

ГЕНЕТИКА

Научная статья

УДК 575.86:582:58.088

doi: 10.17072/1994-9952-2023-3-259-273.

Генетическое разнообразие российских и европейских представителей *Dryopteris expansa* (C. Presl) Fraser-Jenkins et Jermy (*Dryopteridaceae*)

Сергей Юрьевич Малых

Гимназия № 31, Пермь, Россия, MSU101@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-1478-2344>

Аннотация. Представлены результаты молекулярно-генетического анализа (ISSR-PCR) 112 особей *Dryopteris expansa* (C. Presl) Fraser-Jenkins et Jermy, собранных на территории России и Европы. При выделении ДНК использовался свежий материал и материал из гербария Южно-сибирского ботанического сада (ALTB): сбор свежего материала осуществлялся во время экспедиций (40 образцов из Пермского края, Московской, Смоленской и Тверской областей), отбор материала из гербария происходил путём изъятия визуально-пригодной для анализа части засушенной вайи (72 образца из различных регионов России и Европы). Компьютерный анализ полиморфизма ДНК и генетическая структура исследованных групп с вычислением доли (P_{95}) полиморфных локусов, абсолютного (n_a) числа аллелей, эффективного (n_e) числа аллелей, ожидаемой (H_E) гетерозиготности и информационно-энтропийной меры (I) Шеннона, проведен с помощью программы POPGENE 1.31. Для описания генетической структуры исследованных групп использованы следующие параметры: ожидаемая доля гетерозиготных генотипов (H_T) во всей группе, как мера её общего разнообразия; ожидаемая доля гетерозиготных генотипов в подгруппе (H_S), как мера её внутреннего разнообразия; доля межгруппового генетического разнообразия в общем разнообразии или показатель подразделенности (G_{ST}). В дополнение к этому использовался пакет AMOVA с вычислением показателя подразделенности групп с использованием 1 000 раундов перестановок. На основании сравнения показателей информационно-энтропийной меры Шеннона (I), подразделённости групп Нея (F_{ST}), а также внутри- и межгрупповой изменчивости по результатам анализа молекулярных вариантов (AMOVA), полученных для *D. expansa*, с аналогичными показателями, приводимыми для *D. fragrans* (L.) Schott, сделано заключение о нецелесообразности деления *D. expansa* s.l. на два самостоятельных вида – *D. expansa* s. str. и *D. assimilis* S. Walker. Приводимые в публикации показатели всех индексов и рассчитанных величин могут быть использованы в качестве основы для сравнения в других работах, посвящённых генетической изменчивости видов рода *Dryopteris* на территории России.

Ключевые слова: папоротники, систематика, *Dryopteris dilatata* комплекс, ISSR-анализ, полиморфизм ДНК

Для цитирования: Малых С. Ю. Генетическое разнообразие российских и европейских представителей *Dryopteris expansa* (C. Presl) Fraser-Jenkins et Jermy (*Dryopteridaceae*) // Вестник Пермского университета. Сер. Биология. 2023. Вып. 3. С. 259–273. <http://dx.doi.org/10.17072/1994-9952-2023-3-259-273>.

Благодарности: исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-34-90102.

GENETICS

Original article

Genetic diversity of Russian and European individuals *Dryopteris expansa* (C. Presl) Fraser-Jenkins et Jeremy (*Dryopteridaceae*)

Sergey Yu. Malyh

Gymnasium № 31, Perm, Russia, MSU101@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-1478-2344>

Abstract. The results of molecular genetic analysis (ISSR-PCR) of 112 *Dryopteris expansa* (C. Presl) Fraser-Jenkins et Jermy specimens collected in Russia and Europe are presented. DNA was extracted using fresh material and material from the herbarium of the South Siberian Botanical Garden (ALTB): the collection of fresh material was carried out during expeditions (40 samples from Perm Krai, Moscow, Smolensk and Tver regions), the selection of material from the herbarium was carried out by removing a part of the dried frond (72 samples from various regions of Russia and Europe). An analysis of DNA polymorphism and the genetic structure of the

studied groups with the calculation of the proportion (P_{95}) of polymorphic loci, the absolute (n_a) number of alleles, the effective (n_e) number of alleles, the expected (H_E) heterozygosity and the information-entropy measure (I) of Shannon was carried out using the POPGENE 1.31 program. To describe the genetic structure of the studied groups, the following parameters were used: the expected proportion of heterozygous genotypes (H_T) in the entire group as a measure of its overall diversity; the expected proportion of heterozygous genotypes in a subgroup (H_S) as a measure of its internal diversity; the proportion of intergroup genetic diversity in the total diversity or the subdivision index (G_{ST}). In addition to this, the AMOVA package was used with the calculation of the subdivision index of groups using 1000 rounds of permutations. Based on a comparison of the indicators of the Shannon information measure (I), Nei fixation index (F_{ST}), as well as intra- and intergroup variability based on the results of the analysis of molecular variants (AMOVA) obtained for *D. expansa* with similar indicators given for *D. fragrans* (L.) Schott, a conclusion is made about the inexpediency of dividing *D. expansa* s.l. into two independent species – *D. expansa* s. str. and *D. assimilis* S. Walker. The indicators of all indices and calculated values given in the publication can be used as a basis for comparison in other works devoted to the genetic variability of species of the genus *Dryopteris* in Russia.

Keywords: Ferns, Systematics, *Dryopteris dilatata* complex, ISSR-analysis, DNA polymorphism

For citation: Malyh S. Yu. [Genetic diversity of Russian and European individuals *Dryopteris expansa* (C. Presl) Fraser-Jenkins et Jeremy (*Dryopteridaceae*)]. *Bulletin of Perm University. Biology*. Iss. 3 (2023): pp. 259-273. (In Russ.). <http://dx.doi.org/10.17072/1994-9952-2023-3-259-273>.

Acknowledgments: the reported study was funded by RFBR, project number 20-34-90102.

Введение

На территории России имеются виды рода *Dryopteris* Adans., чья идентификация осложнена рядом причин [Цвелев, 2003]: сходный морфологический облик представителей, полностью или практически полностью перекрывающиеся ареалы популяций, отсутствие уникальных черт скульптуры периспория и т.д. Особую сложность работа с такими природными образованиями принимает в том случае, если мы имеем дело не с парой, а с большим числом морфологически сходных видов. Примером совокупности таких видов является *Dryopteris dilatata* комплекс, включающий в настоящее время [Шмаков, 2009; Конспект флоры..., 2012], две (*Dryopteris expansa* (C. Presl) Fraser-Jenkins et Jermy, *D. dilatata* (Hoffm.) A. Gray) или три (*Dryopteris expansa*, *D. dilatata* и *D. assimilis* S. Walker) внешне практически неразличимые единицы.

История изменения представлений об объёме *Dryopteris dilatata* комплекса включает следующие ключевые даты:

В 1950 г. Ирен Мэнтон обнаружила, что таксономической единице, обозначаемой как *D. dilatata*, соответствует два разных цитотипа [Manton, 1950]. После обсуждения обозначенной проблемы [Walker, 1955, 1961], было предложено рассматривать данные цитотипы в ранге видов: *D. dilatata* s. str. и *Dryopteris assimilis* S. Walker. Основанием для этого послужили хромосомные числа: у *D. dilatata* s. str. – $2n = 128$, у *D. assimilis* – $2n = 64$. В последующие годы изменчивость морфологического облика *D. assimilis* многократно обсуждалась [Walker, Jermy, 1964; Döpp, Gätzi, 1964; Nannfeldt, 1966; Simon, Vida, 1966; Widén et al., 1967], однако каких-либо новых таксономически значимых признаков предложено не было. Из-за морфологического сходства *D. carthusiana* (Vill.) H. P. Fuchs (в то время *D. spinulosa* (Müll.) Watt), *D. dilatata*, *D. assimilis*, а также *D. cristata* (L.) A. Gray стали обозначаться как *Dryopteris spinulosa* комплекс.

В 1970 г. вышла статья [Crabbe et al., 1970] посвящённая *Dryopteris dilatata* комплексу в Британии, который, по мнению авторов, включает два аллотетраплоида с $2n = 128$ – *D. dilatata* и *D. carthusiana*, а также диплоид с $2n = 64$ – *D. assimilis*. Как видно, *Dryopteris dilatata* комплекс – это тот же *Dryopteris spinulosa* комплекс, из которого был исключён *D. cristata*.

В 1977 г. в номенклатурной записке «An Earlier Name for *Dryopteris assimilis*» [Fraser-Jenkins, Jermy, 1977] авторы доказывают, что типовой материал *N. expansum*, хранящийся в National Museum of Prague (PR), принадлежит к *D. assimilis*. Из этого следует, что для данного вида приоритетным эпитетом является *expansa*. Комбинация, предложенная авторами, следующая – *Dryopteris expansa* (C. Presl) Fraser-Jenkins & Jermy.

В 2003 г. была опубликована статья с несколько иным взглядом на объём комплекса [Цвелев, 2003]. В ней *D. expansa* s.l. разделён на два самостоятельных вида: *D. expansa* s. str. и *D. assimilis*. Последний, по мнению автора, обладает габитуальным сходством с *D. dilatata*, но отличается по более узким чешуйкам на черешках и менее интенсивным железистым опушением. Следует отметить, что данная статья является первой и, до последнего времени, последней специализированной работой, посвящённой непосредственно роду *Dryopteris* на территории России.

Начиная с 2015 г. автором настоящей статьи ведётся работа по инвентаризации рода *Dryopteris* на территории России. Исследования, проведённые за последние 9 лет, позволили сделать ряд заключений касательно видов, входящих в *Dryopteris dilatata* комплекс. Важнейшие из них [Малых, 2022]: имеется

всего один критерий (неморфологического характера), позволяющий достоверно различать *D. expansa* и *D. dilatata*; не было обнаружено ни одного критерия, позволяющего достоверно отличить выделяемый некоторыми специалистами *D. assimilis* от *D. expansa* и *D. dilatata*; *D. dilatata* – европейский тетраплоид, не проникающий на территорию России.

С целью поиска дополнительных данных, подтверждающих или опровергающих предположение о том, что *D. expansa* – это природное образование, которое не нуждается в дроблении (на *D. expansa* s.str. и *D. assimilis*, в частности), был проведён анализ генетического разнообразия¹ российских и европейских представителей данного вида.

Материал и методы

При выделении ДНК для проведения молекулярно-генетического анализа использовался свежий материал и материал из гербария Южно-сибирского ботанического сада (ALTB): сбор свежего материала осуществлялся во время экспедиций (40 образцов из Пермского края, Московской, Смоленской и Тверской областей), отбор материала из гербария происходил путём изъятия визуально-пригодной для анализа части засушенной вайи (72 образца из различных регионов России и Европы). Каждый из этих образцов был определён в одну из следующих групп: **Dr1** – Уральская, **Dr2** – Восточноевропейская, **Dr3** – Западноевропейская, **Dr4** – Алтайская, **Dr5** – Красноярский край и Республика Хакасия, **Dr6** – Бурятия и Иркутская область (табл. 1). В дальнейшем первые три группы будут обозначаться как европейские, оставшиеся три – как азиатские.

Таблица 1

Места сбора образцов *D. expansa*
[Collection locations of *D. expansa* samples]

Группа	Страна	Место сбора	Координаты
Dr1	Россия	Пермский край, Кишертский район, деревня Частые, УНБ «Предуралье», липовый лес	N 57° 22'35 E 57° 09'26
Dr1	Россия	Пермский край, Кишертский район, деревня Частые, УНБ «Предуралье», липовый лес	N 57° 22'35 E 57° 09'26
Dr1	Россия	Пермский край, Кишертский район, деревня Частые, УНБ «Предуралье», липовый лес	N 57° 22'35 E 57° 09'26
Dr1	Россия	Пермский край, Кишертский район, деревня Частые, УНБ «Предуралье», липовый лес	N 57° 22'35 E 57° 09'26
Dr1	Россия	Пермский край, Кишертский район, деревня Частые, УНБ «Предуралье», липовый лес	N 57° 22'35 E 57° 09'26
Dr1	Россия	Пермский край, Кишертский район, деревня Частые, УНБ «Предуралье», липовый лес	N 57° 22'35 E 57° 09'26
Dr1	Россия	Пермский край, Кишертский район, деревня Частые, УНБ «Предуралье», липовый лес	N 57° 22'35 E 57° 09'26
Dr1	Россия	Пермский край, Кишертский район, деревня Частые, УНБ «Предуралье», липовый лес	N 57° 22'35 E 57° 09'26
Dr1	Россия	Пермский край, Кишертский район, деревня Частые, УНБ «Предуралье», липовый лес	N 57° 22'35 E 57° 09'26
Dr1	Россия	Пермский край, Кишертский район, деревня Частые, УНБ «Предуралье», липовый лес	N 57° 22'35 E 57° 09'26
Dr1	Россия	Пермский край, Горнозаводский район, заповедник Басеги, вблизи Северной вершины, пушицево-сфагновое болото	N 58° 56'15 E 58° 26'05
Dr1	Россия	Пермский край, Горнозаводский район, заповедник Басеги, вблизи Северной вершины, пушицево-сфагновое болото	N 58° 56'15 E 58° 26'05
Dr1	Россия	Пермский край, Горнозаводский район, заповедник Басеги, вблизи Северной вершины, пушицево-сфагновое болото	N 58° 56'15 E 58° 26'05
Dr1	Россия	Пермский край, Горнозаводский район, заповедник Басеги, вблизи Северной вершины, пушицево-сфагновое болото	N 58° 56'15 E 58° 26'05
Dr1	Россия	Пермский край, Горнозаводский район, заповедник Басеги, вблизи Северной вершины, пушицево-сфагновое болото	N 58° 56'15 E 58° 26'05
Dr1	Россия	Пермский край, Горнозаводский район, заповедник Басеги, вблизи Северной вершины, еловый лес	N 58° 56'39 E 58° 31'48
Dr1	Россия	Пермский край, Горнозаводский район, заповедник Басеги, вблизи Северной вершины, еловый лес	N 58° 56'39 E 58° 31'48

¹ Анализ литературы показал, что в зарубежной и отечественной печати нет данных, содержащих оценки генетической изменчивости *D. expansa* с помощью метода ISSR PCR. Российские работы, где обсуждается генетическая изменчивость относительно близкородственных групп растений, единичны. Среди них можно выделить работы И.И. Гуреевой, Д.С. Феоктистова и А.А. Кузнецова [2018], а также З.Е. Грушецкой с соавторами [Грушецкая и др., 2013].

Продолжение табл. 1

Группа	Страна	Место сбора	Координаты
Dr3	Австрия	Земля Штирия, Глайнские Альпы, Танцмайстерграбен	N 47° 17'41 E 14° 59'45
Dr3	Австрия	Земля Штирия, Дойчландсберг, долина р. Лассниц	N 46° 48'37 E 15° 11'53
Dr3	Австрия	Земля Штирия, Хохшваб, Афленцер Штарицен, Зееберг	N 47° 37'54 E 15° 16'32
Dr3	Австрия	Земля Штирия, Хохшваб, Афленцер Штарицен, Зееберг	N 47° 37'54 E 15° 16'32
Dr3	Австрия	Земля Штирия, Глайнские Альпы, Танцмайстерграбен	N 47° 17'41 E 14° 59'45
Dr3	Германия	Северная Вестфалия, окр. г. Текленбург, буковый лес, в 20 км западнее г. Оснабрюк	N 52° 12'45 E 07° 46'44
Dr3	Германия	Земля Саксония-Анхальт, Вернигероде, горы Харц, окр. п. Ширке	N 51° 45'55 E 10° 39'58
Dr4	Россия	Республика Алтай, Чемальский район, долина реки Куюм	N 51° 30'00 E 85° 59'00
Dr4	Россия	Республика Алтай, Чемальский район, басс. р. Куба, дол. р. Каяс близ устья, скл. сев. экс	N 51° 20'00 E 86° 24'00
Dr4	Россия	Республика Алтай, окр. с. Иогач, западный склон	N 51° 46'00 E 87° 16'00
Dr4	Россия	Республика Алтай, окр. с. Иогач, западный склон	N 51° 46'00 E 87° 16'00
Dr4	Россия	Республика Алтай, окр. с. Иогач, западный склон	N 51° 46'00 E 87° 16'00
Dr4	Россия	Республика Алтай, окр. с. Иогач, западный склон	N 51° 46'00 E 87° 16'00
Dr4	Россия	Республика Алтай, Турочакский район, дол. р. Клык, окр. пос. Бийка	N 51° 54'00 E 87° 39'00
Dr4	Россия	Республика Алтай, Турочакский район, долина р. Бия, правый берег выше с. Усть-Пыжа	N 51° 50'00 E 87° 07'00
Dr4	Россия	Республика Алтай, Турочакский район, берег Телецкого озера, устье реки Бол. Эстюбе	N 51° 44'40 E 87° 26'40
Dr4	Россия	Республика Алтай, Турочакский район, дол. р. Бия, правый берег, выше села Усть-Пыжа	N 51° 50'00 E 87° 07'00
Dr4	Россия	Республика Алтай, Турочакский район, дол. р. Бия, правый берег, выше села Усть-Пыжа	N 51° 50'00 E 87° 07'00
Dr4	Россия	Алтайский край, Чарышский район, вер. теч. р. Сентелек, оз. Тёплое	N 51° 02'50 E 83° 39'00
Dr4	Россия	Алтайский край, Чарышский район, дол. р. Чарыш, левый берег, в 2 км ниже уст. р. Б. Татарка	N 51° 09'00 E 83° 54'00
Dr4	Россия	Алтайский край, Чарышский район, вер. теч. р. Сентелек, оз. Тёплое	N 51° 02'50 E 83° 39'00
Dr4	Россия	Алтайский край, Чарышский район, 5 км на юго-восток от с. Покровка. Смешанный лес в пойме р. Сентелек	—
Dr4	Россия	Алтайский край, Чарышский район, Башцелакский хр., сев-зап. макросклон г. Бахарева	N 51° 40'00 E 83° 43'00
Dr4	Россия	Алтайский край, Тигирецкий хребет, верх. р. Бол. Тигирек	N 51° 03'93 E 82° 59'24
Dr4	Россия	Алтайский край, Тигирецкий хребет, верх. р. Бол. Тигирек	N 51° 03'93 E 82° 59'24
Dr4	Россия	Алтайский край, Тигирецкий хребет, верх. р. Бол. Тигирек	N 51° 03'93 E 82° 59'24
Dr5	Россия	Красноярский край, хр. Борус, перевал из басс. р. Бол. Шушь в р. Бол. Берёзовая, южный макросклон	N 52° 56'00 E 92° 06'00
Dr5	Россия	Красноярский край, басс. р. Бол. Берёзовая, в 6 км выше уст. р. Безымянка, лев. берег, сев. макросклон	N 52° 54'00 E 92° 06'00
Dr5	Россия	Красноярский край, басс. р. Бол. Берёзовая, в 6 км выше уст. р. Безымянка, лев. Берег, сев. макросклон	N 52° 54'00 E 92° 06'00
Dr5	Россия	Красноярский край, басс. р. Бол. Берёзовая, в 6 км выше уст. р. Безымянка, лев. Берег, сев. макросклон	N 52° 54'00 E 92° 06'00
Dr5	Россия	Красноярский край, Шушенский район, хр. Борус, басс. р. Большая Шушь, дол. р. Корск	N 52° 48'00 E 92° 05'00
Dr5	Россия	Красноярский край, Шушенский район, хр. Борус, басс. р. Большая Шушь, дол. р. Корск	N 52° 48'00 E 92° 05'00
Dr5	Россия	Красноярский край, Шушенский район, хр. Борус, басс. р. Большая Шушь, дол. р. Корск	N 52° 48'00 E 92° 05'00
Dr5	Россия	Красноярский край, Шушенский район, хр. Борус, басс. р. Большая Шушь, дол. р. Корск	N 52° 48'00 E 92° 05'00
Dr5	Россия	Красноярский край, Шушенский район, хр. Борус, басс. р. Большая Шушь, дол. р. Корск	N 52° 48'00 E 92° 05'00
Dr5	Россия	Республика Хакасия, хр. Алан, северо-восточный отрог г. Бабик, склон юго-восточной экспозиции	N 52° 56'00 E 91° 23'00
Dr5	Россия	Республика Хакасия, хр. Алан, северо-восточный отрог г. Бабик, склон юго-восточной экспозиции	N 52° 56'00 E 91° 23'00

Группа	Страна	Место сбора	Координаты
Dr5	Россия	Республика Хакассия, хр. Алан, северо-восточный отрог г. Бабик, склон юго-восточной экспозиции	N 52° 56'00 E 91° 23'00
Dr5	Россия	Республика Хакассия, хр. Алан, северо-восточный отрог г. Бабик, склон юго-восточной экспозиции	N 52° 56'00 E 91° 23'00
Dr5	Россия	Республика Хакассия, хр. Алан, северо-восточный отрог г. Бабик, склон юго-восточной экспозиции	N 52° 56'00 E 91° 23'00
Dr5	Россия	Республика Хакассия, хр. Алан, северо-восточный отрог г. Бабик, склон юго-восточной экспозиции	N 52° 56'00 E 91° 23'00
Dr5	Россия	Республика Хакассия, хр. Алан, северо-восточный отрог г. Бабик, склон юго-восточной экспозиции	N 52° 56'00 E 91° 23'00
Dr5	Россия	Республика Хакассия, Джойский хр., перевал из р. Клай в р. Уй, северный макросклон	N 52° 54'00 E 91° 12'00
Dr5	Россия	Республика Хакассия, Джойский хр., перевал из р. Клай в р. Уй, северный макросклон	N 52° 54'00 E 91° 12'00
Dr6	Россия	Иркутская область, Слюдянский район, дол. р. Слюдянка, в 9 км выше гор. Слюдянка, лев. берег, тайга	N 51° 34'77 E 103°37'38
Dr6	Россия	Иркутская область, Слюдянский район, дол. р. Слюдянка, в 9 км выше гор. Слюдянка, лев. берег, тайга	N 51° 34'77 E 103°37'38
Dr6	Россия	Иркутская область, Слюдянский район, дол. р. Слюдянка, в 9 км выше гор. Слюдянка, лев. берег, тайга	N 51° 34'77 E 103°37'38
Dr6	Россия	Иркутская область, Слюдянский район, дол. р. Слюдянка, в 8 км выше гор. Слюдянка, лев. берег, тайга	N 51° 35'09 E 103°37'70
Dr6	Россия	Иркутская область, Слюдянский район, дол. р. Слюдянка, в 8 км выше гор. Слюдянка, лев. берег, тайга	N 51° 35'09 E 103°37'70
Dr6	Россия	Республика Бурятия, оз. Байкал, Прибайкальский район, окр. пос. Турка	N 52° 57'48 E 108°14'09
Dr6	Россия	Республика Бурятия, оз. Байкал, Прибайкальский район, окр. пос. Турка	N 52° 57'48 E 108°14'09
Dr6	Россия	Бурятия, Кабанский район, хр. Хамар-Дабан, дол. р. Бол. Мамай в верхнем течении	N 51° 23'70 E 104°50'29
Dr6	Россия	Бурятия, Кабанский район, хр. Хамар-Дабан, дол. р. Бол. Мамай в верхнем течении	N 51° 23'70 E 104°50'29
Dr6	Россия	Бурятия, Кабанский район, хр. Хамар-Дабан, дол. Бол. Мамай в верхнем течении	N 51° 23'70 E 104°50'29
Dr6	Россия	Бурятия, Кабанский район, хр. Хамар-Дабан, дол. Бол. Мамай в верхнем течении	N 51° 24'37 E 104°49'58
Dr6	Россия	Бурятия, Кабанский район, хр. Хамар-Дабан, дол. Бол. Мамай в верхнем течении	N 51° 24'37 E 104°49'58
Dr6	Россия	Бурятия, Кабанский район, хр. Хамар-Дабан, дол. Бол. Мамай в верхнем течении	N 51° 24'37 E 104°49'58

Выделение ДНК осуществлялось с помощью СТАВ по методике С.О. Роджерса и А.Дж. Бендича [Rogers, Bendich, 1985] с добавлением PVPP для связывания полифенолов. Навеска растительного материала не превышала 20 мг. Для оценки качества и концентрации выделенной ДНК использовался прибор Spectrofotometr™ NanoDrop 2000 («ThermoFisher Scientific», США), а также электрофорез в агарозном геле (2%). Все пробы, которые были отобраны для дальнейшего анализа, имели концентрацию ДНК 180 нг/мкл и выше (по оптическому поглощению препарата при длине волны 260 нм). Чистота препарата A_{260}/A_{280} (соотношение между оптическим поглощением нуклеиновых кислот при A_{260} и оптическим поглощением белков при длине волны 280 нм) была в пределах от 1.9 до 2.0.

Во время осуществления поиска наиболее эффективных праймеров, были протестированы 22 нуклеотидные последовательности (табл. 2). Первые 16 взяты из работ [Schneller, Krattinger, 2010; Bouchard et al., 2017], посвящённых ISSR-PCR анализу папоротниковидных. Последние 6 найдены в публикации, посвящённой цветковому растению [Светлакова и др., 2012]. Все отобранные для дальнейшей работы праймеры (табл. 2) показали свою эффективность, т.е. инициировали синтез наибольшего числа фрагментов ДНК и обеспечивали воспроизводимость результатов PCR.

Аmplификация ДНК проводилась в термоциклере GeneAmp PCR System 9700 («Applied Biosystems», США) по следующей программе: денатурация – 2 мин. при 94°C; первые пять циклов – 20 сек. при 94°C, затем 10 сек. при t° отжига праймера и 10 сек. при 72°C; последующие тридцать пять циклов – 5 сек. при 94°C, затем 5 сек. при t° отжига праймера и 5 сек. при 72°C; элонгация – 2 мин. при 72°C. Температура отжига праймеров варьировала от 59°C до 62°C. Продукты амплификации окрашивались бромистым этидием, разделялись электрофорезом в 2% агарозном геле с 1x TBE буфером (Tris-Borate-EDTA) и фо-

тографировались в ультрафиолетовом свете с применением системы GelDoc XR («Bio-Rad», США). Для определения длины фрагментов ДНК использовался маркер молекулярного веса ДНК Step 100 Long (14 фрагментов от 100 до 3 000 п.н., «Биолабмикс», Россия) и программа Quantity One («Bio-Rad», США).

Таблица 2

Протестированные ISSR-PCR праймеры
[Tested ISSR-PCR primers]

Праймер		t отжига, °C	Праймер		t отжига, °C
PRM_1	(AC)₈G	62	PRM_12	(CA) ₈ AG	59
PRM_2	(AG) ₈ YT	62	PRM_13	(GT) ₈ CC	56
PRM_3	(CA)₈RC	62	PRM_14	(AC) ₉ TG	59
PRM_4	(AC) ₈ YT	62	PRM_15	(CA)₈CC	59
PRM_5	(AC)₈YG	62	PRM_16	(CA) ₈ CG	59
PRM_6	(AC) ₇ AACC	62	M_1	(AC) ₈ CG	56
PRM_7	(CT) ₈ GG	56	M_2	(AC) ₈ CC	56
PRM_8	(CA)₈GG	59	M_3	(AC) ₈ CT	54
PRM_9	(GA) ₈ TC	58	X_9	(ACC) ₆ G	62
PRM_10	(CT) ₈ GC	59	X_10	(AGC) ₆ C	64
PRM_11	(CA) ₉ AC	58	X_11	(AGC) ₆ G	64

Примечание. Полу жирным шрифтом выделены эффективные ISSR-PCR праймеры.

Всего проанализирован полиморфизм 112 растений с пятью праймерами (560 проб). Для проверки достоверности полученных результатов постановка PCR повторялась не менее двух раз.

Для количественной оценки полиморфизма и определения генетической структуры изученных групп особей, полученные данные были представлены в виде матрицы бинарных признаков, в которой наличие или отсутствие в PCR спектрах одинаковых по размеру фрагментов рассматривалось как состояние 1 или 0. При этом анализировались только воспроизводимые фрагменты, полиморфизм по интенсивности не учитывался.

Компьютерный анализ полиморфизма ДНК и генетическая структура исследованных групп с вычислением доли (P_{95}) полиморфных локусов [Williams, 1990], абсолютного (n_a) числа аллелей, эффективного (n_e) числа аллелей [Kimura, Crow, 1964], ожидаемой (H_E) гетерозиготности [Nei, 1987] и информационно-энтропийной меры (I) Шеннона [Lewontin, 1972], проведены с помощью программы POPGENE 1.31 [Yeh et al., 1999]. Для описания генетической структуры исследованных групп² были использованы следующие параметры [Nei, 1975]: ожидаемая доля гетерозиготных генотипов (H_T) во всей группе, как мера её общего разнообразия; ожидаемая доля гетерозиготных генотипов в подгруппе (H_S), как мера её внутреннего разнообразия; доля межгруппового генетического разнообразия в общем разнообразии или показатель подразделенности (G_{ST}). В дополнение к этому использовался пакет AMOVA (Analysis of Molecular Variance) с вычислением Φ_{PT} -индекса (показателя подразделенности групп) с использованием 1 000 раундов перестановок [Excoffier et al., 1992]. Данный показатель был рассчитан с применением специализированного макроса GenAlEx6 для MS-Excel [Peakall, 2005]. При этом в качестве групп выступали совокупности особей, обозначенные как *Dr1–Dr6*, а в качестве регионов (для обсуждения межрегиональной подразделенности) европейская и азиатская части Евразии.

Результаты исследования

В общей выборке *D. expansa* было выявлено 72 фрагмента ДНК, 69 из которых были полиморфными ($P_{95}=0.958$). Их размеры варьировали в зависимости от праймера (рис. 1): от 500 п.н. (праймеры PRM_1 и

² Вопрос определения границ популяций растений «встречается с серьезными, подчас непреодолимыми трудностями» [Юрцев, 1987, с. 581]. Выделение амфимиктических популяций у папоротников с огромным сплошным ареалом – *D. expansa* как раз принадлежит к таким видам – затруднено, поскольку не существует работ, демонстрирующих невозможность переноса спор за пределы фитоценоза или какой-либо другой фитоценотической единицы. Напротив, имеется ряд публикаций [Perrie et al., 2010; de Groot et al., 2012], где показан перенос спор на сотни и тысячи километров от материнского растения. В добавление к этому жизнеспособность и всхожесть спор папоротников сильно превосходит аналогичные показатели, фиксируемые у пыльцы семенных растений. В связи с этим в данной работе каждая из шести исследованных групп рассматривается как природное образование, характеризующееся панмиксией входящих в него особей и, следовательно, обладающее единым генофондом. Последнее – важная характеристика, позволяющая, пусть и с определёнными допущениями, использовать в данной работе показатель подразделенности популяций (G_{ST}). Также, ряд авторов отмечает [Holsinger, Weir, 2009; Кузнецов, 2020], что если задачей исследования является анализ *текущего* генетического разнообразия (без построения филогенетических деревьев, основанных на генетических дистанциях), статистики Нея могут быть хорошей мерой дифференциации *любых* выборок живых организмов (разновидностей, линий, групп).

PRM_5) до 2 000 п.н. (праймеры PRM_3 и PRM_5). При этом доля полиморфных локусов в группах, установленная с помощью разных праймеров, варьировала от 0.167 (праймер PRM_15, в группе *Dr1*) до 1 (праймер PRM_8 и PRM_1, в группах *Dr2*, *Dr3*). Праймер PRM_15 выявил самые низкие значения полиморфизма для общей выборки ($P_{95}=0.917$), а праймеры PRM_1 и PRM_8 – самые высокие ($P_{95}=1.000$).

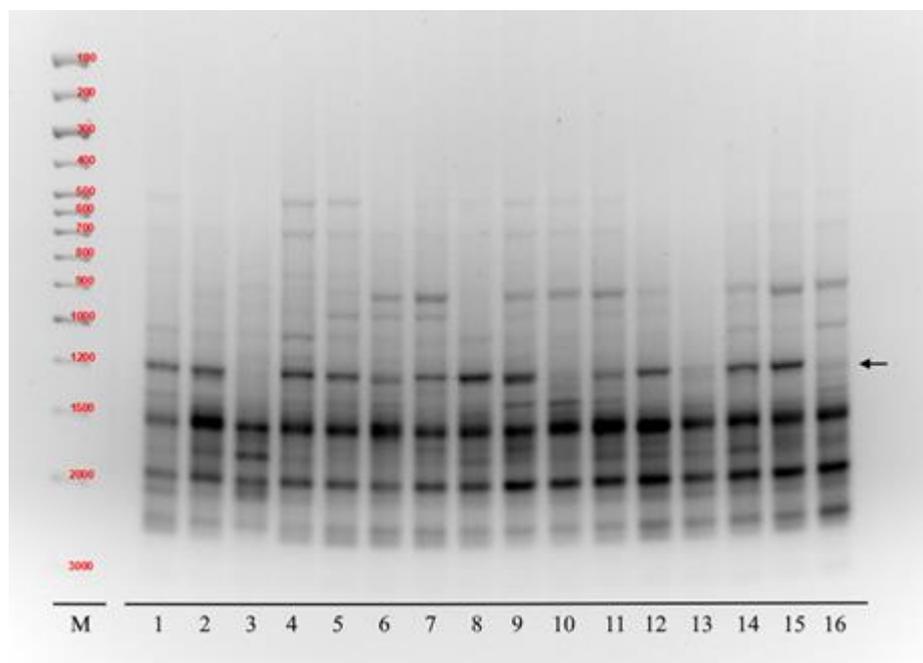


Рис. 1. Пример ISSR-PCR спектров уральских представителей *D. expansa* с праймером PRM_5 ((AC)₈ YG); Столбец №1 – маркер молекулярной массы (100–3 000 bp), стрелкой обозначен один из полиморфных фрагментов

[An example of ISSR-PCR spectra of Ural representatives of *D. expansa* with with primer PRM_5 ((AC)₈ YG); Column No. 1 is a marker of molecular weight (100-3 000 bp), an arrow indicates a polymorphic fragment]

Доля полиморфных локусов ДНК (P_{95}), полученных в результате PCR с пятью праймерами, на общую выборку составила 0.958. Данный показатель выше ($P_{95} = 0.902–0.839$) в группах *Dr1–Dr4*, и ниже ($P_{95} = 0.714–0.696$) в *Dr5* и *Dr6*. Из 72 фрагментов ДНК 2 (2.78%) являются уникальными, так как каждый из них представлен только в какой-то одной из популяций, а 70 (97.22%) – общими для всех десяти исследованных популяций. Уникальные фрагменты ДНК отмечены в группах *Dr2* и *Dr3* (табл. 3).

Таблица 3

Генетическое разнообразие рассматриваемых групп *D. expansa*
[Genetic diversity of the *D. expansa* groups]

Показатель / группа	<i>Dr1</i>	<i>Dr2</i>	<i>Dr3</i>	<i>Dr4</i>	<i>Dr5</i>	<i>Dr6</i>	На общую выборку
P_{95}	0.839	0.848	0.902	0.857	0.714	0.696	0.958
H_E	0.225 (0.025)	0.311 (0.022)	0.262 (0.022)	0.224 (0.022)	0.131 (0.021)	0.135 (0.022)	0.215 (0.010)
n_a	1.375 (0.098)	1.736 (0.071)	1.639 (0.087)	1.500 (0.095)	1.056 (0.106)	1.069 (0.105)	1.396 (0.040)
n_e	1.396 (0.048)	1.552 (0.044)	1.442 (0.042)	1.371 (0.041)	1.218 (0.039)	1.229 (0.040)	1.368 (0.018)
I	0.331 (0.035)	0.457 (0.030)	0.396 (0.030)	0.340 (0.032)	0.200 (0.031)	0.205 (0.032)	0.322 (0.014)
Un	0	1	1	0	0	0	2

Примечание. P_{95} – доля полиморфных локусов; H_E – ожидаемая гетерозиготность; n_a – абсолютное число аллелей на локус; n_e – эффективное число аллелей на локус; I – информационно-энтропийная мера Шеннона; у всех вышеуказанных параметров в скобках даны стандартные отклонения; Un – число уникальных фрагментов ДНК.

Поскольку гетерозиготность является одним из критериев оценки генетической изменчивости различных групп организмов, выявление её значений является важным элементом настоящей работы. Полученные значения следующие: средняя ожидаемая гетерозиготность (H_E) на общую выборку *Dryopteris* – 0.215. В группе *Dr2* ($H_E = 0.311$) этот показатель достигает наибольших значений, а в группе *Dr5* ($H_E = 0.131$) – наименьших. Для вычисления значения эффективного числа аллелей был произведён подсчёт

абсолютного числа аллелей (n_a). Данное значение для общей выборки составило – 1.396. Значения этого показателя в группе **Dr2** ($n_a = 1.735$) является максимальным среди имеющихся, а в группе **Dr5** ($n_a = 1.056$) – минимальным. Среди исследованных групп эффективное число аллелей выше в **Dr2** ($n_e = 1.551$), а ниже в **Dr6** ($n_e = 1.229$) и **Dr5** ($n_e = 1.218$), и в среднем составляет 1.368.

Согласно следующему важному показателю (информационно-энтропийная мера Шеннона) наибольшие значения разнообразия наблюдаются в выборке **Dr2** ($I = 0.457$), а наименьшее – в выборках **Dr5** и **Dr6** ($I = 0.200$ и 0.205). Данные различия носят достоверный характер.

Анализ генетической структуры изученных групп *Dryopteris* выявил, что ожидаемая доля гетерозиготных генотипов (H_T) на общую выборку составила 0.268, а ожидаемая доля гетерозиготных генотипов в отдельной группе по всем локусам (H_S) равна 0.212. Коэффициент подразделённости Нея (G_{ST}) показал, что на межгрупповую компоненту приходится 0.214 всего генетического разнообразия. Наибольшая подразделённость между группами *Dryopteris* установлена с использованием праймера PRM_15 (табл. 4).

Таблица 4

Генетическая структура и дифференциация рассматриваемых групп *D. expansa*
[Genetic structure and differentiation of the *D. expansa* groups]

ISSR-PCR праймер	H_T	H_S	G_{ST}
PRM_1	0,308 (0,018)	0,254 (0,016)	0,175
PRM_3	0,256 (0,028)	0,196 (0,015)	0,259
PRM_5	0,242 (0,018)	0,211 (0,018)	0,127
PRM_8	0,313 (0,021)	0,245 (0,014)	0,216
PRM_15	0,222 (0,022)	0,156 (0,010)	0,295
Вся выборка	0,268 (0,020)	0,212 (0,016)	0,214

Примечание. H_T – ожидаемая доля гетерозиготных генотипов в общей группе; H_S – ожидаемая доля гетерозиготных генотипов в отдельной группе; в скобках даны стандартные отклонения. G_{ST} – показатель подразделённости групп.

Также генетическая дифференциация между группами определялась при помощи пакета AMOVA (Analysis of Molecular Variance, анализ молекулярных вариантов) на основе Φ_{PT} -индекса, который показывает долю межгруппового генетического разнообразия в общем разнообразии и хорошо подходит для сравнения бинарных данных. Анализ молекулярных вариантов (AMOVA) подтвердил, что большая часть всего генетического разнообразия сосредоточена внутри рассматриваемых групп (72%), на долю межгрупповой изменчивости приходится 20% всего наблюдаемого генетического разнообразия. При сравнении двух регионов (Европа и Азия) обнаруживается, что их вклад в общий показатель изменчивости достаточно низок – всего 8% (табл. 5).

Таблица 5

Оценка внутри- и межгрупповой изменчивости *D. expansa* по результатам анализа молекулярных вариантов (AMOVA)

[Intra- and intergroup variability of *D. expansa* based on the results of the analysis of molecular variants (AMOVA)]

Показатель подразделённости	df	SS	MS	Дисперсия	%	p
Между регионами	1	105.756	105.756	0.955	8%	< 0.001
Между группами	4	195.293	48.823	2.282	20%	< 0.001
Внутри групп	104	881.442	8.475	8.475	72%	< 0.001

Примечание. df – степени свободы, SS – сумма квадратов, MS – среднее квадратическое отклонение, % – процент общего генетического разнообразия, p – уровень значимости при использовании 1 000 раундов перестановок.

Ключевыми показателями, которые будут использованы при обсуждении вопроса дробления *D. expansa* на два самостоятельных вида, являются: информационно-энтропийная мера Шеннона (I), коэффициент подразделённости Нея (G_{ST}) и оценка внутри- и межгрупповой изменчивости по результатам анализа молекулярных вариантов (AMOVA). Остальные показатели даются для справки. Они могут выступить основой для сравнения при проведении молекулярно-генетических исследований других представителей рода *Dryopteris* на территории России.

Обсуждение

К настоящему времени в научной среде сформировалось понимание, что данные молекулярно-генетического анализа в отрыве от оценки изменчивости морфологических структур не могут являться критерием для деления одного вида на несколько более мелких или наоборот – объединения двух близ-

ких видов в один³. При этом сами данные (абсолютные значения), используемые при работе с генетическим разнообразием, также зачастую малоинформативны, поскольку только при сравнении показателей открывается возможность для установления границ между категориями *высокая*, *средняя* и *низкая* генетическая подразделённость, *высокий*, *средний* и *низкий* полиморфизм группы и т.д.

К сожалению, корректное сравнение интересующих нас показателей возможно не всегда. Как правило, в свободной печати встречаются данные, которые лишь отчасти соответствуют параметрам исследования [Dong et al., 2008; Schneller, Krattinger, 2010; Animasaun et al., 2018]: проведён анализ родственных групп растений, организована работа со сходными объёмами выборки и сходными размерами площадей сбора материала, использовался тот же метод обработки результатов и т.д.

Принимая во внимание всё вышесказанное, перейдём к обозначению важных особенностей данной работы:

1. Анализ литературы показал, что только одна публикация содержит необходимые для сравнения показатели, которые были получены для вида, относящегося к роду *Dryopteris*. По этой причине основой для сравнения и обсуждения результатов выступит единственная работа – «Contrasting patterns of genetic variation in central and peripheral populations of *Dryopteris fragrans* and implications for colonization dynamics and conservation» [Bouchard et al., 2017]. Прочие цитируемые ниже работы приводятся для справки, их данные не могут выступать основой для корректного сравнения.

2. В рамках настоящего исследования показатели дифференциации популяций – статистика Нея (G_{ST}) и информационно-энтропийная мера Шеннона (I) – это дополнительный критерий при работе с выделением или объединением видов: в том случае, если группа обнаруживает крайнюю изменчивость на генетическом уровне⁴, можно предполагать, что она находится в активной фазе видообразования и нам следует работать над выявлением дополнительных признаков, позволяющих разделить эту группу *объективно*. В противном случае – если показатели дифференциации на низком уровне – имеет смысл рассматривать данную группу в качестве неделимой единицы⁵.

3. Обсуждаемые данные получены с использованием одного типа молекулярных маркеров, а потому все заключения, сделанные на основании этих данных, в известной степени ограничены.

Далее остановимся на ключевых показателях генетической дифференциации популяций и их использовании для работы с группами *D. expansa*.

Значения **информационно-энтропийной меры Шеннона (I)**⁶, полученные при анализе шести групп представителей рода *Dryopteris*, продемонстрировали значения 0.322 на общую выборку, которая включала растения из таких удалённых регионов как Европа, Урал и Алтай. Значение этого показателя можно считать низким, поскольку, сравнивая его с литературными данными, мы обнаруживаем, что *D. fragrans* демонстрирует чуть более высокий уровень разнообразия – 0.343 при анализе не столь удалённых Канадских и Американских популяций (регион Нунавик и штаты Нью Йорк, Нью Хэмпшир, Вермонт, Мэн). Наибольшее расстояние (по прямой) между данными популяциями не превышает 2 000 км, тогда как расстояние между группами, рассматриваемыми в данной работе, составляет более 6 500 км.

Принимая во внимание то обстоятельство, что споры папоротниковидных могут распространяться на расстояния нескольких сотен и даже тысяч километров [Pettie et al., 2010; de Groot et al., 2012], можно сделать предположение, что между удалёнными популяциями идёт обмен генетической информацией. Данные о внутригрупповой, межгрупповой и межрегиональной подразделённости (рис. 2) свидетельствуют о том, что такой вариант не исключён, поскольку вклад межрегиональной изменчивости в изменчивость общей выборки крайне низок – всего 8%. Напротив, аналогичные результаты, полученные для *D. fragrans*, демонстрируют, что межрегиональные различия (Канада и Америка) достигают порядка 70%, межпопуляционные различия – около 18% и, наконец, внутривидовые всего 12%. Если исключить межрегиональный перенос генетической информации, остаётся предполагать низкую динамику изменчивости *D. expansa* в сравнении с *D. fragrans*.

³ Об этом, в частности, свидетельствует сравнение данных, полученных в рамках молекулярно-генетических исследований, с классическими работами по систематике той или иной группы папоротников [см, например, Sessa et al., 2012; Vujnoch, 2015]. В таких работах данные молекулярной генетики являются *дополнительными* в том смысле, что они корректируют классическую систему, а не формируют новую с нуля.

⁴ Например, можно говорить о разных географических расах, если чётко прослеживается, что *общая* изменчивость исследованных экземпляров растений складывается в основном из различий особей *между* удалёнными популяциями, а не особями *внутри* одной ценопопуляции.

⁵ Из положений синтетической теории эволюции следует, что новые виды возникают в результате дифференциации популяций. Мы можем фиксировать этот процесс или его результат как изменение генофонда группы особей или их морфологического облика.

⁶ Данное значение есть степень нашей неосведомлённости о группе, что соразмерно её сложности или внутреннему разнообразию [Кузнецов, 2022].



Рис. 2. Диаграмма генетической изменчивости рассматриваемых представителей *D. expansa*, построенная на основании полиморфизма последовательностей ДНК
 [A diagram of the genetic variability of the representatives of *D. expansa*, based on the polymorphism of DNA sequences]

Несмотря на достаточно высокое *абсолютное* значение показателя индекса Шеннона, оно всё равно на *относительно* низком уровне, поскольку географические расстояния между рассматриваемыми группами очень велики. Среди других папоротников, которые были исследованы с помощью ISSR праймеров, значение информационно-энтропийной меры Шеннона, следующие:

1. *Botrychium pumila* (в пределах от 0.158 до 0.246 для различных популяций) [Camacho, Liston, 2001]. В данном исследовании анализировалась три популяции *Botrychium pumicola* (всего 99 особей) в национальном лесу Дешут, США. Расстояния между ними не превышали нескольких километров.

2. *Ceratopteris thalictroides* (в пределах от 0.100 до 0.230 для различных популяций) [Dong et al. 2008]. В данном исследовании анализировалось 13 популяций *Ceratopteris thalictroides* (всего 225 особей) из различных регионов Китая (Центральный, Западный, Южный, Юго-Восточный и о. Хайнань). Расстояние между популяциями не превышает 1 500 км.

3. *Ceratopteris pteridoides* (в пределах от 0.195 до 0.265 для различных популяций) [Dong et al., 2010]. В данном исследовании проанализированы 5 популяций *Ceratopteris pteridoides* (всего 72 особей) из регионов Хубей и Цзянси, Китай. Расстояние между ними не превышает 500 км.

Аналогичные значения имеет **показатель подразделённости групп Нея (F_{ST})**. В исследовании *D. fragrans* общее значение этого показателя было на уровне 0.213. Значение данного показателя для *D. expansa* – 0.214 (для всей выборки). Если учесть, что одним из критериев вида, находящегося в состоянии активного видообразования, является уровень его генетической разнородности, то, проанализировав полученные результаты (F_{ST}) и (I), можно прийти к выводу, что либо оба вида (*D. expansa* и *D. fragrans*) находятся в состоянии активного видообразования, либо оба вида – это эволюционно стабилизировавшиеся группы со сходным относительно высоким⁷ уровнем генетической дифференциации. Последняя точка зрения кажется более предпочтительной, поскольку находит подтверждение в рамках классического анализа морфологических признаков⁸.

Заключение

Сравнение показателей индексов Шеннона (I), Нея (F_{ST}), а также низкие уровни различий на генетическом уровне между представителями всех исследованных групп позволяют заключить, что деление такого вида как *D. expansa* s. l. на *D. expansa* s. str. и *D. assimilis* нецелесообразно.

⁷ Хочется отметить, что установление объективно выделенных границ для таких категорий, как *высокая* и *низкая* генетическая разнородность для той или иной группы, популяции и, наконец, вида внутри рода *Dryopteris*, станет возможна только после анализа всех или большей части видов данного рода. Особенно интересны в этом отношении другие представители *D. dilatata* комплекса.

⁸ Подробное обсуждение данных признаков было сделано ранее [Малых, 2022].

1. Используемая в настоящем исследовании информационно-энтропийная мера Шеннона (I) демонстрирует значение 0.322 на всю выборку для шести исследованных групп. Поскольку выборка включала растения из таких удалённых регионов как Европа, Урал и Алтай, значение этого показателя можно считать низким. Сравнивая значение меры Шеннона с литературными данными, мы обнаруживаем, что *D. fragrans* демонстрирует чуть более высокий уровень разнообразия – 0.343 при анализе не столь удалённых канадских и американских популяций (регион Нунавик и штаты Нью Йорк, Нью Хэмпшир, Вермонт, Мэн). Здесь стоит обратить внимание на то, что показатели данных видов сопоставимы, т.е. *D. expansa* (предполагаемая к разделению природная единица) настолько же генетически разнороден, что и *D. fragrans* (неделимая природная единица).

2. Аналогичные значения имеет показатель подразделённости групп Нея (F_{ST}). В исследовании *D. fragrans* общее значение этого показателя было на уровне 0.213. Значение данного показателя для *D. expansa* – 0.214 (для всей выборки). При этом, как уже было отмечено выше, *D. expansa*, обнаруживающий значительную изменчивость морфологического облика, предлагается разделить, а *D. fragrans*, менее морфологически изменчивый вид, признаётся неделимой единицей.

3. Оценка внутри- и межгрупповой изменчивости по результатам анализа молекулярных вариантов (AMOVA) показала, что основные различия сосредоточены внутри исследованных групп – 72%, а межрегиональные различия (Европа и Азия) не превышают 8%. Аналогичные результаты для *D. fragrans* следующие – 13% между особями внутри популяции, 69% – различия между регионами (США и Канада)⁹. Как видно, на основании данного показателя именно *D. fragrans*, а не *D. expansa* можно было бы подвергнуть делению на две ясно отграниченные географические расы.

Список источников

1. Грушецкая З.Е. и др. Использование ISSR-анализа для изучения внутри- и межвидового генетического полиморфизма различных таксонов высших растений // Вестник БГУ. Сер 2. 2013. № 3. С. 50–56.
2. Гуреева И.И., Феоктистов Д.С., Кузнецов А.А. Опыт применения молекулярного анализа в демографических исследованиях папоротников // Систематические и флористические исследования Северной Евразии. М., 2018. Т. 1. С. 172–175.
3. Конспект флоры Восточной Европы. / под ред. Н.Н. Цвелева. М.; СПб.: Т-во науч. изд. КМК, 2012. Т. 1. 630 с.
4. Кузнецов В.М. Методы Нея для анализа генетических различий между популяциями // Проблемы биологии продуктивных животных. 2020. № 1. С. 91–110.
5. Кузнецов В.М. Информационно-энтропийный подход к анализу генетического разнообразия популяций (аналитический обзор) // Аграрная наука Евро-Северо-Востока. 2022. Т. 23, № 2. С. 159–173.
6. Малых С.Ю. Род *Dryopteris* Adans. в Европейской части России // Вестник Пермского университета. Сер. Биология. 2022. Вып. 3. С. 189–200.
7. Светлакова Т.Н. и др. Генетическая дифференциация популяций *Populus tremula* L. в Пермском крае на основании полиморфизма ISSR-маркеров // Аграрный вестник Урала. 2012. Вып. 3. С. 11–13.
8. Цвелев Н.Н. О роде *Dryopteris* Adans. (*Dryopteridaceae*) в Восточной Европе // Новости систематики высших растений. 2003. Т. 35. С. 7–20.
9. Шмаков А.И. Определитель папоротников России. 2-е изд., перераб. и допол. Барнаул: АРТИКА, 2009. 126 с.
10. Юрцев Б.А. Популяции растений как объект геоботаники, флористики, ботанической географии // Ботанический журнал. 1987. Т. 72, № 5. С. 581–588.
11. Animasaun D.A. et al. Polymorphism and genetic diversity assessment of some ornamental ferns by microsatellite (ISSR) markers // J. Appl. Hortic. 2018. Vol. 20, № 3. P. 237–241.
12. Bouchard J.R. et al. Contrasting patterns of genetic variation in central and peripheral populations of *Dryopteris fragrans* (Fragrant wood fern) and implications for colonization dynamics and conservation // International Journal of Plant Sciences. 2017. Vol. 178, № 8. P. 607–617.
13. Bujnoch W. A contribution to the phylogeny of *Dryopteris remota* by genotyping of a fragment of the nuclear PgiC gene // Fern. Gaz. 2015. Vol. 20, Part 2. P. 79–89.
14. Camacho F.J., Liston A. Population structure and genetic diversity of *Botrychium pumicola* (*Ophioglossaceae*) based on inter-simple sequence repeats (ISSR) // Am. J. Bot. 2001. Vol. 88. P. 1065–1070.
15. Crabbe J.A., Jermy A.C., Walker S. Distribution of *Dryopteris assimilis* S. Walker in Britain // Watsonia. 1970. Vol. 8. P. 3–15.
16. Döpp W., Gätzi W. Der Bastard zwischen tetraploider und diploider *Dryopteris dilatata* // Ber. Schweiz. Bot. Ges. 1964. Vol. 74. P. 45–53.

⁹ Причиной данных различий может быть низкая динамика изменчивости *D. expansa* в сравнении с *D. fragrans* и особенности постледниковой реколонизации северных регионов Евразии особями *D. expansa*. Данный тезис является предположением и требует подтверждения в рамках специального исследования.

17. de Groot G.A. et al. Diverse spore rains and limited local exchange shape fern genetic diversity in a recently created habitat colonized by long-distance dispersal // *Ann. Bot.* 2012. Vol. 109. P. 965–978.
18. Dong Y.-H. et al. Genetic variation in the endangered aquatic fern *Ceratopteris thalictroides* (Parkeriaceae) in China: implications from RAPD and ISSR data // *Bot. J. Linn. Soc.* 2008. Vol. 157. P. 657–671.
19. Dong Y.-H., Gituru R.W., Wang Q.-F. Genetic variations and gene flow in the endangered aquatic fern *Ceratopteris pteridoides* in China, and conservation implications // *Ann. Bot. Fennici.* 2010. Vol. 47. P. 34–44.
20. Ellstrand N.C., Elam D.R. Population genetic consequences of small population size: implications for plant conservation // *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 1993. Vol. 24. P. 217–242.
21. Excoffier L., Smouse P.E., Quattro J.M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data // *Genetics.* 1992. Vol. 131, № 2. P. 479–491.
22. Fraser-Jenkins C.R., Jermy A.C. Nomenclatural notes on *Dryopteris*: 2 // *Fern Gaz.* 1977. Vol. 11, № 5. P. 338–340.
23. Holsinger K.E., Weir B.S. Genetics in geographically structured populations: defining, estimating and interpreting F_{ST} // *Nat. Rev. Genet.* 2009. Vol. 10. P. 639–650.
24. Kimura M., Crow J.F. The number of alleles that can be maintained in a finite population // *Genetics.* 1964. Vol. 49, № 2. P. 725–738.
25. Leimu R. et al. How general are positive relationships between plant population size, fitness and genetic variation? // *J. Ecol.* 2006. Vol. 94. P. 942–952.
26. Lewontin R.C. The apportionment of human diversity // *Ev. Biol.* 1972. Vol. 6. P. 381–398.
27. Manton I. Problems of Cytology and Evolution in the Pteridophyta. Cambridge: Cambridge University Press, 1950. 316 p.
28. Nannfeldt J.A. *Dryopteris dilatata* och *Dr. assimilis* i Sverige // *Bot. Not.* 1966. Vol. 119. P. 136–152.
29. Nei M. Genetic distance between populations // *Amer. Naturalist.* 1972. Vol. 106. P. 283–292.
30. Nei M. Molecular population genetics and evolution. Amsterdam, Oxford: North-Holland Publishing Company, 1975. 288 p.
31. Nei M. Molecular Evolutionary Genetics. New York: Columbia University Press, 1987. 615 p.
32. Nei M., Li W.-H. Mathematical model for studying genetic variation in terms restriction endonucleases // *PNAS, Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1979. Vol. 76. P. 5269–5273.
33. Peakall R. GenAEx6: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research // *Mol. Ecol. Not.* 2005. Vol. 6, № 1. P. 288–295.
34. Perrie L.R. et al. Tasmanian and Victorian populations of the fern *Asplenium hookerianum* result from independent dispersal from New Zealand // *Aust. Syst. Bot.* 2010. Vol. 23, № 6. P. 387–392.
35. Rogers S.O., Bendich A.J. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues // *Plant Mol. Biol.* 1985. Vol. 5, № 2. P. 69–76.
36. Sessa E.B., Zimmer E.A., Givnish T.J. Unraveling reticulate evolution in North American *Dryopteris* (*Dryopteridaceae*) // *BMC Evol. Biol.* 2012. Vol. 12. P. 104–127.
37. Schneller J.J., Krattinger K. Genetic composition of Swiss and Austrian members of the apogamous *Dryopteris affinis* complex (*Dryopteridaceae*, *Polypodiopsida*) based on ISSR markers // *Plant Syst. Evol.* 2010. Vol. 286. P. 1–6.
38. Simon T., Vida G. Neue Angaben zur Verbreitung der *Dryopteris assimilis* S. Walker in Europa // *Annl. Univ. Scient. bpest. Rolando Eötvös, Sect. Biol.* 1966. Vol. 8. P. 275–284.
39. Walker S. Cytogenetic studies in the *Dryopteris spinulosa* complex I // *Watsonia.* 1955. Vol. 3. P. 193–209.
40. Walker S. Cytogenetic studies in the *Dryopteris spinulosa* complex II // *Amer. Journ. Bot.* 1961. Vol. 48. P. 607–614.
41. Walker S., Jermy A.C. *Dryopteris assimilis* S. Walker in Britain // *Brit. Fern. Gaz.* 1964. Vol. 9. P. 137–140.
42. Widén C.J. Kemotaxonomiska undersökningar av floriglucinderivatet i *Dryopteris assimilis* S. Walker och *D. dilatata* (Hoffm.) A. Gray i Finland. (Summary: Chemotaxonomic investigations of the phloroglucinol derivatives in *Dryopteris assimilis* S. Walker and *D. dilatata* (Hoffm.) A. Gray in Finland.) // *Farm. Notisblad.* 1967. Vol. 76. P. 185–216.
43. Williams J.G.K. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers // *Nucleic Acids Res.* 1990. Vol. 18, № 22. P. 6531–6535.
44. Yeh F.C. et al. POPGENE, the Microsoft Windows-based user-friendly software for population genetic analysis of co-dominant and dominant markers and quantitative traits. Canada: Dept. Renewable Resources, University of Alberta, Edmonton, 1999. 238 p.

References

1. Grushetskaya Z.E., Nikitinskaya T.V., Kubrak S.V., Dzyuban O.V., Kukhareva L.V., Poliksenova V.D., Titok V.V., Lemesh V.A., Parfenov V.I., Khotyleva L.V. [Using ISSR analysis to study intra- and interspecific genetic polymorphism of various taxa of land plants]. *Vestnik BGU. Ser. 2.* No. 3 (2013): pp. 50–56. (In Russ.).

2. Gureeva I.I., Feoktistov D.S., Kuznetsov A.A. [Application of molecular analysis in demographic studies of ferns]. *Sistematicheskie i floristicheskie issledovaniya Severnoj Evrazii* [Systematic and floristic studies of Northern Eurasia. Materials of the scientific conference]. Moscow, 2018, V. 1, pp. 172-175. (In Russ.).
3. Tsvelev N.N., ed. *Konspekt flory Vostočnoj Evropy* [Synopsis of the Eastern European flora.]. / St-Peterburg, KMK Publ., 2012, V. 1. 630 p. (In Russ.).
4. Kuznetsov V.M. [Nei's methods for analyzing genetic differences between populations]. *Problemy biologii produktivnykh životnykh*. No. 1 (2020): pp. 91-110. (In Russ.).
5. Kuznetsov V.M. [Information-entropy approach to the analysis of genetic diversity of populations (analytical review)]. *Agrarnaya nauka Evro-Severo-Vostoka*. V. 23, No. 2 (2022): pp. 159-173. (In Russ.).
6. Malyh S.Yu. [The genus *Dryopteris* Adans. in the European Russia]. *Vestnik Permskogo universiteta. Biologija*. Iss. 3 (2022): pp. 189-200. (In Russ.).
7. Svetlakova T.N., Boboshina I.V., Nechaeva Yu.S., Boronnikova S.V. [Genetic differentiation populations of *Populus tremula* L. in the Perm Region based on the polymorphism of ISSR markers]. *Agrarnyj vestnik Urala*. Iss. 3 (2012): pp. 11-13. (In Russ.).
8. Tsvelev N.N. [About *Dryopteris* Adans. (Dryopteridaceae) in East Europe]. *Novosti sistematiki vysšich rastenij*. V. 35 (2003): pp. 7-20. (In Russ.).
9. Shmakov A.I. *Opredelitel' paporotnikov Rossii* [Key for The Ferns of Russia]. Barnaul, ARTIKA Publ., 2009. 126 p. (In Russ.).
10. Yurtsev B.A. [Plant populations as an object of geobotany, floristics, and botanical geography]. *Botaničeskij žurnal*. V. 75, No. 5 (1987): pp. 581-588. (In Russ.).
11. Animasau D.A., Oyedeji S., Ingalhalli R.S., Krishnamurthy R. Polymorphism and genetic diversity assessment of some ornamental ferns by microsatellite (ISSR) markers. *J. Appl. Hortic*. V. 20, No. 3 (2018): pp. 237-241.
12. Bouchard J.R., Fernando F.F., Bailey S.W., Weber-Townsend J., Leopold D.J. Contrasting patterns of genetic variation in central and peripheral populations of *Dryopteris fragrans* (Fragrant wood fern) and implications for colonization dynamics and conservation. *International Journal of Plant Sciences*. V. 178, No. 8 (2017): pp. 607-617.
13. Bujnoch W. A contribution to the phylogeny of *Dryopteris remota* by genotyping of a fragment of the nuclear PgiC gene. *Fern. Gaz*. V. 20, part 2 (2015): pp. 79-89.
14. Camacho F.J., Liston A. Population structure and genetic diversity of *Botrychium pumicola* (Ophioglossaceae) based on inter-simple sequence repeats (ISSR). *Am. J. Bot*. V. 88 (2001): pp. 1065-1070.
15. Crabbe J.A., Jermy A.C., Walker S. Distribution of *Dryopteris assimilis* S. Walker in Britain. *Watsonia*. V. 8 (1970): pp. 3-15.
16. Döpp W., Gätzi W. Der Bastard zwischen tetraploider und diploider *Dryopteris dilatata*. *Ber. Schweiz. Bot. Ges*. V. 74 (1964): pp. 45-53.
17. de Groot G.A., During H.J., Ansell S.W., Scheider H., Bremer P., Wubs E.R.J., Maas E.R.J., Korpelainen H., Erkens R.H.J. Diverse spore rains and limited local exchange shape fern genetic diversity in a recently created habitat colonized by long-distance dispersal. *Ann. Bot*. V. 109 (2012.): pp. 965-978.
18. Dong Y.-H., Chen J.M., Robert G.W., Wang Q.F. Genetic variation in the endangered aquatic fern *Ceratopteris thalictroides* (Parkeriaceae) in China: implications from RAPD and ISSR data. *Bot. J. Linn. Soc*. V. 157 (2008): pp. 657-671.
19. Dong Y.-H., Gituru R.W., Wang Q.-F. Genetic variations and gene flow in the endangered aquatic fern *Ceratopteris pteridoides* in China, and conservation implications. *Ann. Bot. Fennici*. V. 47 (2010): pp. 34-44.
20. Ellstrand N.C., Elam D.R. Population genetic consequences of small population size: implications for plant conservation. *Annu. Rev. Ecol. Syst*. V. 24 (1993): pp. 217-242.
21. Excoffier L., Smouse P.E., Quattro J.M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*. V. 131, No. 2 (1992): pp. 479-491.
22. Fraser-Jenkins C.R., Jermy A.C. Nomenclatural notes on *Dryopteris*: 2. *Fern Gaz*. V. 11, No. 5 (1977): pp. 338-340.
23. Holsinger K.E., Weir B.S. Genetics in geographically structured populations: defining, estimating and interpreting F_{ST} . *Nat. Rev. Genet*. V. 10 (2009): pp. 639-650.
24. Kimura M., Crow J. F. The number of alleles that can be maintained in a finite population. *Genetics*. V. 49, No. 2 (1964): pp. 725-738.
25. Leimu R., Mutikainen P., Koricheva J., Fischer M. How general are positive relationships between plant population size, fitness and genetic variation? *J. Ecol*. V. 94 (2006): pp. 942-952.
26. Lewontin R.C. The apportionment of human diversity. *Ev. Biol*. V. 6 (1972): pp. 381-398.
27. Manton I. *Problems of Cytology and Evolution in the Pteridophyta*. Cambridge, Cambridge University Press Publ., 1950. 316 p.
28. Nannfeldt J.A. *Dryopteris dilatata* och *Dr. assimilis* i Sverige. *Bot. Not*. V. 119 (1966): pp. 136-152.

29. Nei M. Genetic distance between populations. *Amer. Naturalist*. V. 106 (1972): pp. 283-292.
30. Nei M. Molecular population genetics and evolution. Amsterdam, Oxford, North-Holland Publishing Company, 1975. 288 p.
31. Nei M. Molecular Evolutionary Genetics. New York, Columbia University Press, 1987. 615 p.
32. Nei M., Li W-H. Mathematical model for studying genetic variation in terms restriction endonucleases. *PNAS, Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. V. 76 (1979): pp 5269-5273.
33. Peakall R. GenA1Ex6: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Mol. Ecol. Not.* V. 6, No. 1 (2005): pp. 288-295.
34. Perrie L.R., Ohlsen D.J., Shepherd L.D., Grrreff M., Brownsey P.J., Bayly M.J. Tasmanian and Victorian populations of the fern *Asplenium hookerianum* result from independent dispersal from New Zealand. *Aust. Syst. Bot.* V. 23, No. 6 (2010): pp. 387-392.
35. Rogers S.O., Bendich A.J. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues. *Plant Mol. Biol.* V. 5, No. 2 (1985): pp. 69-76.
36. Sessa E.B., Zimmer E.A., Givnish T.J. Unraveling reticulate evolution in North American *Dryopteris* (*Dryopteridaceae*). *BMC Evol. Biol.* V. 12 (2012): pp. 104-127.
37. Schneller J.J., Krattinger K. Genetic composition of Swiss and Austrian members of the apogamous *Dryopteris affinis* complex (*Dryopteridaceae*, *Polypodiopsida*) based on ISSR markers. *Plant Syst. Evol.* V. 286 (2010): pp. 1-6.
38. Simon T., Vida G. Neue Angaben zur Verbreitung der *Dryopteris assimilis* S. Walker in Europa. *Annls Univ. Scient. bpest. Rolando Eötvös, Sect. Biol.* V. 8 (1966): pp. 275-284.
39. Walker S. Cytogenetic studies in the *Dryopteris spinulosa* complex I. *Watsonia*. V. 3 (1955): pp. 193-209.
40. Walker S. Cytogenetic studies in the *Dryopteris spinulosa* complex II. *Amer. Journ. Bot.* V. 48 (1961): pp. 607-614.
41. Walker S., Jermy A.C. *Dryopteris assimilis* S. Walker in Britain. *Brit. Fern. Gaz.* V. 9 (1964): pp. 137-140.
42. Widén C.J. Kemotaxonomiska undersökningar av floriglucinderivatet i *Dryopteris assimilis* S. Walker och *D. dilatata* (Hoffm.) A. Gray i Finland. (Summary: Chemotaxonomic investigations of the phloroglucinol derivatives in *Dryopteris assimilis* S. Walker and *D. dilatata* (Hoffm.) A. Gray in Finland.). *Farm. Notisblad.* V. 76 (1967): pp. 185-216.
43. Williams J.G.K. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* V. 18, No. 22 (1990): pp. 6531-6535.
44. Yeh F.C., Young R.C., Mao J., Ye Z., Boyle T.J. POPGENE, the Microsoft Windows-based user-friendly software for population genetic analysis of co-dominant and dominant markers and quantitative traits. Canada, Dept. Renewable Resources, University of Alberta, Edmonton, 1999. 238 p.

Статья поступила в редакцию 06.09.2023; одобрена после рецензирования 02.10.2023; принята к публикации 02.10.2023.

The article was submitted 06.09.2023; approved after reviewing 02.10.2023; accepted for publication 02.10.2023.

Информация об авторе

С. Ю. Малых – учитель биологии.

Information about the author

S. Yu. Malyh – biology teacher.