

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

ВЕРИФИКАЦИЯ ГОЛУБИКИ ВЫСОКОРОСЛОЙ (*VACCINIUM CORYMBOSUM* L.) С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ МАРКЕРОВ

Юхимук А. Н., Чижик О. В., Филипеня В. Л., Решетников В. Н.

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

Резюме. Проведено тестирование генотипов голубики высокорослой (*Vaccinium corymbosum* L.) на соответствие референсным сортам, включённым в государственный реестр Республики Беларусь. Произведена оценка и отбор шести SSR-локусов, в совокупности обладающих максимальной разрешающей способностью: CA421F, NA1040, NA398, VССК4, KAN-262 и Pr031818819. Для исследованных генотипов голубики составлены молекулярно-генетические паспорта с подробным описанием аллельных состояний SSR-локусов и развернутым заключением о сортосоответствии. SSR-маркирование может быть применено при решении таких задач как, защита авторских прав, подтверждение качества растительного материала, в селекционном процессе.

VERIFICATION OF BLUEBERRY (*VACCINIUM CORYMBOSUM* L.) USING MICROSATELLITE MARKERS

Yukhimuk A. N., Chizhik O. V., Filipenia V. L., Reshetnikov V. N.

Summary. The genotypes of blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) for compliance with the reference varieties included in the state register of the Republic of Belarus were tested. SSR loci (CA421F, NA1040, NA398, VССК4, KAN-262 and Pr031818819), which together have the maximum resolution were evaluated and selected. Genetic passports were compiled with a detailed description of the allelic states of SSR loci and a detailed conclusion on cultivar matching. SSR marking can be used in solving such problems as copyright protection, confirmation of the quality of plant material, in the breeding process.

Культурная голубика – это многолетние кустарники, принадлежащие к секции *Cyanococcus* Rydb. Семейства вересковые или эриковые (*Ericaceae* Juss.). Дикие представители этой секции встречаются только в Северной Америке [1] и представлены четырьмя основными видами – *Vaccinium corymbosum* L., *Vaccinium angustifolium* Aiton, *Vaccinium virgatum* Aiton, *Vaccinium darrowii* Camp. С начала прошлого столетия эти виды посредством внутривидовой и межвидовой гибридизации внесли основной вклад в культурный генофонд голубики [2]. Наиболее распространёнными в умеренных широтах являются сорта тетраплоидной ($2n = 4x = 48$) северной голубики высокорослой – *Vaccinium corymbosum* L. Голубика северная высокорослая была впервые одомашнена в начале двадцатого века в Соединенных Штатах Америки в Нью-Гэмпшире, Нью-Джерси, Мэриленде и Флориде [3], где проводились первые селекционные работы по оценке и отбору элитных растений, полученных в результате скрещивания перспективных диких форм. Северная Америка остается основным мировым производителем голубики, также интенсивно развивается промышленное голубиководство в таких регионах как Центральная и Южная Америка, Европа, Австралия и Новая Зеландия [2]. Увеличение промышленного производства голубики в том числе вызвано накоплением научных данных и большей осведомленностью о пользе данной культуры для здоровья человека. Плоды голубики богаты антоцианами, которые связывают с улучшением ночного зрения и предотвращением дегенерации желтого пятна [4]. Кроме того, наличие таких производных транс-стильбена как ресвератрол и птеростильбен, как полагают, снижает уровень холестерина, а также ассоциировано с противораковой активностью и снижением риска сердечных заболеваний [5].

Первые опытные посадки голубики высокорослой (*Vaccinium corymbosum* L.) в Беларуси созданы в 1980 г. на Ганцевичской научно-экспериментальной базе ЦБС НАН Беларуси. Сорта этой культуры поступили из Главного ботанического сада АН СССР. Первые исследования по оценке нескольких интродуцированных сортов голубики высокорослой проведены Т. В. Курлович. Первые производственные насаждения голубики высокорослой в Беларуси были заложены в 1989 г. в Барановичском

лесхозе Брестской области на площади около 3 га. Первая коммерческая плантация данной культуры создана в фермерском хозяйстве «Барвинок» в Сенненском районе Витебской области. Самые крупные промышленные насаждения голубики высокорослой – 150 га, созданы в КФХ «Синяя птица», Ганцевичского района. На начало 2021 г. в Беларуси имелось более 1000 га промышленных посадок голубики высокорослой, 70 % которых локализовано в Брестской области [6]. В настоящее время в государственный реестр сортов допущенных к использованию на территории Республики Беларусь внесено 14 перспективных сортов данной культуры («Bluetta», «Bluejay», «Collins», «Denise Blue», «Duke», «Earliblue», «Elizabeth», «Elliott», «Hardiblue», «Jersey», «Patriot», «Spartan», «Weymouth») и 3 сорта голубики гибридной («Northland», «Northblue», «Northcountry») [7].

В связи с высокой актуальностью культуры голубики высокорослой и интенсивным развитием промышленного голубиководства в Республике Беларусь первостепенным является получение качественного посадочного материала, соответствующего современным мировым стандартам. От качества посадочного материала зависят урожайность и долговечность промышленных посадок, коммерческие характеристики плодов. Важными требованиями, предъявляемыми к саженцам, являются их соответствие заявляемому сорту и отсутствие системных патогенов (в том числе вирусов). Как показали многочисленные сравнительные исследования, ДНК-маркирование SSR-локусов (ДНК-фингерпринтинг) является крайне информативным и в высокой степени воспроизводимым методом при идентификации сортов и может быть использовано для защиты авторских прав и/или определения соответствия генотипа референсному сорту [8]. Именно поэтому метод SSR-маркирования рекомендуется Международным союзом по охране новых сортов растений (UPOV) как приоритетный при проведении экспертизы сортов на предмет наличия отличимости, однородности и стабильности (ООС-тест) [9].

В 2016 году в Отделе биохимии и биотехнологии растений Центрального ботанического сада начаты работы по верификации растений голубики высокорослой на соответствие референсным сортам, в первую очередь включённым в государственный реестр РБ [10]. В настоящее время помимо коллекции Центрального ботанического сада протестированы генотипы голубики из коллекций ООО «ГолденБери» (г. Кобрин), КФХ «Ягодка» (п. Зеленый Бор), НИЛ клеточных технологий в растениеводстве Полесского госуниверситета (г. Пинск). В таблице 1 представлены результаты верификации вышеперечисленных коллекций на соответствие референсным сортам из госреестра РБ.

Таблица 1. Сорта голубики высокорослой и голубики гибридной, включённые в государственный реестр сортов Республики Беларусь за 2021 год

№	Сорт	Таксономия	Родословная	BD	GB	YA	PU
1	Bluecrop (T ³)	V. corymbosum L.	(Jersey × Pioneer) × (Stanley × June)	+	+	+	+
2	Bluejay	V. corymbosum L.	Berkeley × (Pioneer × Taylor)				
3	Bluetta	V. corymbosum L.	(North Sedgewick × Coville) × Earliblue	+	+		
4	Collins (T ³)	V. corymbosum L.	Stanley × Weymouth	+			
5	Denise Blue	V. corymbosum L.	—	NO			NO
6	Duke	V. corymbosum L.	(Ivanhoe × Earliblue) × (E30 × E11)	+	+	+	+
7	Earliblue (T ³)	V. corymbosum L.	Stanley × Weymouth	+			
8	Elizabeth (T ³)	V. corymbosum L.	(Katharine × Jersey) × Scammel	+	+		
9	Elliott (T ³)	V. corymbosum L.	Burlington × [Dixi × (Jersey × Pioneer)]	+	+		
10	Hardyblue (T ³)	V. corymbosum L.	Pioneer × Rubel				
11	Jersey (T ³)	V. corymbosum L.	Rubel × Grover	+	+		
12	Patriot (T ³)	V. corymbosum L.	(Dixi × Michigan LB 1) × Earliblue	+	+		–
13	Spartan (T ³)	V. corymbosum L.	Earliblue × US 11–93	+	+	+	

№	Сорт	Таксономия	Родословная	BD	GB	YA	PU
14	Weymouth (T ³)	<i>V. corymbosum</i> L.	June × Cabot	+			
15	Northblue	<i>V. hybr.</i>	Mn 36 (B 10 × US 3)	+			
16	Northcountry	<i>V. hybr.</i>	B6 × R2 P4	+			
17	Northland	<i>V. hybr.</i>	Berkeley × Mich 19H	+		+	

BD – Центральный ботанический сад; GB – ООО «ГолденБери»; YA – КФК «Ягодка»; PU – НИЛ клеточных технологий. «+» – сортосоответствие подтверждено; «-» – сортосоответствие не подтверждено; NO – нет референсных данных. T³ – true to type / сорта, для которых сортность подтверждена данными родословной.

ДНК-маркирование генотипов голубики начато на основе минимальной микросателлитной панели [11] SSR-маркеров, разработанных Boches et al. [12], из которой для базового набора отобраны шесть SSR-локусов, в совокупности обладающих максимальной разрешающей способностью: CA421F, VCCJ5, NA1040, NA398, NA741, VCCK4. В дальнейшем локусы VCCJ5 и NA741 были выбракованы, т.к. не обладали воспроизводимой амплификационной активностью. Позже нами были протестированы четыре локуса из библиотеки, разработанной Basil et al. [2]: VCB-C-04624, GVC-C571, KAN-262, Pr031818819, из которых были отобраны два последних. Сформированный в итоге базовый набор из шести микросателлитных локусов позволил при постановке ПЦР выявить достаточный для идентификации генотипов голубики набор аллелей. ДНК-маркирование SSR-локусов генотипов голубики проводили методом стандартной ПЦР в амплификаторе SureCycler 8800 (Agilent). Для каждого локуса использовали пару специфических праймеров: прямой, модифицированный флуоресцентной меткой, и обратный. Состав амплификационной смеси и режим ПЦР согласно Basil et al. [2]. Качественный и количественный контроль амплифицированных фрагментов ДНК проводили с помощью электрофореза в агарозном геле (1,2%). Для оптимизации экономических затрат формировали объединённые смеси амплифицированных аллелей SSR-локусов каждого образца. Фрагментное разделение мультиплексных смесей проводили методом капиллярного гель-электрофореза в генетическом анализаторе Applied Biosystems 3500 с использованием размерного стандарта LIZ600 (Thermo Fisher Scientific). Файлы данных обрабатывали в GeneMarker V2.7.0 (рисунок 1).

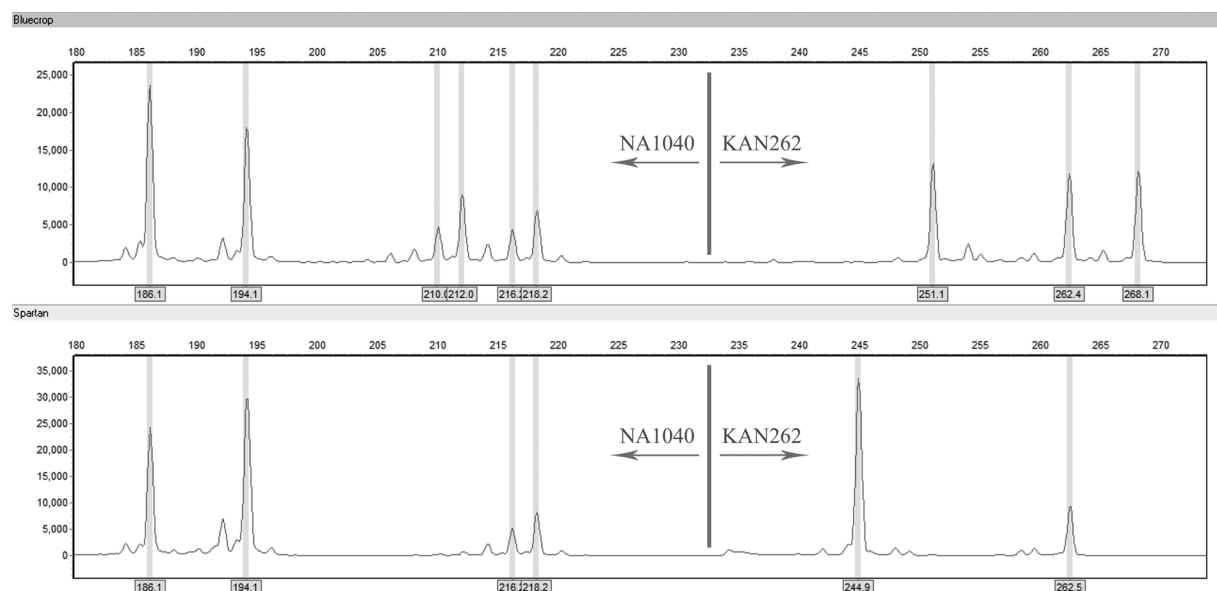


Рис. 1. Электрофореграммы одновременного разделения аллелей двух SSR-локусов (NA1040 и KAN262) в одном капилляре для сортов Bluecrop и Spartan

Для каждого тестируемого генотипа голубики проводили описание аллельных состояний (количество и размер фрагментов ДНК) всех SSR-локусов из базового набора. Наблюдаемые аллельные состояния SSR-локусов сравнивали с аналогичными ожидаемыми значениями, представленными в Информационной сети по ресурсам зародышевой плазмы Службы сельскохозяйственных исследований Министерства сельского хозяйства США. Данная Информационная сеть базируется на результатах двух масштабных исследований 2005 (Boches et al.) и 2020 (Bassil et al.) годов. Соответствие исследуемого генотипа голубики сорту с подтвержденной родословной (сорт со статусом *true to type* – *TTT*) устанавливали в случае идентичности наблюдаемых аллельных состояний SSR-локусов ожидаемым референсным значениям. Для сортов голубики, не имеющих статуса *TTT*, в настоящий момент существует возможность сопоставлять наблюдаемые аллельные состояния SSR-локусов исследуемого генотипа с ожидаемыми значениями эталонных растений, содержащихся в коллекции Министерства сельского хозяйства США. Для всех тестируемых генотипов голубики составлены молекулярно-генетические паспорта с подробным описанием аллельных состояний SSR-локусов и развернутым заключением о сортосоответствии (рисунок 2).

Молекулярно-генетический паспорт голубики высокорослой (*Vaccinium corymbosum* L.)

Исследуемый генотип	Патриот KS	
Держатель генотипа	ООО «ГолденБери» (г. Кобрин, Республика Беларусь)	
Референсный сорт	Патриот (cv. <i>Patriot</i>)	
Источники эталонных данных	Сортосоответствие устанавливалось в результате сопоставления наблюдаемого аллельного состояния (размер и количество аллелей) SSR-локусов исследуемых генотипов с аналогичными данными, представленными в Информационной сети по ресурсам зародышевой плазмы Службы сельскохозяйственных исследований Министерства сельского хозяйства США.	
Характеристика аллельных состояний локусов		
Локус CA421F		
Ожидаемые аллели	166/182/192/198	Наблюдаемое количество аллелей и их размеры СОТВЕТСТВУЮТ ожидаемым значениям для сорта Патриот (cv. <i>Patriot</i>)
Наблюдаемые аллели	166/182/192/198	
Локус NA1040		
Ожидаемые аллели	184/190/192	Наблюдаемое количество аллелей и их размеры СОТВЕТСТВУЮТ ожидаемым значениям для сорта Патриот (cv. <i>Patriot</i>)
Наблюдаемые аллели	184/190/192	
Локус VCC_K4		
Ожидаемые аллели	173/217/241	Наблюдаемое количество аллелей и их размеры СОТВЕТСТВУЮТ ожидаемым значениям для сорта Патриот (cv. <i>Patriot</i>)
Наблюдаемые аллели	173/217/241	
Локус NA398		
Ожидаемые аллели	211/225/228/232	Наблюдаемое количество аллелей и их размеры СОТВЕТСТВУЮТ ожидаемым значениям для сорта Патриот (cv. <i>Patriot</i>)
Наблюдаемые аллели	211/225/228/232	
Локус Pr031818819a		
Ожидаемые аллели	315/323/327	Наблюдаемое количество аллелей и их размеры СОТВЕТСТВУЮТ ожидаемым значениям для сорта Патриот (cv. <i>Patriot</i>)
Наблюдаемые аллели	315/323/327	
Локус KAN-262a		
Ожидаемые аллели	246/269	Наблюдаемое количество аллелей и их размеры СОТВЕТСТВУЮТ ожидаемым значениям для сорта Патриот (cv. <i>Patriot</i>)
Наблюдаемые аллели	246/269	
Заключение:	Исследованный генотип голубики высокорослой (<i>Vaccinium corymbosum</i> L.) СОТВЕТСТВУЕТ сорту Патриот (cv. <i>Patriot</i>) со статусом TTT — TRUE TO TYPE (сортность подтверждена по данным родословной).	

Рис. 2. Молекулярно-генетический паспорт голубики высокорослой (*Vaccinium corymbosum* L.) сорта Патриот из коллекции ООО «ГолденБери» (г. Кобрин, Беларусь)

Проведенные исследования позволили верифицировать сортовую принадлежность генотипов голубики высокорослой (*Vaccinium corymbosum* L.), которые в дальнейшем могут стать основой

для эффективного производства высококачественного сортового посадочного материала в том числе методом микрклонального размножения. Предложенный метод ДНК-маркирования SSR-локусов выявил достаточный для идентификации генотипов голубики набор аллелей и обеспечил возможность проверки генотипов голубики высокой на соответствие критериям отличимости, однородности и стабильности (ООС-теста). SSR-маркирование может быть применено при решении таких задач как, защита авторских прав, подтверждение качества растительного материала, определение соответствия сорта стандарту при закупке посадочного материала. Результаты исследований могут быть использованы в селекционном процессе.

Список литературы

1. Hancock J. F., Draper A. D. Blueberry culture in North America // HortScience.– 1989, № 24.– P.: 551–556.
2. Bassil N., Bidani A., Nyberg A., Hummer K., Rowland L. J. Microsatellite markers confirm identity of blueberry (*Vaccinium* spp.) plants in the USDA-ARS National Clonal Germplasm Repository collection // Genetic Resources and Crop Evolution.– 2020, V. 67.– P.: 393–409.
3. Retamales J. B., Retamales H., Hancock J. F. Blueberries CABI // Crop Prod Sci Hortic.– 2012, 21.– 323 p.
4. Kalt W., Joseph J. A., Shukitt-Hale B. Blueberries and human health. A review of the current research // J Am Pomol Soc.– 2007, 61(3).– P.: 151–160.
5. Rimando A. M., Kalt W., Magee J. B., Dewey J., Ballington J. R. Resveratrol, pterostilbene, and piceatannol in *Vaccinium* berries // J Agric Food Chem.– 2004, 52.– P.: 4713–4719.
6. Титок В. В. История и результаты интродукции ягодных растений семейства *Ericaceae* Juss. в Республике Беларусь / Титок В. В., Решетников В. Н., Володько И. К. [и др.] // Опыт и перспективы выращивания нетрадиционных ягодных растений на территории Беларуси и сопредельных стран.– Минск: Медисонт, 2021.– С. 3–14.
7. Государственный реестр сортов Республики Беларусь, 2021 г.– режим доступа: http://sorttest.by/img/gosudarstvennyy_reyestr_2021.pdf, дата доступа: 15 апреля 2022 г.
8. Powell W., Morgante M., Andre C. et al. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis // Molecular Breeding.– 1996, Vol 2, № 3.– P.: 225–238.
9. Guidelines for DNA-profiling: molecular marker selection and database construction // UPOV: INF – 2010, № 17/1.
10. Филипня В. Л., Юхимук А. Н., Курлович Т. В., Чижик О. В. Генотипическая и фенотипическая верификация растительных коллекций для создания генетического банка и генофонда интродуцированных сортов голубики высокой (*Vaccinium corymbosum* L.) методом микрклонального размножения // Садоводство и виноградарство.– 2018, № 2.– С. 54–57.
11. Hinrichsen P., Castro M. H., Ravest G. et al. Minimal Microsatellite Marker Panel for Fingerprinting Blueberry // Acta Hort.– 2009, Vol. 810.– P.: 173–180.
12. Boches P. S., Rowland L. J., Bassil N. V. Microsatellite markers for *Vaccinium* from EST and genomic libraries. // Mol. Ecol. Notes.– 2005, Vol. 5 – P.: 657–660.