

УДК 631.543.1:634.73:57.06

А. Н. Юхимук¹, Д. В. Гордей², В. Н. Решетников¹¹Центральный ботанический сад Национальной академии наук Беларуси²Белорусский государственный технологический университет**ИДЕНТИФИКАЦИЯ СОРТОВ И ВНУТРИВИДОВЫХ
ТАКСОНОВ ГОЛУБИКИ УЗКОЛИСТНОЙ (*VACCINIUM ANGUSTIFOLIUM* AIT.)
НА ОСНОВЕ АНАЛИЗА МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ ЛОКУСОВ
(SSR-МАРКЕРОВ). ПЕРСПЕКТИВЫ ПРАКТИЧЕСКОГО
ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ДАННЫХ**

ДНК-идентификация на основе анализа аллельного состава восьми микросателлитных локусов позволила составить уникальные генетические профили для одиннадцати генотипов голубики узколистной. Наибольшую разрешающую способность продемонстрировали локусы CA421F, Pr031818819a, NA1040 и GVC-C179a, информационный индекс полиморфизма которых составил от 0,80 до 0,88. Наименее информативным оказался локус KAN262 с информационным индексом полиморфизма 0,66.

Данные о совокупном аллельном состоянии локусов и размере аллелей нашли практическое применение для подтверждения подлинности трех сортов голубики узколистной белорусской селекции. Высказано теоретическое предположение о возможности использования генетической информации для оценки эффективности скрещивания гибридов уже на ранних этапах их онтогенеза путем анализа комбинативной изменчивости семейной группы или по уникальным аллелям родительских генотипов, унаследованных потомством.

Для практического использования данных ДНК-идентификации требуется незамедлительное усовершенствование законодательной базы в Республике Беларусь, которая на уровне нормативно-правовых актов закрепит представления о «генетической информации» и определит широту юридического поля ее использования. Прежде всего речь идет об утверждении единой формы генетического паспорта растения (формально результата ДНК-идентификации) и предоставлении возможности получения патента на сорт на основе его уникального генетического профиля.

Ключевые слова: голубика узколистная, патент на сорт, UPOV, генетический паспорт, ДНК-идентификация, микросателлитные локусы, ДНК-маркеры, маркер-опосредованная селекция.

Для цитирования: Юхимук А. Н., Гордей Д. В., Решетников В. Н. Идентификация сортов и внутривидовых таксонов голубики узколистной (*Vaccinium angustifolium* Ait.) на основе анализа микросателлитных локусов (SSR-маркеров). Перспективы практического использования данных // Труды БГТУ. Сер. 1, Лесное хоз-во, природопользование и перераб. возобновляемых ресурсов. 2024. № 2 (282). С. 141–151.

DOI: 10.52065/2519-402X-2024-282-17.

A. N. Yukhimuk¹, D. V. Gordey², V. N. Reshetnikov¹¹Central Botanical Garden of National Academy of Sciences of Belarus²Belarusian State Technological University**IDENTIFICATION OF VARIETIES AND INTRASPECIFIC TAXONS
OF LOW BUSH BLUEBERRY (*VACCINIUM ANGUSTIFOLIUM* AIT.)
BASED ON ANALYSIS OF MICROSATELLITE LOCUSES (SSR-MARKERS).
PROSPECTS FOR THE PRACTICAL USE OF DATA**

DNA identification based on analysis of the allelic composition of eight microsatellite loci made it possible to compile unique genetic profiles for eleven genotypes of blueberry. The highest resolving power was demonstrated by the primers CA421F, Pr031818819a, NA1040 and GVC-C179a, the information polymorphism index of which was 0.80–0.88. The least informative primer was KAN262 with an information polymorphism index of 0.66.

Data on the total allelic state of loci and the size of alleles have found practical application to confirm the authenticity of three varieties of low bush blueberry of Belarusian selection. A theoretical assumption has been made about the possibility of using genetic information to assess the effectiveness of crossing hybrids already at the early stages of their ontogenesis by analyzing the combinative variability of a family group or by unique alleles of parental genotypes inherited by the offspring.

For the practical use of DNA identification data, immediate improvement of the law in the Republic of Belarus is required, which at the level of regulatory legal acts will consolidate views about “genetic

information” and determine the width of the legal field of its use. First of all, we are talking about the approval of a single form of a plant’s genetic passport (formally the result of DNA identification) and the provision of the opportunity to obtain a patent for a variety based on its unique genetic profile.

Keywords: low bush blueberry, variety patent, UPOV, genetic passport, DNA identification, microsatellite loci, DNA markers, marker-assisted selection.

For citation: Yukhimuk A. N., Gordey D. V., Reshetnikov V. N. Identification of varieties and intraspecific taxons of low bush blueberry (*Vaccinium angustifolium* Ait.) based on analysis of microsatellite locuses (SSR-markers). Prospects for the practical use of data. *Proceedings of BSTU, issue 1, Forestry. Nature Management. Processing of Renewable Resources*, 2024, no. 2 (282), pp. 141–151 (In Russian).

DOI: 10.52065/2519-402X-2024-282-17.

Введение. В 1990-х гг. Т. В. Курлович и В. Н. Босак на основании сопоставления и анализа климатических показателей основных районов возделывания голубики узколистной (*Vaccinium angustifolium* Ait.) в США и Канаде с аналогичными данными областных центров Беларуси сделали теоретическое предположение о возможности успешного культивирования данного североамериканского ягодного вида в Республике Беларусь [1]. Практическую работу по интродукции голубики узколистной на Ганцевичской экспериментальной базе ЦБС «Журавінка» начал О. В. Морозов. Благодаря усилиям ученого в 2002 г. из общей совокупности в 300 семян, выращенных из семян от свободного опыления лучших канадских клонов К70-62, К508, К510 и МЕЗ, были выделены 26 перспективных растений для дальнейших исследований [2]. Весной 2009 г. в ходе практической реализации идеи развития в стране северного голубиководства селекционная работа с вышеупомянутыми экземплярами была продолжена на площади верхового торфяника в Белорусском Поозерье (Шарковщинский район Витебской области). В 2014 г. на основании результатов комплексной оценки хозяйственно-биологических показателей и свойств растений три формы *V. angustifolium* были включены в Государственный реестр сортов сельскохозяйственных растений под названиями «Моте-го» (рег. № 2012312), «Янка» (рег. № 2012313) и «Половчанка» (рег. № 2012314) [3]. Внесение сортов голубики узколистной белорусской селекции в единый банк данных сортов сельскохозяйственных растений Государственной инспекции по испытанию и охране сортов растений дало право официального производства посадочного материала культуры, коммерческой реализации саженцев и их использования для создания промышленных плантаций в Республике Беларусь.

В свою очередь, решение вопросов обеспечения защиты авторских прав на сорта растений в Республике Беларусь находится в исключительной компетенции Национального центра интеллектуальной собственности. В соответствии с законодательством нашей страны организация удостоверяет результат селекционных достижений и предоставляет правовую охрану сорта растения

путем выдачи на него патента [4]. Административная процедура получения охранного документа призвана подтвердить новизну, отличимость, однородность и стабильность нового сорта. Оценку его соответствия вышевыдвинутым требованиям проводят на основании анкеты сорта растения – документа, в котором приводятся поддающиеся точному описанию существенные признаки объекта культурной флоры, позволяющие определить его характерные и отличительные особенности: морфологические, физиологические и др.

Алгоритм проведения проверки представителями рода *Vaccinium* с нюансами оформления анкеты сорта подробно изложен в рекомендациях по проведению испытаний на соответствие критериям отличимости, однородности и стабильности, подготовленных Международным союзом по охране новых сортов растений (UPOV) [5].

Сложность патентования сортов голубики узколистной в рамках установленной «классической» процедуры обусловлена отсутствием каких-либо четких внешних отличительных признаков между селекционными растениями и многочисленными несортными представителями данного вида. С большой долей вероятности даже в имеющейся сейчас в республике немногочисленной семенной популяции *V. angustifolium* можно найти растения очень схожие с сортами белорусской селекции по габитусу куста, способности к формированию сплошного покрова ягодника, окраске коры побегов, форме и линейным параметрам листьев, а также массе, длине и ширине ягод. Риск существования или появления в будущем внешне трудноотличимых от сортов экземпляров делает нецелесообразным проведение трудоемкой и дорогостоящей работы по составлению их анкет.

Усугубляет и без того сложную ситуацию сильная изменчивость ряда признаков растений под влиянием погодно-климатических, эдафических, гидрологических и других факторов живой и неживой природы. Так, например, средняя масса 100 г ягод одной и той же формы голубики узколистной в разные годы может отличаться в 1,2–2,3 раза [6]. Соотношение между площадью ассимиляционных органов растений, произрастающих в условиях естественного

агрофона верховых торфяников и возделываемых с внесением минеральных удобрений, составляет 1 : 1,7–2,9 [7].

В нашем случае, когда подтверждение отличимости, однородности и стабильности новых сортов голубики узколистной путем качественной или количественной оценки фенотипических признаков представляется крайне затруднительным, очевидна необходимость поиска альтернативных способов диагностики исключительного своеобразия растений. Подобного рода проблема не является уникальной в мировой практике, так как с ней уже неоднократно сталкивались ряд исследователей в области селекции растений.

Оценка полиморфизма на генетическом уровне – вполне реальная альтернатива практике строгого документирования фенотипа сорта. В 1996 г. Powell W. с коллегами на основании результатов тестирования зародышевой плазмы сортов культурной (*Glycine max* (L.) Merr.) и линий дикорастущей (*Glycine soja* Siebold & Zucc.) сои дали рекомендации по выбору молекулярно-генетических маркеров RFLP, RAPD, AFLP, SSR в зависимости от объектов и целей исследований [8].

С начала 2000-х гг. ДНК-маркеры, разработанные на основе микросателлитных локусов, начали широко использоваться для изучения генетического разнообразия представителей рода *Vaccinium*. Благодаря их применению удалось установить происхождение, а также провести идентификацию сортов голубики высокорослой (*Vaccinium corymbosum* L.) и гибридов на их основе [9–12]. Есть подтверждения того, что область применения молекулярно-генетических маркеров, разработанных для голубики высокорослой, не ограничена исключительно целевым объектом исследований, а в полной мере включает в себя голубику узколистую, голубику Эша (*Vaccinium virgatum* Ait.) и, вполне возможно, другие родственные виды [13, 14].

Бурное развитие молекулярно-генетических методов требует, с одной стороны, унификации подходов при планировании работ с учетом их специфики, а с другой – единообразия способов обработки полученных данных для последующей правильной интерпретации результатов и их объективного сравнения. Рекомендации UPOV вносят ясность по вопросам выбора молекулярных маркеров и построения баз данных. Согласно тексту документа ДНК-маркеры должны быть информативными – обеспечивать достаточный для установления фактов отличимости, однородности и стабильности уровень генетического полиморфизма, а также воспроизводимыми – аналогичные данные, полученные в разных лабораториях, должны быть сопоставимы. Рекомендации содержат указания по обработке первичной генетической информации и формированию баз

высококачественных молекулярных данных для последующего широкого практического применения в различных областях биологической науки, в том числе и для профилирования ДНК новых сортов с целью защиты авторских прав селекционера [15].

В ряде стран уникальный молекулярно-генетический профиль нового сорта служит официальным основанием для выдачи генетического паспорта установленной формы. Например, законодательством Российской Федерации предусмотрено обязательное оформление данного документа при проведении испытаний и оценке сортов и гибридов сельскохозяйственных растений [16]. В Республике Беларусь юридическая ситуация складывается не в пользу селекционера, поскольку в стране отсутствуют какие-либо нормативные акты, допускающие возникновение права собственности на сорт исходя из результатов успешной генетической идентификации растения. В данной ситуации прямо встает вопрос о необходимости усовершенствования правового регулирования в сфере патентования сортов растений в нашей стране с целью упрощения и ускорения процедуры получения охранного документа. Без сомнения реальные возможности изменений в законодательстве во многом зависят от уровня научных знаний в области генотипирования сортов сельскохозяйственных растений, а также наличия материально-технической базы и квалифицированных кадров для проведения подобного рода исследований. Поэтому ситуацию с культиварами голубики узколистной следует рассматривать как, вероятно, первый случай реальной оценки перспектив нового подхода в области охраны прав на объекты культурной флоры в Республике Беларусь.

Кроме того, использование молекулярно-генетических методов становится одним из основных стандартов в современной селекции культурных растений [17]. При маркер-опосредованной селекции (Marker-Assisted Selection, MAS) отбор растений ведут по ДНК-маркерам, ассоциированным с конкретными хозяйственно ценными признаками. Геномная селекция (Genomic Selection, GS) делает возможным всецелую оценку генетического потенциала индивидуума на основе его полного генома. Оба подхода позволяют селекционерам точно и быстро оценивать исходное генетическое разнообразие таксонов растений, включенных в селекционную работу, а также отбирать растения с желаемыми характеристиками на более ранних стадиях онтогенеза после проведения контролируемых скрещиваний. Внедрение инновационных методик в селекционный процесс обеспечивает многократное сокращение времени и ресурсов, необходимых для создания новых сортов.

Актуальность селекционного улучшения голубики узколистной обусловлена тем, что при всех явных преимуществах полученных культиваров над остальными представителями своей исходной группы им не удалось совместить в себе все востребованные в интенсивном ягодоводстве положительные качества. В 2021 г. общие представления о совокупности характеристик, которыми должен обладать «идеальный» сорт голубики узколистной, предназначенный для возделывания на промышленных плантациях в условиях культивирования на верховых торфяниках Белорусского Поозерья, нашли свое отражение в концепции дальнейшего селекционного улучшения вида. Суть положения сводится к идее выведения сортов, максимально адаптированных к механизированной заготовке ягод: с высотой куста в пределах 25–30 см; маловетвистыми и упругими побегами формирования; высокой урожайностью; одновременным созреванием плодов; крепкими, крупными, сладкими и ароматными ягодами на длинных черешках [3].

Практическая реализация плана предполагает усовершенствование уже имеющихся сортов голубики узколистной путем проведения серий контролируемых скрещиваний между культиварами в различных комбинациях, а также вовлечения в селекционный процесс специально подобранных форм, выступающих носителями целевых хозяйственно ценных признаков. Поставленной цели селекционной работы вполне реально добиться благодаря использованию имеющегося генетического потенциала формового разнообразия вида. Речь прежде всего идет о привлечении форм, у которых интересующие нас количественные и качественные показатели растений максимально выражены в фенотипе. Согласно результатам многолетних интродукционных исследований интерес в качестве источников высокой урожайности представляют формы 1, 2, 4, 7, 9, 12, 13; крупноплодности – формы 4, 6, 7, 17, 26; одновременности созревания плодов – формы 6, 11, 14, 18, 19, 22, 25; высоких вкусовых качеств ягод – формы 4, 8, 15, 16, 19, 20, 22; способности к быстрому формированию покрова – формы 2, 9, 12, 22, 25; высокой зимостойкости – формы 2, 6, 8, 9, 11, 14, 15, 16, 17, 20, 21, 22, 25; высокой устойчивости к болезням – формы 3, 16, 19, 20, 23, 26 [6]. Сорта «Мотега», «Половчанка» и «Янка» упоминаются в приведенном выше перечне под идентификационными номерами 4, 22 и 20 соответственно. Для проведения внутривидовых скрещиваний выбор пал на семь форм, обладающих максимальным набором целевых хозяйственно ценных признаков: 2, 7, 9, 13, 16, 19 и 25.

Первый рекогносцировочный шаг в селекции голубики узколистной на основе генетических данных предусматривает составление и анализ

ДНК-профилей растений, выделенных в группу наиболее перспективных потенциальных носителей ценной наследственной информации. Выбор такого пути продиктован стремлением приблизиться к маркерной технологии селекции, имеющей большие шансы на воплощение в жизнь по сравнению с геномной, так как является менее ресурсоемкой и экономически более доступной.

Осуществление молекулярно-генетических исследований голубики узколистной в Республике Беларусь стало возможно во многом благодаря ранее накопленному опыту в области ДНК-тестирования родственного вида – голубики высокорослой. Изучение генетического полиморфизма микросателлитных локусов *V. corymbosum* в нашей стране начал в 2012 г. Центральный ботанический сад при сотрудничестве с Институтом леса Национальной академии наук Беларуси [18]. С 2016 г. отдел биохимии и биотехнологии растений ЦБС сосредоточил свое основное внимание на работе по верификации генотипов голубики высокорослой на соответствие референсным сортам, в первую очередь включенным в Государственный реестр сортов сельскохозяйственных растений Республики Беларусь [19].

В настоящее время перед научным учреждением поставлена новая задача: провести ДНК-идентификацию голубики узколистной. Положительное решение вопроса позволит оценить перспективы практического использования данных генетической дактилоскопии *V. angustifolium* как для подготовки основания на выдачу патента на сорт, так и для осуществления селекционной работы с культурой.

Основная часть. План исследований предполагал определение уровня молекулярно-генетической изменчивости трех сортов и семи перспективных форм *V. angustifolium* путем проведения ДНК-паспортизации с помощью микросателлитных маркеров. Отбор 16 листовых проб осуществили непосредственно в посадках ягодника в Половском лесничестве Поставского лесхоза 26.07.2023 г. Каждый образец из трех повторностей сортовых растений промаркировали путем указания на этикетке полиэтиленового контейнера русского названия культивара в латинской транскрипции с добавлением после нижнего подчеркивания его порядкового номера. Три образца сорта «Мотега» поместили как Motego_1, Motego_2, Motego_3, сорта «Половчанка» – Polovchanka_1, Polovchanka_2, Polovchanka_3 и сорта «Янка» – Yanka_1, Yanka_2, Yanka_3. Пробам перспективных форм 2, 7, 9, 13, 16, 19 и 25 присвоили следующие наименования Form 2, Form 7, Form 9, Form 13, Form 16, Form 16, Form 19 и Form 25 соответственно. Еще 8 образцов листьев заготовили 03.09.2023 г. с двухлетних саженцев сортовых

растений, для производства которых использовали дочерние парциальные кусты из посадок, размещенных на площади верхового торфяника вышеупомянутого лесохозяйственного учреждения. Две пробы сорта «Мотега» обозначили как Motego_4, Motego_5, две пробы сорта «Половчанка» – как Polovchanka_4, Polovchanka_5, а за четыре пробы сорта «Янка» закрепили названия Yanka_4, Yanka_5, Yanka_6 и Yanka_7. Общее количество образцов составило 24 шт. Фиксацию листовых тканей осуществляли в течение 1–2 мес. в герметичных контейнерах с силикагелем, предварительно поместив в них конверты из фильтровальной бумаги с ассимилирующими органами.

Источником тотальной ДНК служила обезвоженная листовая ткань. Препараты ДНК получали методом СТАВ-экстракции с модификациями [20]. Для ДНК-фингерпринтинга таксонов голубики узколистной из двух библиотек [10, 12], содержащих в общей сложности информацию о 59 микросателлитных локусах, мы отобрали восемь: CA344F, CA421F, NA1040, VCC_I2, GVC-C179a, GVC-C428, KAN262, Pr031818819a. Выбор данных локусов был продиктован комбинацией их высокого генетического полиморфизма, а соответственно, и высокой разрешающей способности на уровне генотипов, а также нашим стремлением оптимизировать процесс фрагментарного разделения аллельных частей ДНК в генетическом анализаторе с четырехканальной системой флуоресцентной детекции. Локусы с неперекрывающимися размерными рядами аллелей были распределены по парам и помечены одной и той же флуоресцентной меткой. Маркирование микросателлитных локусов провели методом стандартной ПЦР в амплификаторе SureCycler 8800 (Agilent). Для приготовления амплификационной

смеси объемом 25 мкл использовали следующие компоненты: ×1 Taq Turbo буфер (Евроген), ×1 dNTP (0,2 мМ каждого) (Евроген), по 20 пмоль прямого и обратного праймеров (ПраймТех), 1 ед. HS Taq ДНК-полимеразы (Евроген), 30 нг тотальной ДНК. Режим ПЦР: начальная денатурация – 3 мин при 95°C; 10 циклов, состоящих из 30 с при 95°C, 30 с при 62°C (–1°C/цикл) и 40 с при 72°C; 25 циклов, состоящих из 30 с при 95°C, 30 с при 52°C и 40 с при 72°C; финальная элонгация – 5 мин при 72°C. Для визуализации продуктов амплификации прямой праймер каждого локуса модифицировали флуоресцентной меткой (FAM, R6G, TAMRA, ROX). Фрагментный анализ провели на генетическом анализаторе Applied Biosystems 3500, в качестве размерного стандарта использован GeneScan 600 LIZ Size Standard v 2.0 (Applied Biosystems). Амплификационные смеси всех локусов каждого образца разделяли в одном капилляре. Для обработки файлов данных использовали программное обеспечение GeneMarker V 2.7.0. С целью согласования полученных данных об относительном размере аллелей с данными Информационной сети по ресурсам зародышевой плазмы (GRIN) Службы сельскохозяйственных исследований (ARS) Министерства сельского хозяйства США (USDA) исследования проводили на фоне репортерных сортов голубики высокорослой с уже известным размером маркированных микросателлитных локусов: Sierra, Nelson, Bluegold, Northblue, Duke, Hardyblue.

В табл. 1 приведены полученные в ходе лабораторных анализов ДНК-профили 11 исследованных генотипов голубики узколистной: локусы обозначены по названию праймера, а аллели (маркеры) – по размерам ДНК-фрагментов в парах нуклеотидов (п. н.).

Таблица 1

Совокупное аллельное состояние микросателлитных локусов (ДНК-профиль) и размер аллелей в парах нуклеотидов (п. н.) 11 генотипов голубики узколистной

Локус (праймер)	Размер аллелей в парах нуклеотидов форм голубики узколистной (образец)					
	2 (Form 2)	4 (Motego_1, Motego_2, Motego_3, Motego_4, Motego_5)	7 (Form 7)	9 (Form 9)	13 (Form 13)	16 (Form 16)
CA421F	164, 186*, 198, 202	164, 178, 202, 216*	178, 192*, 202	178, 182*, 198	164, 190*, 202	196, 202, 206*, 212*
Pr031818819a	321, 325, 327, 329	319, 321, 325, 327	315, 321, 325	321, 325, 327, 329	319, 323, 325, 327	321, 323, 325, 335*
NA1040	188, 190, 196	188, 190, 192	200, 212	188, 192, 200	188, 202	192, 200, 202
KAN262	246	235, 246	246, 258*	246, 263	233*, 246, 248*, 251	246, 263
VCC_I2	217, 219, 223	211, 217, 219, 223	211, 213, 217	211, 213, 217, 219	211, 213, 219	211, 213, 219
GVC-C428	251, 257	251, 254, 257, 266	260, 263	251, 254, 257	257, 260	257, 260, 263
CA344F	162, 165, 168, 171*	162, 168	153, 159, 162	153, 159, 165	159, 162, 165	162
GVC-C179a	211	208, 211, 218*	221	223	211, 223	208, 224
Всего уникальных аллелей	2	2	2	1	3	3

Окончание табл. 1

Локус (праймер)	Размер аллелей в парах нуклеотидов форм голубики узколистной (образец)				
	19 (Form 19)	20 (Yanka_2, Yanka_3, Yanka_4, Yanka_5, Yanka_6 и Yanka_7, Polovchanka_5)	22 (Polovchanka_1, Polovchanka_2, Polovchanka_3, Polovchanka_4)	25 (Form 25)	Безымянная (Yanka_1)
CA421F	196, 200, 204*	168*, 194*, 200, 202	164, 198, 200	164, 188*, 198, 200	164, 178, 202
Pr031818819a	323	319, 321, 325, 327	315, 327, 329	321, 323, 325	321, 325, 327, 329
NA1040	186*, 190, 212	188, 200, 212	190, 192	182*, 184*, 196	190, 192
KAN262	246, 251, 255*, 278*	235, 246	235, 246	246, 250*	246
VCC_I2	217, 219, 221*, 223	217, 219	211, 213, 217, 219	211, 213, 217	211, 213, 217
GVC-C428	257, 263	257, 263	257, 260	251, 257, 263, 266	257, 266
CA344F	162, 165, 174*	162	165, 168	159, 162, 168	156*, 168
GVC-C179a	208, 221, 224	211, 224	206*, 211, 221	208, 221	211, 223
Всего уникаль- ных аллелей	6	2	1	4	1

* Уникальный аллель микросателлитного локуса.

Согласно данным табл. 2, число аллелей варьировало от 17 в локусе CA421F до 6 в локусах VCC_I2 и GVC-C428. Всего выявлено 72 аллели. Максимальное количество аллелей в локусе – 4, что соответствует полной гетерозиготе, выявлено у всех локусов за исключением NA1040 и GVC-C179a. Минимальное количество аллелей – 1, что соответствует полной гомозиготе, обнаружено в локусах Pr031818819a, KAN262, CA344F, GVC-C179a. Из всего пула 71 аллель являлся полиморфным. Только одна аллель – 246 п. н. в локусе KAN262 была мономорфной и встречалась у всех проанализированных генотипов.

В локусах CA421F, Pr031818819a, NA1040, KAN262, VCC_I2 и CA344F всего выявлено 27 уникальных аллелей (табл. 1). Наибольшее их количество присутствует в локусе CA421F – 11 шт., минимальное – в локусах Pr031818819a и VCC_I2 – по 1 шт.

Исследованные локусы характеризовались достаточно высоким уровнем полиморфизма – в

среднем 98,6%. Минимальным полиморфизмом характеризуется локус KAN262 – 90,0%. Изменчивость всех остальных амплифицированных зон достигает максимальных 100,0%.

Для каждого локуса также был рассчитан PIC (Polymorphism Information Content) – информационный индекс полиморфизма, который является мерой вклада маркера в общий уровень полиморфизма и может быть использован для оценки способности локуса различать генотипы [21]. Значения PIC находились в диапазоне от 0,66 для локуса KAN262 до 0,88 для локуса CA421F, что свидетельствует о высокой разрешающей способности локусов (табл. 2).

Согласно данным табл. 1 совокупное аллельное состояние восьми микросателлитных локусов для каждого таксона, включенного в исследование, характеризовалось уникальностью, что позволило использовать эти данные для тестирования на отличимость, однородность и стабильность всех растений *V. angustifolium* и прежде всего сорта и хозяйственно ценные формы вида.

Таблица 2

Характеристика микросателлитных локусов 11 генотипов голубики узколистной

Локус	bp	N(A)	N(A _p)	N(A _u)	P, %	N(A _G)			PIC
						max	avr	min	
CA421F	164–216	17	17	11	100	4	3,6	3	0,88
Pr031818819a	315–335	8	8	1	100	4	3,6	1	0,82
NA1040	182–212	10	10	3	100	3	2,7	2	0,83
KAN262	233–278	10	9	6	90	4	2,1	1	0,66
VCC_I2	211–223	6	6	1	100	4	3,2	2	0,77
GVC-C428	251–266	6	6	–	100	4	2,6	2	0,78
CA344F	153–174	8	8	3	100	4	2,0	1	0,75
GVC-C179a	206–224	7	7	2	100	3	2,3	1	0,80
Всего	–	72	71	27	98,6	–	–	–	–

Примечание. bp – размерный диапазон аллелей локуса в п. н.; N(A) – количество аллелей на локус; N(A_p) – количество полиморфных аллелей на локус; N(A_u) – количество уникальных аллелей; P – уровень полиморфизма; N(A_G) – количество аллелей на генотип (max – максимальное, avr – среднее, min – минимальное); PIC (Polymorphism Information Content) – информационный индекс полиморфизма.

Все пять образцов сорта «Мотега» оказались генетически однородными. Из пяти проб сорта «Половчанка» только одна Polovchanka_5 имела отличный от остальных аллельный состав локусов, который в полной мере соответствовал сорту «Янка». Оставшиеся четыре образца сорта «Половчанка» были полностью генетически однородны. Из семи проб сорта «Янка» одна Yanka_1 имела генетический профиль, который не совпал ни с одной из форм, отобранных для исследований. По этой причине данный генотип обозначили как «безымянный». Генетические профили растений, полученные при анализе шести оставшихся образцов сорта «Янка» и уже упомянутого образца Polovchanka_5, совпали полностью, что подтверждает их идентичность.

Описанная выше ситуация наглядно показывает, как с помощью молекулярно-генетического метода идентификации растений голубики узколистной можно безошибочно определить подлинность любого интересующего нас сорта или экземпляра вида. Провести проверку чистоты культивара можно как в процессе производства его посадочного материала, так и уже после высадки растения на плантацию. Метод обеспечивает гарантированный результат независимо от причин, которые обусловили ошибку идентификации: неправильное обозначение сорта, утрата идентификационного номера, нарушение транспортно-логистических регламентов, умышленное искажение данных и т. д.

Данные об аллельном состоянии микросателлитных локусов являются вариантом индивидуальной характеристики конкретного растения голубики узколистной и их можно использовать для создания уникального генетического паспорта сорта или формы вида, а также считать основанием для выдачи патента, обеспечивающего защиту авторских прав селекционера.

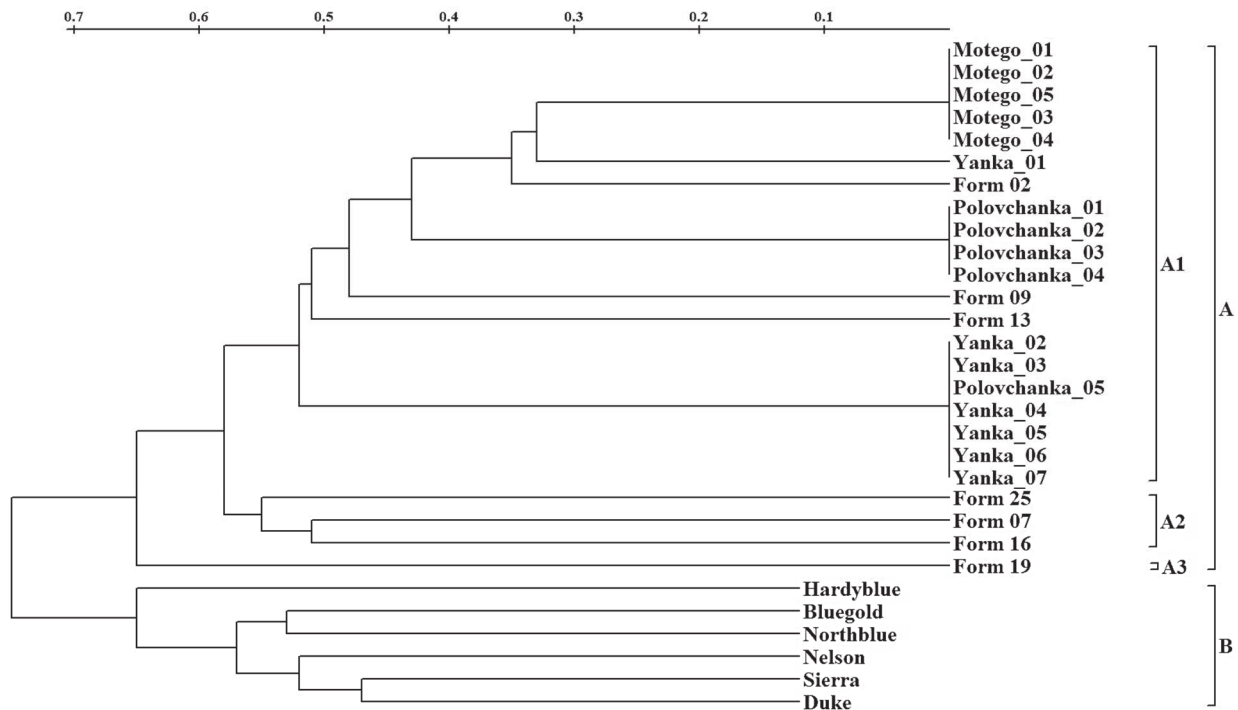
Ключом к проведению селекционной работы на основе данных ДНК-идентификации являются уникальные аллели, распределенные среди генотипов. Их максимальное количество выявлено у формы 19 (6 аллелей в 5 локусах), минимальное – у формы 9 (1 аллель в локусе SA421F). Наличие таких уникальных аллелей в генотипах перспективных форм совместно с анализом комбинативной изменчивости теоретически может ускорить и удешевить проведение селекционного процесса, так как позволяет молекулярно-генетическими способами подтверждать успешность проведенных скрещиваний на ранних этапах онтогенеза гибридов, не дожидаясь проявления морфофизиологических признаков.

Организовать полноценную маркер-сопутствующую селекцию в нашем конкретном случае не представляется возможным ввиду того, что выбранные для анализа локусы не кодируют

последовательности белков, а соответственно, не связаны прямо с конкретными качественными или количественными хозяйственно ценными признаками растений. Тем не менее есть вероятность того, что данные локусы могут быть сцеплены с кодирующими генами и тогда присутствие маркера вполне реально укажет на характерные и отличительные особенности экземпляра голубики узколистной: морфологические, физиологические и др. Для реализации такого подхода необходимо многократно увеличить размер выборки растений и провести глубокий анализ взаимосвязи генетического профиля со всеми внешними и внутренними признаками фитоорганизма, поддающимся оценке.

Для установления генетического сходства сортов и форм голубики узколистной использовали частоты аллелей микросателлитных локусов. Для этого рассчитали генетические дистанции между исследуемыми таксонами по методу Nei M. [22] и провели кластеризацию по методу UPGMA с использованием программного обеспечения Treecon© [23]. Для повышения разрешающей способности кластеризацию таксонов голубики узколистной осуществили совместно с сортами голубики высокорослой, использованными для нормализации относительных размеров аллельных вариантов. Визуализированная посредством дендрограммы кластеризация представлена на рисунке.

На дендрограмме выделяются два кластера А и В, в которые сгруппированы таксоны видов *Vaccinium angustifolium* Ait. и *Vaccinium corymbosum* L. соответственно, что согласуется с данными о больших межвидовых генетических различиях по сравнению с внутривидовыми. Кластер А в свою очередь можно подразделить на три субкластера по признаку генетических отличий перспективных форм голубики узколистной от сортовых форм. Так, в субкластер А1, помимо сортов голубики узколистной, включены формы 2, 9 и 13, что свидетельствует об их большем генетическом сходстве с сортовыми формами по сравнению с другими перспективными формами. В субкластер А2 входят формы 7, 16 и 25, генетически более отдаленные от сортовых форм *V. angustifolium*. Третий субкластер А3 представлен единственной формой 19, которая имеет минимальное сходство с сортами голубики узколистной в сравнении с другими перспективными формами. Наблюдаемая картина в полной мере подтверждает результаты наших предыдущих исследований, в которых высказывалось предположение о потенциальном родстве формы 19 с *V. myrtilloides* Michx. в силу присущего ей характерного именно для данного вида голубик морфологического признака – опушения побегов [24].



Кластеризация UPGMA по степени генетического сходства сортов и форм голубики узколистной (*Vaccinium angustifolium* Ait.)

На рисунке хорошо видно, как образец Polovchanka_5 кластеризуется в одну группу с пробами сорта «Янка», что говорит об их генетической идентичности и позволяет идентифицировать его как сорт «Янка». Образец Yanka_1 наиболее близок генетически к сорту «Мотега», однако не кластеризуется в одну группу ни с образцами этого сорта, ни с какими-либо другими таксонами голубики узколистной.

Заключение. В ходе ДНК-идентификации, проведенной на основе анализа восьми микросателлитных локусов 11 генотипов голубики узколистной, удалось получить уникальную молекулярно-генетическую характеристику всех изучавшихся представителей вида. Информация о совокупном аллельном состоянии локусов позволила проверить подлинность сортовых экземпляров *V. angustifolium*, а также теоретически дала

возможность оценить эффективность скрещивания гибридов уже на ранних этапах их онтогенеза путем анализа комбинативной изменчивости семейной группы или по уникальным аллелям родительских генотипов, унаследованных потомством. Для практического использования данных ДНК-идентификации требуется незамедлительное усовершенствование законодательной базы в Республике Беларусь, которая на уровне нормативно-правовых актов закрепит представления о «генетической информации» и определит широту юридического поля ее использования. Прежде всего речь касается утверждения единой формы генетического паспорта растения (формально результата ДНК-идентификации) и предоставления возможности получения патента на сорт на основе его уникального генетического профиля.

Список литературы

1. Курлович Т. В., Босак В. Н. Голубика высокорослая в Беларуси. Минск: Беларус. навука, 1998. 174 с.
2. Морозов О. В., Яковлев А. П. Цветение и плодоношение голубики узколистной (*Vaccinium angustifolium* Ait.) при интродукции в условиях Беларуси // Проблемы лесоведения и лесоводства: сб. науч. тр. 2008. Вып. 68. С. 642–650.
3. Гордей Д. В., Морозов О. В. Характеристика сортов *Vaccinium angustifolium* Ait. белорусской селекции и концепция дальнейшего селекционного улучшения вида в условиях культивирования на верховых торфяниках Белорусского Поозерья // Труды БГТУ. Сер. 1, Лесное хоз-во, природопользование и перераб. возобн. ресурсов. 2021. № 2 (246). С. 179–187.
4. О патентах на сорта растений: Закон Респ. Беларусь, 13 апр. 1995 г., № 3725-XII // Нац. центр интеллектуал. собственности Респ. Беларусь. URL: <https://www.ncip.by/upload/doc/2020/Sorta/1.pdf> (дата обращения: 04.03.2024).

5. TG/137/5 Rev. Blueberry, 2019-06-14 + 2022-10-25 // UPOV. URL: <https://www.upov.int/edocs/tgdocs/en/tg137.pdf> (дата обращения: 04.03.2024).
6. Культивирование голубики узколистной (*Vaccinium angustifolium* Ait.) в Белорусском Поозерье / О. В. Морозов [и др.]. Минск: БГТУ, 2016. 195 с.
7. Влияние комплексного минерального удобрения на рост и развитие вегетативных органов голубики узколистной (*Vaccinium angustifolium* Ait.) в молодых посадках при возделывании на выработанных верховых торфяниках в Белорусском Поозерье / Д. В. Гордей [и др.] // Труды БГТУ. 2011. № 1: Лесное хоз-во. С. 79–82.
8. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis / W. Powell [et al.] // Molecular Breeding. 1996. Vol. 2, no. 3. P. 225–238. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00564200>.
9. Development of EST-PCR Markers for DNA Fingerprinting and Genetic Relationship Studies in Blueberry (*Vaccinium*, section *Cyanococcus*) / L. J. Rowland [et al.] // Journal of the American Society for Horticultural Science. 2003. Vol. 128, issue 5. P. 682–690. DOI: <https://doi.org/10.21273/JASHS.128.5.0682>.
10. 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. DOI: 10.1111/j.1471-8286.2005.01025.x.
11. Development of an efficient DNA test for genetic identity confirmation in blueberry / A. Bidani [et al.] // Acta Hort. 2017. Vol. 1180. P. 363–368. DOI: 10.17660/ActaHortic.2017.1180.49.
12. Microsatellite markers confirm identity of blueberry (*Vaccinium* spp.) plants in the USDA-ARS National Clonal Germplasm Repository collection / N. Bassil [et al.] // Genetic Resources and Crop Evolution. 2020. Vol. 67. P. 393–409. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10722-019-00873-8>.
13. Suitability of EST-PCR markers developed in highbush blueberry for genetic fingerprinting and relationship studies in lowbush blueberry and related species / D. J. Bell. [et al.] // J. Amer. Soc. Hort. Sci. 2008. Vol. 133 (5). P. 701–707. DOI: <https://doi.org/10.21273/JASHS.133.5.701>.
14. Rowland L. J., Ogden E. L., Ehlenfeldt M. K. EST-PCR markers developed for highbush blueberry are also useful for genetic fingerprinting and relationship studies in rabbiteye blueberry // Sci. Hortic. 2010. Vol. 125. P. 779–784.
15. UPOV/INF/17/2, September 21, 2021 // UPOV. URL: https://www.upov.int/edocs/infdocs/en/upov_inf_17.pdf (дата обращения: 15.03.2024).
16. О семеноводстве: Федер. закон, 30.12.2021, № 454-ФЗ // Собрание законодательства Рос. Федерации. URL: <https://www.szrf.ru/api/issues/image?volid=1002022001010#zoom=100&page=114> (дата обращения: 15.03.2024).
17. Алтухов Ю. П., Салменкова Е. А. Полиморфизм ДНК в популяционной генетике // Генетика. 2002. Т. 38, № 9. С. 1173–1195.
18. Использование молекулярно-генетических методов для решения проблем выращивания голубики высокой / Л. В. Гончарова [и др.] // Голубиководство в Беларуси: итоги и перспективы: материалы Респ. науч.-практ. конф., Минск, 17 авг. 2012 г., Минск, 2012. С. 18–23.
19. Генотипическая и фенотипическая верификация растительных коллекций для создания генетического банка и генофонда интродуцированных сортов голубики высокой (*Vaccinium corymbosum* L.) методом микроклонального размножения / В. Л. Филиппеня [и др.] // Садоводство и виноградарство. 2018. № 2. С. 54–57.
20. Rapid DNA extraction from ferns for PCR-based analyses / E. L. Dempster [et al.] // Biotechniques. 1999. Vol. 27 (1). P. 66–68. DOI: 10.2144/99271bm13.
21. PICcalc: an online program to calculate polymorphic information content for molecular genetic studies / S. Nagy [et al.] // Biochem. Genet. 2012. Vol. 50. P. 670–672. DOI: 10.1007/s10528-012-9509-1.
22. Nei M. Molecular population genetics and evolution. Amsterdam: North-Holland, 1975. 278 p.
23. Van de Peer Y., De Wachter R. TREECON for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment // CABIOS. 1994. Vol. 10 (5). P. 569–570. DOI: 10.1093/bioinformatics/10.5.569.
24. Гордей Д. В., Морозов О. В., Терешкина Н. В. Вариабельность форм голубики узколистной по высоте и диаметру горизонтальной проекции кроны кустов, максимальной длине, окраске и опушению побегов в Белорусском Поозерье // Труды БГТУ. Сер. 1, Лесное хоз-во, природопользование и перераб. возобновляемых ресурсов. 2019. № 2 (222). С. 138–143.

References

1. Kurlovich T. V., Bosak V. N. *Golubika vysokoroslava v Belarusi* [Highbush blueberry in Belarus]. Minsk, Belaruskaya navuka Publ., 1998. 174 p. (In Russian).

2. Morozov O. V., Yakovlev A. P. Flowering and fruiting of lowbush blueberry (*Vaccinium angustifolium* Ait.) during introduction in the conditions of Belarus. *Problemy lesovedeniya i lesovodstva* [Problems of forestry and forest management], 2007, no. 68, pp. 642–650 (In Russian).
3. Gordey D. V., Morozov O. V. The characteristics of *Vaccinium angustifolium* Ait. varieties of belarusian selection and conception of further selection improvement of species under cultivation in conditions of a developed riding peat bogs in Belarusian Poozerye. *Trudy BGTU* [Proceedings of BSTU], issue 1, Forestry. Nature management. Processing of Renewable Resources, 2021, no. 2 (246), pp. 179–187 (In Russian).
4. On patents for plant varieties: law of the Republic of Belarus, 13.04.1995, no. 3725-XII. Available at: <https://www.ncip.by/upload/doc/2020/Sorta/1.pdf> (accessed 04.03.2024) (In Russian).
5. TG/137/5 Rev. Blueberry, 2019-06-14 + 2022-10-25. Available at: <https://www.upov.int/edocs/tgdocs/en/tg137.pdf> (accessed 04.03.2024).
6. Morozov O. V., Gordey D. V., Sautkin F. V., Buga S. V., Yarmolovich V. A. *Kul'tivirovaniye golubiki uzkolistnoy (Vaccinium angustifolium Ait.) v Belorusskom Poozer'ye* [Cultivation of lowbush blueberry (*Vaccinium angustifolium* Ait.) in the Belarusian Lakeland]. Minsk, BGTU Publ., 2016. 195 p. (In Russian).
7. Gordey D. V., Morozov O. V., Filanchuk L. P., Kosobutskaya O. N. The influence of complex mineral fertilizer on the growth and development of vegetative organs of lowbush blueberry (*Vaccinium angustifolium* Ait.) in young plantings when cultivated on depleted high-moor peatlands in the Belarusian Lakeland. *Trudy BGTU* [Proceedings of BSTU], 2011, no. 1: Forestry, pp. 79–82 (In Russian).
8. Powell W., Morgante M., Andre C., Hanafey M., Vogel J., Tingey S., Rafalski A. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Molecular Breeding*, 1996, vol. 2, no. 3, pp. 225–238. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00564200>.
9. Rowland L. J., Mehra S., Dhanaraj A. L., Ogden E. L., Slovin J. P., Ehlenfeldt M. K. Development of EST-PCR Markers for DNA Fingerprinting and Genetic Relationship Studies in Blueberry (*Vaccinium*, section *Cyanococcus*). *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 2003, vol. 128, no. 5, pp. 682–690. DOI: <https://doi.org/10.21273/JASHS.128.5.0682>.
10. Boches P. S., Rowland L. J., Bassil N. V. Microsatellite markers for *Vaccinium* from EST and genomic libraries. *Molecular Ecology Notes*, 2005, vol. 5, pp. 657–660. DOI: [10.1111/j.1471-8286.2005.01025.x](https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2005.01025.x).
11. Bidani A., Hummer K. E., Rowland L. J., Bassil N. V. Development of an efficient DNA test for genetic identity confirmation in blueberry. *Acta Hort.*, 2017, vol. 1180, pp. 363–368. DOI: [10.17660/ActaHortic.2017.1180.49](https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2017.1180.49).
12. 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, vol. 67, pp. 393–409. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10722-019-00873-8>.
13. Bell D. J., Rowland L. J., Polashock J. J., Drummond F. A. Suitability of EST-PCR markers developed in highbush blueberry for genetic fingerprinting and relationship studies in lowbush blueberry and related species. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 2008, vol. 133(5), pp. 701–707. DOI: <https://doi.org/10.21273/JASHS.133.5.701>.
14. Rowland L. J., Ogden E. L., Ehlenfeldt M. K. EST-PCR markers developed for highbush blueberry are also useful for genetic fingerprinting and relationship studies in rabbiteye blueberry. *Sci. Hort.*, 2010, vol. 125, pp. 779–784.
15. UPOV/INF/17/2, September 21, 2021. Available at: https://www.upov.int/edocs/infdocs/en/upov_inf_17.pdf (accessed 15.03.2024).
16. About seed production: the Federal Law, 30.01.2021, no. 454-FZ. Available at: <https://www.szrf.ru/api/issues/image?valid=1002022001010#zoom=100&page=114> (accessed 04.03.2024) (In Russian).
17. Altukhov Yu. P., Salmenkova E. A. DNA polymorphism in population genetics. *Genetika* [Genetics], 2002, vol. 38, no. 9, pp. 1173–1195 (In Russian).
18. Goncharova L. V., Spiridovich E. V., Baranov O. Yu., Makhovik I. V. The use of molecular genetic methods to solve the problems of growing high bush blueberries. *Golubikovodstvo v Belarusi: itogi i perspektivy* [Blueberry growing in Belarus: results and prospects]. Minsk, 2012, pp. 18–23 (In Russian).
19. Filipenya V. L., Yukhimuk A. N., Kurlovich T. V., Chizhik O. V. Genotypic and phenotypic verification of plant collections to create a genetic bank and gene pool of introduced varieties of high bush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) using the method of microclonal propagation. *Sadovodstvo i vinogradarstvo* [Horticulture and viticulture], 2018, no. 2, pp. 54–57 (In Russian).
20. Dempster E. L., Pryor K. V., Francis D., Young J. E., Rogers H. J. Rapid DNA extraction from ferns for PCR-based analyses. *Biotechniques*, 1999, vol. 27, no. 1, pp. 66–68. DOI: [10.2144/99271bm13](https://doi.org/10.2144/99271bm13).
21. Nagy S., Poczai P., Cerna'k I., Mousapour G. A., Hegedus G., Taller J. PICcalc: an online program to calculate polymorphic information content for molecular genetic studies. *Biochem. Genet.*, 2012, vol. 50, pp. 670–672. DOI: [10.1007/s10528-012-9509-1](https://doi.org/10.1007/s10528-012-9509-1).

22. Nei M. Molecular population genetics and evolution. Amsterdam, North-Holland Publ., 1975. 278 p.

23. Van de Peer Y., De Wachter R. TREECON for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment. *Computer applications in the biosciences*, 1994, vol. 10, no. 5, pp. 569–570. DOI: 10.1093/bioinformatics/10.5.569.

24. Gordey D. V., Morozov O. V., Tereshkina N. V. Variability of the forms of sweet lowbush blueberry on height and diameter of the horizontal projection of the bush crown, maximum length, color and glabrous of stems in the Belarusian Lakeland. *Trudy BGTU* [Proceedings of BSTU], issue 1, Forestry. Nature management. Processing of Renewable Resources, 2019, no. 2 (222), pp. 138–143 (In Russian).

Информация об авторах

Юхимук Андрей Николаевич – научный сотрудник отдела биохимии и биотехнологии растений. Центральный ботанический сад Национальной академии наук Беларуси (220012, г. Минск, ул. Сурганова, 2в, Республика Беларусь). E-mail: yukhimuk@cbg.org.by

Гордей Дмитрий Васильевич – кандидат биологических наук, старший преподаватель кафедры туризма, природопользования и охотоведения. Белорусский государственный технологический университет (220006, г. Минск, ул. Свердлова, 13а, Республика Беларусь). E-mail: gordey@belstu.by

Решетников Владимир Николаевич – академик, профессор, заведующий отделом биохимии и биотехнологии растений. Центральный ботанический сад Национальной академии наук Беларуси (220012, г. Минск, ул. Сурганова, 2в, Республика Беларусь). E-mail: reshetnikov@cbg.org.by

Information about the authors

Yukhimuk Andrei Nikolaevich – Researcher, the Department of the Biochemistry and Biotechnology of Plants. Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus (2v, Surganova str., 220012, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: yukhimuk@cbg.org.by

Gordey Dmitriy Vasil'yevich – PhD (Biology), Senior Lecturer, the Department of Tourism, Nature Management and Game Management. Belarusian State Technological University (13a, Sverdlova str., 220006, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: gordey@belstu.by

Reshetnikov Vladimir Nikolaevich – Academician, Professor, Head of the Department of the Biochemistry and Biotechnology of Plants. Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus (2v, Surganova str., 220012, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: reshetnikov@cbg.org.by

Поступила 15.03.2024