

**Матэрыяльныя ўмовы жыцця. Біяхімія. Малекулярная біялогія. Біяфізіка**

УДК 575.22+577.21:582.912.46

Н. В. Водциц, Е. О. Юрченко, А. А. Вологович

**ПРИМЕНЕНИЕ CAPS-АНАЛИЗА ISSR-МАРКЕРОВ  
ПРИ ТИПИРОВАНИИ СОРТОВ ГОЛУБИКИ ВЫСОКОЙ**

Во введении указан объект исследования – голубика высокая (*Vaccinium corymbosum*) и перспективы развития голубиководства в Беларуси, а также возможности применения к данному виду рестрикционного анализа амплифицированных фрагментов ДНК (CAPS). Целью исследования является выявление полиморфизма в избранных мономорфных (повторно амплифицированных) ISSR-фрагментах шести сортов с помощью CAPS-анализа. В основной части описаны: метод выделения ДНК из молодых стеблей голубики, методика получения изолированных ISSR-фрагментов элюцией из геля, условия проведения ISSR-ПЦР и CAPS-анализа. Перечислены эндонуклеазы, которыми обрабатывали данные фрагменты, полученные при помощи праймеров UBC 808, 818, 824 и 845. Приведены основные сведения о частотах ISSR-маркеров в изученной выборке сортов голубики. Описано применение CAPS-метода для изучения полиморфизма 10 ISSR-участков генома по наличию сайтов рестрикции. Даны результаты расщепления трех ISSR-фрагментов, элюированных из агарозных гелей, двумя эндонуклеазами рестрикции, характеризующимися повышенной частотой расщепления геномной ДНК. Получены три качественных CAPS-маркера у трех сортов голубики (Reka, Northblue и Bluejay), отличающие их от остальных изученных сортов. Отмечено, что внутри фрагмента небольшой длины (до 300 п.н.) CAPS-маркеры, вероятно, из-за малого размера трудновыявляемы. Представлены электрофореграммы мономорфных фрагментов шести сортов голубики после обработки эндонуклеазами. Проведена дополнительная оценка степени генетического сходства сорта Reka и Bluejay. Выдвинуты предположения о возможности *HinP11* разрезать метелированные основания. Полученные результаты могут быть применены как дополнение при молекулярной идентификации и сертификации сортов *Vaccinium corymbosum* и для филогенетических исследований.

**Ключевые слова:** ISSR-ПЦР, праймер, CAPS-маркер, эндонуклеаза рестрикции, сайт рестрикции.

**Введение.** Голубика высокая, или щитковая (*Vaccinium corymbosum* L.), характеризуется высокой урожайностью ягод, быстрой окупаемостью затрат на закладку плантаций и пищевой ценностью [1, с. 5]. Перспективы развития голубиководства в Беларуси заложены и отражены в Государственной комплексной программе развития картофелеводства, овощеводства и плодоводства на 2011–2015 годы и Региональной программе развития Припятского Полесья [2].

Наиболее точным и эффективным методом определения сортопринадлежности образцов является идентификация по молекулярным маркерам [3]. CAPS-маркеры (cleaved amplified polymorphic sequences) представляют собой обособленную группу хорошо изученных и успешно применяемых маркеров, способных решать широкий спектр задач [4]. Преимущества CAPS-маркеров – это кодоминантный тип наследования, при котором не только гомо-, но и гетерозиготные генотипы четко отличаются друг от друга, простота идентификации получаемых результатов, так как продукты гидролиза четко представлены всего одним или несколькими фрагментами в геле, и отсутствие необходимости использования дорогостоящего и сложного оборудования [4; 5]. CAPS-маркеры нашли важное применение для определения генетического внутри- и межвидового полиморфизма. Принцип действия их основан

**Водциц Наталья Васильевна**, аспирант каф. биотехнологий ПолесГУ (Беларусь); науч. рук. – А. А. Вологович, канд. биол. наук, доц., декан биотехнологического факультета ПолесГУ (Беларусь).

**Адрес для корреспонденции:** ул. Днепровской флотилии, 23, 225710, г. Пинск, Беларусь; e-mail: vodna76@mail.ru

**Юрченко Евгений Олегович**, канд. биол. наук, доц. каф. биотехнологий ПолесГУ (Беларусь).

**Адрес для корреспонденции:** ул. Днепровской флотилии, 23, 225710, г. Пинск, Беларусь; e-mail: eugene\_yu@tut.by

**Вологович Антон Анатольевич**, канд. биол. наук, доц., декан биотехнологического факультета ПолесГУ (Беларусь).

**Адрес для корреспонденции:** ул. Днепровской флотилии, 23, 225710, г. Пинск, Беларусь; e-mail: volant777@tut.by

на амплификации небольшого фрагмента ДНК вместо использования всего генома [4]. Ранее в исследованиях, проведенных в Республике Беларусь, для идентификации и паспортизации сортов голубики были созданы наборы ДНК-маркеров на основе RAPD- и ISSR-праймеров [6; 7]. Согласно доступным публикациям, CAPS-анализ для голубики ранее в Беларуси не проводился.

Целью настоящей работы было выявление с помощью CAPS-анализа полиморфизма в избранных повторно амплифицированных ISSR-фрагментах шести сортов голубики. При этом на первом этапе исследования (ISSR-ПЦР) данные фрагменты трактовались как мономорфные, т.е. идентичные и постоянные для всего набора сортов.

**Материал и методы исследований.** Исследования были проведены на базе научно-исследовательской лаборатории прикладной и фундаментальной биотехнологии биотехнологического факультета учреждения образования «Полесский государственный университет» (далее – БТФ ПолесГУ).

Объектом исследования явились полугодичные растения голубики щитковой (*V. corymbosum*) Bluecrop, Northland, Reka, Denise blue, Northblue и Bluejay, произведенные методом клонального микроразмножения *in vitro* на базе научно-исследовательской лаборатории клеточных технологий в растениеводстве БТФ ПолесГУ.

Выделение ДНК из молодых стеблей проводилось СТАВ-методом с небольшими модификациями применительно к объекту исследования [8; 9]. Препарат ДНК растворяли в 50 мкл деионизированной воды. Растворы нуклеиновых кислот хранили при  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Реакционная смесь для проведения ПЦР готовилась в объеме 25 мкл и включала следующие компоненты:  $10 \times$  ПЦР-буфер «А», 50 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10 mM dNTP-mix, 20 пмоль праймера, 20 нг ДНК, 2 ед. *Taq*-ДНК полимеразы (все производства «Праймтех», Беларусь, за исключением dNTP-mix производства Carl Roth, Германия). Полимеразные цепные реакции проводились на термоциклере Biometra. Для праймеров UBC 818, UBC 824 и UBC 845 устанавливали следующую программу:  $94^{\circ}\text{C} - 30$  с; 40 циклов:  $94^{\circ}\text{C} - 1$  мин,  $50^{\circ}\text{C} - 1$  мин,  $72^{\circ}\text{C} - 1$  мин;  $72^{\circ}\text{C} - 5$  мин. Для праймеров UBC 808 и UBC 867 устанавливали следующие режимы:  $94^{\circ}\text{C} - 10$  мин; 35 циклов:  $94^{\circ}\text{C} - 1$  мин,  $46,5^{\circ}\text{C} - 1$  мин,  $72^{\circ}\text{C} - 2$  мин;  $72^{\circ}\text{C} - 10$  мин.

Длину фрагментов амплифицированной ДНК оценивали с помощью горизонтального электрофореза в 2%-м агарозном геле [7]. Для определения длины фрагментов ДНК использовали размерные маркеры 100 bp Plus и 100 bp DNA Ladder (производства Thermo Scientific, Литва).

Мономорфные фрагменты, выявленные у шести сортов голубики, выделяли из агарозного геля с помощью центрифугирования [10, с. 154]. Элюированные фрагменты использовали как ДНК-матрицу в повторной ПЦР.

CAPS-анализ проводили с использованием следующих эндонуклеаз рестрикции фирмы New England Biolabs: *TaqI*, *HhaI*, *HindIII*, *HinPII*, *XbaI*, *PvuII*. Рестриктную обработку продуктов амплификации в количестве 7 мкл проводили в буфере согласно инструкциям, прилагаемым фирмой-производителем к каждой эндонуклеазе. Время инкубации для рестриктаз составляло 2–4 ч при температуре  $37^{\circ}\text{C}$ . Смесь с *TaqI* инкубировали при  $65^{\circ}\text{C}$ . Для выявления продуктов рестрикции использовали горизонтальный электрофорез в агарозном геле [7].

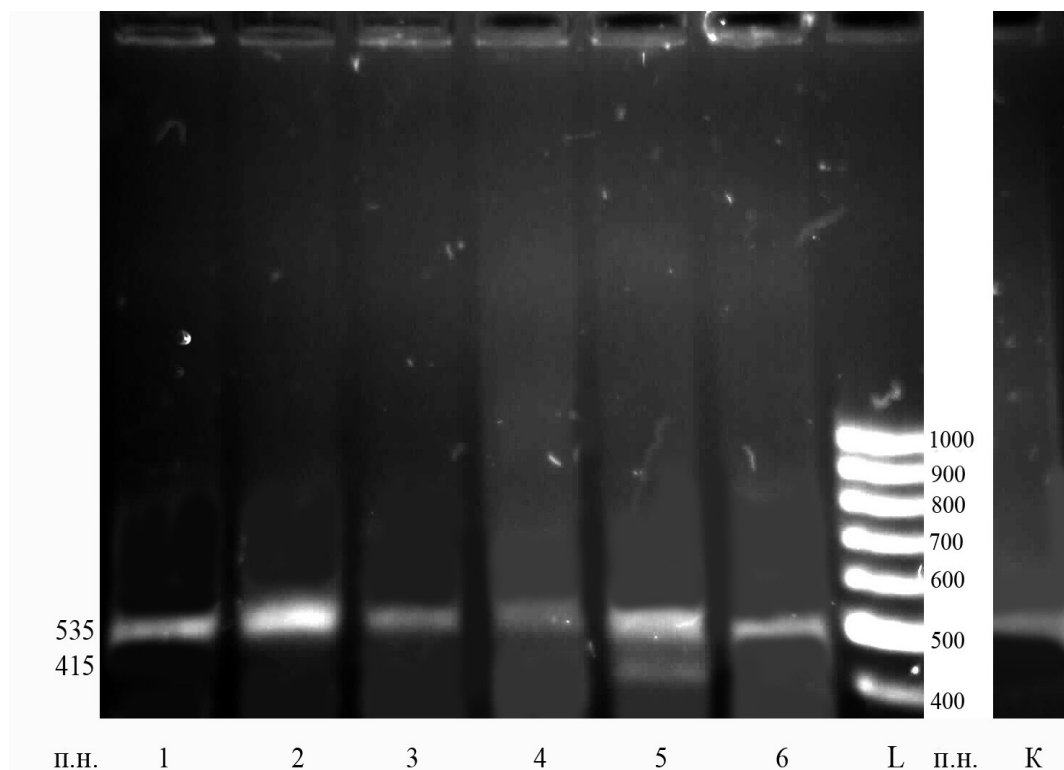
**Результаты и их обсуждение.** Среди разных методов поиска полиморфизма по наличию сайтов рестрикции в амплифицированных фрагментах нами было выбрано расщепление ISSR-ПЦР-продуктов, элюированных из агарозных гелей, шестью ферментами. Перед рестрикцией элюированные фрагменты подвергали обогащению через повторную амплификацию. Во избежание ошибочных заключений о полиморфизме было проведено 3-кратное повторение процедуры рестрикции.

При проведении сравнительного молекулярно-генетического анализа ряда сортов голубики мы выявили 110 ISSR-фрагментов, из них 25 (22,7 %) были общими для всех сортов. Для исследования были выбраны фрагменты, полученные с помощью праймера UBC 824, так как он выявил самый низкий полиморфизм – 70,8 % [7]. Также были выделены из геля и обработаны эндонуклеазами рестрикции мономорфные фрагменты, полученные с помощью праймеров UBC 808, 818 и 845. Маркеры, детектируемые у сортов голубики при амплификации ДНК с праймером UBC 867, мы не учитывали, так как он показал самую высокую долю полиморфных ISSR-фрагментов – 85,7 % [7].

В соответствии с техническими возможностями нашей лаборатории для выделения фрагментов ДНК из агарозного геля были протестированы различные методики, среди них: метод «ловчей лунки»; выделение ДНК после гомогенизации геля; выделение ДНК из геля с помощью жидкого азота; метод замораживания / оттаивания; метод элюции ДНК из агарозного геля с помощью центрифугирования [10, с. 153, 154]. Достаточно простым в применении, не требующим много времени, оказался последний из упомянутых методов. Он позволяет выделить одновременно много фрагментов ДНК любого размера.

Главной особенностью создания и использования CAPS-маркеров является то, что генетические изменения в нуклеотидной последовательности должны затрагивать сайты распознавания эндонуклеаз. Наглядно образец амплификации, у которого присутствует один сайт рестрикции, после обработки специфической эндонуклеазой будет представлен двумя фрагментами [4].

В ходе ISSR-ПЦР с праймером UBC 824 у шести сортов голубики нами наблюдался мономорфный фрагмент размером 535 п.н. Этот фрагмент для каждого сорта был элюирован, повторно амплифицирован и обработан по отдельности шестью эндонуклеазами. Электрофоретическое разделение показало продукт рестрикции *TaqI* размером 415 п.н. для сорта Northblue наряду с исходным фрагментом 535 п.н. (рисунок 1). Это обусловлено тем, что нуклеотидная последовательность фрагмента 535 п.н. для данного сорта, в отличие от других, имеет локус узнавания эндонуклеазой T↑CGA (AGC↓T). Поскольку после рестрикции остается как исходный фрагмент, так и появляется один дополнительный фрагмент меньшего размера, а также с учетом того, что CAPS маркеры являются кодоминантными и позволяют выявить оба аллеля, можно говорить о том, что гибрид Northblue является гетерозиготным, остальные пять сортов – растения с гомозиготными генотипами.

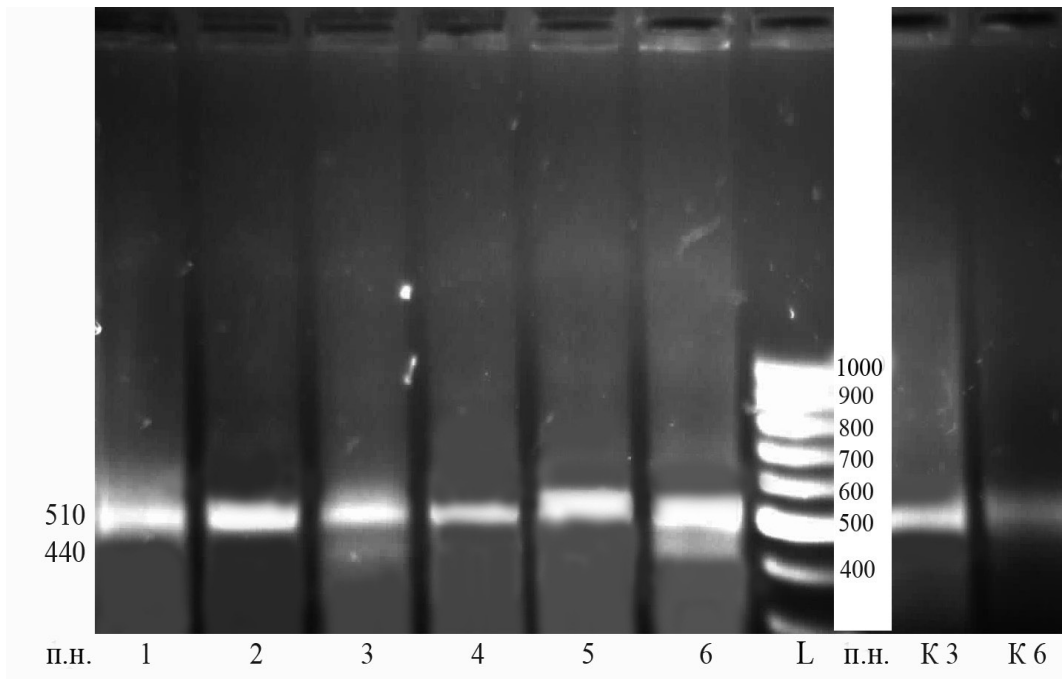


Пояснения: Для сортов голубики: 1 – Bluecrop; 2 – Northland; 3 – Reka; 4 – Denise blue; 5 – Northblue; 6 – Bluejaу. К – контроль. L – размерный стандарт (п.н.).

**Рисунок 1 – Электрофореграмма ISSR-фрагмента 535 п.н. (праймер UBC 824), обработанного эндонуклеазой *TaqI***

При обработке фрагмента 535 п.н. другими эндонуклеазами CAPS-полиморфизма не наблюдалось.

Точно так же фрагмент размером 510 п.н., полученный из ДНК шести сортов голубики с праймером UBC 808, был обработан каждой из перечисленных выше эндонуклеаз, после чего проводилось сопоставление продуктов электрофорезом в агарозном геле. В результате у сортов Reka и Bluejaу после обработки *TaqI* наблюдался один дополнительный фрагмент размером 440 п.н. (рисунок 2). Обработка фрагмента 510 п.н. остальными эндонуклеазами не показала видимых продуктов рестрикции.



Пояснения: Для сортов голубики: 1 – Bluecrop; 2 – Northland; 3 – Reka; 4 – Denise blue; 5 – Northblue; 6 – Bluejaу. К 3 – контроль Reka, К 6 – контроль Bluejaу. L – размерный стандарт (п.н.).

**Рисунок 2 – Электрофореграмма ISSR-фрагмента размером 510 п.н. (праймер UBC 808), обработанного эндонуклеазой *TaqI***

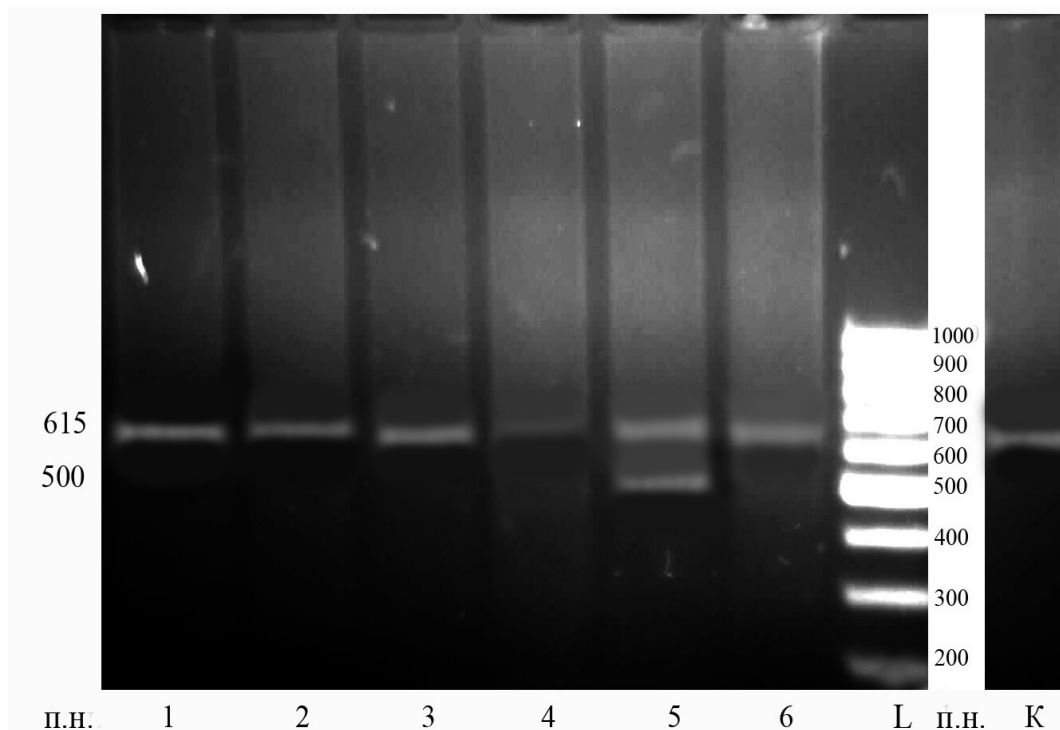
Полученный CAPS-маркер размером 440 п.н. мы рассматриваем как идентичный для сортов Reka и Bluejaу. Следует отметить, что в ходе кластерного анализа на основе ISSR-маркеров сорта Reka и Bluejaу попали в один кластер, из чего было сделано предположение о генотипическом сходстве их родительских форм [7]. Выявленный общий CAPS-маркер выступает дополнительным аргументом о близком родстве сортов. С данными сортами в одном кластере находился сорт Northblue, но данный CAPS-маркер у него не наблюдается. Сорт Northblue, в отличие от двух предыдущих, является гибридом *V. angustifolium* × *V. corymbosum*.

Обработка перечисленными эндонуклеазами фрагмента размером 445 п.н., полученного с помощью праймера UBC 808, для всех сортов не дала продуктов рестрикции.

Внутри фрагмента 300 п.н., полученного при ISSR-ПЦР с праймером UBC 818, CAPS-маркеры выявлены не были, что может объясняться его небольшой длиной, а значит, низкой вероятностью нахождения локусов узнавания эндонуклеазами *TaqI*, *HhaI*, *HinPII*, *HindIII*.

Следующим мономорфным ISSR-фрагментом, подвергнувшимся рестрикции под действием *HinPII*, был фрагмент 615 п.н., полученный с праймером UBC 818. Фрагмент

наблюдался у всех шести сортов голубики, а CAPS-маркер был выявлен у гибрида Northblue. Таким образом, на уровне нуклеотидного сиквенса фрагмент является полиморфным, и для сорта Northblue в его последовательности есть локус узнавания G $\uparrow$ CGC (GCG $\downarrow$ C). В процессе «разрезания» появляется CAPS-маркер размером 500 п.н. (рисунок 3).



Пояснения: Для сортов голубики: 1 – Bluecrop; 2 – Northland; 3 – Reka; 4 – Denise blue; 5 – Northblue; 6 – Bluejay. К – контроль. L – размерный стандарт (п.н.)5.

**Рисунок 3 – Электрофореграмма мономорфного ISSR-фрагмента размером 615 п.н. (примером UBC 818), обработанного эндонуклеазой *HinP1I***

Стоит отметить, что данный фрагмент мы не смогли гидролизировать эндонуклеазой рестрикции *HhaI* GCG $\uparrow$ C (C $\downarrow$ GCG), хотя она является изошизомером *HinP1I* и сайты узнавания у них идентичны. Можно предположить, что причиной может быть присутствие в мономорфном ISSR-фрагменте метилированного остатка цитозина. В литературе накоплено большое количество экспериментальных данных, свидетельствующих о том, что распространение микросателлитов и, в частности, их инвертированных повторов тесно связаны с перемещениями мобильных генетических элементов – ретротранспозонов [11]. Выявлено, что высокий уровень метилированных остатков цитозина в ДНК имеют центромерная и перицентромерная области гетерохроматина, а в особенности это касается транспозонов и ретроэлементов [12; 13]. В то же время накапливаются данные, свидетельствующие о том, что геномное распределение и полиморфизм микросателлитных локусов могут в существенной степени определяться не длиной элементарной единицы повтора, а ее коровым мотивом, а также могут быть ассоциированы с распространением отдельных видоспецифичных ретротранспозонов [11].

В литературе нет данных о способности рестриктазы *HinP1I* разрезать модифицированные основания, но доказано поразительное структурное сходство с мономерным ферментом рестрикции *MspI*, который расщепляет подобную сайту узнавания *HinP1I* палиндромную последовательность ДНК C $\downarrow$ CGG, не чувствителен к метилированию и очень часто применяется в методе метилчувствительной ПЦР (МЧ-ПЦР) у позвоночных [14–16].

Одной из областей применения этого же анализа для растений является исследование процессов метилирования у гибридов и клонов, а выявленный нами маркер наблюдался именно у межвидового гибрида Northblue.

Таким же путем были обработаны шестью эндонуклеазами характерные для всех сортов фрагменты, равные 505 п.н. и 705 п.н., полученные с помощью праймера UBC 845; 715 п.н. и 890 п.н., выявленные праймером UBC 824; 1060 п.н., детектируемый с праймером UBC 818, но CAPS-полиморфизм выявлен при этом не был.

Так как аллели – это различные варианты одного и того же молекулярного маркера, расположенные в одинаковых локусах гомологичных хромосом, которые отличаются по длине или по нуклеотидным заменам [17], то причиной появления CAPS-маркеров у отдельных сортов может быть однонуклеотидный полиморфизм (single nucleotide polymorphism, SNP). Очевидно, что чем выше частота изменений в изучаемых образцах, тем проще и удобнее разработать эффективный CAPS-маркер [4].

**Заключение.** Нам удалось разработать четыре CAPS-маркера для трех сортов голубики высокой. Полученные маркеры основаны на наличии четырехнуклеотидного локуса узнавания для эндонуклеаз. Эндонуклеазы, показавшие CAPS-маркеры, характеризуются повышенной частотой расщепления геномной ДНК. В результате CAPS-анализа предположительно мономорфные ISSR-фрагменты обнаруживают полиморфность на уровне нуклеотидных сиквенсов. Полученные таким образом кодоминантные маркеры можно использовать как дополнение при ISSR-типировании растений, для выявления генетического внутривидового и межвидового полиморфизма и для филогенетических исследований.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кудряшова, О. А. Физиолого-биохимические особенности действия брассиностероидов на процессы микрочлонального размножения голубики высокорослой *Vaccinium corymbosum* L. : дис. ... канд. биол. наук : 03.01.05 / О. А. Кудряшова. – Минск, 2015. – 176 с.
2. Трухоновец, Е. Н. Развитие рынка голубики в Полесском регионе / Е. Н. Трухоновец // Устойчивое развитие экономики: состояние, проблемы, перспективы : сб. тр. VII Междунар. науч.-практ. конф., Пинск, 18 окт. 2013 г. : в 2 ч. / Национальный банк Республики Беларусь [и др.] ; редкол.: К. К. Шебеко [и др.]. – Пинск : ПолесГУ, 2013. – Ч. 2. – С. 149–151
3. Кокаева, З. Г. Паспортизация сортов гороха посевного (*Pisum sativum* L.) / З. Г. Кокаева, А. В. Алешин // Доклады Московского общества испытателей природы. – 2010. – Т. 47. – С. 52–54.
4. Шавруков, Ю. Н. CAPS-маркеры в биологии растений / Ю. Н. Шавруков // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2015. – № 19 (2). – С. 19–34.
5. Калько, Г. В. ДНК-маркеры для оценки генетических ресурсов ели и сосны / Г. В. Калько // Труды Санкт-Петербургского научно-исследовательского института лесного хозяйства. – 2015. – № 4. – С. 205–213.
6. Сертификация сортов голубики высокой (*Vaccinium corymbosum* L.), районированных в Беларуси, на основе RAPD- и ISSR-маркеров / А. Б. Власова [и др.] // Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів. – 2010. – Т. 8, № 2. – С. 203–210.
7. Водчиц, Н. В. Применение ISSR-маркеров для генетической паспортизации и сертификации растений рода *Vaccinium* / Н. В. Водчиц // Весні НАН Беларусі. Серыя біял. навук. – 2016. – № 3. – С. 115–120.
8. Rapid DNA extraction from ferns for PCR-based analyses / E. L. Dempster [et al.] // Biotechnology. – 1999. – Vol. 27, No. 1. – P. 66–68.
9. Водчиц, Н. В. Сравнительный анализ методов экстракции общей геномной ДНК голубики высокорослой / Н. В. Водчиц [и др.] // Веснік Палескага дзяржаўнага ўніверсітэта. Серыя прыродазнаўчых навук. – 2014. – № 2. – С. 25–30.
10. Остерман, Л. А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: электрофорез и ультрацентрифугирование : практ. пособие / Л. А. Остерман. – М. : Наука, 1981. – 288 с.
11. Эркенов, Т. А. Генетическая структура и внутривидовая дифференциация карачаевской лошади : дис. ... канд. с.-х. наук : 06.02.07 / Т. А. Эркенов ; МСХА. – М., 2015. – 203 с.
12. Берестяная, А. Н. Анализ методов оценки метилирования остатков цитозина на примере ДНК монокарпического растения *Linum usitatissimum* / А. Н. Берестяная // Доповіді Національної академії наук України. – 2014. – № 6. – С. 133–139.
13. Ванюшин, Б. Ф. Эпигенетика сегодня и завтра / Б. Ф. Ванюшин // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2013. – Т. 17, № 4 (2). – С. 805–832.
14. Structure of *HinP1I* endonuclease reveals a striking similarity to the monomeric restriction enzyme *MspI* / Z. Yang [et al.] // Nucl. Acids Res. – 2005. – Vol. 33, No. 6. – P. 1892–1901.

15. Degenerate sequence recognition by the monomeric restriction enzyme: single mutation converts *BcnI* into a strand-specific nicking endonuclease / G. Kostiuk [et al.] // Nucl. Acids Res. – 2011. – Vol. 39, No. 9. – P. 3744–3753.

16. A histone methylation-dependent DNA methylation pathway is uniquely impaired by deficiency in *Arabidopsis* S-adenosylhomocysteine hydrolase / L. Mull [et al.] // Genetics. – 2006. – Vol. 174, No. 3. – P. 1161–1171.

17. Хлесткина, Е. К. Молекулярные маркеры в генетических исследованиях и в селекции / Е. К. Хлесткина // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2013. – Т. 17, № 4/2. – С. 1044–1054.

Поступила в редакцию 05.09.16.

“Vesnik of Yanka Kupala State University of Grodno. Series 5. Economics. Sociology. Biology”

Vol. 6, No. 3, 2016, pp. 132–139

© Yanka Kupala State University of Grodno, 2016

## The use of CAPS-analysis of ISSR-markers in typing of highbush blueberry cultivars

N. V. Vodchits <sup>1</sup>, E. O. Yurchenko <sup>2</sup>, A. A. Volotovich <sup>3</sup>

<sup>1</sup> *Polessky State University (Belarus)*

Dneprovskoi flotilii St., 23, 225710, Pinsk, Belarus; e-mail: vodna76@mail.ru

<sup>2</sup> *Polessky State University (Belarus)*

Dneprovskoi flotilii St., 23, 225710, Pinsk, Belarus; e-mail: eugene\_yu@tut.by

<sup>3</sup> *Polessky State University (Belarus)*

Dneprovskoi flotilii St., 23, 225710, Pinsk, Belarus; e-mail: volant777@tut.by

**Abstract.** In the introduction the object of the research – highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum*) – is briefly characterized and its perspectives of cultivation in Belarus are noted. The possibility of CAPS (cleaved amplified polymorphic sequences) analysis application to blueberry is introduced. The aim of the research is to disclose molecular polymorphism in isolated amplified ISSR-fragments of homogeneous size (presumably monomorphic) by CAPS-analysis in six blueberry cultivars. The main part includes description of the way of DNA extraction from young stems, the method of fragments purification by recovery from agarose gel, the conditions of ISSR-PCR (with primers UBC 808, 818, 824, 845) and restriction digest. The applied endonucleases are listed. The main data about ISSR markers frequency in a sample of blueberry cultivars are given. The results of CAPS procedure are introduced. Ten different ISSR-fragments are tested on the presence of restriction sites. Restriction digest by two restriction endonucleases is observed in three ISSR-PCR fragments. Three CAPS-markers are obtained, which distinguished three cultivars (Reka, Northblue and Bluejay) from other cultivars. It is noted that within a short length fragment (300 bp) CAPS-markers probably due to the small size are not easy to detect. Electrophoretic profiles of the ISSR-fragments for six blueberry cultivars, before and after restriction digests, are given. The additional data on genetic similarity between cultivars Reka и Bluejay, based on CAPS markers, are discussed. The results can be used as an addition in molecular identification and certification of *Vaccinium corymbosum* cultivars, and in phylogenetic studies.

**Keywords:** ISSR-PCR, primer, CAPS-marker, restriction endonuclease, restriction site.

## References

1. Kudriashova O. A. Physiological and biochemical features of brassinosteroid effects on micropropagation processes of highbush blueberry *Vaccinium corymbosum* L. [*Fiziologo-biokhimicheskie osobennosti deistviia brassinosteroidov na protsessy mikroklonal'nogo razmnozheniia golubiki vysokorosloi Vaccinium corymbosum* L. : dis. ... kand. biol. nauk]. Minsk, 2015, 176 p.

2. Trukhonovets E. N. The development of the blueberry market in the Polesie region [*Razvitie rynka golubiki v Polesskom regione*]. *Ustoichivoe razvitie ekonomiki: sostoianie, problemy, perspektivy* : sb. tr. VII Mezhdunar. nauch.-prakt. konf., Pinsk, 18 okt. 2013 g. : v 2 ch.; ed. board: K. K. Shebeko [et al.]. Pinsk, 2013, part 2, pp. 149-151.

3. Kokaeva Z. G., Aleshin A. V. Certification of varieties of pea (*Pisum sativum* L.) [*Pasportizatsiia sortov gorokha posevnogo (Pisum sativum L.)*]. *Doklady Moskovskogo obshchestva ispytatelei prirody*, 2010, vol. 47, pp. 52-54.

4. Shavrukov Yu. N. CAPS-markers in plant biology [*CAPS-markery v biologii rastenii*]. *Vavilovskii zhurnal genetiki i seleksii*, 2015, No. 19 (2), pp. 19-34.

5. Kalko G. V. The DNA markers for exploring of genetic resources of pruce and pine [DNK-markery dlia otsenki geneticheskikh resursov eli i sosny]. *Trudy Sankt-Peterburgskogo nauchno-issledovatel'skogo instituta lesnogo khoziaistva*, 2015, No. 4, pp. 205-213.
6. Vlasova A. B. [et al.]. Certification of highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) cultivars, released in Belarus, on the basis of RAPD-and ISSR-markers [Sertifikatsiia sortov golubiki vysokoi (*Vaccinium corymbosum* L.), raionirovannykh v Belarusi, na osnove RAPD- i ISSR-markerov]. *Visn. Ukr. tov-va henetykiv i seleksioneriv*, 2010, vol. 8, No. 2, pp. 203-210.
7. Vodchits N. V. The assessment of ISSR-markers application to genetic typing and certification of *Vaccinium* plants [Primenenie ISSR-markerov dlia geneticheskoi pasportizatsii i sertifikatsii rastenii roda *Vaccinium*]. *Vestsi NANB. Seryia biial. navuk*, 2016, No. 3, pp. 115-120.
8. Dempster E. L. [et al.]. Rapid DNA extraction from ferns for PCR-based analyses. *Biotechnology*, 1999, vol. 27, No. 1. pp. 66-68.
9. Vodchits N. V. [et al.]. Comparative analysis of methods of highbush blueberry general genomic DNA extraction [Sravnitel'nyi analiz metodov ekstraktsii obshchei genomnoi DNK golubiki vysokorosloi]. *Vesnik Paleskaha dziarzhavnaha universiteta. Seryia pryrodaznauchnykh navuk*, 2014, No. 2, pp. 25-30.
10. Osterman L. A. Methods of study of proteins and nucleic acids: electrophoresis and ultracentrifugation [Metody issledovaniia belkov i nukleinovyykh kislot: elektroforez i ul'tratsentrifugirovanie : prakt. posobie]. Moscow, 1981, 288 p.
11. Erkenov T. A. Genetic structure and differentiation within Karachai horses [Geneticheskaiia struktura i vnutriporodnaia differentsiatsiia karachaevskoi loshadi : dis. ... kand. sel'skokhoz. nauk]. Moscow, 2015, 203 p.
12. Berestianaya A. N. The analysis of methods for assessing the methylation of cytosine residues in the DNA sample of monocarpic plant *Linum usitatissimum* [Analiz metodov otsenki metilirovaniia ostatkov tsitozina na primere DNK monokarpicheskogo rasteniia *Linum usitatissimum*]. *Dopovidi Natsionalnoi akademii nauk Ukrainy*, 2014, No. 6, pp. 133-139.
13. Vaniushin B. F. Epigenetica today and tomorrow [Epigenetika segodnia i zavtra]. *Vavilovskii zhurnal genetiki i seleksii*, 2013, vol. 17, No. 4 (2), pp. 805-832.
14. Yang Z. [et al.]. Structure of *HinPII* endonuclease reveals a striking similarity to the monomeric restriction enzyme *MspI*. *Nucl. Acids Res.*, 2005, vol. 33, No. 6, pp. 1892-1901.
15. Kostiuk G. [et al.]. Degenerate sequence recognition by the monomeric restriction enzyme: single mutation converts *BcnI* into a strand-specific nicking endonuclease. *Nucl. Acids Res.*, 2011, vol. 39, No. 9, pp. 3744-3753.
16. Mull L. [et al.]. A histone methylation-dependent DNA methylation pathway is uniquely impaired by deficiency in *Arabidopsis* S-adenosylhomocysteine hydrolase. *Genetics*, 2006, vol. 174, No. 3, pp. 1161-1171.
17. Khlestkina E. K. Molecular markers in genetic studies and breeding [Molekuliarnye markery v geneticheskikh issledovaniakh i v seleksii]. *Vavilovskii zhurnal genetiki i seleksii*, 2013, vol. 17, No. 4/2, pp. 1044-1054.



Уважаемые авторы!

Болеe подробно требования к оформлению материалов, а также условия для  
принятия материалов см. на сайте журнала

<http://vesnik.grsu.by>