

УДК 582.912.46: 577.213.3/575.22

СЕРТИФИКАЦІЯ СОРТОВ ГОЛУБИКИ ВИСОКОЇ (*VACCINIUM CORYMBOSUM* L.), РАЙОНІРОВАНИХ В БЕЛАРУСИ, НА ОСНОВЕ RAPD- І ISSR-МАРКЕРОВ

А.Б. ВЛАСОВА, А.Н. ЮХИМУК, Е.В. СПИРИДОВИЧ., В.Н. РЕШЕТНИКОВ

Центральный ботанический сад Национальной академии наук Беларуси
Беларусь, 220012, г. Минск, ул. Сурганова 2В
e-mail: nastasia_vlasova@nm.ru

Предпринят RAPD+ISSR подход для генотипирования сортов голубики высокой (*V. corymbosum*) с целью дифференциации генотипов. Для семи районированных в РБ сортов голубики высокой составлены генотипические паспорта на основе использования RAPD+ISSR анализа, которые могут служить эталонами при проведении сертификации посадочного материала и коллекций культуры *in vitro*. Использование прибора Bioanalyzer-2100 позволяет стандартизировать получение и обработку результатов, повысить разрешающую способность и сопоставимость данных, что важно при поточной сертификации образцов голубики высокой.

Ключевые слова: голубика высокая, *Vaccinium corymbosum* L., сорта, генетическая дифференциация, генетические сертификаты, RAPD, ISSR, маркеры.

Введение. Голубика высокая (*Vaccinium corymbosum* L.) является ценной ягодной культурой, имеющей длительную историю использования в пищевых и лекарственных целях. Благодаря уникальному комплексу антоцианов, пектинов, флавоноидов, витамина С, голубика высокая является превосходным источником антиоксидантов, применяется как бактерицидное, противовоспалительное средство, для снижения уровня холестерина, лечения ревматоидных болезней [1, 2].

Культура голубики высокой является коммерчески важной и успешно возделывается в странах Северной Америки и Европы [2]. Существует большое разнообразие сортов голубики высокой (около двухсот), в основном селекции США, а также Германии, Польши и др. Работа по интродукции культуры в Беларуси начата в Центральном ботаническом саду НАН Беларуси (ЦБС НАНБ) в 80-х годах прошлого столетия [3]. В ЦБС НАН Беларуси поддерживается коллекция из 40 сортов голубики, в том числе микроклонально размноженного материала.

В связи с высокой актуальностью культуры, возникновением нового направления – промышленного голубиководства, а также высокой востребованностью и эффективностью фармакологических субстанций из растительного сырья голубики, стоит задача четкой сертификации сортности коллекционного и посадочного материала и коллекций *in vitro* на основе современных молекулярно-биологических и генетических методов, разработки методологии проведения анализа и его стандартизации. Создание генетического паспорта сорта является стратегической необходимостью при оценке качества растительного материала: подтверждения сортности, стабильности генотипа при микроклональном размножении и т.д.

© А.Б. ВЛАСОВА, А.Н. ЮХИМУК, Е.В. СПИРИДОВИЧ., В.Н. РЕШЕТНИКОВ, 2010

Молекулярные методы на основе ДНК-фингерпринтинга на сегодняшний день занимают лидирующее положение в области идентификации и сертификации сортов различных культур растений [4]. Для видов *Vaccinium* предпринят ряд филогенетических исследований на основе использования молекулярно-генетических маркеров, в том числе для распознавания сортов культур. С использованием RAPD-маркеров было произведено дифференцирование сортов и диких форм *Vaccinium* [5 – 8], а также опубликована карта сцепления диких диплоидных видов рода [9]. Для голубики высокой были проведены исследования по идентификации сортов с помощью произвольных праймеров [8], разработаны микросателлитные (SSR) маркеры на основе EST-локусов для этой культуры [10] и проведена SSR-сертификация сортов [11].

Для исследований межсортового полиморфизма, выявления генетического сходства/отдаленности генотипов сортов с целью их дифференцирования нами был выбран комплексный подход совместного использования двух методик, основанных на RAPD- (Random Amplified Polymorphic DNA) и ISSR- (Inter Simple Sequence Repeats) ПЦР. Это продиктовано очевидными преимуществами данных методов и совместного использования двух маркерных систем, которое позволяет значительно расширить зоны покрытия, получить генетические маркеры в двух независимых срезах. Цель данного исследования состояла в разработке и стандартизации комплексного RAPD+ISSR генотипирования сортов голубики высокой, внесенных в государственный реестр РБ, создании их уникальных RAPD+ISSR сертификатов.

Материалы и методы

Для выделения ДНК навеску свежих листьев (100 мг) использовали немедленно либо замораживали и хранили в кельвинаторе «REVCO ULT-390» при -80°C . ДНК

изолировали методом СТАВ [12], при этом из листьев 9 растений каждого сорта формировали 3 объединенных образца (повторности).

В ходе исследований были оптимизированы условия проведения RAPD- и ISSR-ПЦР. ПЦР проводили в 25 μl смеси, содержащей 1 \times ПЦР буфер (PrimeTech, Беларусь), 100 μM каждого dNTP (PrimeTech, Беларусь), 20 пМ праймера (PrimeTech, Беларусь), 50 нг ДНК, 1 ед. (для RAPD) или 2 ед. (для ISSR) Taq ДНК полимеразы (PrimeTech, Беларусь). Реакцию проводили в термоциклере Mastercycle Personal (Eppendorf). Для RAPD-ПЦР устанавливали следующие режимы: 96 $^{\circ}\text{C}$ 5 мин; 40 циклов: 94 $^{\circ}\text{C}$ 1 мин, (Tm–3 $^{\circ}\text{C}$) 45 с, 72 $^{\circ}\text{C}$ 2 мин; 72 $^{\circ}\text{C}$ 7 мин. ISSR-ПЦР проводили следующим образом: 94 $^{\circ}\text{C}$ 5 мин; 40 циклов: 94 $^{\circ}\text{C}$ 1 мин, (Tm–3 $^{\circ}\text{C}$) 1 мин, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 мин; 72 $^{\circ}\text{C}$ 5 мин. Список использованных праймеров для обнаружения генотипической вариабельности между сортами голубики высокой приведен в табл. 1.

Электрофоретическое разделение и визуализацию ампликонов осуществляли с использованием прибора 2100 Bio-analyzer (Agilent). Обработку полученных данных проводили по стандартным протоколам с использованием пакетов специализированного программного обеспечения 2100 Expert (Agilent), Treecon.

Результаты и обсуждение

Для обнаружения генетической вариабельности и с целью выявления взаимосвязей между семью сертифицированными сортами голубики высокой был проведен скрининг ряда праймеров. Три RAPD и два ISSR праймера были отобраны после первичного скрининга, как выявляющие наибольший полиморфизм между исследованными генотипами голубики высокой, которые и были использованы в настоя-

щей работе. Данные о характеристиках праймеров представлены в табл. 1. Все использованные праймеры (табл. 1) позволили получить четкие воспроизводимые ампликоны, набор которых для каждого исследуемого сорта характеризовался уникальностью, т. е. праймеры обнаруживали полиморфизм между сортами и таким образом позволили дифференцировать все генотипы. На рис. 1 представлено разделение ампликонов геномной ДНК сортов *V. corymbosum* с произвольным праймером OPA-08, проведенное на при-

боре Bioanalyzer-2100. Прибор Bioanalyzer-2100 позволяет быстро, с высокой точностью разделять фрагменты, получать воспроизводимые и сопоставимые данные.

Всего было сгенерировано 46 дискретных RAPD-маркеров (в среднем 15 маркеров на праймер) и 40 ISSR-маркеров (20 маркеров на праймер). Число амплифицированных фрагментов варьировало от 13 (с праймером OPA-08) до 19 (OPA-09). ISSR праймерами было сгенерировано по 20 ампликонов. RAPD и ISSR-маркеры об-

Таблица 1. Список произвольных и микросателлитных праймеров, использованных для генотипирования коллекции сортов голубики высокой (*V. corymbosum*)

№	Праймер	Последовательность, 5'→3'	Tm, °C	MW, Da	% GC
RAPD					
1	OPA-08	GTGACGTAGG	32	3108,1	60
2	OPA-09	GGGTAACGCC	34	3053,0	70
3	OPA-20	GTTGCGATCC	32	3019,0	60
ISSR					
4	UBC-818	CACACACACACACACAG	53	5086,4	53
5	UBC-824	TCTCTCTCTCTCTCTCG	53	5014,3	53

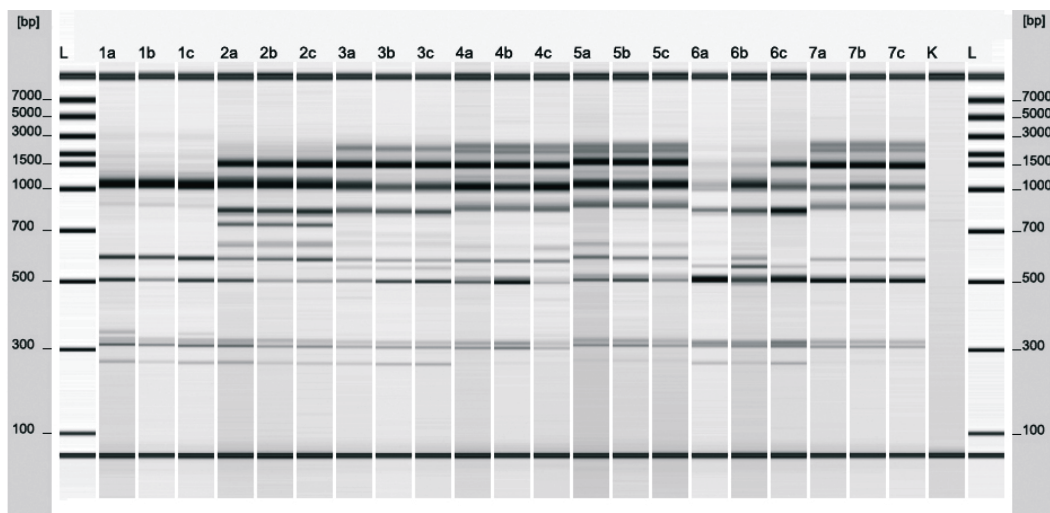


Рис. 1. Разделение ампликонов геномной ДНК сортов *V. corymbosum* с произвольным праймером OPA-08 на Bioanalyzer-2100. Сорта: 1 – Bluecrop; 2 – Elisabeth; 3 – Earlyblue; 4 – Northland; 5 – Duke; 6 – Patriot; 7 – Bluetta. Обозначения: а, b, с – повторности. К – контроль, L – стандарт длин фрагментов (bp)

ладали размерами в областях 270-2500 пн и 225-1775 пн, соответственно. Праймерами OPA-09, OPA-20 и UBC-818 обнаружили 100 % полиморфизм между проанализированными сортами, что и позволило различить все генотипы. Данные о спектрах ампликонов сортов *V. corymbosum*, полученных с помощью RAPD и ISSR праймеров приведены в табл. 2. Все использованные RAPD и ISSR праймеры позволили разработать генотип-специфические (уникальные) маркеры (табл. 2). Праймеры OPA-20 и UBC-824 были наиболее эффективными для получения сорт-специфических маркеров. Разработанные сорт-специфические маркеры могут послужить основой для создания SCAR-маркеров и маркирования генов биосинтеза вторичных метаболитов культуры.

Коэффициенты подобия Nei & Li были рассчитаны для семи генотипов *V. corymbosum* на основе ISSR- и RAPD-анализов, как по отдельности, так и совместно (RAPD+ISSR) [13]. Дистанционные матрицы на основе рассчитанных RAPD- и ISSR (RAPD+ISSR)- маркеров для сортов голубики (данные не представлены) были использованы для построения дендрограмм по методу UPGMA, которые представлены на рис. 2, а и 2, б, соответственно.

Основываясь на данных RAPD-анализа, коэффициенты сходства между сортами

варьировали от 0,15 (между *Bluetta/Northland* и *Bluetta/Duke*) до 0,5 (между *Bluetta* и *Patriot*, данные не представлены). В полученной RAPD-дендрограмме генотипы сформировали 2 основных кластера (обозначены на рис. 2, а как А и В): кластер А включает все генотипы, кроме *Bluecrop*, и разделяется еще на два субкластера (А1 и А2). Коэффициенты сходства между сортами голубики высокой на основании ISSR-анализа варьировали от 0,09 (между *Duke/Northland* и *Bluetta/Northland*) до 0,66 (между *Bluetta* и *Earlyblue*, данные не представлены). Согласно полученным данным сорта кластеризовались в 2 группы (А и В), см. рис. 2, б. Кластер А включал сорта *Northland*, *Duke* и *Bluetta* (объединенные в субкластер А1) и сорт *Elisabeth* (субкластер А2). Кластер В объединял *Earlyblue* (субкластер В2), а также *Bluecrop* и *Patriot* (субкластер В1).

Поскольку дендрограммы, основанные на данных RAPD- и ISSR-анализа, показали довольно схожую кластеризацию генотипов голубики высокой ($r = 0,908$), данные были объединены, и получена сводная RAPD+ISSR-матрица (данные не представлены). Используя UPGMA алгоритм, была построена консенсусная дендрограмма (RAPD+ISSR), представленная на рис. 3. В соответствии с RAPD+ISSR-дендрограммой была уточнена и детали-

Таблица 2. Характеристика спектров ампликонов сортов *V. corymbosum*, полученных с помощью RAPD и ISSR праймеров

Праймер	Число маркеров	Длина фрагментов, пн	Число фрагментов на образец (min/max/средн.)	Число полиморфных маркеров/ % полиморфизма	Число уникальных маркеров	Число идентичных генотипов
RAPD						
OPA-08	13	340-2480	3/9/6,9	10/76,9	3	2
OPA-09	19	310-1475	7/11/9,57	17/84,5	5	0
OPA-20	14	300-2015	5/9/6,85	12/85,7	4	0
ISSR						
UBC-818	20	225-1775	6/11/8,86	18/90	7	0
UBC-824	20	405-1775	7/9/7,43	19/95	9	2

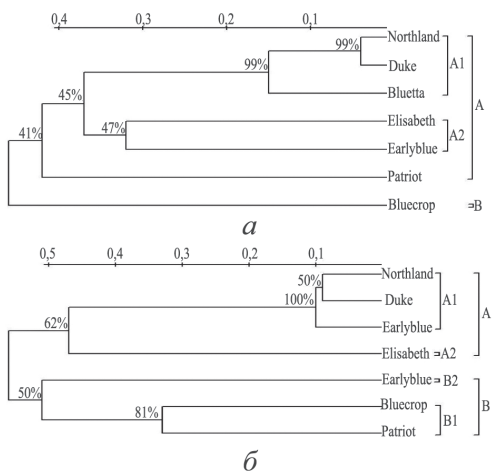


Рис. 2. Дендрограмма, отражающая степень генетического сходства сортов *V. corymbosum*, на основании UPGMA кластерного анализа, используя коэффициент Nei & Li: а – RAPD; б – ISSR. Горизонтальная шкала позволяет определить дистанцию между сортами. Числа под ветвями отражают величины поддержки, основанные на 2000 реплик Bootstrap анализа

зирована кластеризация генотипов, полученная на основе RAPD- и ISSR-данных в отдельности. В целом распределение ветвей в RAPD+ISSR-дендрограмме повторяет таковое в ISSR-дендрограмме, и сходно с дендрограммой на основе RAPD-маркеров. Были получены большие величины поддержки ветвей, по сравнению с данными RAPD или ISSR-анализов для Duke/Northland. Разница между RAPD и ISSR-дендрограммами заключалась в следующем. На RAPD-дендрограмме сорт Bluecrop располагается отдельной ветвью В (рис. 2, а), и коэффициент генетической дистанции этого сорта от других сортов составил от 0,42 до 0,47. Тогда как по данным ISSR-анализа кластеризуется вместе с сортом 'Patriot' (коэффициенты генетической дистанции Bluecrop/Patriot 0,33). Сорт Elisabeth также по-разному кластеризовался по данным RAPD и ISSR: в первом случае располагался в субкластере А2 вместе с Earlyblue (рис. 2, а), во втором

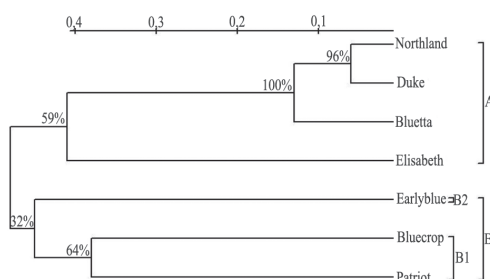


Рис. 3. Консенсусная дендрограмма, сгенерированная с использованием UPGMA алгоритма и генетических дистанций Nei & Li на основе 46 RAPD и 40 ISSR-маркеров. Горизонтальная шкала позволяет определить дистанцию между сортами. Числа под ветвями отражают величины поддержки, основанные на 2000 реплик Bootstrap анализа

случае – отдельной ветвью в кластере А (рис. 2, б).

Поскольку произвольные последовательности и простые повторы, использованные в качестве зондов при анализе, сканируют различные участки генома, то мы считаем, что объединение данных двух анализов детализирует RAPD- и ISSR-результаты. Поэтому данные кластеризации сортов Bluecrop, Patriot, Earlyblue и Elisabeth в RAPD+ISSR-дендрограмме принимаем как уточненные.

На основании полученных данных RAPD, ISSR и RAPD+ISSR и проведенного кластерного анализа были получены данные о генетическом родстве исследованных генотипов голубики высокой. Можно предположить, что сорта Northland и Duke, а также Bluetta и Elisabeth имеют сходные родительские формы, использованные при селекции. Отдельно отстоящие сорта Bluecrop и Patriot, наиболее родственные между собой, а также Earlyblue, вероятно, имеют в своих родословных общую предковую форму. Величины Bootstrap анализа, показывающие относительную поддержку кластеров, варьировали от 100 % до 32 %. Требуется включение еще нескольких праймеров для повышения разрешающей способности анализа.

Выводы

В результате проведенного исследования были разработаны протоколы проведения реакций амплификации с произвольными и микросателлитными праймерами. Использование прибора Bioanalyzer 2100 позволяет стандартизировать получение и обработку результатов, повысить разрешающую способность и сопоставимость данных, что важно при поточной сертификации образцов голубики высокой. Комплексный RAPD+ISSR-подход позволил достоверно дифференцировать все исследованные генотипы (сорта) голубики высокой, которые в настоящее время районированы в Республике Беларусь и внесены в Госреестр сортов и древесно-кустарниковых пород РБ. Показано, что, наряду с морфологической дифференциацией, генотипирование является полезным инструментом для достоверной и надежной оценки генотипов *Vaccinium corymbosum*, может быть использовано для распознавания уникальных генотипов и проведения дальнейшей направленной селекции. Генотипические сертификаты, полученные с помощью RAPD- и ISSR-праймеров для сортов голубики высокой (табл. 3), будут служить основой для проведения четкой сертификации сортности посадочного материала и коллекций *in vitro*. Разработанные уникальные спектры для каждого сорта (паспорта) можно использовать как эталоны для проведения идентификации образцов и подтверждения сортности культуры.

Список литературы

1. Ehlenfeldt M.K., Prior R.L. Oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and phenolic and anthocyanin concentrations in fruit and leaf tissues of highbush blueberry// J. Agric. Food Chem. – 2001. –Vol. 49. – P. 2222–2227.
2. Prodorutti D., Pertot I., Giongo L., Gessler C. Highbush Blueberry: Cultivation, Protection, Breeding and Biotechnology// The European Journal of

- Plant Science and Biotechnology. –2007. –Vol. 1, № 1. – P. 44–56.
3. Курлович Т.В. Босак В.Н. Голубика высокорослая в Беларуси // Нац. акад. наук Беларуси. Центр. ботан. сад. – Минск: Беларус. навука. – 1998. – 176 с.
4. Weising K., Nybom H., Wolff K., Kahl G. Application of DNA fingerprinting in Plant Science / In: DNA fingerprinting in plants: principles, methods, and applications. – Boca Raton: CRC Press., 2005. – P. 235–276.
5. Levi A., Rowland L.J., Hartung, J.S. Production of reliable randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) markers from DNA of woody plants// Plant genetics and breeding. – 1993. – Vol. 28, №12. – P. 1188–1190.
6. Burgher K.L., Jamieson A.R. Lu X.-V. Genetic relationships among lowbush blueberry genotypes as determined by randomly amplified polymorphic DNA analysis // Journal of the American Society for Horticultural Science. – 2002. –Vol. 127. – P. 98–103.
7. Debnath S.C. Differentiation of Vaccinium cultivars and wild clones using RAPD markers// Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology. – 2005. – Vol. 14. – P. 173–177.
8. Arce-Johnson P., Rios M., Zúñiga M., Vergara E. Identification of blueberry varieties using random amplified polymorphic DNA markers// Acta Hort. (ISHS). – 2002. – Vol. 574. – P. 221–224.
9. Rowland L. J. and Levi A. RAPD-based genetic linkage map of blueberry derived from a cross between diploid species (*Vaccinium darrowii* and *V. elliotii*) // TAG. – 1994. – Vol. 87, № 7. – P. 863–868.
10. Boches P.S., Bassil N.V., Rowland L.J. Microsatellite markers for Vaccinium from EST and genomic libraries // Molecular Ecology Notes. – 2005. –Vol. 5. – P. 657–660.
11. Bassil N., Oda A., Hummer K.E. Blueberry microsatellite markers identify cranberry cultivars // Acta Hort. (ISHS). – 2009. –Vol. 810. – P. 181–187.
12. Dempster E.L., Pryor K.V., Francis D., Young J. E., Rogers H.J. Rapid DNA extraction from ferns for PCR-based analyses // Biotechnique. – Vol. 27, № 1. – 1999. – P. 66–68.
13. Nei M., Li W.-H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases // Proc. Natl. Acad. Sci. – 1979. – Vol. 76. P. 5269–5273.

Представлена Е.Н. Тищенко
Поступила 5.10.2010

Таблица 3. Генотипические сертификаты сортов голубики высокой на основании RAPD- и ISSR-локусов

Сорта	Пример/локусы			
	OPA-08	OPA-09	OPA-20	UBC-818
Bluestop	OPA08 ₃₁₀ ³²⁵ OPA08 ₅₀₅ ⁵⁹⁰ OPA08 ₁₀₇₅	OPA09 ₃₂₅ ⁴³⁵ OPA09 ₇₁₅ ⁶⁵⁰ OPA09 ₈₈₅ ⁸²⁵ OPA09 ₁₀₈₀	OPA20 ₅₁₀ ⁵⁴⁰ OPA20 ₆₅₅ ⁶⁷⁵ OPA20 ₈₀ ⁸⁸⁵ OPA20 ₁₁₂₀ ¹⁴¹⁵	UBC818 ₂₂₅ ³⁰⁰ UBC818 ₃₇₅ ⁴⁶⁵ UBC818 ₅₃₀ ⁶¹⁵ UBC818 ₆₆₀ ¹²¹⁰ UBC818 ₁₇₇₅
Elisabeth	OPA08 ₃₁₀ ³²⁵ OPA08 ₅₀₅ ⁵⁹⁰ OPA08 ₆₄₅ ⁷⁴⁵ OPA08 ₈₄₅ ¹⁰⁷⁵ OPA08 ₁₅₁₅	OPA09 ₃₃₅ ⁵⁰⁰ OPA09 ₅₃₀ ⁵⁹⁰ OPA09 ₆₅₀ ⁶⁶⁵ OPA09 ₈₂₅ ⁸⁶⁰ OPA09 ₉₈₅ ⁹²⁵	OPA20 ₆₅₅ ⁶⁷⁵ OPA20 ₈₂₀ ⁹²⁰ OPA20 ₈₈₅ ¹²¹⁰ OPA20 ₁₄₁₅ ²⁰¹⁵	UBC824 ₄₄₀ ⁵²⁵ UBC824 ₆₄₅ ⁶⁶⁰ UBC824 ₉₁₅ ⁹⁸⁰ UBC824 ₁₃₅₀ ¹⁴⁸⁵
Earlyblue	OPA08 ₃₁₀ ³²⁵ OPA08 ₅₀₅ ⁵⁹⁰ OPA08 ₆₄₅ ⁷⁰⁵ OPA08 ₁₅₁₅ ²³²⁰	OPA09 ₃₀₀ ⁵³⁰ OPA09 ₃₆₅ ⁵⁹⁰ OPA09 ₆₀₅ ⁶⁵⁰ OPA09 ₆₈₅ ⁸²⁵ OPA09 ₈₆₀ ¹⁴⁷⁵	OPA20 ₄₄₀ ⁵⁵⁵ OPA20 ₆₇₅ ⁷⁰⁰ OPA20 ₈₂₀ ¹¹²⁰ OPA20 ₁₄₁₅	UBC824 ₄₄₀ ⁵²⁵ UBC824 ₅₆₅ ⁶³⁰ UBC824 ₆₈₅ ⁸²⁰ UBC824 ₁₀₃₀ ¹²²⁰ UBC824 ₁₆₅₅
Northland	OPA08 ₃₁₀ ³²⁵ OPA08 ₅₀₅ ⁵⁹⁰ OPA08 ₈₇₅ ¹⁰⁷⁵ OPA08 ₁₅₁₅ ²²⁰⁵ OPA08 ₂₄₈₀	OPA09 ₃₂₅ ⁵⁰⁰ OPA09 ₅₃₀ ⁵⁸⁵ OPA09 ₅₉₀ ⁶⁰⁵ OPA09 ₆₅₀ ⁶⁶⁵ OPA09 ₈₆₀	OPA20 ₅₁₀ ⁵⁵⁵ OPA20 ₈₂₀ ⁹⁸⁵ OPA20 ₁₁₂₀	UBC824 ₄₄₀ ⁵²⁵ UBC824 ₆₇₀ ⁸¹⁵ UBC824 ₉₉₀ ¹³⁵⁰ UBC824 ₁₆₅₅
Duke	OPA08 ₃₁₀ ³²⁵ OPA08 ₅₀₅ ⁵⁹⁰ OPA08 ₈₇₅ ¹⁰⁷⁵ OPA08 ₁₅₁₅ ²²⁰⁵ OPA08 ₂₄₈₀	OPA09 ₃₂₅ ⁵⁰⁰ OPA09 ₅₃₀ ⁵⁸⁵ OPA09 ₅₉₀ ⁶⁵⁰ OPA09 ₈₈₅ ⁷⁴⁵ OPA09 ₈₆₀	OPA20 ₅₁₀ ⁵⁵⁵ OPA20 ₈₂₀ ⁹⁸⁵ OPA20 ₁₁₂₀ ²⁰¹⁵	UBC824 ₄₄₀ ⁵²⁵ UBC824 ₆₇₀ ⁸¹⁵ UBC824 ₉₉₀ ¹³⁵⁰ UBC824 ₁₆₅₅
Patriot	OPA08 ₅₀₅ ⁵⁹⁰ OPA08 ₁₀₇₅	OPA09 ₃₂₅ ⁴⁷⁵ OPA09 ₅₀₀ ⁵³⁰ OPA09 ₅₉₀ ⁶⁰⁵ OPA09 ₆₅₀ ⁶⁶⁵ OPA09 _{745⁸²⁵ OPA09₁₀₈₀}	OPA20 ₄₄₀ ⁵⁵⁵ OPA20 ₈₂₀ ¹¹²⁰ OPA20 ₂₀₁₅	UBC824 ₄₀₅ ⁴⁴⁰ UBC824 ₅₂₅ ⁵⁴⁵ UBC824 ₆₃₀ ⁹¹⁵ UBC824 ₁₆₅₅
Bluetta	OPA08 ₃₁₀ ³²⁵ OPA08 ₅₀₅ ⁵⁹⁰ OPA08 ₈₇₅ ¹⁰⁷⁵ OPA08 ₁₅₁₅ ²²⁰⁵ OPA08 ₂₄₈₀	OPA09 ₃₁₀ ³²⁵ OPA09 ₅₀₀ ⁵³⁰ OPA09 ₅₆₅ ⁵⁹⁰ OPA09 ₆₁₅ ⁶⁵⁰ OPA09 ₆₆₅ ⁷⁴⁵ OPA09 ₈₆₀	OPA20 ₃₀₀ ⁵¹⁰ OPA20 ₅₅₅ ⁶⁷⁵ OPA20 ₈₆₀ ⁸²⁰ OPA20 ₉₈₅ ¹¹²⁰ OPA20 ₂₂₅₀	UBC824 ₄₄₀ ⁵²⁵ UBC824 ₆₇₀ ⁸¹⁵ UBC824 ₉₉₀ ¹³⁵⁰ UBC824 ₁₇₇₅

Примечание. Жирным шрифтом обозначены уникальные для генотипа локусы; курсивом – встречаемые у всех генотипов локусы.

СЕРТИФІКАЦІЯ СОРТІВ БУЯХІВ ВИСОКИХ
(*VACCINIUM CORYMBOSUM* L.),
РАЙОНОВАНИХ У БІЛОРУСІ НА ОСНОВІ
RAPD- І ISSR-МАРКЕРІВ

А.Б. Власова, А.Н. Юхимук, Е.В. Спиридович,
В.Н. Решетников

Центральний ботанічний сад Національної академії наук Білорусі
Білорусь, 220012, Мінськ, вул. Сарганова, 2В
e-mail: nastasia_vlasova@nm.ru

Застосовано RAPD+ISSR підхід для генотипування сортів буяхів високих (*V. corymbosum*) з метою диференціації генотипів. Для семи районованих у РБ сортів буяхів високих складені генотипні паспорти на основі використання RAPD+ISSR-аналізу, які можуть служити еталонами при проведенні сертифікації посадкового матеріалу й колекцій культури *in vitro*. Використання приладу Bioanalyzer-2100 дозволяє стандартизувати одержання й обробку результатів, підвищити роздільну здатність і порівняність даних, що важливо при потоковій сертифікації зразків буяхів високих.

Ключові слова: буяхи високі, *Vaccinium corymbosum* L., сорти, генетична диференціація, генетичні сертифікати, RAPD, ISSR, маркери.

CERTIFICATION OF HIGHBUSH BLUEBERRY
(*VACCINIUM CORYMBOSUM* L.) CULTIVARS,
RELEASED IN BELARUS, ON THE BASIS
OF RAPD-AND ISSR-MARKERS

N.B. Vlasova, A.N. Yukhimuk, E.V. Spirydovich.,
V.N. Reshetnikov

Central botanical gardens of NAS of Belarus
Belarus, 220012, Minsk, Surganova str., 2V
e-mail: nastasia_vlasova@nm.ru

RAPD+ISSR fingerprinting approach has been undertaken aimed at differentiation of highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum*) cultivars. Genotyping certificates on the basis of RAPD+ISSR analysis has been developed for seven released in Belarus cultivars of *V. corymbosum*, which can serve as standards for the certification of planting material and collections of the culture *in vitro*. Using the instrument Bioanalyzer-2100 allows standardizing the acquisition and processing of results, increasing the resolution and comparability of data, which is important when carrying out large-scale certification of samples of highbush blueberry.

Key words: Highbush blueberry, *Vaccinium corymbosum* L., cultivars, genetic differentiation, genotyping certificates, RAPD, ISSR, markers.