

ISSN 1029-8940 (Print)
ISSN 2524-230X (Online)
УДК 581.4:581.19
<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2022-67-2-147-157>

Поступила в редакцию 15.12.2022
Received 15.12.2022

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

Центральный ботанический сад НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

ГОЛУБИКА ВЫСОКАЯ (*VACCINIUM CORYMBOSUM* L.): ПРОТЕОМНЫЕ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Аннотация. Результаты интродукции представителей сем. Вересковые (*Ericaceae* Juss.), начатой Центральным ботаническим садом НАН Беларуси в 1980 г. в Белорусском Полесье, дали начало новому для республики направлению – промышленному ягодоводству.

Для повышения эффективности получения качественного посадочного материала необходимо изучить фундаментальные процессы, лежащие в основе роста и развития растений и установить возможные пути их регуляции. Также крайне актуальными являются исследования, направленные на подтверждение сортосоответствия посадочного материала заявленному сорту (разработка генетических паспортов). Развитие биотехнологии способствует появлению новых подходов к исследованиям, переходу к новым технологиям изучения и анализа генома и протеома растительного организма.

Впервые для представителя *Vaccinium corymbosum* L. (голубики высокой) проведена молекулярно-генетическая идентификация и разработаны генетические паспорта с использованием маркерной системы SCoT (Start Codon Targeted). Предложенный метод ДНК-паспортизации обеспечивает возможность проверки сортосоответствия посадочного материала.

Методом 2D-электрофореза впервые получены протеомные карты листовой ткани и дана оценка протеомного статуса растений четырех сортов голубики высокой – *in vitro* культуры и исходных растений (*in vivo*). Установлена видо- и сортоспецифичность продуктов экспрессированного генома исследуемых растений. Впервые определены белки, претендующие на роль маркерных для вида *Vaccinium corymbosum* L., а также белки-маркеры сортовой принадлежности и физиологического состояния голубики высокой, культивируемой *in vivo* и *in vitro*.

Ключевые слова: голубика высокая, молекулярно-генетическая идентификация, ДНК-маркирование, SCoT, протеомный анализ, 2D-электрофорез, белки-маркеры

Для цитирования: Чижик, О. В. Голубика высокая (*Vaccinium corymbosum* L.): протеомные и молекулярно-генетические исследования / О. В. Чижик, А. Н. Юхимук, В. Н. Решетников // Вест. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2022. – Т. 67, № 2. – С. 147–157. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2022-67-2-147-157>

Olga V. Chizhik, Andrei N. Yukhimuk, Vladimir N. Reshetnikov

Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

HIGHBUSH BLUEBERRY (*VACCINIUM CORYMBOSUM* L.): PROTEOMIC AND MOLECULAR GENETIC STUDIES

Abstract. The Vacciniaceae family introduction carry out by the Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus since 1980. It made it possible to give rise the new direction for the republic – the industrial berry growing.

To increase the efficiency of high-quality planting material obtaining it is necessary to study the fundamental processes underlying the growth and development of plants and to establish the possible ways of their regulation. It is of current interest to confirm the conformity of the planting material to the declared variety (the genetic passports elaboration). The biotechnology development promotes a new approaches and technologies for studying and analyzing of a plant organism genome and proteome.

For the first time the molecular genetic identification for *Vaccinium corymbosum* L. varieties were carried out by Start Codon Targeted (SCoT) system. This method of DNA certification makes it possible to check the cultivar conformity of the blueberry planting material.

For the first time by 2D electrophoresis the proteomic maps of leaf tissue were obtained and the proteomic status of four highbush blueberry varieties – *in vitro* culture and parental plants (*in vivo*) was estimated. The species and varieties specificity of the expressed genome products were established. The proteins that claims to be markers for the *Vaccinium* species and the variety markers were identified for the first time, as well as the physiological state markers of high blueberry cultivated *in vivo* and *in vitro*.

Keywords: high bush blueberry, molecular genetic identification, DNA marking, SCoT primers, proteomic analysis, 2-D electrophoresis, marker proteins

For citation: Chizhik O. V., Yukhimuk A. N., Reshetnikov V. N. Highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.): proteomic and molecular genetic studies. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2022, vol. 67, no. 2, pp. 147–157 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2022-67-2-147-157>

Введение. Для удовлетворения высокого спроса населения в качественных продуктах здорового питания необходимо внедрение новых источников витаминной плодово-ягодной продукции и лекарственного сырья. Голубика высокая (*Vaccinium corymbosum* L.) – ягодная культура, ценность которой определяется содержанием широкого спектра биологически активных веществ, гипоаллергенностью и прекрасными вкусовыми качествами ягод [1, 2].

Результаты интродукции клюквы крупноплодной, голубики высокорослой и брусники обыкновенной, начатой Центральным ботаническим садом (ЦБС) НАН Беларуси в 1980 г. в Белорусском Полесье, дали начало новому для республики направлению – промышленному нетрадиционному ягодоводству [3].

Для повышения эффективности получения качественного посадочного материала необходимо изучить фундаментальные процессы, лежащие в основе роста и развития растений и установить возможные пути их регуляции. Также крайне актуальными являются исследования, направленные на подтверждение сортоответствия посадочного материала заявленному сорту (разработка генетических паспортов).

Развитие биотехнологии способствует появлению новых подходов к исследованиям, переходу к новым технологиям изучения и анализа генома и протеома растительного организма. Современные аналитические способы исследования специфичности биологических макромолекул позволяют на принципиально новой основе решить проблему идентификации генотипов, а также ряд вопросов, касающихся охраны прав собственности на селекционные достижения, сохранения и реализации сортов, контроля безопасности материала (наличие патогенов) и т. п. В дополнение к традиционным подходам (паспортизации на основе морфолого-физиологических признаков) успешно разрабатываются целые направления с использованием биохимических и молекулярных маркеров – белков и нуклеиновых кислот. Использование молекулярных маркеров, основанных на полиморфизме фрагментов белков и ДНК, позволяет успешно решать целый ряд задач фундаментального и прикладного характера, в том числе создавать новые тест-системы для анализа генетического полиморфизма, расширяя возможности направленной селекции растений.

Известно, что ключевым этапом реализации наследственной информации является биосинтез белков, гетерогенность и специфичность которых определяют ход метаболизма и онтогенетическое развитие организма. Следовательно, на протяжении жизненного цикла растений появляются группы белков и отдельные белки, которые функционально, количественно и качественно ответственны за определенный этап развития и/или за ответную реакцию на воздействие внешних факторов. Определение таких белков дает возможность использовать их как тест для оценки состояния организма, а в отдельных случаях – как непосредственную мишень регуляторного воздействия.

Цель работы – проведение ДНК-идентификации (паспортизации) представителя семейства *Ericaceae* Juss. (голубики высокой), оценка протеомного статуса, установление функциональных особенностей продуктов экспрессированного генома и сравнительная молекулярно-биологическая характеристика исходных растений (*in vivo*) и растений *in vitro*. Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи: провести молекулярное маркирование исследуемых растений с помощью ПЦР-техники, получить протеомные карты и определить биохимические маркеры, отражающие стадии развития голубики.

Материалы и методы исследования. Объектами исследования являлись растения голубики высокой (*Vaccinium corymbosum* L.) хозяйственно ценных интродуцированных сортов, полученные методом *in vitro*, и растения открытого грунта (*in vivo*) из маточника голубики отраслевой лаборатории интродукции и технологии ягодных растений (ЦБС, г. Ганцевичи). В исследовании использованы 5 сортов голубики высокой, в том числе включенных в Госреестр РБ: Atlantic, Concord, Bluecrop, Elizabeth, Weymouth.

Обезвоженную в силикагеле листовую ткань предварительно гомогенизировали. Препараты тотальной ДНК из исследуемых образцов получали методом СТАВ-экстракции [4] в нашей модификации. Качественный и количественный анализ полученных препаратов ДНК проводили спектрофотометрическим методом. Полученные препараты тотальной ДНК соответствовали предъявляемым к качеству требованиям: $R_{260/280} - 1,7-1,9$; $R_{260/230} - 1,7-2,2$. Все полученные препараты тотальной ДНК включены в ДНК-банк отдела биохимии и биотехнологии растений ЦБС НАН Беларуси.

Маркирование тотальной ДНК осуществляли с использованием техники полимеразной цепной реакции (ПЦР) и системы SCoT (Start Codon Targeted) – маркирующей участки ДНК однопраймерной мультилокусной системы, которая ассоциирована с короткими консервативными участками ДНК, фланкирующими стартовый кодон в генах растений [5–7]. В исследование был включен базовый набор из 36 SCoT-праймеров, протестированных на предмет получения высокополиморфных воспроизводимых маркеров.

Реакционная смесь для ПЦР объемом 25 мкл включала следующие компоненты: 1×реакционный буфер, содержащий 2 mM $MgCl_2$ («Евроген», Россия), 0,2 mM dNTPs («Евроген», Россия), 20 mM SCoT-праймера («Праймтех», Беларусь), 1 ед. HS Taq-полимеразы и 30 нг геномной ДНК. ПЦР проводили в термоциклере SureCyler 8800 (Agilent), протокол состоял из следующих этапов: начальной денатурации при 95 °C в течение 3 мин (30 циклов, последовательно включающих денатурацию при 95 °C в течение 30 с, отжиг праймеров (T_m) в течение 30 с, элонгацию при 72 °C в течение 2 мин) и финальной элонгации при 72 °C в течение 10 мин. T_m праймеров определялась нуклеотидной последовательностью праймера и составом реакционного буфера.

Продукты амплификации разделяли посредством горизонтального электрофореза в агарозных гелях (1,2 % Agarose, 1×TAE), предварительно окрашенных бромидом этидия до рабочей концентрации 1 мкг/мл, и визуализировали на приборе VersaDoc MP4000 (Bio-Rad, США). Длину фрагментов в парах нуклеотидов (п. н.) рассчитывали с использованием программного обеспечения Quantity One (Bio-Rad) на основе сравнения с маркерами молекулярного веса 100 и 1000 п. н. («Праймтех», Беларусь).

Для проведения молекулярно-генетической идентификации исследуемых образцов сортового материала голубики были отобраны 7 SCoT-праймеров, обладающих достаточным полиморфизмом и воспроизводимой амплификационной активностью (табл. 1).

Т а б л и ц а 1. Список SCoT-праймеров, отобранных для генотипирования сортов *V. corymbosum*

Table 1. SCoT primers list selected for genotyping *V. corymbosum* cultivars

Праймер	5'→3'	Nn	GC, %	T_m , °C
SCoT-18	ACCATGGCTACCACCGCC	18	67	60,8
SCoT-19	ACCATGGCTACCACCGGC	18	67	60,8
SCoT-22	AACCATGGCTACCACCAC	18	56	56,3
SCoT-28	CCATGGCTACCACCGCCA	18	67	60,8
SCoT-29	CCATGGCTACCACCGGCC	18	72	62,9
SCoT-31	CCATGGCTACCACCGCCT	18	67	60,8
SCoT-35	CATGGCTACCACCGGCC	18	72	62,9

П р и м е ч а н и е. Nn – количество нуклеотидов в праймере, GC – соотношение гуаниновых и цитозинового оснований.

Все использованные праймеры генерировали четкие воспроизводимые маркеры, набор которых для каждого сорта голубики характеризовался выраженной индивидуальностью (рис. 1).

Общую фракцию клеточных белков из листовой ткани получали методом ТХУ/ацетоновой преципитации по Amme [8] в нашей модификации. При подготовке опытных образцов к 2D-электрофорезу к сухому осадку белка добавляли DeStreak Rehydration Solution (GE Healthcare) и инкубировали в течение 45 мин при +4 °C, затем центрифугировали. Супернатант очищали

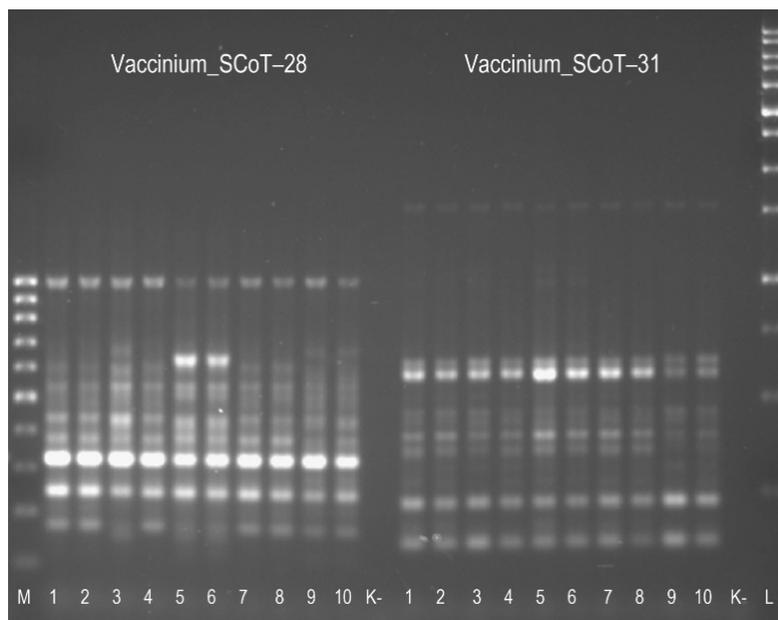


Рис. 1. Электрофоретическое разделение продуктов амплификации тотальной ДНК сортов *V. corymbosum* L. с праймерами SCoT-28 и SCoT-31: 1 – *Atlantic_vv*, 2 – *Atlantic_vt*, 3 – *Concord_vv*, 4 – *Concord_vt*, 5 – *Bluecrop_vv*, 6 – *Bluecrop_vt*, 7 – *Elizabeth_vv*, 8 – *Elizabeth_vt*, 9 – *Weymouth_vv*, 10 – *Weymouth_vt*; К – отрицательный контроль; М – размерный стандарт 100 bp, L – размерный стандарт 1 Kb; vv – *in vivo*, vt – *in vitro*

Fig. 1. Electrophoretic separation of amplification products of total DNA of *V. corymbosum* L. cultivars with primers SCoT-28 and SCoT-31: 1 – *Atlantic_vv*, 2 – *Atlantic_vt*, 3 – *Concord_vv*, 4 – *Concord_vt*, 5 – *Bluecrop_vv*, 6 – *Bluecrop_vt*, 7 – *Elizabeth_vv*, 8 – *Elizabeth_vt*, 9 – *Weymouth_vv*, 10 – *Weymouth_vt*; K – negative control; M – size standard 100 bp, L – size standard 1 Kb; vv – *in vivo*, vt – *in vitro*

от примесей с помощью набора реагентов 2-D Clean-Up Kit (GE Healthcare). Очищенный и сконцентрированный белковый осадок растворяли в ReadyPrep Rehydration/Sample buffer (Bio-Rad). Количество белка в образцах определяли с помощью набора реагентов RC DC Protein Assay (Bio-Rad).

Изоэлектрофокусирование (ИЭФ) общей фракции клеточных белков проводили на автоматической станции Protean i12 IEF Cell (Bio-Rad) на иммобилизованных сухих стрипах (ReadyStrip™ IPG Strips pI 3-10, 11 см, Bio-Rad). После ИЭФ IPG-стрипы уравнивали с буферными системами ReadyPrep 2-D Starter Kit Equilibration Buffer (Bio-Rad). SDS-электрофорез, как второе направление 2D-электрофореза, проводили по методу Laemmli [9] на готовых гелях Criterion TGX Precast Midi Protein Gel, 13,3×8,7 см, 4–15 %, 11 см (Bio-Rad). В качестве маркера использовали Precision Plus Protein Unstained Standards (Bio-Rad). Гели окрашивали красителем Oriole Fluorescent Gel Stain (Bio-Rad) и фотографировали с использованием системы VersaDoc (Bio-Rad). Анализ протеомных карт осуществляли с помощью специализированного программного обеспечения PDQuest 2-D Analysis Software (Bio-Rad), учитывая только хорошо различимые визуально пятна. Идентификацию белков проводили путем сравнения экспериментально рассчитанных молекулярных масс с данными, содержащимися в базе UniProt (<https://www.uniprot.org/>). Полученные результаты статистически обрабатывали с использованием компьютерной программы Statistica 7.0, изменения считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. Для генотипов сортов *V. corymbosum* L. максимальное количество локусов (ДНК-маркеров), равное 11, было идентифицировано с помощью праймеров SCoT-18, SCoT-19, SCoT-29 и SCoT-22, тогда как минимальное, равное 9, – с использованием праймеров SCoT-28, SCoT-31, SCoT-35. В общей сложности нами идентифицирован 71 локус (ДНК-маркер). Для каждого праймера были определены максимальное, минимальное и среднее количество маркеров, а также показатель R_p, характеризующий разрешающую способность праймера [10].

Максимальной разрешающей способностью характеризовался праймер SCoT-29 (5,6), минимальной – SCoT-31 (3,4). Из всего пула маркеров 60 являлись полиморфными. Примененная

маркерная система позволила выявить достаточно высокий уровень полиморфизма у исследуемых генотипов сортов *V. corymbosum* L., составивший в среднем 84,5 %. Максимальные его значения (100,0 %) установлены при использовании праймера SCoT-18, минимальные (72,7 %) – при использовании праймера SCoT-22.

Для каждого маркера (локуса) был рассчитан информационный индекс полиморфизма (PIC), отражающий вклад маркера в общий уровень полиморфизма [11]. Средние значения данных индексов для всех маркеров варьировались от 0,22 для праймеров SCoT-19 и SCoT-22 до 0,28 для праймера SCoT-18.

По результатам анализа 71 ДНК-маркера были определены генетические дистанции и произведена кластеризация исследуемых генотипов сортов *V. corymbosum* L. по методу присоединения соседей – *Neighbor joining*. На основании полученных данных для каждого праймера нами сконструированы отдельные дендрограммы, а также построена комплексная дендрограмма (рис. 2). За корневой таксон принята искусственная аут-группа – *artificial outgroup*; узлы, имеющие достоверную топологию (более 50 %), обозначены соответствующим значением; bootstrap-анализ составил 1000 реплик.

Комплексный анализ приведенных данных позволил уточнить топологию и генетические взаимосвязи исследуемых образцов. Так, на основании комплексной дендрограммы было установлено, что исследуемые сорта *V. corymbosum* L., за исключением сорта Concord, группируются попарно, в соответствии с сортовой принадлежностью. Растения *in vivo* голубики высокой сорта Concord совместно кластеризуются с парой сорта Bluecrop, в то время как растения, полученные методом микрклонального размножения (*in vitro*), находятся в метакластере с парами сортов Atlantic, Elizabeth и Weymouth. Подобная топология свидетельствует об определенных генетических различиях растений голубики сорта Concord, что позволяет усомниться в их сортовой принадлежности, поэтому данный таксон был исключен из дальнейших исследований.

Таким образом, проведенное мультилокусное маркирование генотипов исследуемых сортов *V. corymbosum* L. с использованием маркерной системы SCoT позволило дифференцировать все исследуемые генотипы, разработать и составить уникальные профили для каждого из них, рассчитать генетические дистанции родства/отдаленности. На основании полученных мультилокусных ДНК-спектров для всех исследованных образцов составлены генетические паспорта, четыре из которых представлены в табл. 2.

Разработанная нами система генетических SCoT-маркеров дает возможность регистрировать генотипы сортов голубики в виде молекулярно-генетических паспортов, что позволит использовать полученные данные в маркер-сопутствующей селекции.

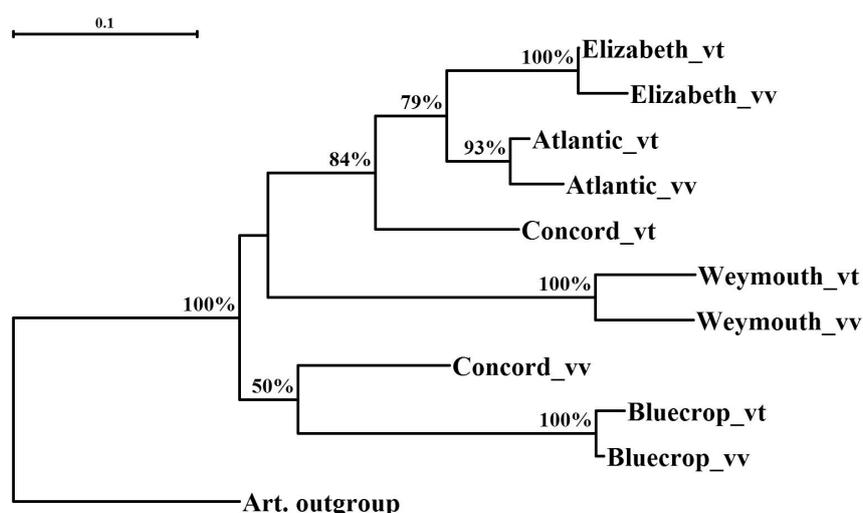


Рис. 2. Дендрограмма *Neighbor Joining*, отражающая степень генетического сходства между сортами *V. corymbosum* L., выявленного при использовании маркерной системы SCoT

Fig. 2. *Neighbor Joining* dendrogram, reflecting the degree of genetic similarity between *V. corymbosum* cultivars, identified by SCoT marker system

Т а б л и ц а 2. Молекулярно-генетические паспорта сортов *V. corymbosum*Table 2. Molecular genetic passports of *V. corymbosum* varieties

Праймер	ДНК-маркеры
Bluecrop (in vivo)	
SCoT-18	SCoT18 ₆₂₇ , SCoT18 ₅₃₈ , SCoT18 ₃₉₅ , SCoT18 ₃₂₀ , SCoT18 ₂₈₄ , SCoT18 ₂₁₁ , SCoT18 ₁₇₅
SCoT-19	SCoT19 ₆₁₄ , SCoT19 ₅₆₈ , SCoT19 ₄₇₉ , SCoT19 ₄₁₃ , SCoT19 ₃₃₈ , SCoT19 ₂₂₆ , SCoT19 ₁₇₅
SCoT-28	SCoT28 ₆₁₁ , SCoT28 ₅₂₉ , SCoT28 ₄₁₅ , SCoT28 ₃₇₁ , SCoT28 ₂₄₈
SCoT-31	SCoT31 ₁₀₅₅ , SCoT31 ₉₇₈ , SCoT31 ₆₁₂ , SCoT31 ₅₇₁ , SCoT31 ₄₄₉ , SCoT31 ₄₁₄ , SCoT31 ₃₈₁ , SCoT31 ₃₄₂
SCoT-29	SCoT29 ₁₀₁₇ , SCoT29 ₆₉₇ , SCoT29 ₅₆₂ , SCoT29 ₅₁₆ , SCoT29 ₄₆₁ , SCoT29 ₃₆₀ , SCoT29 ₃₂₂ , SCoT29 ₂₄₀ , SCoT29 ₂₁₀
SCoT-35	SCoT35 ₉₈₃ , SCoT35 ₇₇₉ , SCoT35 ₆₅₇ , SCoT35 ₅₃₉ , SCoT35 ₄₅₃ , SCoT35 ₃₁₄ , SCoT35 ₂₈₆ , SCoT35 ₂₂₀
SCoT-22	SCoT22 ₇₇₇ , SCoT22 ₆₁₃ , SCoT22 ₅₆₄ , SCoT22 ₄₆₄ , SCoT22 ₄₃₃ , SCoT22 ₃₀₆ , SCoT22 ₂₆₉ , SCoT22 ₂₂₄
Bluecrop vt (in vitro)	
SCoT-18	SCoT18 ₆₂₇ , SCoT18 ₅₃₈ , SCoT18 ₃₂₀ , SCoT18 ₂₈₄ , SCoT18 ₂₁₁ , SCoT18 ₁₇₅
SCoT-19	SCoT19 ₆₁₄ , SCoT19 ₅₆₈ , SCoT19 ₄₇₉ , SCoT19 ₄₁₃ , SCoT19 ₃₃₈ , SCoT19 ₂₂₆ , SCoT19 ₁₇₅
SCoT-28	SCoT28 ₆₁₁ , SCoT28 ₅₂₉ , SCoT28 ₄₁₅ , SCoT28 ₃₇₁ , SCoT28 ₂₄₈
SCoT-31	SCoT31 ₁₀₅₅ , SCoT31 ₉₇₈ , SCoT31 ₆₁₂ , SCoT31 ₅₇₁ , SCoT31 ₄₄₉ , SCoT31 ₄₁₄ , SCoT31 ₃₈₁ , SCoT31 ₃₄₂
SCoT-29	SCoT29 ₁₀₈₉ , SCoT29 ₁₀₁₇ , SCoT29 ₆₉₇ , SCoT29 ₅₆₂ , SCoT29 ₅₁₆ , SCoT29 ₄₆₁ , SCoT29 ₃₆₀ , SCoT29 ₃₂₂ , SCoT29 ₂₄₀ , SCoT29 ₂₁₀
SCoT-35	SCoT35 ₉₈₃ , SCoT35 ₇₇₉ , SCoT35 ₆₅₇ , SCoT35 ₅₃₉ , SCoT35 ₄₅₃ , SCoT35 ₃₁₄ , SCoT35 ₂₈₆ , SCoT35 ₂₂₀
SCoT-22	SCoT22 ₇₇₇ , SCoT22 ₆₁₃ , SCoT22 ₅₆₄ , SCoT22 ₄₆₄ , SCoT22 ₄₃₃ , SCoT22 ₃₀₆ , SCoT22 ₂₆₉ , SCoT22 ₂₂₄
Elizabeth vv (in vivo)	
SCoT-18	SCoT18 ₃₃₅ , SCoT18 ₃₂₀ , SCoT18 ₂₈₄ , SCoT18 ₂₁₁
SCoT-19	SCoT19 ₈₄₀ , SCoT19 ₆₆₂ , SCoT19 ₆₁₄ , SCoT19 ₅₆₈ , SCoT19 ₂₂₆ , SCoT19 ₁₇₅
SCoT-28	SCoT28 ₅₈₁ , SCoT28 ₅₂₉ , SCoT28 ₄₂₄ , SCoT28 ₃₇₁ , SCoT28 ₂₄₈ , SCoT28 ₁₆₈
SCoT-31	SCoT31 ₅₇₁ , SCoT31 ₄₁₄ , SCoT31 ₃₈₁ , SCoT31 ₃₄₂
SCoT-29	SCoT29 ₃₆₀ , SCoT29 ₃₂₂ , SCoT29 ₂₄₀ , SCoT29 ₂₁₀
SCoT-35	SCoT35 ₉₈₃ , SCoT35 ₇₇₉ , SCoT35 ₆₅₇ , SCoT35 ₅₃₉ , SCoT35 ₃₁₄ , SCoT35 ₂₈₆ , SCoT35 ₂₂₀ , SCoT35 ₁₈₅
SCoT-22	SCoT22 ₆₄₅ , SCoT22 ₅₆₄ , SCoT22 ₄₆₄ , SCoT22 ₄₃₃ , SCoT22 ₂₈₆ , SCoT22 ₂₂₄
Elizabeth vt (in vitro)	
SCoT-18	SCoT18 ₃₂₀ , SCoT18 ₂₈₄ , SCoT18 ₂₁₁
SCoT-19	SCoT19 ₈₄₀ , SCoT19 ₆₆₂ , SCoT19 ₆₁₄ , SCoT19 ₅₆₈ , SCoT19 ₂₂₆ , SCoT19 ₁₇₅
SCoT-28	SCoT28 ₅₈₁ , SCoT28 ₅₂₉ , SCoT28 ₄₂₄ , SCoT28 ₃₇₁ , SCoT28 ₂₄₈ , SCoT28 ₁₆₈
SCoT-31	SCoT31 ₅₇₁ , SCoT31 ₄₁₄ , SCoT31 ₃₈₁ , SCoT31 ₃₄₂
SCoT-29	SCoT29 ₆₉₇ , SCoT29 ₃₆₀ , SCoT29 ₃₂₂ , SCoT29 ₂₄₀ , SCoT29 ₂₁₀
SCoT-35	SCoT35 ₉₈₃ , SCoT35 ₇₇₉ , SCoT35 ₆₅₇ , SCoT35 ₅₃₉ , SCoT35 ₃₁₄ , SCoT35 ₂₈₆ , SCoT35 ₂₂₀ , SCoT35 ₁₈₅
SCoT-22	SCoT22 ₆₄₅ , SCoT22 ₅₆₄ , SCoT22 ₄₆₄ , SCoT22 ₄₃₃ , SCoT22 ₂₈₆ , SCoT22 ₂₂₄

Несмотря на то что все клеточные структуры обладают идентичной генетической информацией, содержащейся в молекулах ДНК, в процессе развития организма данная информация считается избирательно. Ключевым моментом в реализации наследственной информации растительного организма является биосинтез белков. Контроль за реализацией наследственной информации (включением/выключением генов) осуществляют эпигенетические механизмы, к которым относятся модификация ДНК и изменение структуры хроматина. Следует отметить, что практически все хроматин-регулирующие соединения относятся к классу белков [12, 13].

Протеомные исследования позволяют оценить влияние различных факторов на реализацию наследственной информации и составляют основу разработок современных биотехнологий. Протеомика дает возможность охарактеризовать виды растений и идентифицировать предполагаемые молекулярные маркеры не только видо- и сортоспецифичности, но и белки-маркеры функционального состояния растительного организма. Таким образом, протеомика является многообещающим подходом, который может дополнять геномику, транскриптомику и метаболомику.

Следует подчеркнуть, что до настоящего времени детального изучения протеомного статуса растений голубики высокой практически не проводилось. Исследования общего протеома голубики высокой методом 2D-электрофореза с использованием автоматической станции Protean i12 IEF Cell (Bio-Rad, США) были выполнены в нашей республике впервые.

На основе проведенных исследований были составлены протеомные карты *in vivo* и *in vitro* растений четырех сортов голубики высокой. По нашим оценкам, общий протеом листовой ткани растений данного вида насчитывает около 350 белков. Однако следует учитывать, что количество последних может быть занижено, поскольку часть белков в процессе анализа подвергается протеолизу, а при проведении ИЭФ их молекулы способны агрегироваться, что может несколько изменять количество фракций, величину молекулярной массы и значение изоэлектрической точки pI. Поэтому для определения общего количества функционально различающихся белков в наблюдаемом спектре пятен вносили поправку на изоформы, продукты протеолиза и возможные потери, обусловленные посттрансляционными модификациями [14].

Установлено, что независимо от генотипа основная масса белков на протеомных картах голубики *in vivo* и *in vitro* находится в области молекулярных масс (Мм) от 10 до 80 кДа и диапазоне pI 3,5–7,5. При этом белковые профили листовой ткани всех исследуемых образцов характеризовались высокой степенью идентичности, подтверждаемой присутствием в них сходных групп белков, являющихся, на наш взгляд, характерными для данного вида вересковых. На представленных на рис. 3 протеомных картах растений голубики *in vivo* и *in vitro* отчетливо детектируются 9 сходных по молекулярным массам белковых зон (обозначены красным маркером), представляющих собой изоформы, различающиеся значениями pI, а также отдельные белки (обозначены синим маркером) (рис. 3).

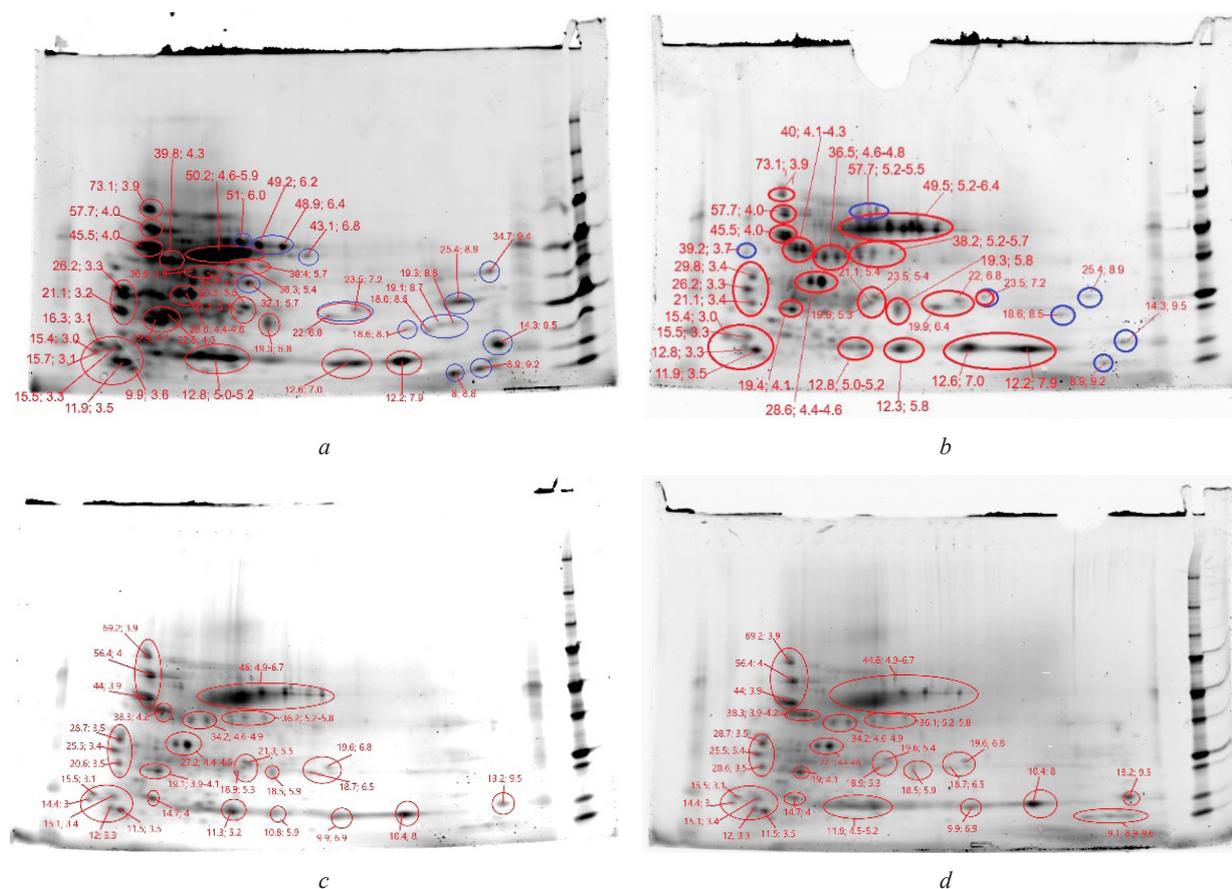


Рис. 3. Протеомные карты общего пула белков листовой ткани *V. corymbosum* L. сортов Weymouth (*a* – *in vivo*, *b* – *in vitro*) и Elizabeth (*c* – *in vivo*, *d* – *in vitro*)

Fig. 3. Proteomic maps of the total pool of proteins in the of *V. corymbosum* L. leaf tissue of Weymouth (*a* – *in vivo*, *b* – *in vitro*) and Elizabeth (*c* – *in vivo*, *d* – *in vitro*) cultivars

Сходные для всех образцов белковые зоны находились в диапазоне Мм 12–60 кДа и рI 3–5 и характеризовались следующими параметрами: 1) Мм 57,7–60,0 кДа, рI 5,2–5,5; 2) Мм 49,5–50,0 кДа, рI 5,2–5,5; 3) Мм 49,5–50,0 кДа, рI 5,2–5,5; 4) Мм 38,2–40,0 кДа, рI 4,1–6,4; 5) Мм 23,6 кДа, рI 4,4–4,6; 6) Мм 19,3–23,5 кДа, рI 4,1–7,2; 7) Мм 21,1–29,8 кДа, рI 3,4–3,7; 8) Мм 11,9–15,5 кДа, рI 3,0–3,5; 9) Мм 12,2–12,6 кДа, рI 7,0–7,9.

Дифференциально экспрессирующиеся, сходные для всех образцов голубики кислые белки имели следующие характеристики: Мм 73,1 кДа, рI 3,9; Мм 57,7 кДа, рI 4,0; Мм 45,5 кДа, рI 4,0. Предположительно, это ферменты гидроксилазы и факторы транскрипции. Данные белки могут претендовать на роль белков-маркеров вида *Vaccinium corymbosum* L.

Для выявления белков-маркеров сортовой принадлежности и функционального состояния растений голубики высокой, произрастающих в условиях открытого грунта (*in vivo*) и *in vitro*, нами проведен сравнительный анализ протеомных карт каждого сорта.

На электрофореграммах общего протеома голубики сорта Weymouth, представленных на рис. 4, были обнаружены дифференциально экспрессирующиеся белки, которые можно рассматривать в качестве белков-маркеров сортовой принадлежности, а также функционального состояния растений (отмечены синим маркером). Так, в образцах листовой ткани *in vivo* голубики высокой сорта Weymouth выявлены три полипептида – низкомолекулярные основные белки с Мм 8,9 кДа, рI 9,2 (Transcription factor T); Мм 8,8 кДа, рI 8,0 (Flavonoid 3'-hydroxylase (фрагмент)); Мм 34,7 кДа, рI 9,4 (Cyclin-dependent kinase B1), которые не экспрессируются у *in vitro* растений того же сорта. Также на протеомной карте голубики сорта Weymouth *in vivo* были обнаружены два основных белка – с Мм 14,3 кДа, рI 9,5 (Dehydrin), Мм 25,4 кДа, рI 8,9 (Glutathione S-transferase), хорошо детектируемые у исходных *in vivo* растений, но с крайне слабой экспрессией у *in vitro* образцов.

У растений голубики сорта Bluecrop *in vivo* (рис. 5) зафиксированы три низкомолекулярных основных белка – с Мм 23 кДа, рI 9; 34 кДа, рI 9; 36 кДа, рI 9 (Transcription factor, фрагменты), отсутствующие на электрофореграмме *in vitro* растений.

У голубики высокой сорта Atlantic *in vivo* на электрофореграмме общего протеома (рис. 6) обнаружены низкомолекулярные белки с Мм 20,1 кДа, рI 5,7; Мм 22,6 кДа, рI 6,7 (белки Ribulose biphosphate carboxylase large chain), отсутствующие на электрофореграмме растений, полученных методом клонального микроразмножения *in vitro*. При этом можно предположить, что белок с Мм 19,9 кДа и рI 8,0, выделенный на протеомной карте последних, является изоформой белка с Мм 22,6 кДа, рI 6,7.

Идентификация дифференциально экспрессирующихся белков проведена путем сравнения экспериментально рассчитанных молекулярных масс с данными, содержащимися базе UniProt (<https://www.uniprot.org/>).

Что касается сорта Elizabeth, то у данного сорта не выявлено значимых различий в протеомах растений *in vivo* и *in vitro*. Дальнейшая идентификация белков на полученных протеомных картах будет продолжена при проведении масс-спектрометрического анализа.

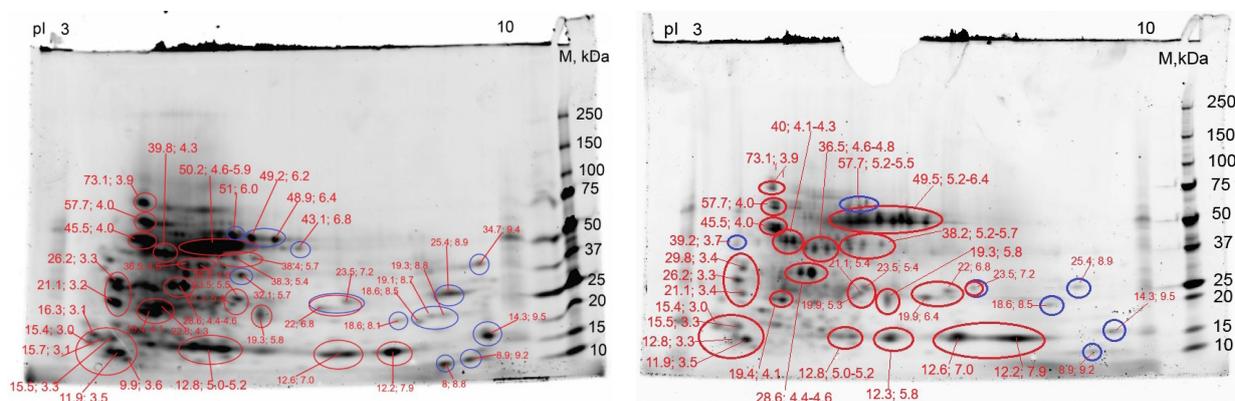


Рис. 4. Электрофореграмма *V. corymbosum* L., сорт Weymouth (a – *in vivo*, b – *in vitro*)
 Fig. 4. Electrophoregram of *V. corymbosum* L., Weymouth cultivare (a – *in vivo*, b – *in vitro*)

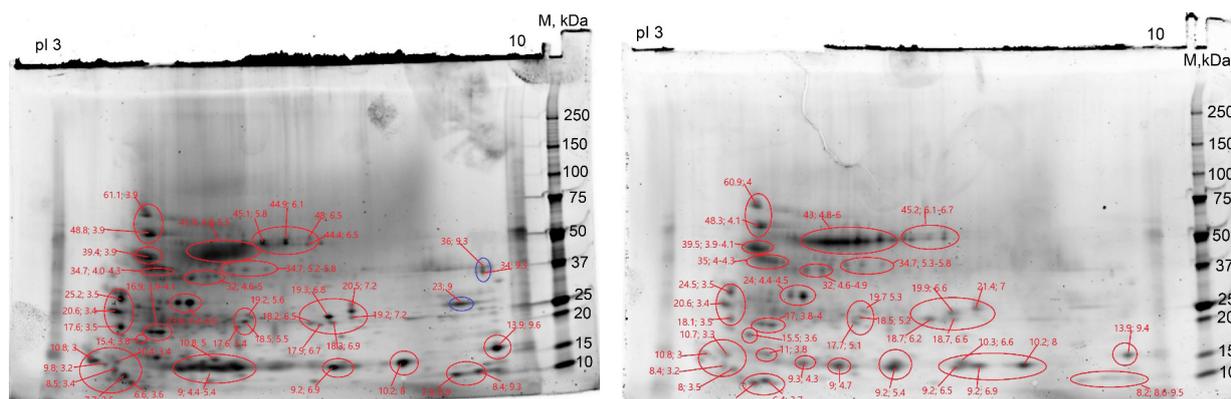


Рис. 5. Электрофореграмма *V. corymbosum* L., сорт Bluecrop (*a* – *in vivo*, *b* – *in vitro*)
 Fig. 5. Electrophoregram of *V. corymbosum* L., Bluecrop cultivare (*a* – *in vivo*, *b* – *in vitro*)

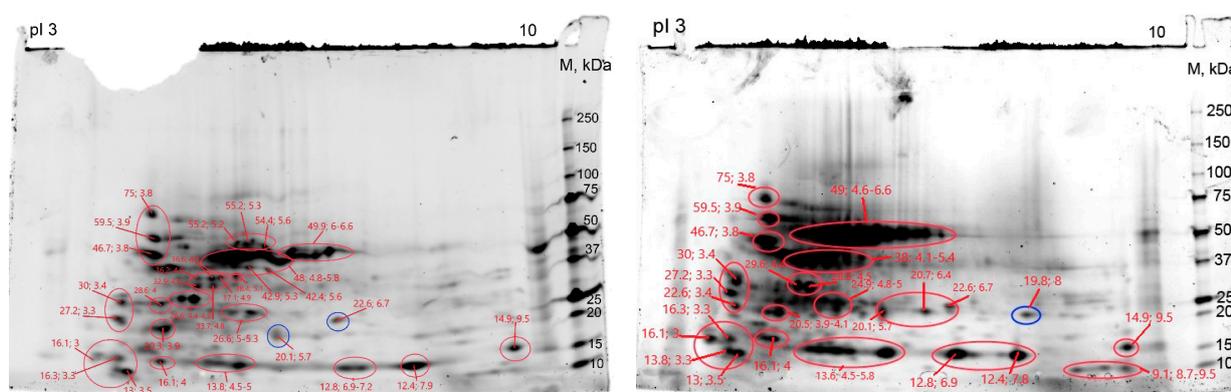


Рис. 6. Электрофореграмма *V. corymbosum* L., сорт Atlantic (*a* – *in vivo*, *b* – *in vitro*)
 Fig. 6. Electrophoregram of *V. corymbosum* L., Atlantic cultivare (*a* – *in vivo*, *b* – *in vitro*)

Результаты сравнительного протеомного анализа общего пула белков листовой ткани четырех сортов голубики высокой *in vivo* и растений, полученных методом микроклонального размножения *in vitro*, показали высокую степень идентичности белковых профилей, что подтверждает стабильность и сортоотчетливость исследуемых образцов. Вместе с тем были выделены и зоны с дифференциально экспрессирующимися белками, которые могут претендовать на роль маркеров видовой и сортовой принадлежности голубики. Выявленные различия в экспрессии групп белков, являющихся в основном субъединицами окислительно-восстановительных ферментов и факторами транскрипции, могут быть обусловлены эпигенетическими воздействиями, влияющими на экспрессию определенных генов. В составе протеомов листовой ткани *in vivo* растений обнаружены дифференциально экспрессирующиеся низкомолекулярные белки (преимущественно защитные PR-белки и белки (субъединицы) патогенов), отсутствующие на протеомных картах клонированных растений. На основании этого можно сделать вывод, что с помощью метода электрофореза можно осуществлять тестирование в том числе на наличие патогенов растений голубики, которые будут рекомендованы в качестве исходного материала для тиражирования данной культуры в промышленных масштабах.

Заключение. Проведенные нами исследования носят как фундаментальный, так и прикладной характер. Впервые проведена ДНК-идентификация с использованием маркерной системы SCoT, дана оценка протеомного статуса и определены потенциальные биохимические маркеры, отражающие видовую и сортовую принадлежность таксонов *V. corymbosum* L., а также стадии развития растений голубики высокой.

Выявленные на основании маркерной системы SCoT ДНК-маркеры могут быть использованы для создания генетических паспортов, что найдет применение при защите авторских прав,

в маркер-сопутствующей селекции растений сем. *Ericaceae* Juss., а также в сельском хозяйстве при производстве высококачественного посадочного материала, отвечающего мировым стандартам.

Составление биохимических паспортов (протеомных карт) даст возможность разработать способы определения биопродуктивности растений и позволит проводить быстрый отбор культур, перспективных для биотехнологического производства. Кроме того, использование протеомных карт может быть использовано в качестве тест-систем состояния организма на разных этапах роста и развития или как мишень регуляторного воздействия.

Полученные результаты развивают биологию ценных ягодных культур, а также научные подходы к их использованию в народном хозяйстве.

Список использованных источников

1. Phuong, H. L. Blueberry supplementation in neuronal health and protective technologies for efficient delivery of blueberry anthocyanins / H. L. Phuong, T. D. Thao // *Biomolecules*. – 2021. – Vol. 11, N 1. – Art. 102. <https://doi.org/10.3390/biom11010102>
2. Голубика высокорослая: оценка адаптационного потенциала при интродукции в условиях Беларуси / Ж. А. Рупасова [и др.]; под ред. В. И. Парфенова. – М. : Белорус. наука, 2007. – 442 с.
3. История и результаты интродукции ягодных растений семейства Ericaceae в Республике Беларусь / В. В. Титок [и др.] // Опыт и перспективы выращивания нетрадиционных ягодных растений на территории Беларуси и сопредельных стран: материалы Междунар. науч.-практ. семинара (Минск–Ганцевичи, Минск, 28 сент.–1 окт. 2021 г.) / редкол. : В. В. Титок [и др.]. – Минск, 2021. – С. 3–14.
4. Rapid DNA extraction from ferns for PCR-based analyses / E. L. Dempster [et al.] // *Biotechniques*. – 1999. – Vol. 27, N 1. – P. 66–68. <https://doi.org/10.2144/99271bm13>
5. Collard, B. C. Y. Start codon targeted (SCoT) polymorphism: a simple, novel DNA marker technique for generating gene-targeted markers in plants / B. C. Y. Collard, D. J. Mackill // *Plant Mol. Biol. Rep.* – 2009. – Vol. 27. – Art. 86. <https://doi.org/10.1007/s11105-008-0060-5>
6. Start Codon Targeted (SCoT) markers provide new insights into the genetic diversity analysis and characterization of Tunisian Citrus species / A. Mahjbi [et al.] // *Biochem. Syst. Ecol.* – 2015. – Vol. 61. – P. 390–398. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2015.07.017>
7. Guo, D. L. Genetic diversity in some grape varieties revealed by SCoT analyses / D. L. Guo, J. Y. Zhang, C. H. Liu // *Mol. Biol. Rep.* – 2012. – Vol. 39, N 5. – P. 5307–5313. <https://doi.org/10.1007/s11033-011-1329-6>
8. A proteome approach defines protective functions of tobacco leaf trichomes / S. Amme [et al.] // *Proteomics*. – 2005. – Vol. 5, N 10. – P. 2508–2518. <https://doi.org/10.1002/pmic.200401274>
9. Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 / U. K. Laemmli // *Nature*. – 1970. – Vol. 227, N 5259. – P. 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
10. Prevost, A. A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars / A. Prevost, M. J. Wilkinson // *Theor. Appl. Genet.* – 1999. – Vol. 98, N 1. – P. 107–112. <https://doi.org/10.1007/s001220051046>
11. 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. <https://doi.org/10.1007/s10528-012-9509-1>
12. Chromatin remodeling in plant development / J. A. Jarillo [et al.] // *Int. J. Dev. Biol.* – 2009. – Vol. 53. – P. 1581–1596. <https://doi.org/10.1387/ijdb.072460jj>
13. Шемарова, И. В. Посттрансляционная регуляция программируемых клеточных процессов у низших эукариот / И. В. Шемарова // *Цитология*. – 2008. – Т. 50, № 8. – С. 663–670.
14. Кузовкова, А. А. Первичный протеомный анализ хлоропластов озимой ржи и методические подходы к его проведению / А. А. Кузовкова, Е. В. Спиридович, В. Н. Решетников // *Физиология и биохимия культ. растений*. – 2011. – Т. 43, № 2. – С. 105–112.

References

1. Phuong H. L., Thao T. D. Blueberry supplementation in neuronal health and protective technologies for efficient delivery of blueberry anthocyanins. *Biomolecules*, 2021, vol. 11, no. 1, art. 102. <https://doi.org/10.3390/biom11010102>
2. Rupasova Zh. A., Reshetnikov V. N., Ruban N. N., Ignatenko V. A., Yakovlev A. P., Pyatnitsa F. S. *Highbush blueberry: assessment of adaptive potential during introduction in Belarus*. Minsk, Belorusskaya nauka Publ., 2007. 442 p. (in Russian).
3. Titok V. V., Reshetnikov V. N., Volod'ko I. K., Pavlovskii N. B. History and results of the introduction of berry plants of the Ericaceae family in the Republic of Belarus. *Opyt i perspektivy vyrashchivaniya netraditsionnykh yagodnykh rastenii na territorii Belarusi i sopredel'nykh stran : materialy Mezhdunarodnogo nauchno-prakticheskogo seminar (Minsk–Gantsevichi, 28 sentyabrya–01 oktyabrya 2021 goda)* [Experience and prospects for growing non-traditional berry plants in Belarus and neighboring countries : materials of the International scientific and practical seminar (Minsk–Gantsevichi, September 28–October 01, 2021)]. Minsk, 2021, pp. 3–14 (in Russian).
4. 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. <https://doi.org/10.2144/99271bm13>

5. Collard B. C. Y., Mackill D. J. Start codon targeted (SCoT) polymorphism: a simple, novel DNA marker technique for generating gene-targeted markers in plants. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2009, vol. 27, art. 86. <https://doi.org/10.1007/s11105-008-0060-5>
6. Mahjbi A., Baraket G., Oueslati A., Salhi-Hannachi A. Start Codon Targeted (SCoT) markers provide new insights into the genetic diversity analysis and characterization of Tunisian Citrus species. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2015, vol. 61, pp. 390–398. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2015.07.017>
7. Guo D. L., Zhang J. Y., Liu C. H. Genetic diversity in some grape varieties revealed by SCoT analyses. *Molecular Biology Reports*, 2012, vol. 39, no. 5, pp. 5307–5313. <https://doi.org/10.1007/s11033-011-1329-6>
8. Amme S., Rutten T., Melzer M., Sonsmann G., Vissers J., Schlesier B., Mock H.-P. A proteome approach defines protective functions of tobacco leaf trichomes. *Proteomics*, 2005, vol. 5, no. 10, pp. 2508–2518. <https://doi.org/10.1002/pmic.200401274>
9. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, vol. 227, no. 5259, pp. 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
10. Prevost A., Wilkinson M. J. A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars. *Theoretical and Applied Genetics*, 1999, vol. 98, no. 1, pp. 107–112. <https://doi.org/10.1007/s001220051046>
11. Nagy S., Poczai P., Cernák I., Gorji A. M., Hegedűs G., Taller J. PICcalc: an online program to calculate polymorphic information content for molecular genetic studies. *Biochemical Genetics*, 2012, vol. 50, pp. 670–672. <https://doi.org/10.1007/s10528-012-9509-1>
12. Jarillo J. A., Piñeiro M., Cubas P., Martínez-Zapater J. M. Chromatin remodeling in plant development. *International Journal of Developmental Biology*, 2009, vol. 53, pp. 1581–1596. <https://doi.org/10.1387/ijdb.072460jj>
13. Shemarova I. V. Post-translational regulation of programmed cellular processes in lower eukaryotes. *Tsitologiya = Cell and Tissue Biology*, 2008, vol. 50, no. 8, pp. 663–670 (in Russian).
14. Kuzovkova A. A., Spiridovich E. V., Reshetnikov V. N. Primary proteomic analysis of winter rye chloroplasts and methodological approaches to its implementation. *Fiziologiya i biokhimiya kul'turnykh rastenii* [Physiology and biochemistry of cultivated plants], 2011, vol. 43, no. 2, pp. 105–112 (in Russian).

Информация об авторах

Чижик Ольга Владимировна – канд. биол. наук, доцент, заведующий лабораторией. Центральный ботанический сад НАН Беларуси (ул. Сурганова, 2в, 220012, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: chizhikolga17@gmail.com, chizhik@cbg.org.by

Юхимук Андрей Николаевич – науч. сотрудник. Центральный ботанический сад НАН Беларуси (ул. Сурганова, 2в, 220012, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: andrei.yukhimuk@gmail.com, yukhimuk@cbg.org.by

Решетников Владимир Николаевич – академик, д-р биол. наук, профессор, заведующий отделом. Центральный ботанический сад НАН Беларуси (ул. Сурганова, 2в, 220012, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: v.reshetnikov@cbg.org.by

Information about the authors

Olga V. Chizhik – Ph. D. (Biol.), Associate Professor, Head of the Laboratory. Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus (2v, Surganov Str., 220012, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: chizhikolga17@gmail.com, chizhik@cbg.org.by

Andrei N. Yukhimuk – Researcher. Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus (2v, Surganov Str., 220012, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: andrei.yukhimuk@gmail.com, yukhimuk@cbg.org.by

Vladimir N. Reshetnikov – Academician, D. Sc. (Biol.), Professor, Head of the Department. Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus (2v, Surganov Str., 220012, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: V.Reshetnikov@cbg.org.by