

**Национальная академия наук Беларуси  
Центральный ботанический сад**

**Интродукция, сохранение и использование  
биологического разнообразия мировой флоры**

Материалы Международной конференции,  
посвященной 80-летию Центрального ботанического сада  
Национальной академии наук Беларуси  
(19–22 июня 2012 г., Минск, Беларусь)

**В двух частях  
Часть 2**

**Assessment, Conservation and Sustainable Use  
of Plant Biological Diversity**

Proceedings of the International Conference  
dedicated to 80th anniversary of the Central Botanical Garden  
of the National Academy of Sciences of Belarus  
(June 19–22, 2012, Minsk, Belarus)

**In two parts  
Part 2**

Минск  
2012

УДК 582:581.522.4(082)

ББК 28.5я43

И73

**Редакционная коллегия:**

*Д-р биол. наук В.В. Титок (ответственный редактор);  
д-р биол. наук, академик НАН Беларуси В.Н. Решетников;  
д-р биол. наук, ч.-кор. НАН Беларуси Ж.А. Рупасова;  
д-р биол. наук, чл.-кор. НАН Беларуси Е.А. Сидорович;  
канд. биол. наук Ю.Б. Аношенко; канд. биол. наук А.В. Башилов;  
канд. биол. наук А.А. Веевник; канд. биол. наук И.К. Володько;  
канд. биол. наук И.М. Гаранович; канд. биол. наук Л.В. Гончарова;  
канд. биол. наук А.А. Кузовкова; канд. биол. наук Л.В. Кухарева;  
канд. биол. наук Н.М. Лунина; канд. биол. наук Е.В. Спиридович;  
канд. биол. наук В.И. Торчик; канд. биол. наук О.В. Чижик;  
канд. биол. наук А.Г. Шутова; канд. биол. наук А.П. Яковлев.*

Иллюстрации предоставлены авторами публикаций

**И 73 Интродукция, сохранение и использование биологического разнообразия мировой флоры;** Материалы Международной конференции, посвященной 80-летию Центрального ботанического сада Национальной академии наук Беларуси. (19–22 июня 2012, Минск, Беларусь). В 2 ч. Ч. 2 / Нац. акад. Наук Беларуси, Централ. ботан. сад; редкол.: В.В. Титок /и др./, Минск, 2012. – 492 с.

В сборнике представлены материалы Международной конференции «Интродукция, сохранение и использование биологического разнообразия мировой флоры», посвященной 80-летию Центрального ботанического сада Национальной академии наук Беларуси.

В 1-й части публикуются тезисы докладов секций «Теоретические основы и практические результаты интродукции растений» и «Современные направления ландшафтного дизайна и зеленого строительства»

Во 2-й части представлены тезисы докладов секций «Экологическая физиология и биохимия интродуцированных растений», «Генетические и молекулярно-биологические аспекты изучения и использования биоразнообразия растений» и «Биотехнология как инструмент сохранения биоразнообразия растительного мира».

**УДК 582:581.522.4(082)**

**ББК 28.5я43**

## Молекулярно-генетические аспекты анализа сортов 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, г. Минск, Беларусь, e-mail: L.Goncharova@cbg.org.by

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

**Резюме.** В работе представлен обзор основных направлений, связанных с использованием молекулярно-генетических методов для анализа сортов голубики высокой, проводимых Центральным ботаническим садом НАН Беларуси и Институтом леса НАН Беларуси: генетическая паспортизация, фитопатологический анализ, выявление генетических нарушений в культурах *in vitro*.

**Summary.** The review of main investigations of blueberry cultivars, with utilization of molecular genetic assays, held by the Central Botanical Garden of NAS of Belarus and Forest Research Institute of NAS of Belarus, are presented: genetic certification, phytopathologic analysis, diagnostics of genetic aberration in micropropagated plants.

Голубика высокая, или голубика ковилла (*Vaccinium x covilleianum* Butkus et Pliszka), – ценное пищевое и лекарственное растение. Данный вид был получен в результате гибридизации трех североамериканских видов голубик и 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].

С 1983 г. Центральный ботанический сад НАН Беларуси (ЦБС) начал проводить целенаправленную работу по интродукции сортов данной культуры. 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 качество ягод, установлены климатические зоны промышленного выращивания голубики в Беларуси, а также разработана технология ее возделывания. На сегодняшний день коллекция ЦБС содержит более 40 сортов *V. x covilleianum*, 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 микроклонального 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 аспектов 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].

Целью данной работы явился обзор основных направлений в области молекулярно-генетического анализа сортов голубики высокой, реализуемых ЦБС и Институтом леса НАН Беларуси.

**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]. RAPD-анализ основан на амплификации препаратов ДНК с короткими (обычно десятичными) произвольными праймерами. 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*», «*Croatian*», «*Herbert*», «*Delite*», «*Jersey*») и девять промышленных сортов голубики высокой («*Aiwengo*», «*Tifblue*», «*Weymuth*», «*Concord*», «*Blueray*», «*Dixi*», «*Rancocas*», «*Erliblu*», «*Atlantic*»). Типичный SSR-спектр некоторых сортов представлен на рис. 1.

Одним из результатов внедрения созданной базы данных генетических паспортов голубики явилась инвентаризация промышленной плантации голубики Милошевичского лесхоза. В результате проведенного 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. 2). Три варианта генотипов были выявлены неоднократно, и были определены как сортовой материал. Последующий анализ по генетической базе данных позволил идентифицировать их как «*Erliblu*», «*Jersey*» и «*Bluecrop*».

**Фитопатологический анализ.** Инфекции представляют одну из наиболее актуальных проблем, связанных с выращиванием и культивированием голубики. В первую очередь, это связано 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.

Проведение фитопатологического мониторинга сортов является целесообразным как в рабочих коллекциях и маточных культурах, так и при закладке плантаций, и уже на существующих промышленных объектах. Особую важность представляет диагностика трудно культивируемых, 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].

Принципы 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

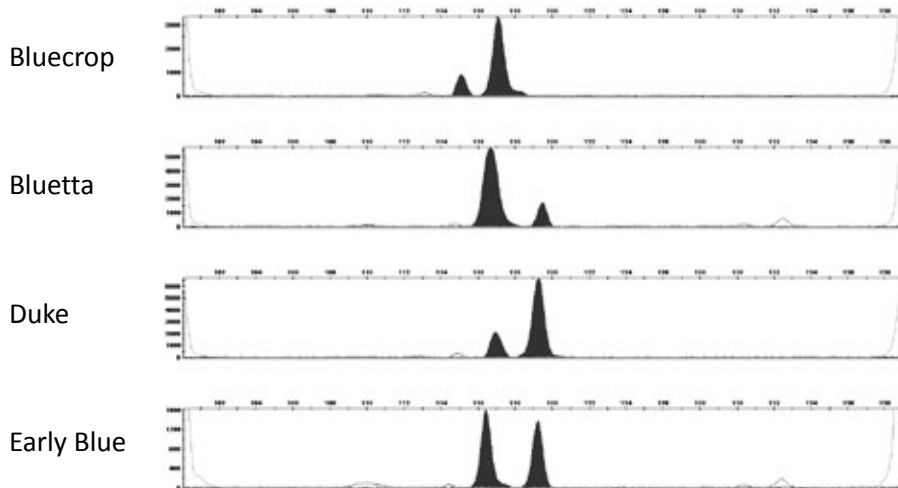


Рисунок 1. Микросателлитные спектры сортов голубики высокой (локус Vc 18).

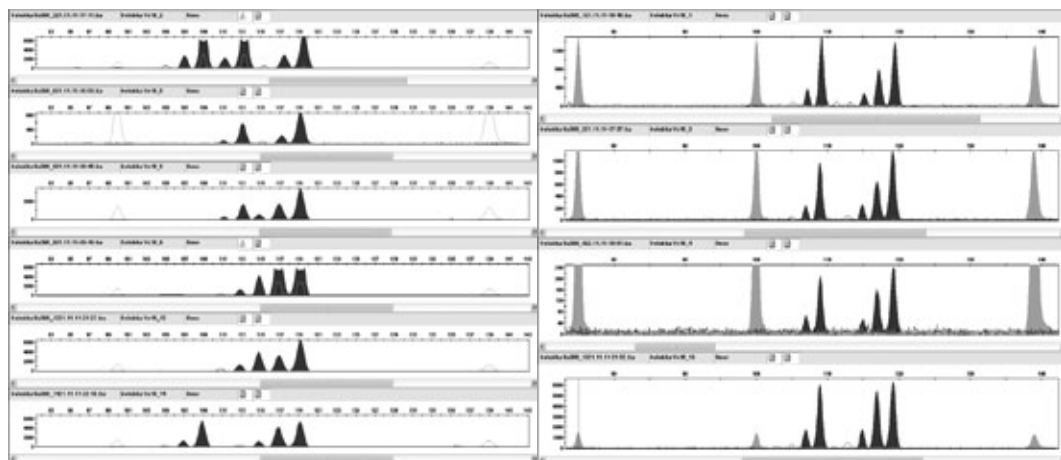


Рисунок 2. Молекулярно-генетический анализ сортов голубики (локус Ca 23) (слева – несортной материал, справа – сортной материал).

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].

В наибольшем числе случаев диагностика и идентификация возбудителей заболеваний 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 мультикопийностью – 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 универсальными 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. 3). В случае необходимости детекции конкретного вида патогена разрабатываются специфические праймеры, дающие позитивную реакцию только с данным видом.

В ходе проведенного нами фитопатологического анализа голубики высокой некоторых белорусских плантаций были выявлены патогенные грибные виды, поражающие различные

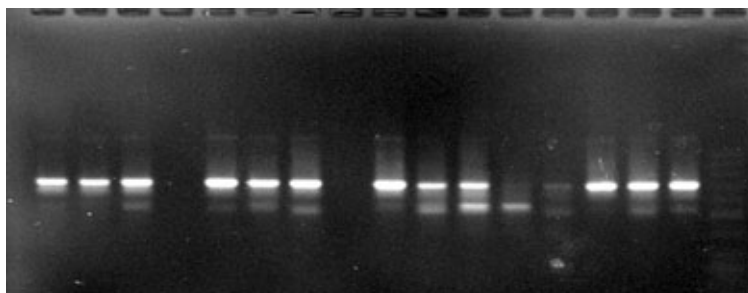


Рисунок 3. Молекулярно-фитопатологический анализ растений голубики (инфицированные образцы представлены многофракционными спектрами).

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.

**Выявление генетических нарушений.** Одним из важнейших условий, предъявляемых к созданию культур *in vitro* голубики, наряду с отсутствием инфекции, является генетическая однородность микроклонов – отсутствие химеризма и соматклональной изменчивости. Данное условие может быть достигнуто путем подбора оптимального для роста и развития растений состава гормонов и минеральных солей. Кроме того, на уровень возникновения генетических аномалий влияет и способ получения асептических культур. Так, например, в случае непрямого морфогенеза (через каллусные культуры) частота образования мутантных микро-растений в значительной степени выше по сравнению с альтернативными способами.

За последние десятилетие использование ДНК-маркеров для характеристики хромосомных aberrаций и точечных мутаций приобрело особую значимость. В качестве примера можно привести применение микросателлитных маркеров для выявления потери гетерозиготности (ПГ, или LOH) и микросателлитной нестабильности (МИ, или MI) [9].

Для анализа микросателлитных локусов на современном этапе используют автоматизированные генетические анализаторы, характеризующиеся высокой чувствительностью детекции исследуемых молекул ДНК и стандартизированными условиями электрофоретического фракционирования.

Наличие цитологических аномалий основано на количественном анализе продуктов амплификации микросателлитных локусов. Так, например, в случае миксоплоидии на денситограммах выявляется существенный дисбаланс уровня амплификации аллельных вариантов в гетерозиготных образцах (рис. 4).

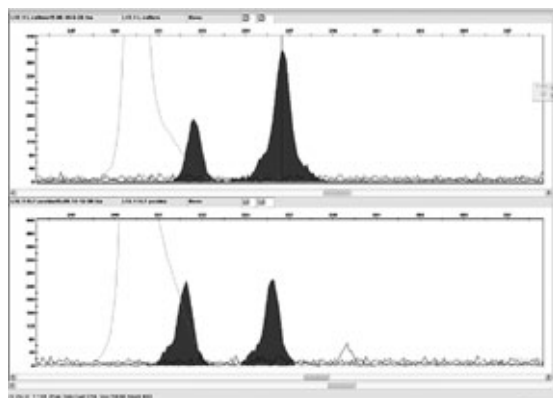


Рисунок 4. Анализ образцов культур *in vitro* на наличие миксоплоидии (верхний образец – миксоплоид, нижний – норма).

Кроме того, данный способ позволяет проводить и анализ пloidности исследуемых образцов. Выявление соматклональной изменчивости основано на выявлении достоверных различий в ПЦР-спектрах по отдельным локусам изучаемых образцов. При этом основным типом изменений является делетирование той или иной фракции амплифицируемого продукта. Однако следует отметить, что большинство локусов образцов с соматклональной изменчивостью имеют идентичный с исходным растением генотип.

**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.
9. Beroukhim R. et al. Inferring loss-of-heterozygosity from unpaired tumors using high-density oligonucleotide SNP arrays. *PLoS Comput Biol.*, 2006, V. 2 (5), p. 30–41.

## Отдаленная гибридизация брусничных в ЦСБС СО РАН, г. Новосибирск

Горбунов А.Б., Снакина Т.И.

Центральный Сибирский ботанический сад СО РАН, г. Новосибирск, Россия,  
e-mail: gab\_2002ru@ngs.ru

**Резюме.** В статье обобщены результаты многолетних исследований по отдаленной гибридизации брусничных в Сибири. Показана возможность получения межвидовых и межродовых гибридов на основе скрещивания аборигенных и североамериканских видов.

**Summary.** The results of a multi-year researches on remote hybridization of *Vaccinoideae* in Siberia are generalized in the article. A possibility of creating of interspecific and itergeneric hybrids on the basis of crossing of aboriginal and North-American spesies is shown.

Брусничные являются пищевыми, лекарственными и декоративными растениями. Наибольшее распространение в культуре имеют высокорослая голубика (*Vaccinium corymbosum* L. и ее межвидовые гибриды), голубика прутьевидная, или голубика Эша (*V. virgatum* Aiton или *V. ashei* Reade), голубика узколистная (*V. angustifolium* Aiton), полувысокая голубика (*V. corymbosum* x *V. angustifolium*) и клюква крупноплодная [*Oxycoccus macrocarpus* (Aiton) Pursh]. Существенную роль в формо- и видообразовании брусничных играет отдаленная гибридизация. Так, S.P. Vander Kloet (1977), на основе данных по искусственной гибридизации предполагает, что вид *V. angustifolium* произошел от скрещивания *V. boreale* Hall & Aalders с *V. pallidum* Aiton. По мнению W.H. Camp (1944), клюква болотная (*O. palustris* Pers.) представляет смесь тетраплоидных гибридов и их производных, образовавшихся в результате гибридизации клюквы мелкоплодной (*O. microcarpus* Turcz. ex Rupr.) с клюквой крупноплодной в Плейстоценовом периоде, когда под давлением ледников первый вид сместился на юг Северной Америки и контактировал со вторым. Более половины из известных 108 сортов высокорослой и все 10 сортов полувысокой голубики созданы на основе межвидовых скрещиваний. Голубика узколистная как вид с высокой зимостойкостью использован при выведении сортов полувысоких голубик, предназначенных для районов с холодным климатом. В Латвии зарегистрировано 3 сорта фертильного, урожайного межродового гибрида клюквы крупноплодной (сорт «Франклин») с брусникой обыкновенной (*V. vitis-idaea* L.), что значительно расширяет возможности в селекции брусничных (Ripa and Audriņa, 2009). Отдаленная гибридизация является одним из эффективных методов создания сортов брусничных при продвижении их в новые районы интродукции, в т.ч. и в более суровые в климатическом отношении.