

**ДЛИТЕЛЬНОЕ СОХРАНЕНИЕ В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO* *OSMUNDA REGALIS* L.
И ОЦЕНКА ЕЁ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ СТАБИЛЬНОСТИ
С ПОМОЩЬЮ SCOT-МАРКЕРОВ**

В.И. Маяровская, Р.М. Шхалахова

*Федеральный исследовательский центр «Субтропический научный центр Российской академии наук»,
Сочи, Россия*

Osmunda regalis L. вид, который внесён в Красную книгу РФ и имеет категорию «Находящийся под угрозой исчезновения». На территории Сочинского национального парка в настоящее время сохраняется около 30 растений этого вида. Катастрофическое падение численности данного вида в местах произрастания, поставило его под угрозу полного исчезновения на территории Сочинского Причерноморья. Проблема размножения папоротника усугубляется тем, что споры длительное время не прорастают в почве во влажных условиях и быстро теряют жизнеспособность. Поэтому в ФИЦ СНЦ РАН проводятся работы по сохранению и размножению *O. regalis* методами биотехнологии в условиях культуры *in vitro*. Целью наших исследований являлось изучение физических факторов депонирования в условиях *in vitro* и подбор информативных SCOT-праймеров для оценки генетической стабильности *Osmunda regalis* L. Объект исследований – гаметофиты *O. regalis*. Показано, влияние температуры (13 °C, 21 °C, 23°C) и освещенности (800 лк, 1000 лк и 3500 лк) на морфометрические показатели и процент жизнеспособности гаметофитов при длительном культивировании (250 сут) в условиях *in vitro*. Установлено, что при понижении температуры (13 °C) и освещенности (800-1000 лк) уменьшались морфометрические показатели и процент жизнеспособности гаметофитов (41,5-43,6 %). Выявлено, что для длительного культивирования *O. regalis* оптимальными условиями являются температура 21 °C и освещенность 800-1000 лк, при которых жизнеспособность гаметофитов соответствовала 73,5-78,2 %. Для оценки генетической стабильности образцов из культуры *in vitro* апробировано 36 SCOT-праймеров, среди которых восемь (SCoT1, SCoT2, SCoT9, SCoT10, SCoT21, SCoT22, SCoT24, SCoT34) показали низкий уровень амплификации. Установлено, что наибольшее количество бэндов генерировали два маркера: SCoT19 и SCoT29. Вместе с тем, эффективность показали еще 9 SCOT-маркеров (SCoT3, SCoT8, SCoT13, SCoT14, SCoT15, SCoT16, SCoT18, SCoT20, SCoT32), которые могут быть использованы при оценке внутривидового разнообразия *O. regalis*. Анализ полученных данных выявил генетическую стабильность между длительно (5 лет) культивируемыми гаметофитами *O. regalis* L. в коллекции генобанка *in vitro* и маточными растениями, произрастающими в ботаническом саду «Дерево Дружбы» ФИЦ СНЦ РАН.

Ключевые слова: *Osmunda regalis* L., гаметофиты, исчезающий вид, условия *in vitro* депонирование, SCOT-маркеры, питательная среда, регуляторы роста, спорофиты

Сохранение видов растений в условиях замедленного роста в культуре *in vitro* определяется в большей степени их биологическими особенностями. При этом сохранение жизнеспособности растений основная цель при создании медленно растущих коллекций. Замедления роста можно достичь за счет различных факторов, физических условий культивирования, модификации питательных сред и т.д. Среди модификаций питательных сред можно рекомендовать разбавление их минеральной основы, изменение концентраций или комбинаций регуляторов роста, применение осмотиков, ингибиторов роста и т.д. Нами в ФИЦ СНЦ РАН ранее были проведены исследования по депонированию исчезающих, редких видов природной флоры Западного Кавказа *Campanula sclerophylla* (Kolak.) Czer., *Lilium martagon* subsp. *caucasicum* Misch. ex Grossh. [1, 2]. Эти исследования включали оценку ряда показателей: влияние применения осмотиков (сорбит, маннит), ингибитора роста – абсцизовую кислоту и различные

режимы температуры и освещенности на замедление роста и развития растений в условиях *in vitro* [1, 7]. Среди физических факторов наиболее часто применяют снижение температуры, в комбинации с уменьшением интенсивности освещения.

Депонирование в условиях *in vitro* гермоплазмы является частью консервации генетических ресурсов *ex situ* и, как известно, обладает рядом преимуществ. Вместе с тем при долговременном субкультивировании в течение нескольких лет необходима оценка генетической стабильности растений сохраняемых в генобанке *in vitro* [3].

Цель настоящих исследований – изучение физических факторов депонирования и подбор информативных SCoT-праймеров для оценки генетической стабильности *Osmunda regalis* L.

Объекты и методы исследований.

Объектом исследований служили гаметофиты *Osmunda regalis*. Эксперимент заложен на среде ¼ МС (без NH₄NO₃ и витаминов). Варианты опыта: температура воздуха 13 °C, освещённость 800 и 1 000 лк; температура воздуха 21 °C, освещённость 800 и 1 000 лк; контроль - освещённость 3500 лк, температура воздуха 23±1 °C. Состояние гаметофитов оценивали через 250 суток культивирования с помощью морфометрических показателей (длины и количества гаметофитов) и их жизнеспособности (%). Гаметофиты культивировали при фотопериоде 16/8 часов и влажности 70 %. Для статистической обработки полученных результатов использовали программное приложение Statistica 6.0.

Растительный материал и экстракция ДНК. В данной работе в качестве образцов были отобраны маточные растения *Osmunda regalis* L., произрастающее на территории сада-музея «Дерево Дружбы» г. Сочи, и растения из медленнорастущей коллекции *in vitro*, находящиеся в культуре в течении 5 лет в отделе биотехнологии ФИЦ СНЦ РАН. ДНК выделяли из листьев согласно протоколу СТАВ [6] Качество выделенной ДНК проверяли в 1% агарозном геле и спектрофотометрическим методом. Все образцы разбавляли до рабочей концентрации 200 ng/µL.

Генетический анализ. В работе использованы 36 SCoT-праймера, первоначально разработанные для *Oryza sativa* [5]. Реакционная смесь для ПЦР SCoT состояла из 10 мкл 2x реакционного буфера HS-TaqPCR (Biolabmix, Новосибирск, Россия), содержащего Hot Start Taq-полимеразу, 0,4 мкл праймера (10 мкМ), 2 мкл ДНК (200 нг мкл⁻¹) и обработанная DEPC вода в общем объеме ПЦР 20 мкл. Амплификацию проводили в термоциклире MiniAmp (Thermo Fisher Scientific, Массачусетс, США) по следующей программе: первичная денатурация 5 мин при 95 °C, отжиг 35 циклов денатурация при 95 °C в течение 1 мин, отжиг при 52 °C в течение 1 мин, элонгация при 72 °C в течение 2 минут и финальная элонгация при 72 °C в течение 5 минут. Разделение SCoT-фрагментов проводили в 2 % агарозном геле в течение 2,5 часов при 90 В в 1 × TAE буфере.

Статистическая обработка. Параметры генетического разнообразия: общее количество бэндов; количество полиморфных бэндов (Р = полиморфизм (%)) рассчитаны с использованием программы IMEC (<https://irscope.shinyapps.io/iMEC/>).

Результаты и обсуждение.

В результате исследований установлено, что условия депонирования (температура и освещенность) в течение 250 суток культивирования, влияли на биометрические показатели и жизнеспособность гаметофитов *O. regalis* (табл. 1). Так, показатели количества и длины гаметофитов варьировали от 6,1 до 17,3 шт./экспл. и от 0,5 до 1,3 см, соответственно. При этом наименьшие морфометрические показатели получены у гаметофитов в условиях пониженных температуры и освещенности, и процент их жизнеспособности в этих условиях культивирования также был низок.

Наибольшие морфометрические показатели отмечены в контроле, однако процент жизнеспособных гаметофитов также был невысок – 48,3 %. Вместе с тем, установлено, что оптимальными условиями для длительного культивирования гаметофитов *O. regalis* является температура воздуха 21 °C и освещенность 800-1000 лк, при которых жизнеспособность гаметофитов составляет 73,5 и 78,2%, соответственно.

Таблица 1.

Влияние температуры и освещенности на морфометрические показатели и жизнеспособность гаметофитов

Температура культивирования, °C (освещённость, лк)	Количество гаметофитов, шт./экспл.	Длина гаметофитов, см	Жизнеспособных гаметофитов, %
Контроль, освещённость 3500 лк, температура воздуха 23 ± 1 °C	17,3±3,2	1,3±0,2	48,3
Температура воздуха 13 ± 1 °C, освещённость 800 лк	6,1±1,1	0,5±0,1	41,5
Температура воздуха 13 ± 1 °C, освещённость 1 000 лк	6,4±1,3	0,7±0,2	43,6
Температура воздуха 21 ± 1 °C, освещённость 800 лк	8,7±2,1	0,9±0,1	73,5
Температура воздуха 21 ± 1 °C, освещённость 1 000 лк	9,1±1,9	1,1±0,1	78,2

Для оценки генетической стабильности гаметофитов и спорофитов *O. regalis* апробировано 36 SCoT-праймеров. Установлено, что восемь (SCoT1, SCoT2, SCoT9, SCoT10, SCoT21, SCoT22, SCoT24, SCoT34) из них показали низкий уровень амплификации в образцах. Наибольшее количество бэндов генерировали два маркера: SCoT19 и SCoT29 (рис. 1).

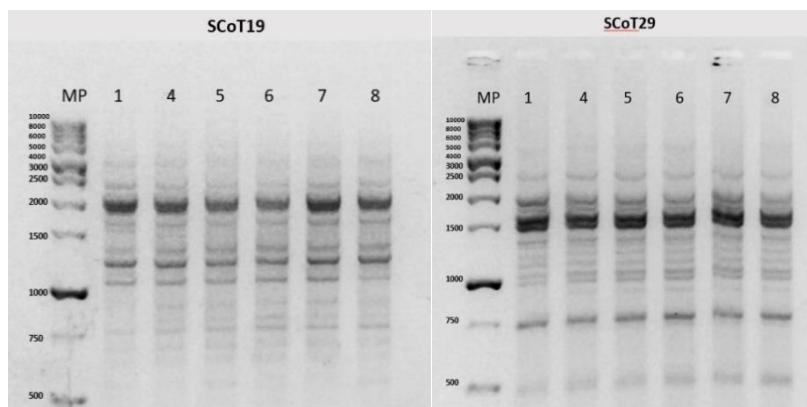


Рисунок 1. Электрофоретические спектры маркеров SCoT19 и SCoT29

Всего было генерировано 212 ампликонов, в диапазоне от 3 (SCoT26) до 13 (SCoT29), в среднем 7,5 бэнда на праймер. При этом, размер амплифицированных продуктов варьировал от 0,35 (SCoT13) до 4,1 т.п.н. (SCoT3) (рис. 2, 3).

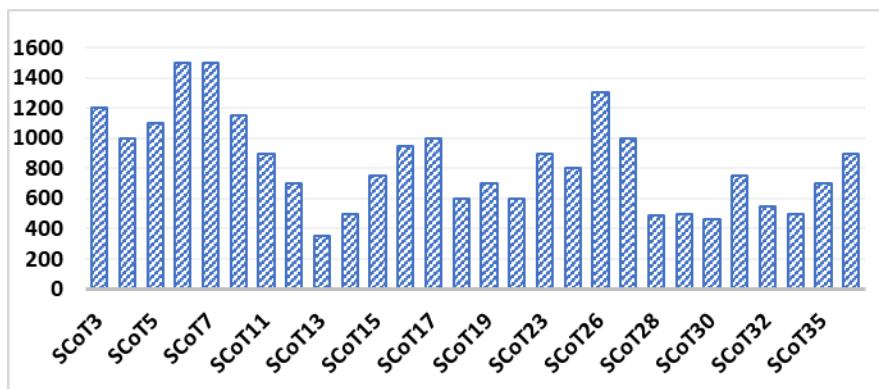


Рисунок 2. Минимальный размер бэндов, п.н.

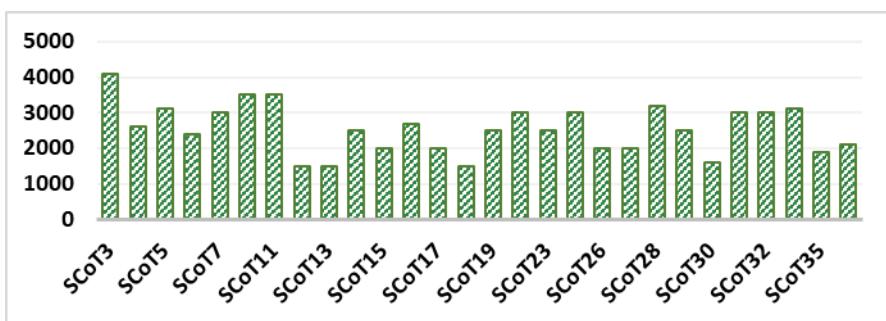


Рисунок 3. Максимальный размер бэндов, п. н.

Все маркеры были распределены на два кластера. В первый кластер вошли девять SCoT-маркеров, которые выявили низкий уровень полиморфизма среди образцов. Процент полиморфизма варьировал от 10 % до 33,3 %. При этом наибольшее значение показал маркер SCOT35, наименьшее SCOT8B. Во второй кластер вошли SCoT-праймеры, которые не выявили полиморфизм у *Osmunda regalis* L.

Известно, что SCoT-маркеры эффективны при изучении внутривидового генетического разнообразия ряда других видов растений, и выявляют высокий уровень полиморфизма, в пределах от 50 до 75 % [4. 8-10]. В нашей работе, апробированные на *Osmunda regalis* L. SCoT-маркеры, в целом, показали низкий уровень полиморфизма и не выявили значительных генетических различий между маточными растениями и регенерантами, что может свидетельствовать о генетической стабильности *Osmunda regalis* L. в коллекции генобанка *in vitro*. Аналогичные результаты нами с соавторами получены на видах природной флоры с другими праймерами [3, 4].

Заключение. Таким образом, нами выявлено, что для длительного культивирования *O. regalis* оптимальными условиями являются температура 21 °C и освещенность 800-1000 лк, при которых жизнеспособность гаметофитов была максимальна: 73,5-78,2 %.

В результате апробации 36 SCoT-праймеров выделено среди них 11 SCoT-маркеров (SCOT3, SCOT8, SCOT13, SCOT14, SCOT15, SCOT16, SCOT18, SCOT19, SCOT20, SCOT29, SCOT32), которые показали большее количество ампликонов и могут быть использованы при оценке внутривидового разнообразия *O. regalis*. Анализ полученных данных выявил генетическую стабильность эксплантов *Osmunda regalis* L. в коллекции *in vitro*.

Благодарности. Публикация подготовлена в рамках реализации ГЗ ФИЦ СНЦ РАН FGRW-2024-0003, регистрационный номер № госрегистрации 124022000093-1 и FGRW-2024-0005 регистрационный номер 1022040700995-7-1.6.4

Библиографический список

1. Маляровская В.И., Шуркина Е.С. Влияние факторов культивирования на длительность депонирования *in vitro* эндемичного вида *Campanula sclerophylla* Kolak //Субтропическое и декоративное садоводство. 2022. – № 81. – С. 98-106. DOI: 10.31360/2225-3068-2022-81-98-106
2. Методика клonalного микроразмножения и сохранения видов природной флоры и красивоцветущих кустарников в условиях *in vitro*/Маляровская В.И., Коломиец Т.М., Самарина Л.С. Сочи, 2020. 28 с.
3. Супрун И.И., Маляровская В.И., Степанов И.В., Самарина Л.С. IRAP-анализ для оценки генетической стабильности эндемичных и исчезающих видов флоры. Западного Кавказа в коллекции *in vitro*. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2019;23(1):8-14. DOI 10.18699/VJ19.455
4. Шхалахова Р.М., Маляровская В.И., Конинская Н.Г. Эффективность SCoT-маркеров для характеристики внутривидового генетического разнообразия *Cyclamen coum*, *Helleborus caucasicus*, *Galanthus woronowii*, *Paeonia caucasica*//Turczaninowia. 2023. Т. 26. № 2. С. 45-58. DOI: 10.14258/turczaninowia.26.2.3

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, 27, 86–93, doi:10.1007/s11105-008-0060-5. <https://irscope.shinyapps.io/iMEC/>
6. Doyle J.J. Isolation of plant DNA from fresh tissue // *Focus*. 1990. T. 12. C. 13-15.
7. Kolomiets T.M., Malyarovskaya V.I., Samarina L.S. *In vitro* conservation of *Campanula sclerophylla* Kolak. - endemic endangered species of Western Caucasus // *Plant Tissue Cult. & Biotech.* 2016. – № 26 (2). – P. 143-149, DOI: 10.3329/ptcb.v26i2.30564
8. Luo C., He X.-H., Chen H., Hu Y. and Ou S.-J. Genetic relationship and diversity of *Mangifera indica* L., revealed through SCoT analysis. *Genet. Resour. Crop. Evol.* 2012. 59, 1505–1515.
9. Nath V. S., Hegde V. M., Jeeva M. L., Misra R. S., Veena S. S., Raj M. et al. Genetic diversity of *Phytophthora colocasiae* causing taro leaf blight, analysis using start codon targeted (SCoT) polymorphism. *J. Root Crops* 2015.39, 168–177.
10. Wu J.-M., Li Y.-R., Yang L.-T., Fang F.-X., Song H.-z., Tang H.- Q. et al. cDNA-Scot, a novel rapid method for analysis of gene differential expression in sugarcane and other plants. *Aust. J. Crop Sci.* 2013. 7, 659