornes M., ... Zabeau M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. — *Nucleic Acids Res.* 23 (21): 4407–4414. <https://doi.org/10.1093%2Fnar%2F23.21.4407>