

**ЭКОЛОГО-ФИТОЦЕНОТИЧЕСКАЯ ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ,
ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ И СТРУКТУРА
ПРИРОДНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ РЕЛИКТОВОГО ВИДА АКВАФЛОРЫ
Isoetes lacustris L. В БЕЛАРУСИ¹**

© 2021 г. А. Б. Власова^{1, *}, А. Н. Юхимук¹, М. А. Джус², М. С. Тухфатуллина¹, Б. П. Власов²

¹Центральный ботанический сад Национальной академии наук Беларуси, Минск, 220012 Беларусь

²Белорусский государственный университет, Минск, 220030 Беларусь

*e-mail: nastassia_vlasova@yahoo.com

Поступила в редакцию 12.03.2020 г.

После доработки 01.09.2020 г.

Принята к публикации 01.10.2020 г.

С использованием RAPD- и ISSR-систем изучены генетическое разнообразие и структура популяций *Isoetes lacustris* L. реликтового вида аквафлоры, приуроченного к олиготрофным озерам и резко сокращающего численность в Европе. Для четырех изученных популяций вида на южной границе ареала в Беларуси совокупно выявлено 127 маркеров (90.6 полиморфных, 83.5% информативных). На уровне вида показатели генетической изменчивости составили: $H_e = 0.247$, $P_p = 100\%$, $I = 0.390$. Выявлен средний уровень подразделенности ($\Phi_{PT} = 0.269$, $p \geq 0.001$; $F_{st} = 0.193$, $p \geq 0.0001$) и генетического обмена (2.7 мигранта на поколение). Большая доля изменчивости (73.13%) приходится на внутривидовой уровень, 13.36% – на межвидовой, а 13.51% объясняет различия между регионами (южными и северными популяциями). Ранжирование по генетическому разнообразию ($H_e = 0.063–0.243$; $P_p = 17.92–93.4\%$; $I = 0.095–0.379$) и обнаружение индивидуальных аллелей определяет уникальность каждой популяции и значимость в программах по охране вида. Уменьшение уровня генетического разнообразия в малочисленных изолированных популяциях в совокупности с лимитирующими факторами (естественные – южный предел распространения, антропогенные – эвтрофирование и изменение режима озер) представляют угрозу для развития популяций и распространения вида в Беларуси. На основе интегрального анализа эколого-фитоценологических характеристик обитаний *I. lacustris*, уровня и структуры генетического разнообразия его популяций предложены меры по *in situ* и *ex situ* сохранению вида.

Ключевые слова: *Isoetes lacustris*, экологические параметры, RAPD, ISSR, генетическое разнообразие, граница ареала.

DOI: 10.31857/S0016675821020132

При продолжающейся фрагментации природных обитаний видов антропогенные воздействия и глобальное изменение климата оказывают существенное влияние на демографическую и генетическую структуру их популяций и повышают риски исчезновения видов. Сегодня природоохранная и ландшафтная генетика использует эффективные диагностические методы оценки уровня генетического разнообразия (ГР), формирующих его экологических факторов, эволюционного (адаптационного) потенциала и сопротивляемости видов, содействуя предотвращению потерь биологического разнообразия и их обитаний [1–3]. Популяции видов растений на границе ареалов важны для долго-

временного выживания вида, и их изучение помогает оценить эволюционный потенциал таксона, как локально, так и в пределах ареала (в т. ч. в связи с изменением климата), прояснить историю распространения вида [4]. Краевые популяции находятся под воздействием более сильного давления отбора и ограниченного потока генов, они как правило локально адаптированы, т.е. могут поддерживать необходимый пул ГР и обеспечивать возникновение полезных адаптаций. Данные популяции являются важными объектами для сохранения [4, 5].

Бореальная аквафлора особо подвержена трансформации и сокращает численность в связи с незначительными локальными изменениями среды [6]. Обитание ряда реликтовых видов Беларуси приурочено к уникальной группе озер пре-

¹ Дополнительные материалы (ESM 1–ESM 11) для этой статьи доступны по doi 10.31857/S0016675821020132 для авторизованных пользователей.

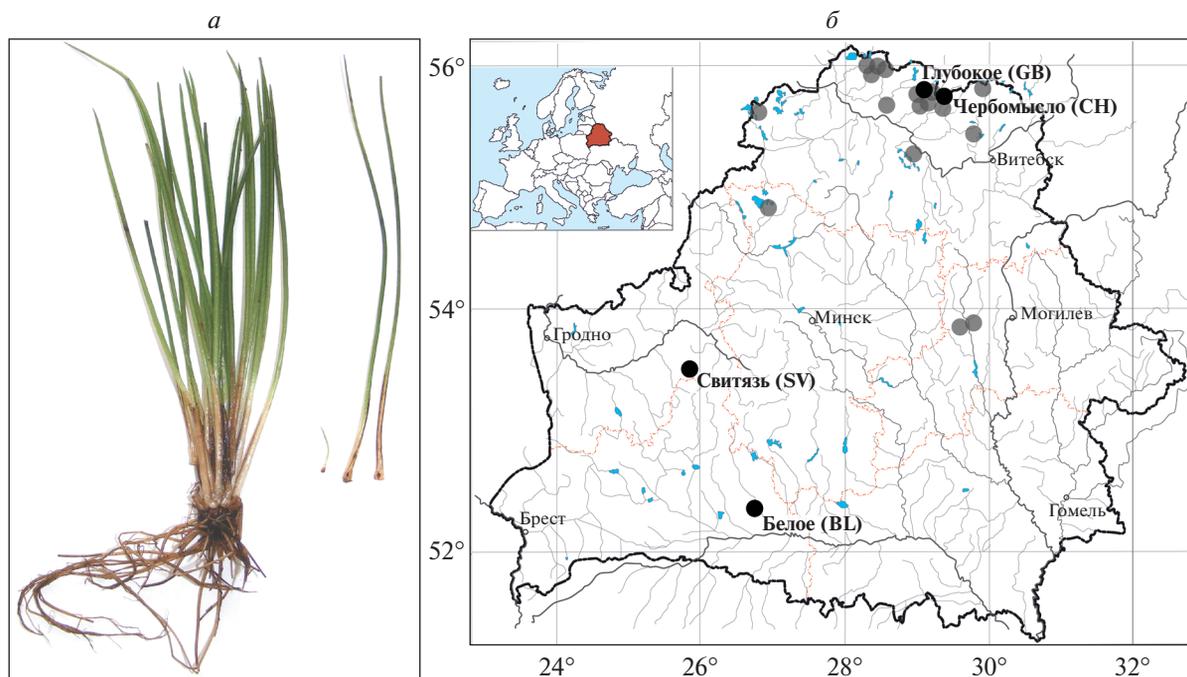


Рис. 1. а — общий вид *I. lacustris*. б — местонахождения *I. lacustris* на территории Беларуси и точки сбора материала для генетических исследований (●).

имущественно ледникового происхождения (на севере республики в регионе Белорусского Поозерья) и карстового происхождения (на юге республики в регионе Полесья), возраст обеих групп озер около 12 тыс. лет [7, 8]. В Республике Беларусь одним из уязвимых реликтовых видов, находящихся здесь на южной границе распространения, является разноспоровый представитель плаунообразных — полушник озерный (*Isoetes lacustris* L., Isoetaceae Dumort; декаплоид $2n = 10x = 110$), погруженное вечнозеленое многолетнее растение (рис. 1,а) [9]. В Восточной Европе ареал этого циркумбореального вида приходится на страны Прибалтики, Украину (крайне редко) и Россию. Полушник обитает в узком диапазоне экологических условий — в основном в олиготрофных или мезотрофных пресных озерах с низкой минерализацией (менее 100 мг/л), высокой прозрачностью (более 4 м), как правило кислой (рН 4–6) реакцией среды. Произрастает на песчаных или песчаноилистых грунтах в прибрежной зоне, а также на глубине до 4–5 м. Местообитания полушника обладают высоким экологическим статусом и включены в список редких биотопов Республики Беларусь и Европы [10]. *I. lacustris* является индикатором состояния этих экосистем и охраняется в большинстве стран Европы, в т. ч. России, ряде штатов США [11–15]. С начала XX столетия численность и распространение вида в Европе резко сокращается вследствие загрязнения, эвтрофикации озер, механического уничтожения растений [11, 13]. В

Беларуси полушник озерный включен в Красную книгу с 1981 г. (категория охраны — 3; Vu — под прямой угрозой исчезновения) [15]. Несмотря на то, что практически все местообитания вида на территории страны находятся на особо охраняемых природных территориях (ООПТ), в последние десятилетия наблюдается резкое сокращение его численности [7, 8, 16]. Биологические особенности и экологические предпочтения *I. lacustris* (близ южного предела распространения) обуславливают высокий риск его исчезновения в связи с антропогенными факторами и изменением климата.

Род *Isoetes* включает около 200 космополитно распространенных, древних в эволюционном отношении видов, обладающих зачастую реликтовыми ареалами [12]. Для некоторых видов *Isoetes* разработаны программы по сохранению, в т. ч. на основе данных о генетической вариабельности с использованием доминантных ДНК-маркеров (AFLP, RAPD, ISSR и др.) [12, 17–22]. Для *I. lacustris* предложены методы мониторинга популяций на основе морфофизиологических показателей растений [23], а также приемы сохранения *in vitro* [24]. Имеются данные по филогеографической структуре полушника озерного на Британских островах [25], однако популяционная структура и ГР вида не исследованы.

Целью данной работы было оценить популяционно-генетический потенциал полушника озерного в Беларуси и его роль в распростране-

нии вида на южной границе ареала. В задачи входило: а) провести сравнительную эколого-ботаническую инвентаризацию местообитаний и оценить состояние популяций полушника; б) оценить ГР вида на меж- и внутривидовых уровнях на основе RAPD и ISSR; в) на основании интегрального анализа данных экологического мониторинга и параметров ГР предложить стратегию устойчивой охраны генофонда вида в республике.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объект исследования и инвентаризация популяций. На территории Беларуси *I. lacustris* распространен преимущественно в озерах северной части республики. Известно 21 место произрастания вида (или локалитета), из них 16 подтверждены гербарными сборами (рис. 1, б) [26]. В данной работе исследованы четыре популяции, выбор которых обусловлен их расположением в двух основных регионах распространения вида – Белорусском Поозерье на севере республики (озера Глубокое, **GB** и Чербомысло, **CH**) и Белорусском Полесье в южной части страны (озера Белое, **BL** и Свитязь, **SV**), где вид характеризуется наиболее значительным сокращением площади произрастания на протяжении последних 15 лет (рис. 1, б, ESM 1; см. дополнительные материалы в электронной версии **ESM 1–ESM 11**) [10, 11]. Учет параметров среды произрастания вида (физико-химические показатели водной среды) и его относительной численности (занимаемая площадь, частное проективное покрытие (ЧПП, 1–100%)), обилие по Друде (1–6 баллов) проводили во время вегетационного периода в 2001–2016 гг. по адаптированной методике [27]. По совокупности относительной численности видов оценена толерантность вида (ценотическая и экологическая) к среде произрастания, которую определяли как “оптимум” (соответствовал максимальным показателям развития вида, балл 4–5), “угнетение” (низкие значения величин, балл 2–3), и “гибель” (отсутствие или наличие единичных экземпляров растений, балл 0–1) [27]. В работе использованы данные многолетних мониторинговых обследований озер Беларуси с 1973 г. (НИЛ Озероведения, БГУ), в т. ч. их морфометрические параметры, состав грунтов и физико-химические показатели водной среды [8]. Оценку фитоценотического разнообразия местообитаний проводили на основании геоботанических описаний [27, 28].

Сбор материала для генотипирования проводили в 2010 и 2011 гг. Образцы (фрагменты листьев) отбирали произвольно у особей, находящихся на расстоянии не менее 10 м друг от друга. Из каждой популяции отобрано от четырех до 30 образцов, число которых коррелировало с площадью и численностью популяции.

RAPD- и ISSR-анализ. Геномную ДНК экстрагировали из обезвоженных в силикагеле листьев с использованием СТАВ-буфера [29]. После тестирования были отобраны три RAPD- и четыре ISSR-праймера (ESM 5). Состав RAPD-ПЦР (25 μ L): 1 \times ПЦР буфер (2.0 mM MgCl₂), 0.4 mM dNTPs, 20 pM праймера, 0.5 ед. Taq-полимеразы (ПраймТех, Беларусь) и 20 ng ДНК. Состав ISSR-ПЦР (25 μ L): 1 \times ПЦР-буфер с (NH₄)₂SO₄, 2.0 mM MgCl₂, 0.4 mM dNTPs, 30 pM праймера, 1 ед. Taq-полимеразы (ПраймТех, Беларусь), 30 ng ДНК. Режим RAPD-ПЦР: 96°C (5 мин); 96°C (30 с), Та (30 с), 72°C (2 мин), 40 циклов; 72°C (10 мин); ISSR-ПЦР: 96°C (5 мин), Та (30 с), 72°C (1 мин), 1 цикл; 96°C (30 с), Та (30 с, +1°C/цикл), 72°C (1 мин), 30 циклов; 72°C (10 мин). Продукты ПЦР разделяли на Bioanalyzer 2100 (Agilent; ISSR) и в 1%-ном агарозном геле (RAPD). Размер фрагментов рассчитывали в Expert 2100 (Agilent) или QuantityOne (Bio-Rad) на основе стандартов молекулярных масс (ПраймТех, Беларусь). Учитывали только четкие, дискретные, воспроизводимые ампликоны. Присутствие фрагмента обозначали как “1”, а отсутствие как “0”.

Обработка данных, статистический анализ. Число маркеров, процент полиморфизма и информационный индекс полиморфизма праймеров PIC (Polymorphic Information Content) [30] рассчитывали вручную. Согласно методу, предложенному для доминантных маркеров [31], локусы, частота которых превышает $1 - (3/N)$, где N – число особей в анализе, не учитывали. Общее (N_a) и эффективное число аллелей (N_e), число полиморфных локусов и их процент (P_p), число редких аллелей, ожидаемую гетерозиготность (H_e), индекс разнообразия Шеннона (H) оценивали в GenAlex 6.5 [32], поток генов (Nm) рассчитывали в PopGen v1.32. Анализ главных координат (PCoA) выполняли в GenAlEx, выделяя северный и южный регионы. Популяционную структуру анализировали в Structure 2.3 [33], при количестве кластеров (K) 1–10, по 20 прогонов для каждого, число burn-in периодов – 1000000, количество итераций длины пробега – 100000, значения подобия $Q > 0.7$, применяя модели кластеризации “admixture” и “no admixture”. Наиболее вероятное значение K оценивали на основании delta K (ΔK) [34]. Распределение уровней генетического разнообразия и генетическую подразделенность популяций (фРТ, аналог F_{st}) оценивали методом анализа молекулярной дисперсии (AMOVA) в GenAlEx 6.5 в соответствии с регионом произрастания. ГР и F_{st} также оценивали байесовским методом для доминантных маркеров [35] в AFLP-SURV 1.0 (при числе перестановок для F_{st} теста – 500, бутстрэп – 1000). Латентный генетический потенциал (Latent genetic potential, LPG) оценивали по F. Bergmann et al. [36]. Тест Мантеля [37] (GenAlEx 6.5, при 999

пермутациях) применяли для оценки корреляции географических (ГД; логарифмическая функция расстояния, $\log(1 + \text{ГД})$) и генетических дистанций между популяциями и ФРТ. Аналогично анализировали редуцированный массив данных (примерно уравнинное количество особей из каждого озера, когда для популяций GB и CH анализировали только десять особей) для изучения ГР малочисленных популяций и оценки корректности полученных данных. Зависимость параметров ГР от экологических параметров и относительной численности оценивали, используя регрессионный анализ Пирсона в MS Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Экологическая инвентаризация местообитаний I. lacustris и характеристика растительных сообществ

Озера Свитязь и Белое значительно подвержены процессам эвтрофирования в результате рекреационного использования. Для озер Чербымысло и Глубокое эти процессы наблюдаются в меньшей степени (табл. ESM 2). Сравнительная характеристика сообществ погруженной и прибрежной растительности исследованных водоемов позволила выявить предполагаемые виды-индикаторы оптимальных условий произрастания полувшиника, присутствие которых взаимосвязано с относительной численностью популяций *I. lacustris* и вероятно с гидрохимическим режимом (приведены в табл. ESM 4).

Относительная численность *I. lacustris* в изученных озерах (обилие, толерантность и ЧПП; 2001–2011 гг.) варьировала: наибольшие показатели зафиксированы для озер Чербымысло и Глубокое, меньшие – для Белое и Свитязь (ESM 2). Значимая корреляция параметров относительной численности выявлена с гидрохимическими показателями водной среды: содержание Mg^{2+} , общая минерализация, общий фосфор ($p \leq 0.05$, ESM 3). Корреляция обилия с рН и прозрачностью была сильной, но не значимой ($r = -0.82$ и $r = 0.74$; соответственно, $p > 0.05$, ESM 3).

Полиморфизм и внутривидовая изменчивость

Отобранные RAPD- и ISSR-праймеры обнаруживали вариабельность участков ДНК у 71 особи *I. lacustris* имели высокую информативность (число фрагментов на образец, P_p , PIC, H и H_e) и генерировали совокупно 127 аллелей (ESM 5). RAPD- и ISSR-данные по отдельности выявили сходный характер распределения ГР (ESM 6), а также значимую корреляцию матриц генетических расстояний (u_{NeiP}) между особями на их основании ($r = 0.154$, $p = 0.005$, тест Мантеля; $r = 0.378$, $p \leq$

≤ 0.0001 , регрессионный анализ), что дало основание объединить RAPD- и ISSR-маркеры для дальнейших расчетов ГР. После стандартизации [31] число локусов составило 106 или 83.5% (табл. 1). Уникальные аллели отмечены для всех популяций кроме BL, а их максимальное число (13 или 12.7%) выявлено для GB. Значения ожидаемой гетерозиготности (H_e) по популяциям варьировали от 0.063 (BL) до 0.243 (GB). Процент полиморфных локусов (P_p) составил в среднем 56.6%; наибольшее значение (93.4%) обнаружено для GB, наименьшее (17.92%) – для BL (табл. 1). Максимальное значение индекса разнообразия Шеннона (I) зарегистрировано для GB (0.379), минимальное – для BL (0.095), при среднем значении 0.246. На видовом уровне $H_e = 0.247$, $I = 0.39$. Ожидаемая гетерозиготность на уровне вида, оцененная Байесовским методом, была несколько выше и составила $H_e = 0.251$ (табл. 1). Данный метод выявил минимальную разницу параметров ГР для полного и редуцированного массивов данных (см. методику, данные не приведены); наименьшие показатели вновь отмечены для популяции BL, наибольшие – для GB. Таким образом, на основании нескольких алгоритмов анализа вариационный ряд распределения параметров ГР и латентного генетического потенциала популяций (показатель адаптивности) в направлении их снижения был аналогичным: оз. Глубокое (GB) → оз. Чербымысло (CH) → оз. Свитязь (SV) → оз. Белое (BL) (рис. 2, табл. 1).

Межпопуляционная дифференциация и генетическая структура популяций

Кластеризация UPGMA на основе генетических дистанций не всегда совпадала с принадлежностью особей к популяции (ESM 10). PCoA особей иллюстрирует, что три главных оси отвечают за 13.54, 11.43 и 6.23% разнообразия соответственно, при этом первыми двумя осями обусловлено 24.97% изменчивости (рис. 3,а). Отметим, что ось 4 (Coord. 4) достоверно выявила различия между BL и SV (рис. 3,б). PCoA на популяционном уровне (рис. 3,в) обнаружил наличие градиентов “запад–восток” (Coord. 1, все популяции) и “север–юг” (Coord. 2, все популяции кроме GB и CH, дистанция между которыми составляет всего 2 км, см. ESM 1). Согласно программе “Structure” наиболее вероятное количество групп K было равно трем (ESM 11). Самые высокие значения подобия выявлены в модели admixture с корреляцией локусов для этих трех кластеров (данные не приведены). Анализ подтвердил наличие дифференциации между близкорасположенными GB и CH: 88.9% особей GB отнесены к K_1 ($Q \geq 0.781$), а особи CH распределились между тремя выявленными кластерами (11.1% отнесены к K_1 , 37.0% – K_2 , и 14.8% – K_3 , $Q \geq 0.795$). Две другие популяции,

Таблица 1. Генетическая вариабельность внутри- и между популяциями *I. lacustris*, рассчитанная на основании RAPD- и ISSR-маркеров

Популяция (код)	n	Число локусов		Генетическое разнообразие								
		N	N _r , %	N _a	N _e	P _p	P _p B*	I	H _e	H _e B*	uH _e	LGP
Глубокое (GB)	27	102	13↓ (12.75↓)	1.934 (0.250)	1.400 (0.352)	93.4	74.5	0.379 (0.022)	0.243↓ (0.017)	0.268 (0.017)	0.248↓ (0.017)	56.616
Чербомысло (CH)	27	89	2↓ (2.25↓)	1.830 (0.377)	1.357 (0.345)	83.02	66.0	0.342↑ (0.024)	0.219↑ (0.017)	0.237 (0.017)	0.224↑ (0.018)	50.131
Свитязь (SV)	7	46	1↓ (2.17↓)	1.321 (0.469)	1.193 (0.337)	32.08	43.4	0.167 (0.025)	0.112↓ (0.018)	0.170 (0.019)	0.121↓ (0.019)	13.523
Белое (BL)	4	39	0 (0)	1.179 (0.385)	1.106 (0.261)	17.92	36.8	0.095 (0.020)	0.063↓ (0.014)	0.134 (0.016)	0.072↓ (0.016)	7.745
Общее внутри популяций (среднее)	16.25	69	4↓ (5.8↓)	1.566 (0.372)	1.264 (0.138)	56.6 (18.59)	55.18	0.246 (0.013)	0.159 (0.009)	0.202 (0.031)	0.166↓ (0.009)	32.004 (24.929)
Общее по совокупности всех локусов и популяций	65	106	16↓ (15.09↓)	2 (0)	1.412 (0.331)	100	100	0.390 (0.021)	0.247 (0.016)	0.251	0.250 (0.016)	62.342

Примечание. n – количество проанализированных особей; N – общее число локусов после стандартизации; N_r – число уникальных аллелей; N_a – наблюдаемое число аллелей; N_e – эффективное число аллелей; P_p – процент полиморфных локусов; H_e – ожидаемая гетерозиготность (или генное разнообразие по Неи); I – информационный индекс Шеннона, LPG – латентный генетический потенциал. В скобках приведены величины стандартного отклонения. B* – значения оценены Байесовским методом. Стрелками отмечено увеличение (↑) или уменьшение (↓) параметра по сравнению с полученным при обработке локусов уменьшенного числа особей из популяций GB (10) и CH (10, объяснения в тексте).

находящиеся на юге, – BL и SV – определены как одна (K3, Q = 0.766–0.986). Значения дифференциации для трех выделенных кластеров составили: F_{st(K1)} = 0.282; F_{st(K2)} = 0.296; F_{st(K3)} = 0.589 (ESM 7).

Согласно AMOVA, наибольший компонент изменчивости (73.13%) обнаружен на внутривнутри популяционном уровне, а примерно равные части оставшейся вариабельности распределены между популяциями – 13.36% и выделенными региона-

ми – 13.51% (северные и южные популяции; табл. 2). Дифференциация была значимая (p ≥ 0.0001), умеренная на общепопуляционном уровне (φPT = 0.269), и более слабая – между популяциями (φPR = 0.154) и регионами (φRT = 0.135) (табл. 2). Общая байесовская дифференциация популяций оказалась значимой и так же среднего уровня (F_{st} = 0.193, p = 0.03), что подтверждает их генетическое родство. Попарные значения межпопуля-

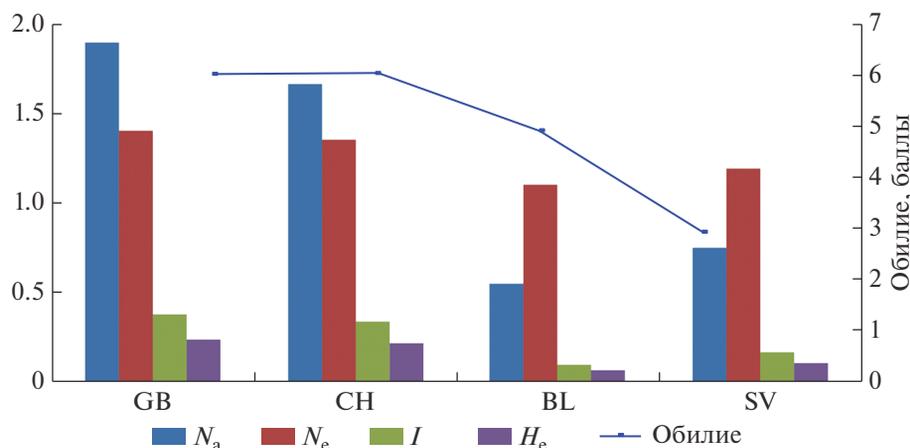


Рис. 2. Параметры ГР популяций *I. lacustris* и их сопряженность с параметром обилие. Популяции: Глубокое (GB); Чербомысло (CH); Белое (BL); Свитязь (SV).

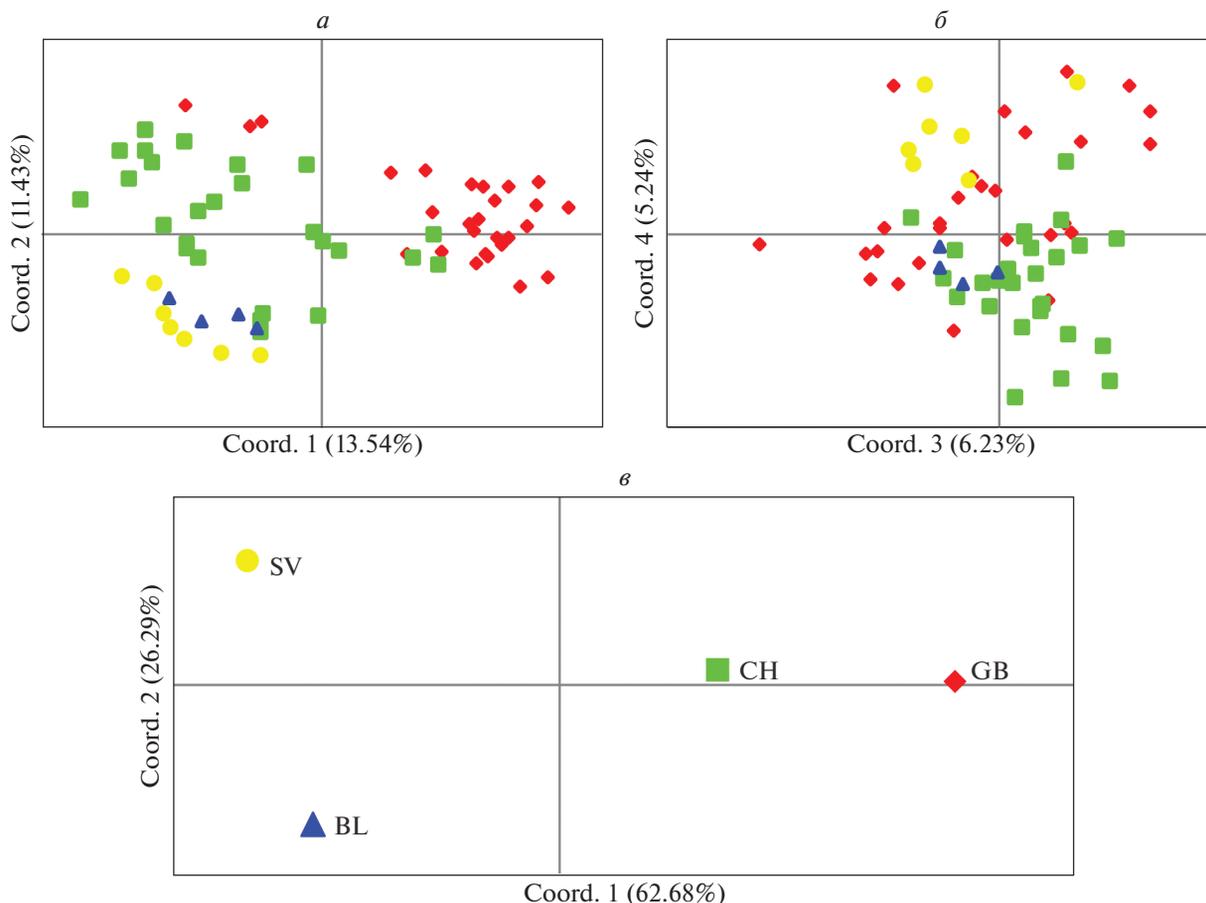


Рис. 3. Анализ главных координат (PCoA) особей *I. lacustris* из четырех популяций Беларуси на основании матрицы попарных генетических дистанций ($uNeiP$), рассчитанных по совокупности RAPD- и ISSR-маркеров. *a* – группировка особей согласно 1 и 2 осям, *б* – группировка по 3 и 4 осям, *в* – на основании популяционных генетических дистанций. Обозначения популяций: Глубокое (GB) – ромбы; Чербомысло (CH) – квадраты; Белое (BL) – треугольники; Свитязь (SV) – круги.

ционных значений дифференциации (фРТ) значимо различались ($p \leq 0.007$): от 0.151 (CH–BL) до 0.313 (GB–SV), в среднем составили 0.230 (табл. 3). Различия в дифференциации согласуются с оцененным уровнем генетического обмена между популяциями (данные не приведены), который был наиболее высок между GB и CH ($Nm = 6.13$), и значительно ниже между BL и SV ($Nm = 1.17$). Поток генов на видовом уровне – 2.7 мигранта на поколение – подтверждает довольно высокую миграцию для региона Беларуси.

Корреляционный анализ географических ($\log(1 + \text{ГД})$) и генетических дистанций ($uNeiP$ и опосредованно фРТ) между популяциями ($r = 0.636$ и 0.426 соответственно, $p > 0.05$), а также на уровне индивидуальных растений ($uNeiP$, $r = 0.029$, $p = 0.316$) не выявил значимой зависимости ГР от удаленности в пространстве, предполагая, что этот фактор не является основным, определяющим вариабельность между популяциями.

Корреляция экологических характеристик местообитаний, параметров развития и ГР популяций I. lacustris

Для обследованных озер обнаружена сильная корреляция параметров ГР *I. lacustris* с девятью эколого-морфологическими характеристиками озер из более чем 20-ти изученных (ESM 8, рис. 2). В период, предшествующий измерениям ГР (2001–2006 г.) популяции GB, CH и BL отнесены к группе “оптимум”, а SV – к угнетенной популяции [8] (ESM 2). Однако по совокупности показателей генетического разнообразия BL угнетена наравне с SV (рис. 2), что выражалось в сокращении относительной численности вида в оз. Белое, зафиксированной в 2016 г. (ESM 2).

ОБСУЖДЕНИЕ

Интегральная эколого-генетическая оценка уязвимых видов аквафлоры крайне важна для их сохранения. Нами показано нарастание экологических угроз для *I. lacustris* в Беларуси в связи с эв-

Таблица 2. Анализ молекулярной дисперсии (АМОВА) популяций *I. lacustris*

Источник варибельности	Степень свободы, <i>d.f.</i>	Сумма квадратов	Средняя сумма квадратов	Компонент дисперсии, Est. Var., %	Дифференциация, ϕ , $p \geq 0.0001$	Диаграмма распределения молекулярной дисперсии
Между регионами (Р)	1	81.573	81.573	2.468 (13.51)	$\phi_{RT} = 0.135$	
Между популяциями (П)	2	104.976	52.488	2.439 (13.36)	$\phi_{PR} = 0.154$	
Внутри популяций (ВП)	61	814.688	13.356	13.356 (73.13)	$\phi_{PT} = 0.269$	
Общее	64	1001.238	—	18.262 (100)	—	

трофированием водоемов. Выявленные флористические индикаторы эвтрофирования (ESM 4) могут использоваться в прогнозировании нежелательных для вида изменений среды, подтверждая данные литературы [13].

Полученные нами показатели ГР *I. lacustris* на южной границе ареала на видовом уровне на основе RAPD- и ISSR-маркеров можно оценить как средний уровень ($H_e = 0.247$), в т. ч. по сравнению с сопоставимыми данными, представленными для других *Isoetes* на основе доминантных маркеров [17–22]. Стоит учитывать, что ГР во многом определяется биологией развития и способом размножения видов в связи со средой их обитания [38]. Так, довольно низкие показатели ГР заявлены для ди- или тетраплоидов, вегетативно размножающихся или с ограниченным размножением спорами видов: полушников из Новой Зеландии *I. kirkii* A. Braun и *I. alpina* Kirk ($H_e = 0.03$, RAPD) [21], *I. sinensis* T.C. Palmer в Китае ($H_e = 0.118$, AFLP) и других азиатских видов [17, 18]. Более высокие показатели характерны для тетраплоидов и диплоидов с преимущественно половым размножением. Для средиземноморского реликта *I. malinverniana* Ces. et De Not ($H = 0.263$, ISSR + AFLP; $H = 0.268$, ISSR) и эндемика амазонии *I. cangae* J.B.S. Pereira, Salino et Stützel ($H_e = 0.245$, ISSR) показатели ГР среднего уровня сравнимы с полученными нами для *I. lacustris* [20, 22]. Помимо численности и уровней ГР, жизненная форма и способ размножения вида, вероятно, определяют три основных сценария распределения генетической варибельности для полушников. 1) ГР в основном (60–80%) распределено между популяциями, и меньшая часть (20–40%) – внутри них (виды из Азии и Новой Зеландии, *I. kirkii* и *I. alpina*, см. выше) [17, 21]. 2) Около половины ГР распределено внутри популяций (*I. hypsophila* Hand.–Mazz. в Китае; вегетативно размножающийся диплоид) [18]. 3) Большинство разнообразия зафиксировано внутри популяций (~68–85%) для *I. malinverniana* в Италии [20], *I. yunguiensis* Q.F.

Wang et W.C. Taylor в Китае (диплоид, с преимущественно перекрестным оплодотворением) [17]), и *I. cangae* [22].

Выявленные для *I. lacustris* в Беларуси средний уровень дифференциации ($\phi_{PT} = 0.269$; $F_{st} = 0.193$) и большая доля внутривидового разнообразия (73.13%), в целом характерны для перекрестно-опыляемых и длительно живущих видов [38]. Обнаруженный разброс показателей ГР и их значимая сопряженность с численностью популяций (обилие и толерантность, рис. 2, ESM 8) согласуется с принятым положением, что малые и изолированные популяции не могут поддерживать достаточный пул разнообразия, по сравнению с большими [1, 2, 38]. Так, для более крупных и близкорасположенных популяций, как GB и CH (2 км), которые согласно нашим данным Structure и $\phi_{PT} = 0.155$ являются субпопуляциями, процесс недавнего резкого снижения численности и вероятно ГР (для CH) будет менее чувствителен благодаря интенсивному генетическому обмену между ними ($Nm = 6.13$, при среднем – 2.7 мигранта на поколение). Стоит отметить, что озера Глубокое и Чербомысло обособлены с момента образования, гидрологически не связаны и в настоящее время. Меньшие и изолированные популяции – оз. Белое (BL) и Свитязь (SV) – более уязвимы из-за недостаточности ресурсов эффективного накопления изменчивости (низкий обмен $Nm = 1.17$, экологиче-

Таблица 3. Матрица попарных значений дифференциации (ϕ_{PT} , ниже диагонали; $p \leq 0.007$) и несмещенных генетических дистанций Неи (u_{NeiP} , выше диагонали) популяций *I. lacustris*

	GB	CH	BL	SV	
	—	0.043	0.133	0.147	GB
	0.155	—	0.081	0.085	CH
	0.254	0.151	—	0.075	BL
	0.313	0.250	0.259	—	SV

ские риски, снижение ГР) и краевой локализации. Довольно высокий поток генов на видовом уровне ($Nm = 2.7$) и отсутствие изоляции расстоянием предполагает в изученном регионе вклад полового размножения и распространение спор и частей растений на дальние расстояния с возможным участием мигрирующих и перелетных птиц. Можно заключить, что обнаруженный тип распределения и сравнительно высокие значения видовых показателей ГР вероятно обусловлены особенностями биологии и расселения полушника озерного: гетероспоровостью, половым размножением и высокой плоидностью ($10\times$), вовлечением материала из других генераций благодаря многолетней жизненной форме и способностью спор сохранять жизнеспособность в озерах до десяти лет [24].

Региональная дифференциация и градиент ГР между северными и южными популяциями (~14%, табл. 2) согласуется с различным происхождением этих озер (ледниковые на севере и карстовые на юге). Также это может указывать на независимо протекающие региональные эволюционные процессы и накопление адаптивных мутаций (важных при противостоянии резким изменениям качества среды) [4, 5] и на важность сохранения всех краевых местообитаний (BL и SV, рис. 1), особенно в связи с современными процессами изменения климата.

Выявленная сопряженность эрозии ГР полушника со снижением численности с одной стороны, и качества среды с другой, лучше объясняла снижение общей устойчивости популяции, чем все эти факторы по отдельности (ESM 3, ESM 8). Таким образом, для *I. lacustris* обнаружена взаимосвязь “лимитирующие факторы \rightarrow численность \leftrightarrow ГР”, подтвержденная для других видов [39]. Полученные нами данные в совокупности позволяют использовать ГР как более чувствительную меру численности вида, а интегральный анализ всех компонентов как функцию для выявления лимитирующих факторов.

Для разработки стратегий сохранения вида также важна информация о его расселении на исследуемой территории. По совокупности гидрологических показателей и типометрии озер, а также анализа гербарных сборов, мы предполагаем, что ранее мест для обитания полушника озерного на территории Беларуси было больше, чем в настоящее время. По фрагментарным находкам спор *I. lacustris* места произрастания этого вида отмечены в юго-западном регионе Беларуси [40], вид обитает и южнее, на Украине [41]. С учетом появления вида в пределах Кольского п-ова в диапазоне 12.0–10.0 тыс. калиброванных лет назад (кал. л.н.) [42], появление *I. lacustris* в регионе Беларуси предполагается со времени формирования озер, начиная с ~13.5 тыс. кал. л.н. в регионе Полесья (В.П. Зерницкая, перс. сообщ.). Способ-

ность вида мигрировать на дальние расстояния и различия уровней ГР в разных географических точках дает возможность предположить, что малочисленные изолированные популяции *I. lacustris* на юге республики, объединенные программой Structure в один кластер, представляют собой реликты позднеледникового периода, заселившиеся вероятно из рефугиальных зон на территории региона. И хотя наши методы в полной мере не позволяют раскрыть всю историческую картину расселения вида, косвенные доказательства — время возникновения озёр, спорадические локальные популяции на юге региона, их малочисленность и низкий уровень ГР, позволяют предполагать, что южные популяции старше, чем их северные соседи. Согласно уровням и распределению ГР, мы предполагаем, что по мере отступления ледникового щита, послеледниковое расселение вида в пределах Беларуси могло происходить из южных водоемов в северную ее часть. После формирования популяций полушника в озерах Поозерья на севере республики — регионе последнего оледенения, между популяциями севера и юга (а возможно и сопредельных территорий) продолжился генетический обмен, способствующий увеличению ГР, что также может объяснять наличие центра современного распространения вида в пределах Беларуси на севере республики. Вместе с тем средний уровень дифференциации, говорит о сравнительно недавней фрагментации или уничтожении пригодных для обитания вида мест, вследствие антропогенной трансформации, вероятно масштабной мелиорации в 20-х и 50–60-х гг. XX в. и экстенсивного сельского хозяйства.

Заключение и стратегии охраны

Снижение качества водной среды уникальных олиготрофных озер повсеместно в Европе ведет к драматическим потерям численности популяций полушника озерного или полной их утрате. В Беларуси, где проходит южная граница распространения *I. lacustris*, угроза для исчезновения вида заключается в основном в нарастании эвтрофирования водоемов: вид исчез в примерно 17% мест произрастания за несколько десятилетий. Среди них озёра, подвергающиеся комплексу негативных воздействий в связи с хозяйственной деятельностью арендаторов водоемов (туристический комплекс “Красный Бор”, оз. Белое Доброплесы) или высокой рекреационной нагрузкой (оз. Белое, Мядельский р-н) [7, 8, 16]. Полученные данные имеют важное значение для практической охраны вида на пределе распространения. В частности, выявлено достоверное влияние лимитирующих факторов, связанных с притоком веществ и загрязнением вод (азотными и фосфорными соединениями), снижением прозрачности и увеличения рН водной среды на численность и уровни ГР попу-

ляций *I. lacustris*, а также на присутствие видов фитоиндикаторов этих состояний. По происхождению данные угрозы в основном антропогенного характера: приток загрязнений, рекреация, мелиорация, изменение уровня поверхностных и грунтовых вод (ESM 9).

По совокупности эколого-генетических данных можно заключить, что несмотря на то, что на видовом уровне сохраняется благоприятный баланс генетического разнообразия, сопряженность его потери с воздействием негативных антропогенных воздействий предполагает снижение эволюционного потенциала вида и дальнейшее сокращение числа его местообитаний на территории республики. Все изученные популяции уникальны по своим генетическим характеристикам, подвержены обмену генетической информацией (средний уровень Nm и подразделенности, большая часть ГР приходится на внутривидовый уровень) и вносят важный вклад в общее состояние генофонда вида. Сохранение каждой популяции вида и места произрастания — задача природоохранной практики *in situ*. Успешность мер охраны можно повысить при использовании индивидуального подхода, особенно для снижающих численность популяций (в т. ч. организация заповедной зоны, сохранение гидрологического режима озер, снижение антропогенной нагрузки; см. ESM 9). Развитие научно обоснованных программ по *ex situ* сохранению вида (создание банка спор из всех известных местообитаний для наибольшего охвата генетического разнообразия вида, размножение растений в аквакультуре для последующей репатриации [24, 43, 44]) будет способствовать повышению шансов на устойчивое развитие и сохранение каждой популяции (см. ESM 9). Эколого-генетический мониторинг популяций и их ранжирование по ГР обоснованы на всех этапах *in situ* и *ex situ* сохранения вида, в т. ч. для прогнозирования динамики развития популяций полушника, при любых манипуляциях по восстановлению популяций [45]. Перспективными исследованиями, важными для сохранения полушника озерного, являются реконструкция филогеографии и истории послеледникового расселения вида, расширение списка исследуемых местообитаний, идентификация генов, ответственных за приобретенные адаптации к изменениям окружающей среды.

Авторы признательны: к. б. н. В.С. Панкратову и рецензенту за внимательное прочтение рукописи и ценные замечания, к. г. н. В.П. Зерницкой за важные комментарии по расселению вида.

Работа выполнена в рамках задания “Мониторинг водной растительности”, раздел НСМОС начиная с 2000 г., гранта БРФФИ № Б10-132.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием в качестве объекта животных.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием в качестве объекта людей.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Frankham R. Genetics and extinction // Biol. Conserv. 2005. V. 126. № 2. P. 131–140.
2. Allendorf F.W., Luikart G.H., Aitken S.N. Conservation and the Genetics of Populations, 2nd ed. Hoboken (New Jersey): Wiley-Blackwell, 2012. 624 p.
3. Manel S., Schwartz M.K., Luikart G., Taberlet P. Landscape genetics: combining landscape ecology and population genetics // Trends Ecol. & Evol. 2003. V. 18. № 4. P. 189–197. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(03\)00008-9](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(03)00008-9)
4. Hampe A., Petit R.J. Conserving biodiversity under climate change: the rear edge matters // Ecol. Lett. 2005. V. 8. № 5. P. 461–467. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2005.00739.x>
5. Lessica P., Allendorf F.W. When are peripheral populations valuable for conservation? // Conserv. Biol. 1995. V. 9. P. 753–760.
6. Heino J., Virkkala R., Toivonen H. Climate change and freshwater biodiversity: Detected patterns, future trends and adaptations in northern regions // Biol. Rev. Camb. Philos. Soc. 2009. V. 84. № 1. P. 39–54. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.2008.00060.x>
7. Vlasov B.P. Geoeological features of Belarus lakes — the habitats of relict species *Isoetes lacustris* L. // Acta Geogr. Silesiana. 2012. V. 12. P. 57–64.
8. Власов Б.П. Особенности уникальных озер Беларуси как формирующая основа ресурсов реликтовых видов *Isoetes* L. и *Lobelia dortmanna* L. // Вестник БГУ. Серия 2. Химия. Биология. География. 2014. № 1. С. 62–67.
9. Jermy A.C. Isoetaceae // Pteridophytes and Gymnosperms / Eds Kramer K.U., Green P.S. Berlin/Heidelberg: Springer, 1990. P. 26–31.
10. Пугачевский А.В., Вершицкая И.Н., Ермохин М.В. и др. Редкие биотопы Беларуси. Минск: Альтиора — Живые Краски, 2013. 236 с.
11. Voge M. Environmentally related demography: Field studies on *Isoetes lacustris* L. (Lycophyta, Isoetaceae) in Europe // Pteridology in the New Millennium. Dordrecht: Springer, 2003. P. 233–260.
12. Brunton D.F., Troia A. Global Review of recent taxonomic research into *Isoetes* (Isoetaceae), with implications for biogeography and conservation // Fern Gaz. 2018. V. 20. P. 309–333.
13. Arts G.H. Deterioration of Atlantic soft water macrophyte communities by acidification, eutrophication and alkalisation // Aquat. Bot. 2002. V. 73. № 4. P. 373–393. [https://doi.org/10.1016/S0304-3770\(02\)00031-1](https://doi.org/10.1016/S0304-3770(02)00031-1)
14. Красная книга Российской Федерации (растения и грибы) / Под ред. Трутнева Ю.П. и др., сост. Ка-

- мелин Р.В. и др. М.: Тов-во научн. изд. КМК, 2008. 855 с.
15. Красная книга Республики Беларусь: редкие и находящиеся под угрозой исчезновения виды дикорастущих растений / Под ред. Качановского И.М. и др. 4-е изд. Минск: Беларус. Энцыкл. імя П. Броўкі, 2015. 448 с.
 16. *Вознячук И.П., Масловский О.М., Романенко Я.А. и др.* Мониторинг растительного мира // Национальная система мониторинга окружающей среды Республики Беларусь: результаты наблюдений, 2013 / Под ред. Кузьмина С.И. [Электронный ресурс]. Минск: РУП "Бел НИЦ "Экология", 2014. С. 200–237.
 17. *Kang M., Ye Q., Huang H.* Genetic consequence of restricted habitat and population decline in endangered *Isoetes sinensis* (Isoetaceae) // *Ann. Bot.* 2005. V. 96. № 7. P. 1265–1274.
<https://doi.org/10.1093/aob/mci277>
 18. *Chen Y.Y., Liao L., Li W., Li Z.* Genetic diversity and population structure of the endangered alpine quillwort *Isoetes hypsophila* Hand.-Mazz. revealed by AFLP markers // *Plant Syst. Evol.* 2010. V. 290. P. 127–139.
<https://doi.org/10.1007/s00606-010-0355-5>
 19. *Mengxue M.A., Xiang D.O., Kuo L.I. et al.* Outcrossing rates and gene flow in natural population of the endangered endemic aquatic lycophyte *Isoetes yunguiensis* as revealed by ISSR markers // *Not. Bot. Horti Agrobot. Cluj Napoca.* 2019. V. 47. №. 2. P. 339–346.
<https://doi.org/10.15835/nbha47111264>
 20. *Gentili R., Abeli T., Rossi G. et al.* Population structure and genetic diversity of the threatened quillwort *Isoetes malinverniana* and implication for conservation // *Aquat. Bot.* 2010. V. 93. № 3. P. 147–152.
<https://doi.org/10.1016/j.aquabot.2010.05.003>
 21. *Hofstra D., de Winton M.* Geographic scales of genetic variation amongst *Isoetes* in New Zealand // *Aquat. Bot.* 2016. V. 131. P. 28–37.
<https://doi.org/10.1016/j.aquabot.2016.02.004>
 22. *Santos M.P., Araújo J.V., Lopes A.V. et al.* Genetic diversity by ISSR of two endemic quillworts (*Isoetes* L.) species from Amazon Iron Rocky Outcrops, *Isoetes cangae* e *I. serracarajensis* // *BioRxiv.* 2019. P. 635771.
<https://doi.org/10.1101/635771>
 23. *Vöge M.* Monitoring the vitality of *Isoetes lacustris* by using a non-destructive method // *Limn. Rev.* 2015. V. 14. № 3. P. 153–158.
<https://doi.org/10.1515/limre-2015-0005>
 24. *Civrilikova M., Znachor P., Vrba J.* The effect of temperature on the phenology of germination of *Isoetes lacustris* // *Preslia.* 2014. V. 86. № 3. P. 279–292.
 25. *Wood D.P., Olofsson J.K., McKenzie S.W., Dunning L.T.* Contrasting phylogeographic structures between freshwater lycophytes and angiosperms in the British Isles // *Bot. Lett.* 2018. V. 165. P. 476–486.
<https://doi.org/10.1080/23818107.2018.1505545>
 26. *Блажевич Р.Ю., Дмитриева С.А., Парфёнов В.И. и др.* Флора Беларуси. Сосудистые растения. Т. 1. Lycopodiophyta. Equisetophyta. Polypodiophyta. Ginkgophyta. Pinophyta. Gnetophyta // Под ред. Парфёнова В.И. Минск: Беларус. навука, 2009. 199 с.
 27. *Власов Б.П., Гигевич Г.С., Грищенкова Н.Д.* Концепция и методика мониторинга водной растительности // Методика проведения мониторинга растительного мира в составе Национальной системы мониторинга окружающей среды Республики Беларусь / Под ред. Пугачевского А.В. Минск: Право и экономика, 2011. С. 28–39.
 28. *Сценановіч І.М.* Эколага-фларыстычны дыягназ сінтаксонаў прыроднай травяністай расліннасці Беларусі. Мінск: Камтат, 2000. 140 с.
 29. *Dempster E.L., Pryor K.V., Francis D. et al.* Rapid DNA extraction from ferns for PCR-based analyses // *Biotechniques.* 1999. V. 27. № 1. P. 66–68.
 30. *Botstein D., White R.L., Skolnick M., Davis R.W.* Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms // *Am. J. Hum. Gen.* 1980. V. 32. P. 314–331.
 31. *Lynch M., Milligan B.G.* Analysis of population genetic structure with RAPD markers // *Mol. Ecol.* 1994. V. 3. № 2. P. 91–99.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.1994.tb00109.x>
 32. *Peakall R., Smouse P.E.* GenAEx 6.4: Genetic analysis in Excel. Population Genetic Software for teaching and research // *Mol. Ecol. Notes.* 2010. V. 6. P. 288–295.
<https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2005.01155.x>
 33. *Pritchard J.K., Stephens M., Donnelly P.* Inference of population structure using multilocus genotype data // *Genetics.* 2000. V. 155. P. 945–959.
 34. *Evanno G., Regnaut S., Goudet J.* Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: A simulation study // *Mol. Ecol.* 2005. V. 14. № 8. P. 2611–2620.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x>
 35. *Zhivotovsky L.A.* Estimating population structure in diploids with multilocus dominant DNA markers // *Mol. Ecol.* 1999. V. 8. P. 907–913.
 36. *Bergmann F., Gregorius H.R., Larsen J.B.* Levels of genetic variation in European silver fir (*Abies alba*) // *Genetica.* 1990. V. 82. № 1. P. 1–10.
<https://doi.org/10.1007/BF00057667>
 37. *Mantel N.* The detection of disease clustering and a generalized regression approach // *Cancer Research.* 1967. V. 27. P. 209–220.
 38. *Hamrick J.L., Godt M.W.* Effects of life history traits on genetic diversity in plant species // *Philos. Trans. Royal Soc. of London. Series B: Biol. Sci.* 1996. V. 351(1345). P. 1291–1298.
<https://doi.org/10.1098/rstb.1996.0112>
 39. *Vergeer P., Rengelink R., Ouborg N.J., Roelofs J.G.* Effects of population size and genetic variation on the response of *Succisa pratensis* to eutrophication and acidification // *J. Ecol.* 2003. P. 600–609.
 40. *Горовец В.К.* Водная растительность некоторых озер Полесской низменности // Тр. комплексной экспед. по изучению водоемов Полесья. Минск: БГУ им. В.И. Ленина, 1956. С. 255–288.
 41. *Прядко О.І., Дідух Я.П.* Молоділляк озерний — *Isoetes lacustris* L. // Червона книга України. Рослинний світ / Під заг. ред. Дідуха Я.П. Київ: Глобалконсалтинг, 2009. С. 11.

42. Лаврова Н.Б., Филимонова Л.В. Использование анализа состава ископаемой флоры для реконструкции растительности и палеоэкологических условий позднеледниковья Карелии // Труды Карельского научного центра РАН. 2018. № 10. С. 27–43.
<https://doi.org/10.17076/eco882>
43. Власова А.Б., Джус М.А., Власов Б.П. Охрана и мониторинг состояния популяций редкого вида аквафлоры Беларуси полушника озерного (*Isoetes lacustris* L.). Минск: БГУ, 2015. 32 с.
44. Спиридович Е.В., Фоменко Т.И., Власова А.Б. и др. Асептическая коллекция и банк ДНК Центрального ботанического сада НАН Беларуси как эффективные инструменты сохранения редких растений // Вести НАН Беларуси. Серия биол. наук. 2017. № 3. С. 117–128.
45. Maschinski J., Albrecht M.A. Center for Plant Conservation's Best Practice Guidelines for the reintroduction of rare plants // Plant Divers. 2017. V. 39. № 6. P. 390–395.
<https://doi.org/10.1016/j.pld.2017.09.006>

Ecological and Phytocenotic Differentiation, Genetic Variability and Structure of Natural Populations of the Relict Species of Aquatic Flora

Isoetes lacustris L. in Belarus

N. B. Vlasava^{a,*}, A. N. Yukhimuk^a, M. A. Dzhus^b, M. S. Tukhfatullina^a, and B. P. Vlasov^b

^aCentral Botanical Gardens of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, 220012 Belarus

^bBelarusian State University, Minsk, 220030 Belarus

*e-mail: nastassia_vlasova@yahoo.com

Using RAPD and ISSR systems the genetic diversity and population structure of *Isoetes lacustris* L. on the southern border of its range in Belarus, the relict species of aquaflora, confined to oligotrophic lakes and drastically decreasing in Europe, were studied. For four studied populations in total 127 markers (90.6% polymorphic, 106 informative) were revealed. At the species level genetic variability parameters comprise: $H_e = 0.247$, $P_p = 100\%$, $I = 0.390$. The average level of subdivision ($\phi_{PT} = 0.269$, $p \geq 0.001$; $F_{st} = 0.193$, $p \geq 0.0001$) and gene flow (2.7 migrants per generation) were revealed. A larger proportion of the variability (73.13%) falls on the intra-population level, 13.36% between populations, and 13.51% explains the difference between regions (southern and northern populations). The ranging of populations by genetic diversity ($H_e = 0.063–0.243$; $P_p = 17.92–93.4\%$; $I = 0.095–0.379$) and identification of individual loci determines uniqueness of each population and significance in conservation programs. A decrease of the level of genetic diversity in the small isolated populations in combination with limiting factors (natural – the southern limit of distribution, anthropogenic – eutrophication and changes in the lake regime) are of high risk for the development of populations and the distribution of the species in Belarus. Using integrated analysis of ecological and phytocenotic characteristics of habitat, level and structure of genetic variability of its populations measures for *in situ* and *ex situ* species conservation were proposed.

Keywords: *Isoetes lacustris*, environmental parameters, RAPD, ISSR, genetic diversity, border of the range.