

Национальная академия наук Беларуси  
Центральный ботанический сад

# **Опыт и перспективы возделывания голубики на территории Беларуси и сопредельных стран**

Материалы международной  
научно-практической конференции  
(17–18 июля 2014 г., г. Минск)

Минск  
«Конфидо»  
2014

УДК 634.734/.737:634.1-15(476)(082)  
ББК 42.358(4Бел)я43  
О62

**Редакционная коллегия:**

д.б.н. В.В. Титок (ответственный редактор);  
к.б.н. Б.Ю. Аношенко;  
к.б.н. А.А. Веевник;  
к.б.н. Л.В. Гончарова;  
к.б.н. Н.Б. Павловский.

О62    Опыт и перспективы возделывания голубики на территории Беларуси и сопредельных стран: материалы международной научной конференции, 17–18 июля 2014 г., г. Минск. – Минск : Конфидо, 2014. – 120 с.

ISBN 978-985-6777-61-8

В сборнике представлены материалы Международной научной конференции «Опыт и перспективы возделывания голубики на территории Беларуси и сопредельных стран». Обсуждаются результаты внедрения новых сортов голубики, применения методов биотехнологии, защиты растений для решения актуальных вопросов технологии возделывания голубики на территории Беларуси и сопредельных стран.

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

ISBN 978-985-6777-61-8

© Центральный ботанический сад НАН Беларуси, 2014  
© Оформление. ЗАО «Конфидо», 2014

# Молекулярные маркеры в таксономии и сохранении генетических ресурсов голубики высокой (*Vaccinium corymbosum* L.)

Спиридович Е.В., Власова А.Б., Юхимук А.Н.,  
Гончарова Л.В., Агабалаева Е.Д., Решетников В.Н.

Центральный ботанический сад НАН Беларуси,

Минск, Беларусь

e-mail: E.Spiridovich@cbg.org.by

**Резюме.** Представлены исследования по документированию и молекулярной паспортизации образцов голубики высокой (*Vaccinium corymbosum* L.) коллекций Центрального ботанического сада НАН Беларуси. Работа с данной культурой проведена с целью разработки набора уникальных генетических маркеров, позволяющих с наименьшими временными и финансовыми затратами выполнять точную молекулярно-генетическую паспортизацию и идентификацию генотипов этого хозяйственно-ценного вида.

**Summary.** Results of documenting and identification of highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) accessions from the collections of the Central Botanical Garden of Belarus NAOs are presented. This investigation was performed for developing set of unique genetic markers that allow precise molecular genetic identification of highbush blueberry genotypes with minimal expenditure of time on finances.

Ботанические сады составляют основу системы сохранения биоразнообразия растений *ex situ* и играют большую роль в выполнении задач Глобальной стратегии сохранения растений. Собранные в садах генофонды поддерживаются в коллекциях генетических ресурсов. Главной предпосылкой изучения генетического фонда растительного мира является поиск и привлечение новых видов и форм, а также тщательное исследование уже имеющегося материала для использования в хозяйственной деятельности, как правило, посредством вовлечения в процесс направленной селекции. Коллекции генетических ресурсов растений ботанических садов являются составной частью государственной системы сохранения и рационального использования биоразнообразия, идентификации наиболее

уникальных генотипов, и подразделяются в соответствии со своим предназначением на следующие категории: национальные базовые коллекции, активные рабочие, дублетные, генетические, стержневые, гербарные, коллекции меристем, ДНК и РНК [1, 2].

В коллекционных фондах Центрального ботанического сада НАН Беларуси (ЦБС) объединены более 30 самостоятельных ботанических коллекций, которые зарегистрированы в Министерстве природных ресурсов и охраны окружающей среды Республики Беларусь, их состав уточняется и анализируется с помощью современных методов исследования. На всех этапах работы с растительными коллекциями необходимо осуществлять строгое документирование и сертификацию образцов. Активное использование сертификации образцов (коллекций) на основе молекулярных маркеров является неотъемлемым этапом корректного сохранения и поддержания коллекций [3].

Развитие молекулярных методов исследований и разработка на их основе усовершенствованных тест-систем позволяет анализировать полиморфизм на уровне генетического материала клетки (полиморфизм ДНК) [4, 5]. Исходя из поставленных задач, в каждом конкретном случае осуществляется подбор или разработка оптимального метода маркирования, наиболее подходящего для их решения. Преимуществом группы ДНК-методов является непосредственный анализ структуры, возможность тестирования в любых вегетативных тканях, на любых стадиях развития, длительность хранения образцов ДНК, возможность использования гербарного материала, ископаемых остатков, отсутствие ограничений в числе маркеров на образце.

Голубика высокая (*Vaccinium corymbosum* L.) является коммерчески важной культурой как ценное пищевое и лекарственное растение и успешно возделывается в странах Северной Америки и Европы [6]. Существует большое разнообразие сортов голубики высокой (около двухсот), в основном селекции США, а также Германии, Польши, и др. С 1980 года ЦБС проводит целенаправленную работу по интродукции сортов данной культуры [18]. В результате многолетних исследований была доказана перспективность выращивания голубики высокой в Беларуси и показано преимущество этого вида перед местным видом – голубикой топяной. Определен перечень сортов голубики, которые имеют стабильные урожаи и высокое товарное качество ягод, установлены климатические зоны промышленного

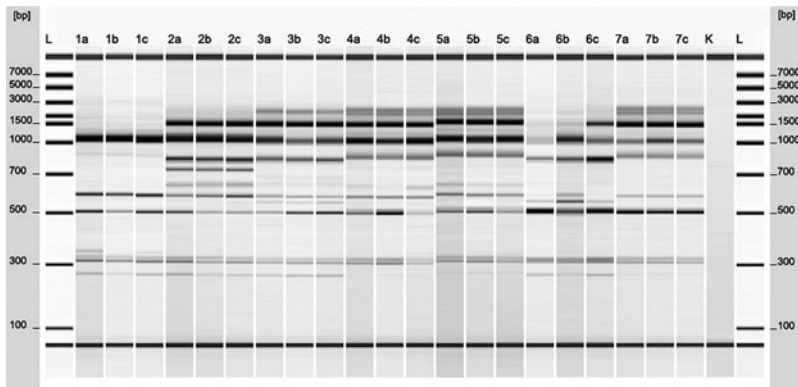
выращивания голубики в Беларуси, а также разработана технология ее возделывания. К настоящему времени в коллекции ЦБС поддерживается около 50 сортов голубики, в том числе 12 сортов – в коллекции *in vitro*.

Для видов *Vaccinium* предпринят ряд филогенетических исследований на основе использования молекулярно-генетических маркеров, в том числе для распознавания сортов культур. На основе RAPD-маркеров было произведено дифференцирование сортов и диких форм *Vaccinium* [8–12], а также опубликована карта сцепления диких диплоидных видов рода [12, 13]. Для голубики высокой были проведены исследования по идентификации сортов с помощью произвольных праймеров [11], разработаны микросателлитные (SSR) маркеры на основе EST-локусов для этой культуры [14], и проведена SSR-сертификация сортов [15].

В связи с высокой актуальностью культуры, возникновением нового направления – промышленного голубиководства, – а также высокой востребованностью и эффективностью фармакологических субстанций из растительного сырья голубики [16] стоит задача строгой сертификации коллекционного и посадочного материала и коллекций *in vitro* на основе современных молекулярно-биологических и генетических методов, разработки методологии проведения анализа и его стандартизации. Создание генетического паспорта сорта является стратегической необходимостью при оценке качества растительного материала: подтверждения сортности, стабильности генотипа при микрклональном размножении и т. д.

Цель данного исследования состояла в разработке и стандартизации комплексного RAPD и ISSR-генотипирования сортов голубики высокой, внесенных в Государственный реестр РБ, создании их уникальных RAPD- и ISSR-сертификатов. Для обнаружения генетической вариабельности и с целью выявления взаимосвязей между 12 сертифицированными сортами голубики высокой был проведен скрининг ряда праймеров. После первичного анализа, были отобраны 3 RAPD- и 2 ISSR-праймера, выявляющие наибольший полиморфизм между исследованными генотипами голубики высокой, которые и были использованы в настоящей работе. Использованные зонды позволили получить четкие воспроизводимые ампликоны, набор которых для каждого исследуемого сорта характеризовался уникальностью, т. е. обнаруживали полиморфизм между всеми сортами, и таким образом позволили их дифференцировать. На рисун-

ке 1 представлено разделение ампликонов, сгенерированных в результате ПЦР-геномной ДНК сортов *V. corymbosum* с произвольным примером ОРА-08, проведенное на приборе Bioanalyzer-2100 (Agilent, США), который позволяет быстро, с высокой точностью разделять фрагменты амплификации, получать воспроизводимые и сопоставимые данные.



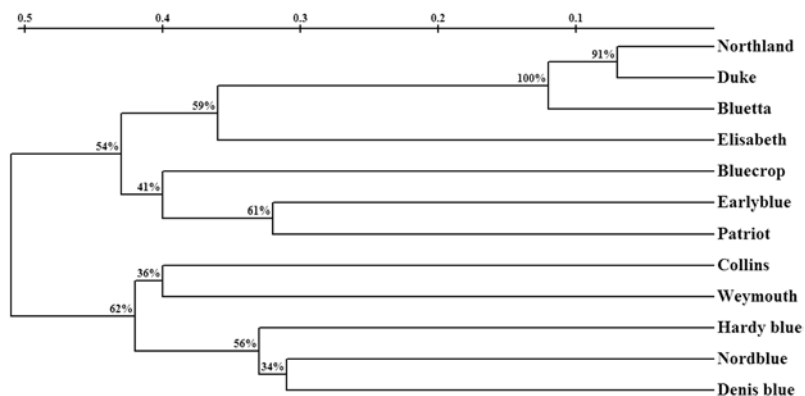
**Рис. 1.** Разделение ампликонов геномной ДНК сортов *V. corymbosum* с произвольным примером ОРА-08 на Bioanalyzer 2100. Сорта: 1 – Blue crop, 2 – Elisabeth, 3 – Early blue, 4 – Northland, 5 – Duke, 6 – Patriot, 7 – Bluest; a, b, c – повторности; К – контроль, L – стандарт длин фрагментов (bp).

Всего было сгенерировано 46 дискретных RAPD-маркеров (в среднем 15 маркеров на праймер) и 40 ISSR-маркеров (20 маркеров на праймер). Число амплифицированных фрагментов варьировало от 13 (праймер ОРА-08) до 19 (ОРА-09). ISSR-праймерами было сгенерировано в среднем по 20 ампликонов на образец. RAPD- и ISSR-маркеры обладали размерами в областях 270–2500 bp и 225–1775 bp, соответственно. Праймеры ОРА-09, ОРА-20 и UBC-818 обнаружили 100% полиморфизм между проанализированными сортами и позволили различить все генотипы. Все использованные RAPD- и ISSR-праймеры позволили разработать генотип-специфические (уникальные) маркеры. Зонды ОРА-20 и UBC-824 наиболее эффективно генерировали сорт-специфические маркеры, которые могут послужить основой для создания SCAR-маркеров и маркирования генов биосинтеза вторичных метаболитов культуры.

Коэффициенты генетического подобия Nei & Li, рассчитанные для 12 исследованных генотипов *V. corymbosum* на основе ISSR- и RAPD-локусов, как по отдельности, так и совместно (RAPD и ISSR) [17], были использованы для создания дистанционных матриц, и далее для построения дендрограмм по методу UPGMA.


Поскольку дендрограммы, основанные на данных RAPD- и ISSR-анализа, обнаружили довольно схожую кластеризацию генотипов голубики высокой ( $r=0,908$ ), данные были объединены в сводной RAPD+ISSR матрице и консенсусной дендрограмме (RAPD+ISSR), которая представлена на рисунке 2. Горизонтальная шкала позволяет определить дистанцию между сортами. Числа около узлов отражают величины поддержки, основанные на 100 повторах Bootstrap анализа.

На основании проведенных RAPD- и ISSR-анализов были созданы молекулярно-генетические паспорта для 12 сортов голубики высокорослой. В таблице 1 представлен молекулярно-генетический паспорт голубики высокой сорта Bluecrop. Данные паспорта будут служить основой для проведения строгой сортовой сертификации посадочного материала голубики высокой и *in vitro* коллекций. Разработанные уникальные спектры для каждого сорта (паспорта) можно использовать как эталоны для проведения идентификации образцов и подтверждения сортности генотипов культуры [18, 19].



**Рис. 2.** Консенсусная дендрограмма сортов голубики, созданная с использованием UPGMA-алгоритма на основе 64 RAPD- и 48 ISSR-маркеров.

**Таблица 1. Мультилокусный генетический паспорт голубики высокой сорта Bluecrop**

<i>Bluecrop</i>		
	Праймер	Ампликоны
	OPA-08	OPA08 <sub>310'</sub>
OPA-09	OPA09 <sub>325'</sub>	OPA09 <sub>435'</sub> , OPA09 <sub>475'</sub> , OPA09 <sub>650'</sub> , OPA09 <sub>685'</sub> OPA09 <sub>825'</sub> , OPA09 <sub>1060</sub>
OPA-20	OPA20 <sub>510'</sub>	OPA20 <sub>540'</sub> , OPA20 <sub>555'</sub> , OPA20 <sub>675'</sub> , OPA20 <sub>760'</sub> OPA20 <sub>985'</sub> , OPA20 <sub>1120'</sub> , OPA20 <sub>1415</sub>
UBC-818		UBC818 <sub>225'</sub> , UBC818 <sub>300'</sub> , UBC818 <sub>375'</sub> , UBC818 <sub>465'</sub> UBC818 <sub>530'</sub> , UBC818 <sub>615'</sub> , UBC818 <sub>660'</sub> , UBC818 <sub>1210'</sub> UBC818 <sub>1775</sub>
UBC-824		UBC824 <sub>525'</sub> , UBC824 <sub>545'</sub> , UBC824 <sub>630'</sub> , UBC824 <sub>645'</sub> UBC824 <sub>670'</sub> , UBC824 <sub>990'</sub> , UBC824 <sub>1655</sub>

Представленный в статье комплексный подход, основанный на ПЦР с использованием произвольных (RAPD) и микросателлитных (ISSR) праймеров, может быть использован для оценки генетического разнообразия, паспортизации сортов хозяйственно ценных ботанических коллекций. Разработаны специфические маркеры для создания уникальных генотипических профилей, на основе которых созданы паспорта 12 ценных сортов голубики высокой (*Vaccinium corymbosum* L.) коллекций ЦБС НАН Беларуси: Northland, Duke, Bluetta, Elisabeth, Bluecrop, Earlyblue, Patriot, Collins, Wewmouth, Hardy blue, Nordblue, Denis blue. Уникальные наборы ампликонов (генотипические паспорта) позволяют дифференцировать генотипы культур (сорта, формы, виды), а эталонные спектры – проводить верификацию образцов коллекций на соответствие генотипу сорта. Сортоспецифические маркеры совместно с детальной характеристикой ряда биохимических параметров предоставляют перспективу поиска доноров ценных аллелей хозяйственно-значимых генов, в т.ч. генов биосинтеза вторичных метаболитов (алколоидов, фенолов, терпенов и др.).

Таким образом, с применением современных молекулярно-генетических методов создана комплексная научно обоснованная схема поддержания, сохранения и изучения образцов репрезентативных коллекций растительных ресурсов голубики высокой коллекции ЦБС. Коллекция является частью национального и глобального биологического разнообразия, основой проведения широкого спектра научных исследований, реализации образовательных программ.



Полученные данные по ДНК-типированию образцов хозяйственно-ценных коллекций включены в отдельный раздел «Биохимические паспорта» информационно-поисковой системы Hortus Botanicus Centralis – Info (№ ГР 20053449 от 14.11.2005). Они служат источником данных для сайтов «Ботанические коллекции Беларуси» (<http://hbc.bas-net.by/bcb/>) и разделов портала Совета ботанических садов России, Беларуси и Казахстана (<http://hortusbotanicus.ru>), что дает основу для расширения сотрудничества и информационного обмена в целях сохранения биоразнообразия.

### Список литературы

1. Модельный закон о сохранении генетических ресурсов культурных растений и их рациональном использовании. 33-е пленарное заседание Межпарламентской Ассамблеи государств – участников СНГ, постановление № 33–8 от 03.12.2009.
2. Trevor R. Hodkinson, Stephen Waldren, John A. N. Parnell, Colin T. Kelleher, Karine Salamin, Nicolas Salamin. DNA banking for plant breeding, biotechnology and biodiversity evaluation. *J Plant Res.*, 2007, v. 120. P. 17–29.
3. Karp A., Seberg O. and Buiatti M. Molecular Techniques in the Assessment of Botanical Diversit. *Annals of Botany*, 1996, v. 78. P. 143–149.
4. Goodall-Copestake W.P., Hollingsworth M.L., Hollingsworth P.M., Jenkins G.L., Collin E. Molecular markers and ex situ conservation of the European elms (*Ulmus* spp.). *Biological Conservation*, 2005, v. 122, Issue 4. P. 537–546.
5. Молекулярные маркеры – инструмент исследования генетического разнообразия // Современное состояние управления генетическими ресурсами животных. Состояние всемирных генетических ресурсов животных в сфере продовольствия и сельского хозяйства // Комиссия по генетическим ресурсам в сфере продовольствия и сельского хозяйства. Продовольственная и сельскохозяйственная Организация Объединенных Наций. Рим–Москва, 2010.
6. Spooner D., van Treuren R., de Vicente M.C. Molecular markers for gene bank management. *IPGRI technical bulletin*, 2005, № 10.
7. Prodorutti D., Pertot I., Giongo L., Gessler C. Highbush Blueberry: Cultivation, Protection, Breeding and Biotechnology. *The European Journal of Plant Science and Biotechnology*, 2007, v. 1 (1). P. 44–56.
8. Weising K., Nybom H., Wolff K., Kahl G. Application of DNA fingerprinting in Plant Science. *DNA fingerprinting in plants: principles, methods, and applications*, CRC Press. Boca Raton, FL, 2005. P. 235–276.
9. Levi A., Rowland L.J., Hartung, J.S. Production of reliable randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) markers from DNA of woody plants. *Plant genetics and breeding*, 1993, v. 28 (12). P. 1188–1190.

10. Burgher K.L., Jamieson A.R. Lu X.-V. Genetic relationships among lowbush blueberry genotypes as determined by randomly amplified polymorphic DNA analysis. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 2002, v. 127. P. 98–103.
11. Debnath S.C. Differentiation of *Vaccinium* cultivars and wild clones using RAPD markers. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 2005, v. 14. P. 173–177.
12. Arce-Johnson P., Ríos M., Zúñiga M. and Vergara E. Identification of blueberry varieties using random amplified polymorphic DNA markers. *Acta Hort. (ISHS)*, 2002, v. 574. P. 221–224.
13. Rowland L. J. and Levi A. RAPD-based genetic linkage map of blueberry derived from a cross between diploid species (*Vaccinium darrowi* and *V. elliotii*). *TAG Theoretical and Applied Genetics*, 1994, v. 87 (7). P. 863–868.
14. Boches P.S., Bassil N.V. and Rowland L.J. Microsatellite markers for *Vaccinium* from EST and genomic libraries. *Molecular Ecology Notes*, 2005, v. 5. P. 657–660.
15. Bassil N., Oda A. and Hummer K.E. Blueberry microsatellite markers identify cranberry cultivars. *Acta Hort. (ISHS)*, 2009, v. 810. P. 181–187.
16. Prior R.I., Cao G., Martin A., Sofic E., McEwen J. et al. Antioxidant capacity is influenced by total phenolic and anthocyanin content, maturity, and variety of *Vaccinium* species. *J. Agric. Food Chem.*, 1998, v. 46. P. 2686–2693.
17. Nei M. and Li W.H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1979, v.76, p. 5269–5273.
18. Власова А.Б., Юхимук А.Н., Спиридович Е.В., Решетников В.Н. Сертификация сортов голубики высокой (*Vaccinium corymbosum* L.), районированных в Беларуси, на основе RAPD- и ISSR-маркеров. *Вестник Украинского общества генетиков и селекционеров*, 2010, т. 8, № 2, с. 203–210.
19. Власова А.Б., Юхимук А.Н., Филипеня В.Л., Спиридович Е.В., Решетников В.Н. RAPD- и ISSR-генотипирование как метод верификации in vitro коллекции сортов голубики высокой (*Vaccinium corymbosum*). *Материалы межд. науч. конф., посвященной 45-летию основания Института генетики и цитологии НАН Беларуси*, 25–29 октября 2010, г. Минск, с. 38.