

Национальная академия наук Беларуси
Институт экспериментальной ботаники им. В.Ф. Купревича НАН Беларуси
Министерство природных ресурсов и охраны окружающей среды Республики Беларусь



БОТАНИЧЕСКИЕ КОЛЛЕКЦИИ БЕЛАРУСИ: СОХРАННОСТЬ, ИСПОЛЬЗОВАНИЕ И ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ ГЕРБАРИЕВ

*Материалы II Международной научно-практической конференции
(Минск, 20-23 сентября 2022 г.)*



HERBARIUM

OF BELARUS

УДК 581.6(476)(082)
ББК 28.5(4Бел)я43
Б 86

Редакционная коллегия:
доктор биологических наук, академик *В. И. Парфенов*,
кандидат биологических наук *Д. В. Дубовик*,
кандидат биологических наук *С. С. Савчук*,
кандидат биологических наук *Т. Г. Шабашова*

Б 86 **Ботанические** коллекции Беларуси: сохранность, использование и перспективы развития гербариев : материалы II Международной научно-практической конференции (Минск, 20-23 сентября 2022 г.) / ред. кол. В. И. Парфенов [и др.]. — Минск: ИВЦ Минфина, 2022. — 246 с.

ISBN 978-985-880-265-3.

В сборник включены материалы Международной научной конференции «Ботанические коллекции Беларуси: сохранность, использование и перспективы развития гербариев», посвященной 100-летию со дня основания Гербария Института экспериментальной ботаники НАН Беларуси (MSK). Всего представлен 65 материал 165 авторов из 41 организаций и ведомств, научно-исследовательских учреждений, высших учебных заведений и заповедников Азербайджана, Беларуси, России, Турции.

В материалах рассматриваются актуальные проблемы гербарного дела как в Беларуси, так и за ее пределами. Подводятся итоги работы гербариев, обсуждаются проблемы и перспективы развития гербариев различных таксономических групп: сосудистых растений, мохообразных, водорослей, лишайников, грибов и других коллекций.

УДК 581.6(476)(082)
ББК 28.5(4Бел)я43

ISBN 978-985-880-265-3

© Государственное научное учреждение
«Институт экспериментальной ботаники
им. В. Ф. Купревича Национальной академии
наук Беларуси», 2022
© Оформление. УП «ИВЦ Минфина», 2022

РАЗРАБОТКА EST-SSR МАРКЕРОВ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ОБРАЗЦОВ ЯБЛОНИ

Кузмицкая П. В.¹, Фомина Е. А.¹, Заинчковская А. Н.¹, Урбанович О. Ю.¹,
Гончарова Л. В.², Пашкевич П. А.²

¹ Государственное научное учреждение «Институт генетики и цитологии
Национальной академии наук Беларуси», Минск, Беларусь, E. Fomina@igc.by

² Центральный ботанический сад Национальной академии наук Беларуси, Минск,
Беларусь

Введение

Яблоня (*Malus × domestica* Borkh.) является одной из важнейших плодовых культур в странах с умеренным климатом. За время возделывания человеком создано более десяти тысяч ее сортов. Они различаются по происхождению, морфологическим признакам, хозяйственным и биологическим свойствам. Различные генотипы сохраняются в коллекциях, включая ботанические. Большую помощь в их идентификации могут оказать молекулярные маркеры. Молекулярные маркеры могут быть применимы для идентификации растительных образцов по фрагменту тканей, что делает их ценным инструментом для идентификации гербарного материала. В настоящее время для идентификации сортов яблони в основном используются маркеры на основе динуклеотидных повторов [1]. Однако использование таких маркеров имеет свои недостатки. Определенную помощь в их устранении может оказать создание маркеров, ограничивающих области генома с более сложной организацией повторяющегося мотива. Они обладают большей точностью и надежностью по сравнению с уже существующими, лучше подходят для практического использования.

Целью представленного исследования являлась разработка EST-SSR-маркеров к геному яблони, удобных для ДНК-идентификации генотипов.

Материалы и методы

На основе нуклеотидной последовательности генома яблони сорта Golden Delicious, находящейся в базе данных GenBank, был проведен дизайн праймеров, подобранных к отдельным регионам 3, 6 и 11 хромосомы. Разработанные праймеры ограничивали область генома, включающую простой повтор с длиной повторяющейся единицы не меньше 4 нуклеотидов.

С помощью данных праймеров был проведен анализ генетического разнообразия деревьев яблони, произрастающих на территории Центрального ботанического сада НАН Беларуси. Препараты ДНК были получены из фрагментов листьев каждого отдельного дерева. Выделение ДНК проводили с помощью Genomic DNA Purification Kit (Thermo scientific, ЕС) согласно рекомендованному протоколу.

Реакционная смесь для проведения ПЦР объемом 20 мкл имела следующий состав: 67 мМ Трис-НСl pH 8,8; 16 мМ (NH₄)₂SO₄, 1,5 мМ MgCl₂; 0,2 мМ dNTP; 250 нМ прямого и обратного праймеров, 50 мкг ДНК, 1 ед. Taq-полимеразы. Реакцию амплификации проводили в следующих условиях: 94⁰С – 4 мин; 35 циклов 94⁰С – 30 с, 50⁰С – 1 мин, 72⁰С – 1 мин; 1 цикл: 72⁰С – 7 мин.

Продукты амплификации разделяли на секвенаторе Genetic Analyzer 3500 (Applied Biosystems, США). В качестве стандарта молекулярного веса использовали внутренний стандарт S450 (Синтол, Россия). Форвард праймер каждого маркера был мечен одним из флуоресцентных красителей FAM, R6G, TAMRA, что позволило проводить анализ продуктов амплификации, полученных в результате реакции мультиплекса.

Результаты и обсуждение

На основании анализа сиквенса генома яблони *in silico* был проведен дизайн праймеров, ограничивающих микросателлитные повторы на хромосомах 3, 6 и 11 с длиной

повторяющегося мотива больше четырех нуклеотидов. На основе экспериментальных данных были отобраны три пары праймеров, ограничивающих полиморфные области генома яблони. Данные маркеры показали четкие пики после разделения продуктов амплификации методом капиллярного электрофореза на секвенаторе. Название маркера, последовательность праймеров и ограниченных ими повторов представлены в таблице 1.

Таблица 1. – Праймеры, использованные для ДНК-идентификации образцов яблони старого плодового сада

Название праймера	Последовательность праймера	Хро-мосома	Повторяющийся мотив
MC03L1	F TCAGGAAAATGCCAGTCCTC R CCACTCGGGGTATTTGACTG	3	CCTGCA
MC06L2	F TCCTCCGTCGTCTTGAGTCT R GGTGCGGTGCTTCAAAGA	6	CTGCCT
MC11L02	F TACTCTTCCGCCTGCTTT R CGTCAACATCATCATATCTTTC	11	TTCT

Как видно из таблицы 1, маркер MC11L02 содержит повторяющийся мотив из 4 нуклеотидов, в то время как маркеры MC03L1 и MC06L2 ограничивают гексануклеотидные повторы. В образцах ДНК индивидуальных деревьев яблони старого плодового сада ЦБС с помощью SSR маркеров был определен аллельный состав локусов MC03L1, MC06L2 и MC11L02.

Подбор наиболее информативных маркеров является важной задачей при изучении генетического разнообразия любой культуры. Эффективность применения отобранных маркеров для генетического исследования по идентификации сортов определяется несколькими параметрами. Один из них – количество выявляемых аллелей. Чем более разнообразен состав аллелей, выявляемый с помощью молекулярного маркера, в популяции исследуемых генотипов, тем выше вероятность, что он будет удобен для оценки генетического разнообразия внутри вида. Общее количество аллелей, выявляемые для каждого маркера, отражающие генетическое разнообразие коллекционного материала яблони представлено в таблице 2.

Таблица 2. – Общее количество аллелей, выявленных с помощью SSR-маркеров, ограничивающих микросателлитные повторы, обнаруженных среди 51 образца яблони старого плодового сада

SSR-маркер	Общее количество выявленных аллелей	Размеры аллелей, п.н.
MC03L1	5	151, 156, 163, 179, 192
MC06L2	13	182, 183, 184, 185, 187, 190, 196, 198, 200, 202, 210, 212, 230
MC11L02	11	193, 207, 214, 218, 222, 226, 230, 238, 242, 246, 250

Проанализированные локусы оказались полиморфными и позволили выявить от 5 до 13 аллелей. Для ДНК-идентификации лучше использовать маркеры, которые обладают более высоким показателем полиморфизма.

В общей сложности среди 51 образца деревьев яблони старого плодового сада Центрального ботанического сада НАН Беларуси с помощью указанных молекулярных маркеров было выявлено 29 аллелей и 46 их сочетаний. Среднее количество аллелей, выявляемое с помощью отобранных маркеров, составило 9,7. Результаты анализа состава аллелей представлены на рисунках 1-3.

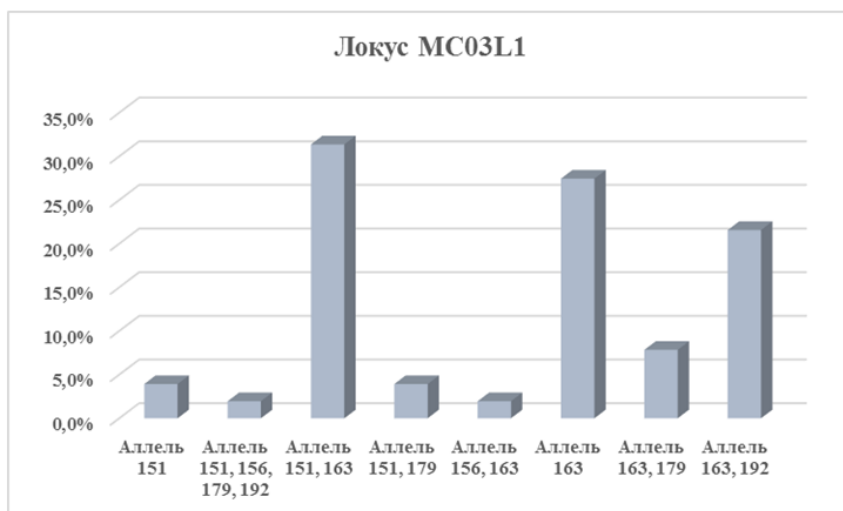


Рисунок 1. Состав аллелей и их сочетаний в геномах деревьев старого плодового сада сектора Б Центрального ботанического сада НАН Беларуси, выявленный с помощью маркера MC03L1

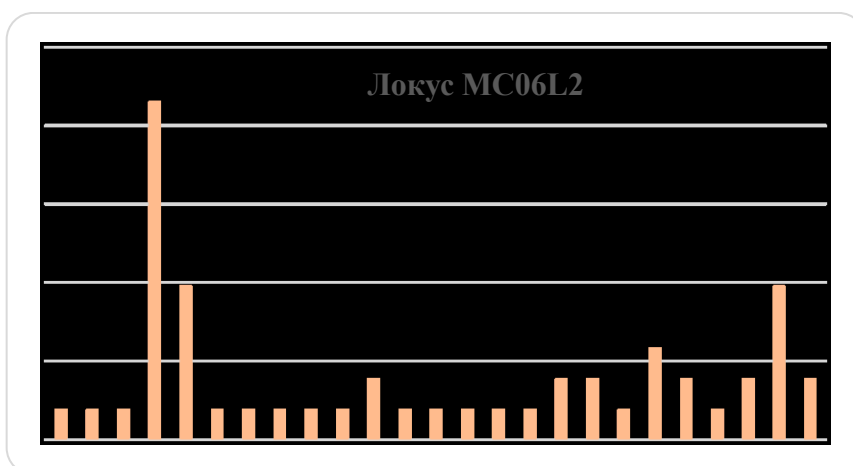


Рисунок 2. Состав аллелей и их сочетаний в геномах деревьев старого плодового сада сектора Б Центрального ботанического сада НАН Беларуси, выявленный с помощью маркера MC06L2

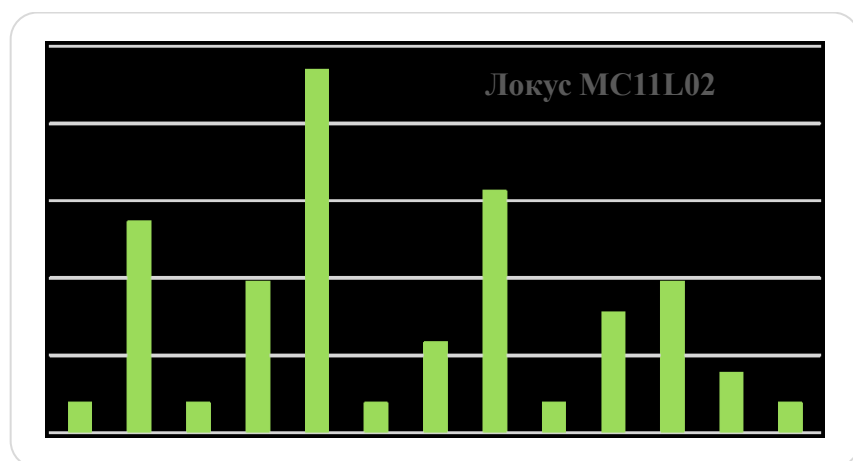


Рисунок 3. Состав аллелей и их сочетаний в геномах деревьев старого плодового сада сектора Б Центрального ботанического сада НАН Беларуси, выявленный с помощью маркера MC11L02

Как видно из представленных данных, количество аллелей, выявляемых каждым из 3 SSR-маркеров, отличается. Наименьший уровень полиморфизма наблюдается в локусе MC03L1. В нем обнаружено 5 аллелей, встречающихся в 8 комбинациях у 51 подвергнутого

анализу дерева. Максимальный уровень полиморфизма был выявлен с помощью маркера MC06L2. Применение данного маркера позволило обнаружить 13 аллелей, встречающихся в 25 комбинациях. По уровню полиморфизма разработанные молекулярные маркеры не уступают информативным маркерам SSR типа [2-4]. Их можно использовать в реакции мультиплекса, а также в сочетании с другими SSR-маркерами.

Таким образом, в результате проведенного исследования созданы EST-SSR- маркеры, характеризующиеся высоким уровнем полиморфизма в сочетании с хорошим качеством визуализации аллелей. Они могут быть применены для идентификации образцов представителей рода *Malus*, как растущих в коллекционных и иных садах, так и сохраняемых в гербарном материале.

Литература

1. Молекулярные методы идентификации и генотипирования яблони и груши / О.Ю. Урбанович // Право и экономика, Минск. – 2013. – Р. 210.
2. Identification of apple tree cultivars growing in Belarus using SSR-markers / O.Y. Urbanovich, Z.A. Kazlovskaya // Acta Hort. – 2009. – Vol. 839. – P. 479-486.
3. Development and characterization of 140 new microsatellites in apple (*Malus x domestica* Borkh.) / R. Liebhard [et al.] // Mol. Breed. – 2002. – Vol. 10. – P. 217-241.
4. Molecular identification of commercial apple cultivars with microsatellite markers / Z. Galli [et al.] // Hort. Science. – 2005. – Vol. 40, № 7. – P. 1974-1977.

DEVELOPMENT OF EST-SSR MARKERS FOR IDENTIFICATION OF APPLE SAMPLES

Kuzmitskaya P.V.¹, Famina A. A.¹, Zainchkovskaya A. N.¹, Urbanovich O.Yu.¹, Goncharova L.V.², Pashkevich P. A.²

Summary

Based on the *in silico* apple genome sequencing analysis, primers were designed to microsatellite repeats on chromosomes 3, 6, and 11 with a repeating motif longer than four nucleotides. As a result, EST-SSR markers were created, which are characterized by a high level of polymorphism in combination with a good quality of allele visualization. They can be used to identify samples of representatives of the genus *Malus*, both growing in collection and other gardens, and preserved in herbarium material.

УДК 582.24

ПЕРВЫЕ СВЕДЕНИЯ О МИКСОМИЦЕТАХ БИОЛОГИЧЕСКОГО ЗАКАЗНИКА «СТИКЛЕВО» (РЕСПУБЛИКА БЕЛАРУСЬ)

Е.Л. Мороз¹, А.Е. Мороз²

¹ Институт экспериментальной ботаники им. В. Ф. Купревича НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

² Государственное учреждение образования «Средняя общеобразовательная школа №45», Минск

Биологический заказник (БЗ) республиканского значения «Стиклево» образован в 2001 году, расположен на территории Минского района Минской области. Создан для сохранения в естественном состоянии участков ценных лесных формаций с популяциями редких и