

Национальная академия наук Беларуси  
Центральный ботанический сад

# Голубиководство в Беларуси: итоги и перспективы

Материалы Республиканской  
научно-практической конференции

Минск  
2012

УДК 634.734/.737:634.1-15(476)(082)  
ББК 42.358(4Бей)я43  
Г62

Редакционная коллегия  
д-р биол. наук В.В. Титок (ответственный редактор);  
канд. биол. наук Б.Ю. Аношенко; канд. биол. наук А.А. Веевник;  
канд. биол. наук Л.В. Гончарова; канд. биол. наук Н.Б. Павловский.

Иллюстрации предоставлены авторами публикаций

© Центральный ботанический сад  
Национальной академии наук  
Беларуси, 2012

Г62 **«Голубиководство в Беларуси: итоги и перспективы»**; Материалы  
Республиканской научно-практической конференции (17 августа 2012 г.,  
Минск, Беларусь) /Центральный ботанический сад НАН Беларуси, ред-  
коллегия: Титок В.В. / и др. /, Минск, 2012. — 78 с.)

В сборнике представлены материалы Республиканской научно-практической  
конференции «Голубиководство в Беларуси: итоги и перспективы». Обсуждаются  
результаты внедрения новых сортов голубики, применения методов биотехноло-  
гии, защиты растений для решения актуальных вопросов технологии возделыва-  
ния разнообразных форм и сортов голубики.

**УДК 634.734/.737:634.1-15(476)(082)**  
**ББК 42.358(4Бей)я43**

## **Использование молекулярно-генетических методов для решения проблем выращивания голубики высокой**

Гончарова Л.В.<sup>1</sup>, Спиридович Е.В.<sup>1</sup>, Баранов О.Ю.<sup>2</sup>, Маховик И.В.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Центральный ботанический сад НАН Беларуси, Минск, Беларусь,  
e-mail: L.Goncharova@cbg.org.by

<sup>2</sup>Институт леса НАН Беларуси, Гомель, Беларусь,  
e-mail: betula-belarus@mail.ru

### Резюме

Представлена информация о состоянии вопроса по исследованиям голубики высокой, реализуемым в Центральном ботаническом саду и Институте леса НАН Беларуси. Приведены данные по использованию молекулярно-генетических методов для анализа сортов голубики: генетической паспортизации и фитопатологическому анализу.

Голубика высокая, или голубика ковилла (*Vaccinium x covilleatum* Butkus et Pliszka), выращивается на промышленных плантациях с целью получения ягод уже практически по всему миру, в том числе и на территории СНГ. В настоящее время насчитывается более 100 сортов голубики различной высоты и различных сроков созревания [1, 2]. В результате многолетних исследований была доказана перспективность выращивания голубики высокой в Беларуси и показано преимущество этого вида перед местным видом — голубикой топяной. Был определен перечень сортов голубики, которые имеют стабильные урожаи и высокое товарное ка-

чество ягод, установлены климатические зоны промышленного выращивания голубики в Беларуси, а также разработана технология ее возделывания. На сегодняшний день коллекция Центрального ботанического сада (ЦБС) содержит более 40 сортов *V. x covilleanum*, для которых разработана технология получения посадочного материала из одревесневших и зеленых черенков, а также методом *in vitro*, что позволяет планировать и проводить работы по обеспечению потребностей республики в посадочном материале [2].

В настоящее время проблемы выращивания голубики высокой связаны с актуальными вопросами сохранения и реализацией сортов, охраной прав собственности на селекционные достижения, фитопатологическое состояние сортового материала, в случае микрклонального размножения сортов голубики — получение генетически однородных клонов и тканей растений. Решение данных задач традиционными морфологическими и микробиологическими методами зачастую сопряжено с длительностью проведения исследований, а для ряда случаев и вовсе является невозможным. В настоящее время наиболее эффективным способом диагностики сортового материала является использование молекулярно-генетических технологий, и, в частности, методов ДНК-маркирования. Наряду с такими преимуществами ДНК-маркеров перед другими методами как высокая чувствительность и воспроизводимость, быстрота выполнения анализов и относительная дешевизна, благодаря использованию автоматизированных и роботизированных процессов снижается влияние человеческого фактора и субъективизма в интерпретации результатов исследований [3].

*Паспортизация сортов.* Важной характеристикой сохранения и реализации сортов является соответствие растений исходному сортовому материалу. С целью предотвращения ошибок в ходе заготовки, черенкования, посадки (неправильное обозначение сортов, замещение другими сортами или несортовым материалом, утрата идентификационных номеров и др.) проводится генетическая паспортизация образцов.

Наиболее распространенным типом ДНК-маркеров, используемых для составления генетических паспортов, являются RAPD- и SSR- (микросателлитные) локусы [4-6]. Выявляемые амплифицированные зоны являются удобными маркерами для составления генетического портрета растения. Микросателлитные локусы характеризуются кодоминантным типом проявления и высокой вариабельностью (наличие большого количества аллельных вариантов). Разработанные наборы RAPD-диагностики позволяют проводить генетическую паспортизацию с вероятностью

ошибки менее  $1 \times 10^{-5}$ , микросателлитной диагностики —  $1 \times 10^{-7}$ . К настоящему времени с помощью разработанного комплексного набора молекулярных маркеров, включающего RAPD- и SSR-локусы, паспортизировано десять сортов из коллекции ЦБС (*Bluetta*, *Bluecrop*, *Duke*, *Patriot*, *Woodart*, *Caroline blue*, *Croatan*, *Herbert*, *Delite*, *Jersey*) и девять промышленных сортов голубики высокой (*Aiwengo*, *Tifblue*, *Weymuth*, *Concord*, *Blueberry*, *Dixi*, *Rancocas*, *Erlibblue*, *Atlantic*).

Проведена инвентаризация промышленной плантации голубики Милошевичского лесхоза как результат внедрения созданной базы данных генетических паспортов. В результате анализа, на основании использования девяти микросателлитных маркеров, была составлена схема расположения генотипов/сортов на территории плантации. В ходе анализа схемы установлено, что большинство выявленных генотипов являлись уникальными и были представлены единичными образцами, что указывает на их семенное, а не сортовое происхождение (рис. 1). Три варианта генотипов были выявлены неоднократно и были определены как сортовой материал. Последующий анализ по генетической базе данных позволил идентифицировать их как *Erlibblue*, *Jersey* и *Bluecrop*.

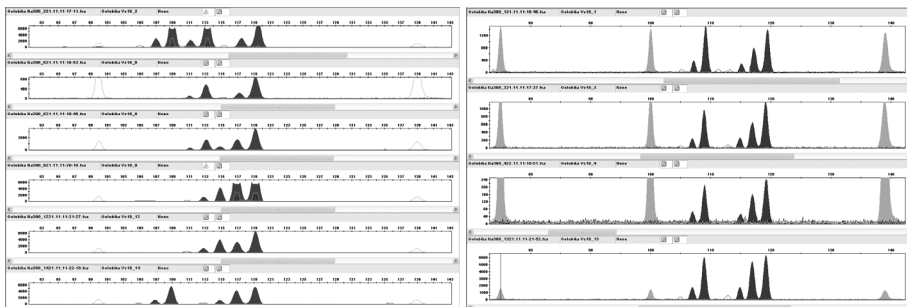


Рисунок 1. Молекулярно-генетический анализ сортов голубики (локус Ca 23) (слева — несортовой материал, справа — сортовой материал).

**Фитопатологический анализ.** Одну из наиболее актуальных проблем, связанных с выращиванием и культивированием голубики, представляют инфекции. В первую очередь это связано как с потенциальной угрозой потери самих растений, представляющих собой определенную селекционную и хозяйственную ценность, так и снижением их устойчивости и биологической продуктивности и, как следствие, — снижением урожайности, товарного качества ягод.

Фитопатологический мониторинг сортов целесообразно проводить как в рабочих коллекциях и маточных культурах, при закладке плантаций, так и на уже существующих промышленных объектах. Особую важность представляет диагностика труднокультивируемых, некультивируемых и персистирующих форм микроорганизмов, включая эндофитные грибы, бактерии и вирусы. Данные виды патогенов могут длительно существовать в латентном состоянии и распространяться с размножаемым материалом, и в дальнейшем при действии определенного сочетания различных абиотических факторов могут активизировать свои патогенетические свойства, что приведет к развитию инфекции, снижению биологического потенциала и гибели растений [3].

Суть диагностики инфекционных заболеваний с помощью методов ДНК-анализа сводятся к выявлению генетического материала патогена в тканях хозяина. Следует отметить, что диагностика только ДНК-микроорганизмов в растениях не может в абсолютной мере свидетельствовать о наличии инфекционного процесса, поскольку мертвые клетки патогенов также содержат дезоксирибонуклеиновую кислоту и дают положительную реакцию в ходе молекулярно-генетических тестов. В то же время выявление матричной РНК как продукта транскрипции генов, возбудителей инфекции однозначно указывает на присутствие активной патогенной микрофлоры. Тем не менее, в большинстве случаев молекулярно-фитопатологический анализ проводится на основании анализа ДНК-маркеров, что связано с большей чувствительностью метода и простотой выполнения исследований [7].

Диагностика и идентификация возбудителей заболеваний в наибольшем числе случаев проводятся на основании изучения фрагментов генов или межгенных участков инфекционного агента, поскольку выявление и анализ полной геномной ДНК патогена является процедурой довольно сложной. Исходя из литературных данных и наших исследований, наиболее удобными ДНК-маркерами являются рибосомальные и митохондриальные локусы микроорганизмов. В первую очередь, это связано с их мультিকопийностью — в каждой клетке содержится от 300 и более копий данных локусов, что увеличивает разрешающую способность ДНК-анализа, т.е. вероятность выявления патогена при его низкой концентрации в ткани. Вторым преимуществом является их консервативность в пределах одного вида, что позволяет определять таксономическую принадлежность инфекции. В-третьих, данные локусы широко изучены, и их нуклеотидные структуры для разных видов широко представлены в генных банках, что также является весьма важным моментом для проведения генетической идентификации. Для грибных инфекций наиболее универсаль-

ными маркерами являются области 25–28S рДНК (праймеры 5.8SR и LR7), внутренних (праймеры ITS1 и ITS4) и межгенного (праймеры LR12R и 5SRNAR) спейсеров [8]. Видовая идентификация патогенных грибов при использовании универсальных праймеров основывается на анализе нуклеотидного состава и размера, выявляемых ампликонов изучаемого региона рДНК. Длина и нуклеотидный состав данных локусов рибосомальной ДНК является для вида величиной постоянной, что в определенной степени можно использовать в качестве диагностического признака. Длина ампликонов определяется с помощью электрофоретического анализа. В качестве контроля используется образец-эталон с установленной видовой принадлежностью. Также длина ампликона может быть рассчитана на основании данных секвенирования изучаемого вида. При анализе голубики с перечисленными универсальными праймерами в ПЦР-спектрах будет присутствовать также ампликон растения-хозяина, что связано с гомологией регионов отжига праймеров у различных организмов. Данное явление удобно использовать в качестве контроля прохождения амплификации. Так, например, отсутствие других ампликонов, кроме растения-хозяина, однозначно будет указывать на отсутствие патогена в образце (рис. 2). В случае необходимости детекции конкретного вида патогена разрабатываются специфические праймеры дающие позитивную реакцию только с данным видом.

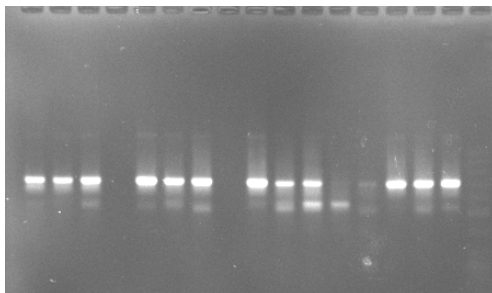


Рисунок 2. Молекулярно-фитопатологический анализ растений голубики (инфицированные образцы представлены многофракционными спектрами).

В ходе проведенного нами фитопатологического анализа голубики высокой некоторых белорусских плантаций были выявлены патогенные грибные виды, поражающие различные части растений, — *Penicillium chrysogenum*, некультивируемый гриб отдела Аскомицеты, *Mycosphaerella*

*sp.*, *Cladosporium cladosporioides*, *Aureobasidium pullulans*. Кроме того, создан диагностический набор праймеров и молекулярно-генетический определитель 22 наиболее патогенных для голубики видов микроорганизмов.

*Список литературы:*

1. Курлович Т.В., Босак В.Н. Голубика высокорослая в Беларуси. Минск, 1998. С. 176.
2. Каталог сосудистых растений Центрального ботанического сада Национальной академии наук Беларуси (открытый грунт) / сост. И.К.Володько [и др.]; научн. ред.: В.Н.Решетников, В.В.Титок. Минск: Тэхналогія, 2010. С. 264.
3. Падутов, В.Е. Баранов О.Ю., Воропаев Е.В. Методы молекулярно-генетического анализа. Минск: Юнипол, 2007. С. 176.
4. J.G.K.Williams, A.R.Kubelik, K.J.Livak et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.*, 1990, V. 18. P. 6531-6535.
5. Boches P.S., Bassil N.V. Rowland L.J. Microsatellite markers for *Vaccinium* from EST and genomic libraries. *Molecular Ecology Notes*, 2005, V. 5, p. 657–660.
6. Boches P., Bassil N.V., Rowland L. Genetic diversity in the highbush blueberry evaluated with microsatellite markers. *J.Amer. Soc. Hort. Sci.*, 2006, V. 131(5). P. 674–686.
7. Dyakov Yu.T. et al. *Comprehensive and Molecular Phytopathology*. ELSEVIER, 2007. P. 369.
8. White T.J. et al. *A Guide to Methods and Applications*. New York, 1990. P. 315–322.