

УДК 582:581(082)  
ББК 28.59я43  
И73

**Редакционная коллегия:**

д.б.н., чл.-корр. НАН Беларуси *В. В. Титок* (ответственный редактор),  
к.б.н. *П. Н. Белый*; к.б.н. *И. М. Гаранович*; д.б.н. *Н. В. Гетко*;  
к.б.н. *Л. А. Головченко*; *С. М. Кузьменкова*; д.б.н. *Е. Н. Кутас*;  
к.б.н. *Н. М. Лунина*; к.б.н. *О. В. Чижик*; к.б.н. *А. П. Яковлев*

**Рецензенты:**

доктор биологических наук, Ботанический институт  
имени В. Л. Комарова Российской академии наук *К. Г. Ткаченко*;  
кандидат биологических наук, Институт экспериментальной  
ботаники имени В. Ф. Купревича Национальной академии наук Беларуси  
*А. В. Пугачевский*

**Интродукция, сохранение и использование биологического разнообразия флоры** : материалы международной научной конференции, посвященной 90-летию Центрального ботанического сада Национальной академии наук Беларуси (Минск, 28 июня – 1 июля 2022 г.). В 2 ч. Ч. 2 / Нац. акад. наук Беларуси [и др.]. редкол.: В.В. Титок [и др.] – Минск : Белтаможсервис, 2022. – 420 с.

ISBN 978-985-7004-75-1

В сборнике представлены материалы международной научной конференции, посвященной 90-летию Центрального ботанического сада Национальной академии наук Беларуси. Часть 2: секция 3 «Биотехнологические и молекулярно-генетические аспекты изучения и использования биоразнообразия растений», секция 4 «Решение вопросов защиты растений в ботанических садах», секция 5 «Научное, прикладное и просветительское значение ботанических коллекций» и секция 6 «Современные направления ландшафтного дизайна и зеленого строительства».

УДК 582:581(082)  
ББК 28.59я43

ISBN 978-985-7004-75-1 (ч. 2)  
ISBN 978-985-7004-72-0

© ГНУ «Центральный ботанический сад  
Национальной академии наук Беларуси», 2022  
© Оформление. РУП «Белтаможсервис», 2022

## СОСТОЯНИЕ ПОПУЛЯЦИОННОГО ГЕНОФОНДА ЧИСТОУСТА ВЕЛИЧАВОГО (*OSMUNDA REGALIS* L.) В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ

**Юхимук А. Н.**

Центральный ботанический сад Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь,  
andrei.yukhimuk@gmail.com

**Резюме.** Проведена ревизия белорусской популяции чистюста величавого (*Osmunda regalis* L.), оценена численность, отмечено сокращение занимаемой видом площади. Разработаны системы мультилокусных доминантных (SCoT, SRAP) ДНК-маркеров. Определена генетическая структура белорусской популяции *Osmunda regalis* L., оценены уровень генетической изменчивости *Osmunda regalis* L. и внутривидовая подразделенность. Установлено, что белорусская популяция *Osmunda regalis* L. в целом генетически однородна, разделение её на ценопопуляции не соответствует генетической структуре и не является генетически обоснованным.

## ROYAL FERN (*OSMUNDA REGALIS* L.) GENE POOL CONDITION IN THE REPUBLIC OF BELARUS

**Yukhimuk A. N.**

**Summary.** For the first time the Belarusian population of the royal fern (*Osmunda regalis* L.) revision was carried out. The decreasing of the area occupied by the species was noted. Systems of multilocus dominant (SCoT, SRAP) DNA markers have been developed. The genetic structure of the *Osmunda regalis* L. Belarusian population was determined, the level of genetic variability and intrapopulation subdivision of the royal fern were assessed. It has been established that the Belarusian population of *Osmunda regalis* L. is genetically homogeneous. The population division into cenopopulations does not correspond to the genetic structure and is not genetically reasonable.

**В** 2010 году Стороны Конвенции о биологическом разнообразии, в том числе Республика Беларусь, приняли Стратегический план в области сохранения и устойчивого использования биоразнообразия на 2011–2020 годы, в рамках которого все страны и субъекты деятельности принимают меры к сохранению биоразнообразия. Компонентами биоразнообразия являются все разнообразные формы жизни на Земле и их генетическое разнообразие. Сохранение генетического разнообразия редких и исчезающих видов растений является одной из основных стратегических целей природоохранного планирования, в связи с тем, что лишь поддержание достаточной генетической вариабельности внутри и между популяциями может обеспечить необходимый уровень адаптивного потенциала вида для приспособления к новым типам антропогенного влияния и давления окружающей среды [1–3]. При этом на первый план выступают задачи по сохранению генофонда исчезающих видов растений региональных флор. Для птеридофлоры Беларуси одним из таких охраняемых видов является чистюст величавый (*Osmunda regalis* L.).

Чистюст величавый (*Osmunda regalis* L.) – многолетнее растение, размножается вегетативно и спорами. Вид распространен в Северной Америке, Вест-Индии, на Бермудских островах, Центральной Америке, Южной Америке, Европе, Азии, Африке. На территории Республики Беларусь известно единственное местонахождение, расположенное в Брестском районе (рисунок 1). Чистюст величавый – вид I категории национального природоохранного значения [4]. Белорусская популяция *Osmunda regalis* L. находится на восточной границе европейской части видового ареала. Такие пограничные популяции, как правило, произрастают в условиях экологического пессимума. Повышенное давление средовых факторов в совокупности с антропогенной нагрузкой оказывают существенное влияние на генетическую структуру популяции посредством отбора адаптивных комплексов аллельных вариантов генов. Степень давления среды и состояние популяционно-генетических ресурсов в конечном итоге определяют степень устойчивости популяции вида и направление ее исторического развития. Для редких и исчезающих видов очевидно нарушение

баланса системы «среда – генотип». Выяснение степени влияния популяционного генофонда на уровень адаптационного потенциала популяции помогает выбрать научно обоснованные направления природоохранных мероприятий.

В настоящее время молекулярные маркеры широко используются с целью установления генетической структуры популяций растений. Оптимальным методологическим подходом к исследованию популяционного генофонда является использование ДНК-маркеров, так как позволяет непосредственно изучать полиморфизм наследственного материала. Особое место в исследованиях популяционных генофондов исчезающих видов растений занимают ДНК-маркеры, ассоциированные с кодирующими последовательностями ДНК. К таким селективно-значимым маркерам, играющим ведущую роль при рассмотрении вопросов взаимодействия генотипов и факторов среды, можно отнести SCoT- и SRAP-маркеры. SCoT (*Start Codon Targeted*) – однопраймерная мультилокусная маркерная система, маркирующая участки ДНК ассоциированные с короткими консервативными участками ДНК, фланкирующими стартовый кодон в генах растений [5]. SRAP (*Sequence-related amplified polymorphism*) – двухпраймерная мультилокусная маркерная система, маркирующая участки ДНК, ассоциированные с открытой рамкой считывания – последовательностью нуклеотидов в составе ДНК, потенциально способной кодировать белок [6].

Материалом исследования служили листья чистюста величавого, произрастающего в четырех фитоценозах на территории Томашовского сельсовета (Брестский район, Брестская область, Республика Беларусь). Листовая ткань собрана в июле 2020 года и августе 2021 года. Для сбора растительного материала сформирована репрезентативная выборка из растений чистюста величавого, равномерно произрастающих на территории локалитета. Препараты тотальной ДНК из обезвоженной листовой ткани получали методом СТАВ-экстракции с модификациями [7]. Качественный и количественный анализ препаратов ДНК проводили спектрофотометрическим способом. Маркирование тотальной ДНК чистюста величавого проводилось с использованием техники ПЦР (полимеразная цепная реакция). В исследование включены базовые наборы из 36 SCoT-праймеров и 58 пар SRAP-праймеров, которые были протестированы на предмет получения высокополиморфных, воспроизводимых маркеров. ПЦР проводили в объеме 25  $\mu$ l. Состав ПЦР-смеси был следующим: 1 $\times$  PCR буфер (Евроген, Россия), 1 $\times$  dNTP (Евроген, Россия), 5  $\mu$ M праймера (ПраймТех, Беларусь), 0,5 ед. HS Taq-полимеразы (Евроген, Россия) и 15 ng матрицы ДНК. Для предотвращения амплификации неспецифических продуктов ПЦР была применена техника Touchdown. ПЦР проводили в термоциклире SureCycler 8800 (Agilent), при следующем режиме: 10 циклов TouchDown (уменьшение  $T_a$  на 1  $^{\circ}$ C в каждом цикле): 10 секунд при 95  $^{\circ}$ C, 20 секунд при  $T_a + 10$   $^{\circ}$ C, 90 секунд при 72  $^{\circ}$ C, далее следовали 35 циклов: 10 секунд при 95  $^{\circ}$ C, 20 секунд при  $T_a$ , 90 секунд при 72  $^{\circ}$ C.

Продукты амплификации разделяли посредством гель-электрофореза и визуализировали на приборе VersaDoc MP4000 (Bio-Rad). Расчет длин фрагментов (в п.н.) проводили с использованием программного обеспечения Quantity One (Bio-Rad) на основе сравнения с маркерами молекулярного веса.

Данные электрофоретического разделения были использованы для количественной оценки основных популяционных показателей, описывающих состояние генетических ресурсов популяции чистюста величавого: доля полиморфных локусов, или полиморфность (P), среднее число аллелей на локус (A) и среднее число нередких аллелей на локус (A1 %), показатель ожидаемой гетерозиготности (HE), коэффициенты, предложенные Райтом (F-статистики) и Ней (G-статистики) [8, 9].

В результате исследования проведена инвентаризация белорусской популяции *Osmunda regalis* L., уточнены границы произрастания чистюста величавого и объем популяции. Отмечено сокращение численности популяции с 1000 особей на момент обнаружения популяции до примерно 300 по состоянию на 2021 год.

Для проведения маркирования SCoT-локусов исследуемого таксона были отобраны праймеры, обладающие достаточным полиморфизмом и имеющие воспроизводимую амплификационную активность. В общей сложности для генотипирования образцов чистюста величавого (*Osmunda regalis* L.) было отобрано 6 SCoT-праймеров (SCoT-06, SCoT-11, SCoT-13, SCoT-18, SCoT-19, SCoT-35) и 3 пары SRAP-праймеров (SRAP-Em06/Me09, SRAP-Em12/Me09, SRAP-Em13/Me05).

Все отобранные в исследовании праймеры генерировали четкие, воспроизводимые маркеры, позволяющие описать аллельные состояния SCoT- и SRAP-локусов *Osmunda regalis* L. (рисунок 1). В общей сложности было идентифицировано 104 локуса (ДНК-маркера).

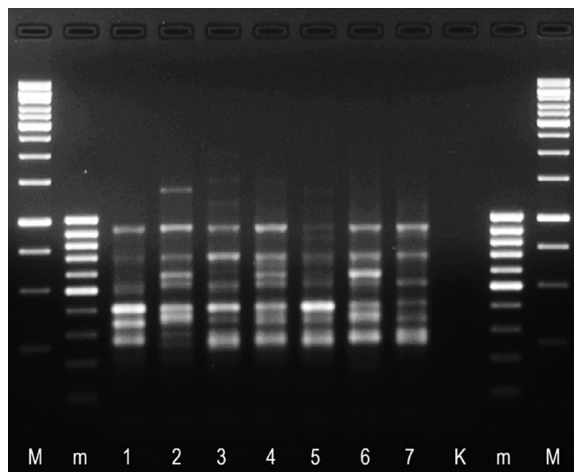


Рис. 1. Электрофоретическое разделение продуктов амплификации тотальной ДНК *Osmunda regalis* L. с праймером SCoT-11: 1–7 – растения *Osmunda regalis* L.; К – отрицательный контроль; m – размерный стандарт GeneRuler 100bp, М – размерный стандарт GeneRuler 1Kb.

Для определения уровня генетической изменчивости *Osmunda regalis* L. в четырёх природных ценопопуляциях Беларуси были рассчитаны значения основных параметров полиморфизма по всем выявленным локусам (данные не представлены). Установлено, что в изученных ценопопуляциях *Osmunda regalis* L. в среднем 30,3 % локусов находятся в полиморфном состоянии, каждый локус в среднем имеет 1,824 аллелей, а каждое растение является гетерозиготным по 12,6 % своих генов. Среди исследованных наиболее богатыми генетическими ресурсами обладает ценопопуляция черноольхового фитоценоза, обладающая наиболее высокими показателями полиморфизма. Минимальное значение гетерозиготности для ценопопуляции сосняка мшистого свидетельствует о наименьшем (9,7 %) количестве локусов, по которым гетерозиготно каждое растение данного локалитета, и дает основание утверждать, что данная популяция находится под бóльшим риском по сравнению с другими исследованными популяциями. В белорусской популяции чистюста величавого (*Osmunda regalis* L.) наблюдается дефицит гетерозигот: показатель *GST* имеет довольно высокие положительные значения: от +0,003 до +0,116. Среднее значение показателя *GST*, определяющего подразделенность, относительно невелико и равняется 0,041. Следовательно, внутривидовая составляющая генетической изменчивости чистюста величавого равна 95,9 %, тогда как ее межвидовая составляющая – всего 4,1 %. Несмотря на умеренный уровень генетического полиморфизма белорусская популяция *Osmunda regalis* L. в целом генетически однородна. Такая генетическая однородность популяции подтверждается достаточно низкими значениями генетических дистанций между ценопопуляциями *Osmunda regalis* L. (данные не представлены), что в совокупности свидетельствует о том, что разделение на ценопопуляции не соответствует генетической структуре и не является генетически обоснованным.

Полученные данные об умеренном генетическом разнообразии и генетической однородности популяции *Osmunda regalis* L. свидетельствуют о её низком генетическом потенциале. Крайне ограниченные генетические ресурсы наряду с существующими естественными и антропогенными угрозами создают риски дальнейшего существования белорусской популяции *Osmunda regalis* L. и требуют неотложных мер реагирования для её сохранения. К таким мерам в первую очередь необходимо отнести контроль за выполнением всех природоохранных мероприятий, гарантированных *Osmunda regalis* L. как виду I категории национальной природоохранной значимости и произрастающему в основной зоне (включающей участки территории с наиболее ценными экосистемами, для которых установлены наиболее строгие ограничения допустимого природопользования) Республиканского ландшафтного заказника «Прибужское Полесье». Особо важным

направлением природоохранных мероприятий для защиты популяции *Osmunda regalis* L. должна стать комплексная работа по ex situ консервации вида с учетом его биологических особенностей, состояния генетических ресурсов и существующих угроз.

Исследование выполнено при поддержке БРФФИ (договор Б20–083).

#### Список литературы

1. Barrett, S.C.H. and Kohn, J. R. Genetic and evolutionary consequences of small population sizes in plants: Implications for conservation. In: Falk, D.A. and Holsinger, K.A., Eds., Genetics and Conservation of Rare Plants, Oxford University Press, New York, 1991. – 3–30.
2. Douglas W. Schemske, Brian C. Husband, Mary H. Ruckelshaus, Carol Goodwillie, Ingrid M. Parker, John G. Bishop. Evaluating Approaches to the Conservation of Rare and Endangered Plants // Ecology. – Volume 75, Issue3, 1994. – P. 584–606.
3. Renau-Morata, B., Nebauer, S. G., Sales, E., Allainguillaume, J., Caligari, P. and Segura, J.) Genetic diversity and structure of natural and managed populations of *Cedrus atlantica* (Pinaceae) assessed using random amplified polymorphic DNA. American Journal of Botany. – V. 92 (5), 2005. – pp. 875–884.
4. Красная книга Республики Беларусь: редкие и находящиеся под угрозой исчезновения виды дикорастущих растений / гл. редкол.: И. М. Качановский (предс.). М. Е. Никифоров, В. И. Парфенов [и др.]. – 4-е изд. – Минск: Беларус. Энцыкл. імя П. Броўкі. – 2015. – 448 с.
5. Collard B. C.Y., Mackill D. J. Start codon targeted (SCoT) polymorphism: a simple, novel DNA marker technique for generating gene-targeted markers in plants // Plant Mol Biol Rep. – 2009. – V.27. – P. 86–93.
6. Li G., Quiros C. F. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in Brassica // Theoretical and Applied Genetics. – 2001. – V. 103. – P: 455–461.
7. Dempster E. L., Pryor K. V., Francis D., Young J. E., Rogers H. J. Rapid DNA extraction from ferns for PCR-based analyses // Biotechniques. – 1999. – V. 27(1). – P: 66–68.
8. Nei M. Molecular population genetics and evolution. Amsterdam, 1975. 278 p.
9. Wright S. Evolution and genetics of populations. Chicago: Univ. Chicago press. – Vol. 2, 1969. – 511 p.