

## ИЗУЧЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЫ ПОПУЛЯЦИИ БРУСНИКИ (*VACCINIUM VITIS-IDAEA* L.) В ЗАПОВЕДНИКЕ

Н.В. Глотов, В.Л. Семериков, Л.В. Прокопьева

Генетическая структура популяции брусники заповедника «Большая Кокшага» исследована по 15 аллозимным локусам, 10 из которых полиморфны. Сбор парциальных кустов (не менее, чем через 10-15 м) проводился по 3 маршрутам, удаленных друг от друга на расстоянии 5-15 км, общий объем материала 122 парциальных куста. 3 выборки сходны по частотам аллелей в соответствующих локусах, среднее число аллелей на локус 1,8-1,9; средняя гетерозиготность 0,208-0,227; наблюдаемые соотношения частот генотипов отличаются от ожидаемых на основании соотношений Харди-Вайнберга на уровне значимости 1-5%. Дифференциация выборок очень мала ( $F_{st}=0,014$ ), хотя и статистически значимо.

Клоновая структура популяции выявляется при сборе парциальных кустов на площадках 4 м<sup>2</sup> и менее (объем выборки 259 парциальных кустов), нижняя граница оценки протяженности клона на полученном материале составляет около 15 м. При полном раскапывании корневищ на площадке 1 м<sup>2</sup> и прослеживании хода корневища с аллозимной идентификацией парциальных кустов на его разделенных отрезках выявлено 7 клонов. Самый крупный клон имел общую длину корневища 36,8 м и 108 парциальных кустов.

### Введение

В течение ряда лет на территории заповедника «Большая Кокшага» нами проводятся систематические исследования ценопопуляций брусники (*Vaccinium vitis-idaea* L.) [3, 7, 8, 9, 21]. Решение основных фундаментальных вопросов популяционной биологии растений возможно только в условиях заповедной территории, где минимизированы антропогенные воздействия на растения и есть гарантия сохранности маркированных особей для многолетних наблюдений за ними. Основной особенностью распространения (размножения) брусники является сочетание полового размножения (возникновение новых генет) и вегетативного размножения (возникновение рамет – парциальных побегов, кустов – в пределах одного корневища). Вклад этих процессов в жизнь популяции и их соотношение только еще начинают изучаться. На первый взгляд, решающим является вегетативное размножение. На это указывает образование брусничкой подчас обширных и достаточно четко отграниченных скоплений парциальных кустов (зарослей, латок, куртин). Тщательное раскапывание корневищ обнаруживает сложные разветвленные структуры, общая длина которых может составлять десятки мет-

ров и которые несут десятки парциальных кустов (ПК) [7, 8]. При этом нет уверенности, что при самом тщательном раскапывании всегда удастся сохранить целостность корневища, так что полученные величины длины корневища следует рассматривать как оценку снизу. Крайний случай из нашей практики – корневище общей длиной 114,4 м с 327 парциальными кустами [6]. Поражает насыщенность подстилки корневищами брусники: общая длина корневищ на площади 1 м<sup>2</sup> составила в одной из наших раскопок 160 м [7]. За 10 лет полевых исследований нами ни разу не были обнаружены проростки брусники. Известно, что семена брусники в природе прорастают лишь при высокой влажности, отсутствии прямого солнечного освещения и хорошо развитого мохового и травяного покрова, хорошо заметными всходы становятся в августе-сентябре. Благоприятными местами для развития семян семейства брусничных местообитаниями являются лесные тропы, обнаженные пески, полусгнившие пни, деревья, валежник, порубочные остатки, обочины старых лесных дорог, а также вырубки и гари, где идет возобновление растительности после рубки лесов или пожаров [1, 10, 11]. С другой стороны, нередко и достаточно короткие корневища (1-2 м) с небольшим числом парциальных кустов (1-3). Учитывая очень большую онтогенетическую изменчивость парциальных кустов и не слишком ярко выраженную морфологическую изменчивость парциальных кустов в пределах определенного онтогенетического состояния, оказывается практически невозможным выявить и оценить разнообразие генет в популяции. Для решения этой задачи остается единственная возможность – использование молекулярных маркеров, ДНК или аллозимных полиморфных локусов.

Настоящая работа состоит из двух частей: 1) оценки генетического разнообразия брусники на территории заповедника, и 2) выявления и оценки размеров клонов брусники.

Поскольку методы анализа белкового полиморфизма являются основой при решении обеих рассматриваемых задач, мы начнем с их описания.

### **Лабораторные методы и интерпретация зимограмм**

Подготовка проб и электрофорез белков осуществлялись в соответствии с методикой, изложенной в [4, 12, 25], с небольшими модификациями.

Для экстракции ферментов 200 мг листьев растирали в 1 мл экстрагирующего буфера, содержащего 200 mM трис-HCl, pH 8,0, 16% сахарозы, 2% поливинилпирролидона, 0,1% аскорбиновой кислоты, 0,02% α-

аминокапроновой кислоты, 0,1% бычьего альбумина, 1% твин-80, 0,1% β-меркаптоэтанола. Образцы центрифугировали, предварительно смешав с 200 мкл CCl<sub>4</sub>, и разделяли в полиакриламидном геле с использованием трис-ЭДТА-боратной буферной системы (pH 8.0). Гистохимическое окрашивание проводили по общепринятым методикам [2, 17].

Для характеристики популяционной изменчивости брусники проведен электрофорез по 8 ферментным системам, пригодным для интерпретации: глутаматоксаламминотрансфераза (синоним – аспаратаминотрансфераза) (GOT, Е.С.2.6.1.1.), глутаматдегидрогеназа (GDH, Е.С.1.4.1.2.), изоцитратдегидрогеназа (IDH, Е.С. 1.1.1.42), фосфоглюкоизомераза (PGI, Е.С. 5.3.1.9.), фосфоглюкомутаза (PGM, Е.С.5.4.2.2.), 6-фосфоглюконатдегидрогеназа (6PGDH, Е.С. 1.1.1.44.), алкогольдегидрогеназа (ADH, Е.С.1.1.1.1.), эстераза (EST, Е.С.3.1.1.1). При выделении клонов проведен анализ еще одного фермента – FDH (FDH, EC 1.2.1.2).

GOT кодируется тремя локусами, более «медленные» из которых *Got-B* и *Got-C* содержат по два аллеля – 130, 120 и 114, 100 соответственно, а самый быстрый *Got-A* был мономорфным. (Аллели при этом обозначаются их относительной подвижностью, выраженной в процентах от подвижности наиболее частого аллеля.). GDH кодировалась мономорфным локусом *Gdh*. IDH кодируется двумя локусами, один из которых интерпретируется с тремя аллелями *Idh-A* 100, 91 и 86. Локус *Idh-B* не был интерпретирован. Выявлены две зоны ферментной активности PGI, предположительно кодируемые локусами *Pgi-A* и *Pgi-B*, из которых первый наиболее подвижный, был изменчив с тремя аллелями: *Pgi-A* 109, 100, 92. Более медленный локус *Pgi-B* был мономорфным. PGM кодируется двумя локусами с тремя аллелями в каждом: *Pgm-A* (100, 95 и 90) и *Pgm-B* (100, 92, 84). 6-PGD кодировалась двумя мономорфными локусами *6-Pgd-A* и *6-Pgd-B*. ADH кодируется двумя локусами *Adh-A* и *Adh-B* с аллелями 100, 96, 81 в первом и 125, 115 и 100 во втором. Светящаяся эстераза EST содержит множество зон активности, одна из которых интерпретируется как продукт локуса с подвижностями аллелей 100 и 85. Ферментная система FDH кодировалась одним локусом *Fdh* с аллелями 83 и 100.

Всего получено 15 локусов, 10 из которых были изменчивы.

Анализ аллозимных данных. Данные анализировались с использованием программ BIOSIS-2 [27], GENEPOP, version 2; [23], Fstat [15].

*Соотношение Харди-Вайнберга.* Соответствие наблюдаемого генотипического распределения ожидаемому из соотношения Харди-Вайнберга оценивалось двумя способами: 1) с помощью точного крите-

рия [16], объединение вероятностей по всем популяциям и по всем локусам проводилось методом Фишера [14, 26]; 2) с помощью множественного теста по всем локусам и всем популяциям на дефицит гетерозигот [24], использующего метод марковских цепей [16].

*Дифференциация популяций.* Сравнение частот аллелей в выборках проводили путем анализа таблиц сопряженности для данного локуса в каждой выборке с помощью точного критерия [22], объединение вероятностей проводили с помощью метода Фишера. Индексы фиксации Райта  $F_{IT}$ ,  $F_{IS}$ ,  $F_{ST}$  были вычислены согласно [28], 95% доверительный интервал находили с помощью бутстреп-метода (по локусам), где  $F_{IS}$  и  $F_{IT}$  – дефицит гетерозигот в выборках и во всей совокупной популяции, соответственно.  $F_{ST}$  – доля общего дефицита гетерозигот, обусловленного различием между популяциями.  $F_{ST}$  является мерой генетической дифференциации выборок [19]. На основании частот аллелей вычислялись генетические расстояния между выборками ( $D$ ) [18].

### **Оценка генетического разнообразия брусники на территории заповедника**

Для выявления полиморфных локусов и общей оценки уровня полиморфизма брусники на территории заповедника «Большая Кокшага» в 2006 г. было заложено три маршрута вдоль лесных дорог и просек. Маршрут № 1 проходит по территории заповедника вблизи кордона Красная горка от речки Шасталень-Энер по кварталам 90 и 89. Маршрут № 2 проходит в охранной зоне заповедника, в 5 км от п. Старожильск, начиная с просеки между кварталами 10 и 11 Старожильского лесничества. Маршруты 1 и 2 расположены вблизи южной границы заповедника, удалены друг от друга на расстояние около 5 км и разделены рекой Б. Кокшага. Маршрут № 3 проходит по территории заповедника вблизи его северной границы в 1 км от п. Кужинский по просеке между кварталами 2 и 3, далее по просеке между кварталами 2 и 18; он удален от маршрутов № 1 и № 2 примерно на 15 км. По ближайшим пунктам выборки обозначены как Красная горка, Старожильск и Кужинский. Протяженность каждого маршрута составила 1,0-1,5 км. По ходу каждого маршрута было выкопано около 40 парциальных кустов брусники. Расстояние между отдельными парциальными кустами не менее 10-15 м. Все маршруты проходили по соснякам, преимущественно соснякам зеленомошным, а также лишайниково-мшистым и долгомошным.

Полный перечень разных генотипов (по 9 локусам), выявленных при анализе 122 парциальных кустов, представлен в табл. 1. (У 6 парциаль-

ных кустов анализ удалось провести не по всем локусам.) Можно видеть, что генотипическое разнообразие брусники на территории заповедника довольно велико: 104 разных генотипа среди 122 проанализированных парциальных кустов.

Парциальные кусты, имеющие одинаковые генотипы были обнаружены как на разных трансектах (генотипы № 51, 74, 94), так и в пределах одной трансекты (генотипы № 26, 36, 40, 45, 54, 67, 71, 74, 75, 86, 88, 97).

Совпадение генотипов парциальных кустов из разных местообитаний, удаленных друг от друга на несколько километров, является очевидно случайным вследствие малого числа анализируемых локусов. Трудно предполагать, что они принадлежат одному клону. В случае совпадения генотипов парциальных кустов в пределах одного маршрута (выборки) дело обстоит сложнее. Поскольку расстояние между последовательными в пробе парциальными кустами фиксировалось в числе шагов (нумерация парциальных кустов была произвольной), можно рассмотреть величины этих расстояний (табл. 2). Вряд ли парциальные кусты №№ 97 и 3 (генотип № 86), 184 и 150 (генотип № 88), принадлежат к одному клону; трудно что-либо сказать о парциальных кустах №№ 146, 134 и 145 (генотип № 75); во всех остальных случаях, скорее всего, речь идет о парциальных кустах одного клона, особенно когда пробы были взяты из одной заросли (см. [13, 20] и наши данные ниже).

Результаты популяционно-генетического анализа представлены в таблицах 3-5.

Можно видеть (табл. 3), что во всех выборках частоты соответствующих аллелей в 9 локусах очень близки. Однако тест на гетерогенность частот показывает, что выборки значительно отличаются друг от друга по локусу *Adh-B* и по совокупности локусов ( $P=0,0003$ , табл. 4 - последний столбец). В локусах *Pgi-A*, *Pgm-B*, *Adh-A*, *Idh* и *Est-F* выявляются единичные особи, несущие редкие аллели.

Анализ соответствия распределения генотипов в выборках соотношениям Харди-Вайнберга посредством точного критерия [24] выявил отклонение от равновесия: во всех популяциях и по всем локусам суммарно объединенная вероятность  $P=0,010$ ,  $\chi^2=48$ ,  $\nu=28,1$ . Наибольшее отклонение обнаружено в популяции Старожильск в *Got-C* (избыток гетерозигот,  $P=0,0214$ ) и в локусе *Pgm-A* (недостаток гетерозигот,  $P=0,009$ ). По *Got-C* также выявляется отклонение для всех популяций

Таблица 1

## Генотипы брусники, выявленные в разных местообитаниях

№ п/п	Генотип									Число парциальных кустов в выборке		
	<i>Pgi-A</i>	<i>Pgm-A</i>	<i>Pgm-B</i>	<i>Adh-A</i>	<i>Adh-B</i>	<i>Idh</i>	<i>Got-B</i>	<i>Got-C</i>	<i>Est</i>	Красная горка	Старожильск	Кужинский
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1	11*	11	11	11	33	11	22	22	11	1		
2	11	11	11	11	23	22	22	12	11		1	
3	11	11	11	22	23	11	22	12	11	1		
4	11	11	11	12	33	11	22	22	11	1		
5	11	33	13	11	33	12	12	22	11			1
6	11	12	11	12	33	12	22	22	11			1
7	11	13	11	11	33	11	22	11	11	1		
8	11	13	11	22	23	11	22	12	11	1		
9	11	13	11	12	33	11	22	12	11			1
10	11	13	12	11	33	11	22	11	11	1		
11	22	11	11	11	33	12	22	11	11	1		
12	22	11	11	11	33	12	12	22	11			1
13	22	11	11	11	33	12	12	12	11			1
14	22	11	11	12	23	12	22	11	11	1		
15	22	11	11	12	33	12	22	22	11		1	
16	22	11	13	12	33	22	22	12	11		1	
17	22	11	13	12	23	12	22	22	11		1	
18	22	33	11	11	33	11	22	12	11		1	
19	22	33	11	11	33	12	12	22	11		1	
20	22	33	11	11	23	22	12	12	11		1	
21	22	33	11	12	33	22	22	11	11			1
22	22	33	13	11	33	12	22	12	11		1	
23	22	12	11	11	33	11	22	12	11		1	
24	22	12	11	11	33	11	12	12	11			1
25	22	12	11	11	33	12	22	11	11	1		
26	22	12	11	11	33	12	12	22	11		3	
27	22	12	11	11	33	11	12	22	11			1
28	22	12	11	11	13	11	11	12	11	1		
29	22	12	11	11	23	11	22	22	11		1	
30	22	12	11	11	23	22	22	12	11			1
31	22	12	11	22	33	22	12	12	11		1	
32	22	12	11	12	22	11	22	12	11	1		
33	22	12	11	12	33	11	11	22	11			1
34	22	12	13	11	33	11	12	12	11	1		
35	22	13	11	11	33	11	22	12	11			1
36	22	13	11	11	33	22	22	12	11		2	
37	22	13	11	11	33	12	22	11	11		1	
38	22	13	11	11	33	12	12	11	11			1

Продолжение таблицы 1

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
39	22	13	11	11	33	13	12	11	11	1		
40	22	13	11	11	13	11	12	12	11	2		
41	22	13	11	12	33	11	12	11	11	1		
42	22	13	11	12	33	11	11	12	11		1	
43	22	13	11	12	33	12	22	12	12		1	
44	22	13	11	12	23	12	22	12	11		1	
45	22	23	11	11	33	11	12	12	11			2
46	22	23	11	11	33	12	22	11	11	1		
47	22	23	11	11	33	12	12	12	11			1
48	2	23	12	11	23	12	22	22	11			1
49	12	11	11	11	33	11	22	11	11		1	
50	12	11	11	11	33	11	22	12	11	1		
51	12	11	11	11	33	11	12	22	11	1		1
52	12	11	11	11	33	12	22	22	11			1
53	12	11	11	11	13	22	12	12	11	1		
54	12	11	11	11	13	12	22	22	11	2		
55	12	11	11	22	23	12	12	22	11	1		
56	12	11	11	12	33	22	22	22	11			1
57	12	11	11	12	13	11	22	22	11	1		
58	12	11	11	12	13	12	22	22	11	1		
59	12	11	11	12	13	12	22	12	11	1		
60	12	11	12	11	33	12	22	12	11			1
61	12	11	13	11	33	11	22	12	11		1	
62	12	11	13	11	33	12	22	12	11	1		
63	12	22	11	11	33	11	22	12	11			1
64	12	22	11	11	33	22	22	22	11	1		
65	12	22	11	11	13	12	22	22	11		1	
66	12	22	11	12	33	22	22	22	11	1		
67	12	33	11	11	33	11	22	12	11		2	
68	12	33	11	11	13	22	22	12	11	1		
69	12	33	11	11	13	22	22	12	11	1		
70	12	33	11	22	33	12	22	12	12		1	
71	12	33	11	12	33	11	12	22	11		2	
72	12	33	11	12	23	12	22	12	11			1
73	12	33	11	13	33	11	12	22	11			1
74	12	12	11	11	33	11	22	22	11	1	2	
75	12	12	11	11	33	22	22	12	11			3
76	12	12	11	11	33	12	22	22	11	1		
77	12	12	11	12	33	12	22	12	11	1		
78	12	12	11	12	23	12	22	12	11		1	
79	12	12	13	11	11	11	22	22	11	1		
80	12	13	11	11	33	11	11	12	11			1
81	12	13	11	11	33	11	22	22	11			1
82	12	13	11	11	33	11	22	12	11		1	
83	12	13	11	11	33	11	12	12	11	1		
84	12	13	11	11	33	22	12	22	11			1

Окончание таблицы 1

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
85	12	13	11	11	33	12	22	22	11	1		
86	12	13	11	11	33	12	22	12	11		3	
87	12	13	11	11	33	12	12	2	11	1		
88	12	13	11	11	33	12	12	12	11			2
89	12	13	11	11	23	12	22	12	11			1
90	12	13	11	22	33	11	22	11	11	1		
91	12	13	11	22	33	22	22	22	11			1
92	12	13	11	12	33	11	22	12	11		1	
93	12	13	11	12	33	22	22	22	11	1		
94	12	13	11	12	33	12	22	12	11	1	1	
95	12	13	11	12	23	11	22	12	11		1	
96	12	13	11	12	23	11	12	12	11		1	
97	12	13	12	11	33	22	22	22	11			2
98	12	13	13	11	33	12	22	12	11			1
99	12	13	13	12	33	12	12	12	11		1	
100	12	23	11	11	33	22	12	22	11			1
101	12	23	11	22	33	22	22	22	11			1
102	12	23	11	12	33	12	22	11	11	1		
103	52	12	11	11	33	12	22	22	11	1		
104	52	13	11	11	23	11	12	12	11			1
105	22	13	11	11		11	12	12	11		1	
106	22				33	12	22	22	11		1	
107		13	11	11	23	12	22	12	11			1
108	12	11	11	12	33		22	12	11			1
109							22	22	11	1		
110				12			12	11	11	1		
Итого										45	42	41

**Примечание:** \* - Здесь и далее нумерация аллелей в аллозимных генотипах приводится в соответствии с убыванием электрофоретической подвижности.

суммарно ( $\chi^2=15,5$ ,  $v=6$ ,  $P=0,016$ ). При проверке гипотезы о недостатке гетерозигот с помощью теста основанного на марковских цепях, в целом для всех популяций и всех локусов не выявлено достоверного дефицита гетерозигот ( $P=0,56$ ), однако в локусе *Adh-A* такой дефицит наблюдался ( $P=0,044$ ). При проверке гипотезы об избытке гетерозигот также в целом не выявлено избытка ( $P=0,46$ ), однако в локусе *Pgi-A* такой избыток выявлен ( $P=0,008$ ). Отметим, что разницы значимы на уровне 0,05-0,01, отклонения от соотношений Харди-Вайнберга если и имеют место, то не слишком велики.

Анализ распределения генетической изменчивости внутри выборок и между выборками [28] выявил очень слабую, но значимую дифференциацию популяций:  $F_{ST}$  (мера генетической дифференциации выборок [19]) варьирует от 0 до 4,3%, составляя в среднем 1,4% (табл. 4).

Генетические расстояния [18] между изученными выборками очень малы: Красная горка и Старожильск – 0,004; Красная горка и Кужинский – 0,006; Старожильск и Кужинский – 0,001.

Таблица 2

**Расстояние между парциальными кустами, имеющими одинаковый генотип**

№ п/п	Выборка	№ генотипа	№№ парциальных кустов и расстояние между ними
1.	Старожильск	26	7—81—84 15 м 15 м
2.	Старожильск	36	31—61 (заросль) 15 м
3.	Красная горка	40	76—47 15 м
4.	Кужинский	45	176—155 25 м
5.	Красная горка	54	8—15 15 м
6.	Старожильск	67	82—21 (заросль) 14 м
7.	Старожильск	71	30—99 (заросль) 13 м
8.	Старожильск	74	86—67 13 м
9.	Кужинский	75	146—134—145 25 м 25 м
10.	Старожильск	86	72—97—3 14 м 857 м
11.	Кужинский	88	184—150 604 м
12.	Кужинский	97	126—135 20 м

Приведенные генетические дистанции, а также очень близкие значения частот аллелей и параметров полиморфизма у изученных выборок (среднее число аллелей на локус, доля полиморфных локусов, гетерозиготность) (табл. 5) позволяют сделать заключение о сходстве трех исследованных выборок. Можно ли их рассматривать как часть единой популяции, покажет накопление данных.

Высокий уровень средней гетерозиготности, тенденция к выполнению соотношений Харди-Вайнберга и большое разнообразие генотипов при малом числе повторяющихся свидетельствуют о том, что решающим фактором в формировании генетической структуры изучаемой популяции брусники является половое размножение (при перекрестном опылении). Наличие клонов, однако, не может вызывать сомнения по самой специфике морфологической организации (полицентрические структуры) особей брусники. Поэтому необходимо рассмотреть следующую задачу.

Таблица 3

**Частоты аллелей аллозимных локусов в изученных выборках брусники**

Локус, объем вы- борки, аллели	Выборки			Среднее
	Красная Горка	Старожильск	Кужинский	
<i>Pgi-A</i> (N)	43	42	40	125
109	0,012	0,000	0,013	0,008
100	0,430	0,262	0,363	0,352
92	0,558	0,738	0,625	0,640
<i>Pgm-A</i> (N)	43	41	41	125
100	0,605	0,451	0,451	0,504
95	0,174	0,134	0,195	0,168
90	0,221	0,415	0,354	0,328
<i>Pgm-B</i> (N)	43	41	41	125
100	0,953	0,939	0,927	0,940
92	0,012	0,000	0,049	0,020
84	0,035	0,061	0,024	0,040
<i>Adh-A</i> (N)	44	41	41	126
100	0,761	0,780	0,854	0,797
96	0,239	0,220	0,134	0,199
81	0,000	0,000	0,012	0,004
<i>Adh-B</i> (N)	43	41	41	125
125	0,151	0,012	0,000	0,056
115	0,070	0,098	0,073	0,080
100	0,779	0,890	0,927	0,864
<i>Idh</i> (N)	43	42	40	125
100	0,651	0,631	0,512	0,600
91	0,337	0,369	0,488	0,396
86	0,012	0,000	0,000	0,004
<i>Got-B</i> (N)	45	42	41	128
130	0,144	0,155	0,244	0,180
120	0,856	0,845	0,756	0,820
<i>Got-C</i> (N)	45	42	41	128
114	0,422	0,369	0,317	0,371
100	0,578	0,631	0,683	0,629
<i>Est-F</i> (N)	45	42	41	128
100	1,000	0,976	1,000	0,992
84	0,000	0,024	0,000	0,008

Таблица 4

**Оценки распределения генетической изменчивости внутри выборок и между выборками [28]. Представлены также результаты теста на гетерогенность аллельных частот между выборками ( $P$ ) по отдельным локусам и суммарно [22]**

Локус	$F(F_{IT})$	$\theta (F_{ST})$	$f(F_{IS})$	$P$
<i>Pgi-A</i>	-0,187	0,024	-0,217	0,084
<i>Pgm-A</i>	-0,012	0,019	-0,032	0,074
<i>Pgm-B</i>	-0,045	-0,001	-0,044	0,186
<i>Adh-A</i>	0,1490	0,003	0,146	0,204
<i>Adh-B</i>	0,034	0,043	-0,009	0,0002
<i>Idh</i>	0,146	0,011	0,137	0,134
<i>Got-B</i>	-0,000	0,008	-0,009	0,191
<i>Got-C</i>	-0,084	0,001	-0,085	0,370
<i>Est G</i>	0,000	0,013	-0,013	0,209
Среднее	-0,004	0,014	-0,018	0,0003
95% доверительный интервал	(-0,089 0,085)	(0,006 0,022)	(-0,108 0,074)	

Таблица 5

**Генетическая изменчивость в популяциях брусники (в скобках – ошибка среднего)**

Выборка	Средний объем выборки на локус	Среднее число аллелей на локус	Частота полиморфных локусов*	Средняя гетерозиготность	
				наблюдаемая	ожидаемая из соотношения Харди-Вайнберга
Красная Горка	44,2 (0,3)	1,9 (0,2)	57,1	0,208 (0,060)	0,222 (0,062)
Старожильск	41,7 (0,1)	1,8 (0,2)	64,3	0,227 (0,064)	0,209 (0,058)
Кужинский	40,9 (0,1)	1,9 (0,2)	57,1	0,221 (0,068)	0,213 (0,062)

**Примечание:** \* – полиморфным рассматривается локус, если альтернативный аллель встретился хотя бы один раз.

### Выявление и оценка размеров клонов брусники

Для выявления и характеристики клоновой структуры в 2007 г. были заложены 3 площадки небольших размеров.

Площадка № 1 расположена в сосняке зеленомошном, возникшем после пожара 1921 г. В подлеске встречается можжевельник обыкновенный *Juniperus communis* L. Возобновление отсутствует. В нижних ярусах преобладают зеленые мхи (проективное покрытие 59,7%), брусника (16,9%). Площадки № 2 и 3 расположены в сосняке березово-зеленомошно-брусничном. Возобновление со сменой вида-эдификатора.

Присутствует подрост *Picea abies* (L.) Karst. В подлеске можжевельник обыкновенный, рябина обыкновенная *Sorbus aucuparia* L. В нижних ярусах преобладают зеленые мхи (90%), брусника (80%), черника *Vaccinium myrtillus* L. (40%). Возраст древостоя 60 лет.

Площадки № 2 и № 3 размером 2×2 м, они разбиты на 16 квадратов по 0,5 м<sup>2</sup> и удалены друг от друга на расстояние 12 м. В разных участках каждого квадрата для определения белкового полиморфизма были взяты листья с трех хорошо развитых парциальных кустов.

На площадке № 1 размером 1×1 м, расположенной выше по склону на расстоянии 30 м от площадок № 2 и № 3, были замаркированы и нанесены на схему масштаба 1:1 266 парциальных кустов; затем были перерезаны все корневища, выходящие за пределы площадки № 1, площадка освобождена от подстилки (рис. 1-3), прослежен и нанесен на схему ход всех корневищ в пределах площадки; общая протяженность корневищ на площади 1 м<sup>2</sup> составила 93,44 м; с каждого отрезка корневищ взяты листья для Электрофоретического анализа с одного развитого парциального куста. Определяли онтогенетические состояния [5] всех парциальных кустов и длину участков корневищ между соседними парциальными кустами.

Всего на трех площадках выявлено 15 клонов, их генотипы по 10 полиморфным локусам представлены в табл. 6.



Рис. 1. Площадка № 1 с замаркированными парциальными кустами брусники.  
Фото Л.В. Прокопьевой.



Рис. 2. Площадка № 1, очищенная от мохового покрова и лесной подстилки.  
Фото Л.В. Прокопьевой.



Рис. 3. Участок той же площадки (рис. 2) при большем увеличении.  
Фото Л.В. Прокопьевой.

Генотипы 15 клонов брусники, выявленных на трех площадках

Клон (номера площадок)	<i>Pgi-A</i>	<i>Pgm-A</i>	<i>Pgm-B</i>	<i>Adh-A</i>	<i>Adh-B</i>	<i>Idh-A</i>	<i>Idh-B</i>	<i>Got-B</i>	<i>Got-C</i>	<i>Est</i>	<i>Fdh</i>
1 (№ 1)	12	11	22	12	33	12	12	22	12	22	33
3 (№ 2)	12	11	22	11	13	12	12	22	12	22	33
4 (№ 1)	12	12	12	11	33	11	12	12	22	22	33
6 (№ 1)	12	12	22	12	13	12	11	22	12	22	13
7 (№ 2, 3)	12	12	22	12	33	12	11	22	12	22	33
8 (№ 3)	12	13	22	12	33	12	11	22	12	22	33
11 (№ 2, 3)	12	23	22	12	33	12	11	22	11	22	33
12 (№ 1)	22	11	22	12	33	12	12	22	12	22	33
13 (№ 2, 3)	22	11	22	11	13	12	12	22	12	22	—
14 (№ 1)	22	12	12	11	33	11	12	12	22	22	33
17 (№ 1)	22	12	22	12	13	12	11	22	12	22	13
19 (№ 1)	22	12	12	11	33	11	12	22	22	22	—
22 (№ 2)	22	12	22	12	33	12	11	22	12	22	33
23 (№ 2)	22	11	22	12	33	11	12	22	12	12	—
24 (№ 3)	22	11	22	11	33	12	12	22	12	12	—

**Примечание:** По локусам *Got-A* и *Pgi-B* все клоны идентичны, соответственно, 11 и 11; «—» не определялось.

В таблице 7 можно видеть, что при попарном сравнении клонов только в 7 из 105 сравнений клоны различаются лишь по одному локусу; это свидетельствует о надежности идентификации клонов. На площадке № 2 выявлено 6 клонов, на площадке № 3 – 5 клонов (табл. 8). В таблицах 9, 10 приведена сводка размещения клонов на этих участках. Можно видеть, что клоны №№ 7, 11, 13 представлены на обоих участках, при этом на участке № 2 клон 11 встречается в 12 квадратах, дважды обнаружен на 6 из них; на участке № 3 клон 11 встречается на всех 16 квадратах, на 11 из них – дважды, а на одном квадрате все 3 парциальных куста принадлежат этому клону (табл. 10). Таким образом, нижняя граница протяженности клона составляет около 15 м. Число клонов (генотипов) на 1 м<sup>2</sup> составляет на этих площадках, соответственно, 1,5 и 1,25.

На площадках №№ 2, 3 и на площадке № 1 применялись разные методические подходы. На площадках №№ 2, 3 – это общепринятая методика выявления клонов с использованием множества (10) белковых полиморфных локусов, на площадке № 1 – морфолого-генетическая методика, когда принадлежность парциального куста к определенному клону

устанавливалась (а) по общности корневища и затем (б) листья парциальных кустов разных отрезков корневищ сравнивались по изозимным спектрам. Это позволило, проведя Электрофоретический анализ лишь 83 парциальных кустов, охарактеризовать по 10 локусам генотипы 259 парциальных кустов на участке 1 м<sup>2</sup> и получить демографическое описание клонов на этой площадке (размер клона по числу парциальных кустов, длина корневища, онтогенетический спектр парциальных кустов, пространственное распределение парциальных кустов одного и разных клонов).

Таблица 7

**Число локусов, по которым различаются клоны брусники**

Клон	1	3	4	6	7	8	11	12	13	14	17	19	22	23	24
1															
3	2														
4	6	6													
6	4	3	8												
7	2	4	6	2											
8	2	4	7	3	1										
11	3	5	7	4	2	2									
12	1	3	7	5	2	3	4								
13	3	1	7	4	5	5	6	2							
14	7	7	1	8	6	8	8	5	6						
17	5	5	8	1	3	4	5	4	3	8					
19	6	6	2	7	6	7	7	5	5	1	6				
22	3	5	7	3	1	2	3	2	4	6	2	5			
23	3	5	7	6	5	5	6	2	4	6	5	5	4		
24	3	3	7	6	5	5	6	2	2	6	5	5	4	2	

Таблица 8

**Распространенность клонов брусники на участках № 2 и № 3**

№ клона	Площадка № 2		Площадка № 3	
	Число парциальных кустов	Число квадратов 0,5 м <sup>2</sup> с ПК данного клона	Число парциальных кустов	Число квадратов 0,5 м <sup>2</sup> с ПК данного клона
3	1	1	—	—
7	9	7	10	9
8	—	—	4	3
11	18	12	29	16
13	16	10	3	3
22	2	2	—	—
23	2	2	—	—
24	—	—	2	2

Таблица 9

**Размещение парциальных кустов шести клонов брусники (указаны их номера)  
по квадратам площадью 0,5 м<sup>2</sup> на площадке № 2**

11	7	11	11
11	7	13	11
23	11	13	13
13	7	7	7
13	11	7	11
13	11	11	23
11	11	7	11
11	11	13	13
13	13	13	22
11	7	13	3
11	11	13	7
13	22	13	13

Таблица 10

**Размещение парциальных кустов пяти клонов брусники (указаны их номера)  
по квадратам площадью 0,5 м<sup>2</sup> на площадке № 3**

8	7	7	8
11	7	11	8
13	11	11	11
7	7	11	7
11	11	11	11
11	11	13	11
8	11	7	11
11	11	11	11
11	24	11	11
11	7	7	7
13	11	11	11
24	11	11	11

На площадке № 1 выявлено 7 клонов (табл. 6, 11), 3 из них представлены большим числом парциальных кустов (49, 90, 108), 4 – единичными парциальными кустами (2-6). Любопытно, что только один клон с малым числом парциальных кустов входит отрезком корневища с края площадки № 1, три других проходят практически через всю площадку, но представлены редкими парциальными кустами. Сеть корневищ на площадке № 1 крайне запутана, отрезки корневищ неоднократно пересекаются в подстилке толщиной около 2 см (рис. 4). Корневища хорошо представленных клонов многократно «уходят» за пределы площадки и вновь «возвращаются» на нее. Поэтому клоны 17, 14, 1 представлены на площади 1 м<sup>2</sup>, скорее всего, своей меньшей частью. Установленная длина корневища между соседними парциальными кустами может варьировать от нескольких см до примерно 2 м (за счет изогнутости корневища).

Клоны брусники, выявленные на площадке №1

№ клона	Число ПК	Общая длина корневища, м	Число ПК/1 м корневища
17	108	36,77	2,9
14	90	31,92	2,8
1	49	14,21	3,4
4	6	2,51	2,4
6	2	2,15	0,93
19	2	1,91	1,1
12	2	0,86	2,3

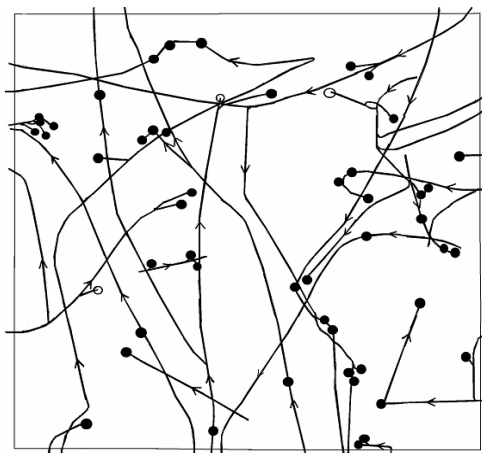


Рис. 4. Схема расположения отрезков корневищ брусники клона № 1. на площадке размером 1×1 м ( — направление роста корневища; ● - парциальный куст; — молодое окончание корневища).

Ранее было показано, что новые парциальные кусты возникают не только последовательно по ходу роста корневища, но и на молодых, и на старых его участках из спящих почек [7]; на этом материале такой анализ будет проводиться позже. Онтогенетические спектры ПК трех наиболее распространенных клонов однородны ( $\chi^2=14,01$ ;  $v=10$ ,  $P>0,1$ ). Общий онтогенетический спектр для всех парциальных кустов на площадке №1 показан на рисунке 5: спектр левосторонний с максимумом на  $g_1$  онтогенетической группе и заметным преобладанием группы  $im$  над группой  $v$ , что объясняется, скорее всего, интенсивным возникновением новых парциальных кустов в последние 2 года.

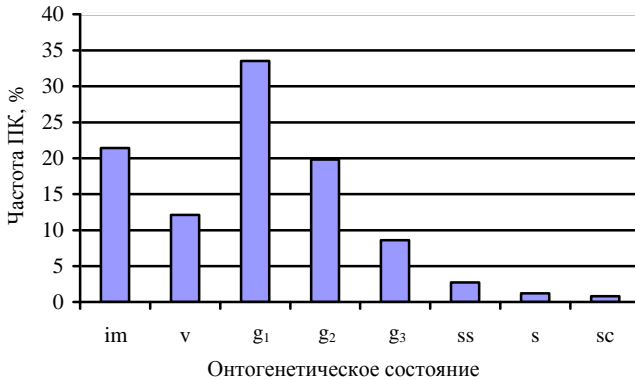


Рис. 5. Онтогенетический спектр ПК брусники на площадке № 1 (n=259).

### Заключение

Выявлению клоновой структуры и оценке размеров клонов у брусники посвящена работа шведских исследователей [20]. В двух популяциях, удаленных друг от друга на 350 км, вдоль трансект через каждые 10 м были заложены площадки  $1\text{ м}^2$ , на каждой из них брали листья с 3-8 парциальных кустов. Техника исследования полиморфизма ДНК (RAPD-анализ, 43 полиморфных маркера) обеспечивала точность идентификации клона  $6,72 \times 10^{-5}$ . Среди 129 растений было выявлено 29 разных генотипов (клонов). Один и тот же клон мог неоднократно встречаться на единственной площадке  $1\text{ м}^2$ , на двух-трех соседних площадках; на одной из площадок все шесть проанализированных растений принадлежали к одному клону, этот клон не был выявлен на двух следующих одна за другой площадках, но два растения этого клона обнаружены на третьей площадке. Сходные результаты были получены для двух популяций *Vaccinium uliginosum* L. в Бельгии [13].

Таким образом, можно полагать, что размеры клонов брусники не слишком велики. Поэтому клоновая структура практически не выявляется в явном виде при последовательном сборе парциальных кустов через 10-20 метров, как это делалось в первой части нашей работы. Однако представляется вполне возможным, что разные генотипы (клоны) могут обладать разной приспособленностью и в особенно благоприятных локальных условиях среды могут достигать большой протяженности. В связи с этим интересными представляются две задачи:

1) последовательное тщательное раскапывание корневища с молекулярно-генетическим контролем парциальных кустов по разные стороны поврежденного (перегнившего) корневища, т.е. прослеживание хода корневища на возможно большем протяжении;

2) сопоставление клоновой насыщенности и размеров клонов в популяциях брусники, контрастно различающихся по экологическим условиям местообитания, времени формирования популяций и т.п.

Авторы благодарят Н.Н. Крылову и А.Б. Трубянова за помощь в сборе материала.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ (06-04-49191-а) и гранта МарГУ (задание Минобразования РФ).

### **Библиографический список**

1. Авдошенко А.К. Семенное размножение брусничных // Доклады АН СССР. 1948. Т. 60. № 5. С. 897-899.
2. Генетика изоферментов. – М: Наука, 1977. 275 с.
3. Глотов Н.В., Прокопьева Л.В. Влияние календарного и биологического возраста парциальных кустов *Vaccinium vitis-idaea* (Ericaceae) на урожайность ягод // Растительные ресурсы. 2007. Т.43. Вып. 3. С. 1-9.
4. Подогас А.В., Шурхал А.В., Семериков В.Л., Ракицкая Т.А. Генетическая изменчивость ферментов хвои сосны кедровой сибирской // Генетика. 1991. Т. 27. № 4. С. 695-703.
5. Прокопьева Л.В., Жукова Л.А., Глотов Н.В. Онтогенез брусники обыкновенной (*Vaccinium vitis-idaea* L.) // Онтогенетический атлас лекарственных растений. Т. II. – Йошкар-Ола: Мар. гос. ун-т, 2000. С. 39-46.
6. Прокопьева Л.В. Некоторые методические аспекты изучения подземной структуры вегетативно-подвижных растений на примере брусники обыкновенной // Методы популяционной биологии. Сб. материалов VII Всероссийского популяционного семинара (Сыктывкар, 16-21 февраля 2004г.). Ч.1. – Сыктывкар, 2004. С. 172-173.
7. Прокопьева Л.В. Экологические особенности популяций брусники *Vaccinium vitis-idaea* L. в условиях подтаежных лесов Марийской низменности. Автореф. дисс. ... к.б.н. – Н.Новгород, 2006. 22 с.
8. Прокопьева Л.В. Структура популяций брусники *Vaccinium vitis-idaea* L. // Проблемы биологии растений: Материалы Международной конференции, посвященной 100-летию со дня рождения В.В. Письяуковой. 22-24 ноября 2006 г. – СПб.: Изд. «ТЕССА», 2006. С. 171-173.
9. Прокопьева Л.В., Глотов Н.В. Онтогенетические пути парциальных кустов брусники (*Vaccinium vitis-idaea* L.) // Научные труды государственного природного заповедника «Большая Кокшага». Вып. 2. – Йошкар-Ола: Мар. гос. техн. ун-т, 2007. С. 173-202.
10. Солоневич Н.Г. Материалы и эколого-биологическая характеристика болотных трав и кустарников. Вып. 2. – М.-Л.: Изд. АН СССР, 1956. С. 307-497.

11. Таргонский Л.Н. Семенное и вегетативное возобновление брусники обыкновенной в Полесье Украины // Брусничные в СССР. – Новосибирск, 1990. С. 114-119.
12. Шурхал А.В., Подагас А.В., Семериков В.Л., Животовский Л.А. Аллозимный полиморфизм лиственницы сибирской (*Larix sibirica* Ledeb.) // Генетика. 1989. Т. 25. № 10. С. 1899-1901.
13. Albert T, Raspe O., Jacquemart A.-L. Diversity and spatial structure of clones in *Vaccinium uliginosum* populations // Can. J. Botany. 2005. V. 83. № 2. P. 211-218.
14. Fisher R.A. Statistical Methods for Research Workers. R.A. Fisher. 12th ed. – Edinburgh: Oliver & Boyd, 1954. 356 p.
15. Goudet J. Fstat v-1.2: a computer program to calculate F-statistics // J. Heredity. 1995. Vol. 86. P. 485-486.
16. Guo S.W., Thompson E.A. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportions for multiple alleles // Biometrics. 1992. V. 48. P. 361-372.
17. Harris H., Hopkinson D.A. Handbook of enzyme electrophoresis. V. 1. – Amsterdam: North-Holland Publ. Comp., 1976.
18. Nei M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals // Genetics. 1978. V. 83. P. 583-590.
19. Nei M. Molecular Evolutionary Genetics. Columbia University Press. – New York. 1987.
20. Persson H.A., Gustavsson A. The extent of clonality and genetic diversity in lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea* L.) revealed by RAPDs and leaf-shape analysis // Mol. Ecol. 2001. V. 10. P. 1385-1397.
21. Prokopyeva L.V. Berry yield of cowberry in natural populations // *Vaccinium* spp. and less known small fruits: cultivation and health benefit. Intern. Conf., Book of abstr. – Nitra: IPGB SAS, 2007. P. 103-104.
22. Raymond M., Rousset F. An exact test for population differentiation // Evolution. 1995a. Vol. 49. P. 1280-1283.
23. Raymond M., Rousset F. Genepop (version 1.2) a population genetics software for exact tests and ecumeicism // J. Heredity. 1995b. V. 86. P. 248-249.
24. Rousset F., Raymond M. Testing heterozygote excess and deficiency // Genetics. 1995. Vol. 140. P. 1413-1419.
25. Shurkhal A.V., Podogas A.V., Zhivotovsky L.A. Allozyme differentiation in the genus *Pinus* // Silvae Genetica. 1992. V. 41. P. 105-109.
26. Sokal R.R., Rohlf F.J. Biometry: The principles and practice of statistics in biological research. – New York: W.H. Freeman and Co., 1994. 887 p.
27. Swofford D.L., Selander R.B. BIOSYS-1: a FORTRAN program for the comprehensive analysis of electrophoretic data in population genetics and systematics // J. Heredity. 1981. Vol. 72. P. 281-283.
28. Weir B.S., Cockerham C.C. Estimating F-statistics for the analysis of population structure // Evolution. 1984. V. 38. P. 1358-1370.

**RESEARCH ON GENETIC STRUCTURE OF A COWBERRY POPULATION (*VACCINIUM VITIS-IDAEA* L.) IN THE RESERVE**

N.V. Glotov, V.L. Semerikov, L.V. Prokopyeva

Genetic structure of a cowberry population in the reserve Bolshaya Kokshaga was examined based on the analyses of 15 allozyme loci, 10 of those being polymorphic. Partial plants (spaced by no less than 10-15 m) were sampled along 3 routes, being 5-15 km distant from each other; the total number made 122 partial plants. Three samples demonstrated similar allele frequencies for the corresponding loci, the average allele number per locus made 1.8 -1.9; average heterozygosis values were 0.208-0.227; the observed genotype ratios differed from the values expected after the Hardy-Weinberg relation at 1-5% level of significance. Differentiation of the samples was very low ( $F_{st}=0,014$ ), yet statistically significant. Probably one should regard these three samples as parts of the same population.

Clonal structure of the population was revealed when the partial plants were collected from the plots not bigger than 4 square m (the sample included 259 partial plants); the lower limit of the estimated clone extent for the sampled plants made about 15 m. Complete excavation and tracing of the rootstocks on the plot of 1 sq.m, with allozyme identification of partial plants on its separated segments, lead to reveal 7 clones. The biggest clone was marked for the rhizome length of 36.8 m and had 108 partial plants.