

ОБЗОРНЫЕ
И ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ СТАТЬИ

УДК 634.7:577.21

ИССЛЕДОВАНИЕ ГЕНОМА С ПРИМЕНЕНИЕМ
ДНК-МАРКЕРОВ У СМОРОДИНЫ

© 2019 г. А. В. Пикунова¹*, С. Д. Князев¹, О. Д. Голяева¹, А. Ю. Бахотская¹, О. В. Калинина¹

¹Всероссийский научно-исследовательский институт селекции плодовых культур,
Орловская область, п/о Жилина, 302530 Россия

*e-mail: pikuanna84@mail.ru

Поступила в редакцию 28.12.2018 г.

После доработки 19.03.2019 г.

Принята к публикации 02.04.2019 г.

Приводится обзор зарубежных и отечественных работ по изучению генома представителей рода смородина с применением ДНК-маркеров. Представлен перечень методик для выделения ДНК из смородины. Собраны работы по применению различных типов ДНК-маркеров (RAPD, AFLP, ISSR, SSR) в исследованиях по генетическому разнообразию, идентификации сортов представителей рода смородина, молекулярной филогении и систематике. В работах различных научных коллективов показан высокий уровень полиморфизма, выявляемый микросателлитными маркерами, и перспективы их использования для разработки систем идентификации и паспортизации, уточнения родословных и менеджмента коллекций. Описаны составленные на данный момент генетические карты черной смородины с применением AFLP, SSR, SNP ДНК-маркеров. Приведен перечень QTL (локусов количественных признаков), локализованных на генетических картах. Описываются опубликованные методики для маркер-вспомогательной селекции: маркеры генов *Ce* и *P* устойчивости черной смородины к почковому клещу, зеленой и черной окраски ягод. Приведена усовершенствованная авторами методика детекции гена *Ce* устойчивости к почковому клещу. Наиболее глубоко изученной с применением ДНК-маркеров культурой рода *Ribes* L. является смородина черная. Рассматриваются перспективы развития исследований генома смородины с применением ДНК-маркеров и возможности, которые эти исследования откроют для дальнейшего направленного человеком совершенствования генома этой хозяйственно важной культуры.

Ключевые слова: смородина, геном, ДНК-маркеры, генетическая карта, маркер-вспомогательная селекция, *Ribes* L.

DOI: 10.1134/S001667581909011X

Род смородина *Ribes* L. включает более 150 видов, произрастающих главным образом в умеренной зоне Северного полушария. Хозяйственное значение имеют смородина черная (*Ribes nigrum* L.), смородина красная (*Ribes rubrum* L.) и крыжовник (*Ribes uva-crispa* L.). Декоративное значение имеет смородина золотистая (*Ribes aureum* Pursh), кроваво-красная (*Ribes sanguineum* Pursh). В медицинских целях используются плоды и другие части растений рода смородина.

Смородина черная – ведущая ягодная культура в России. Популярность ее объясняется высокой, стабильной урожайностью, неприхотливостью к условиям возделывания, высоким уровнем механизации, что позволяет выращивать ее в промышленных масштабах [1].

Ведущими производителями ягод смородины черной являются Польша, Германия и Россия. В США и Канаде смородина черная не так популярна, как в Западной Европе и России [2].

Смородина красная на сегодняшний день широко распространена в промышленном ягодоводстве стран Европейского Союза [3]. Сравнительная непопулярность крыжовника в промышленном садоводстве, вероятно, связана с отсутствием сортов, пригодных к механизированной уборке, и наличием у этой культуры шипов.

Дикорастущие виды смородины, на данный момент не востребованные в производстве ягод, являются или могут стать источниками пополнения генетического разнообразия и донорами хозяйственно полезных признаков. Несмотря на то, что межвидовые гибриды естественного происхождения немногочисленны, в селекции наиболее значительные успехи достигнуты при использовании отдаленной гибридизации, в том числе между видами, входящими в разные секции *Ribes* L. [4]. Зачастую отдаленные гибриды оказываются стерильными, однако в ряде случаев метод искусственной полиплоидизации успешно использовался для вос-

становления фертильности, например, в случае с искусственно выведенными амфидиплоидными, 32-хромосомными смородинно-крыжовниковыми гибридами, которые отнесены к виду *Ribes × nidigrolaria* [5].

В настоящее время с помощью молекулярно-биологических методов, в том числе методов манипуляции с ДНК, пополняются знания об устройстве генетического аппарата растений, на основании чего разрабатываются и внедряются инструменты для усовершенствования генома посредством ускорения селекционного процесса или принципиально иных методов генетической трансформации и геномного редактирования. Современный этап развития селекции рассматривают как этап адаптивной селекции с использованием генных технологий [1].

Одним из молекулярно-биологических методов, нашедших применение в селекционных исследованиях, является ДНК-маркирование. Молекула ДНК – материальная основа хранения и передачи генетической информации, поэтому использование ее полиморфизма в качестве маркеров вызвало огромный интерес.

ДНК-МАРКЕРЫ В ИССЛЕДОВАНИЯХ ПО ГЕНЕТИЧЕСКОМУ РАЗНООБРАЗИЮ, ИДЕНТИФИКАЦИИ СОРТОВ, МОЛЕКУЛЯРНОЙ ФИЛОГЕНИИ И СИСТЕМАТИКЕ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА СМОРОДИНА

В естественных условиях дикой природы все виды рода смородина – диплоидны ($n = 8$), что в определенной степени облегчает изучение генома по сравнению с геномами полиплоидных видов. Размер генома *Ribes petraeum* Wulf., *R. rubrum* L. и *R. grossularia* составляет $2C = 1.91 \text{ пг} = 1868 \text{ Мпн}$ ($1 \text{ пг} = 978 \text{ Мпн}$) [6].

Изучение генома с применением ДНК-маркеров зачастую начинается с оценки генетического полиморфизма, изучения филогенетических связей, а затем переходит к созданию генетических и физических карт хромосом конкретных видов, локализации локусов качественных и количественных признаков, приблизительной локализации генов на картах, их более точной локализации, разработке тесно сцепленных ДНК-маркеров, выявлению генов-кандидатов и клонированию генов. По этому пути, на наш взгляд, идет и изучение генома смородины.

Базовой методикой при работе с ДНК-маркерами является выделение ДНК. Листья смородины содержат фенольные компоненты и танины, а определенные виды также имеют высокое содержание сложных полисахаридов, которые могут ингибировать ПЦР (полимеразную цепную реакцию). Messinger et al. [7] отмечают, что для боль-

шинства видов рода смородина подошли модифицированные и дополненные методики, основанные на СТАВ-методе выделения ДНК, предложенном Doyle и Doyle [8], а в некоторых случаях были более действенны дополнительные экстракции хлороформом, повышенный процент поливинилпирролидона и бисульфита натрия, очень высокое соотношение СТАВ и ткани, дополнительный этап СТАВ/полиэтиленгликоль осаждения, как описано у Rowland и Nguyen [9]. В работах шотландской группы ученых [10–12] использовали для выделения ДНК методику, описанную Milligan [13]. В более поздних работах использовался также набор готовых реактивов DNeasy Mini Extraction Kit (Qiagen) [12]. При работе с гербарным материалом Weigend et al. [14] использовал СТАВ-метод, описанный у Struwe et al. [15]. В исследованиях Palmieri et al. [16] использовали для выделения набор готовых реактивов NucleoSpin® 96 Plant kit (MACHEREY-NAGEL, Germany). В наших исследованиях выделение растительной ДНК проводили из молодых листьев по методикам, предложенным Puchooa [17] и, позднее, Doyle и Doyle [18] с модификациями (измельчение материала осуществляли без использования жидкого азота, в СТАВ-буфере присутствовал 2%-ный поливинилпирролидон, отмывку осажденной ДНК проводили 70%-ным этанолом без добавления ацетата аммония). В основе обеих методик лежит СТАВ-метод с применением поливинилпирролидона и меркаптоэтанола.

Пионерами в использовании ДНК-маркеров при работе с генетическими ресурсами смородины стали ученые из Шотландского института селекции сельскохозяйственных культур (Scottish Crop Research Institute, Invergowrie, Dundee, Scotland, UK), ныне ставшего частью James Hutton Institute (<https://www.hutton.ac.uk/>), применившие RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), ISSR (Inter-Simple Sequence Repeat), SNP (Single-Nucleotide Polymorphism), SSR (Simple Sequence Repeat) маркеры [10–12, 19–21].

Первым типом ДНК-маркеров были RAPD, использованные на смородине Lanham et al. в 1995 г. для фингерпринтинга сортов черной смородины [19]. RAPD-анализ – один из наиболее распространенных среди методов амплификации с праймерами, случайно выбирающими участки генома. Он характеризует полиморфизм длин случайным образом амплифицированных фрагментов [22, 23]. Метод очень прост и производителен, так как амплифицируется большое количество фрагментов, конкретное число зависит от объекта исследований, прост в исполнении, не требуются дополнительные данные сиквенса генома объекта и дорогостоящее оборудование.

Однако полученные результаты недостаточно воспроизводимы в различных лабораториях. Другим недостатком RAPD-анализа является преимущественно доминантное наследование RAPD-фрагментов, при котором фрагмент либо присутствует (Aa, AA, не различая гомозиготу от гетерозиготы), либо отсутствует (aa), и лишь небольшое число фрагментов имеют кодоминантное наследование, т.е. амплифицируются как два аллеля различного размера и помогают отличить гомозиготу от гетерозиготы [22]. В последние годы RAPD-метод все чаще используется только на предварительной стадии изучения полиморфизма ДНК [23].

В наших исследованиях смородины мы также начинали с RAPD-анализа и использовали его для изучения варибельности генома и филогенетических отношений у представителей рода *Ribes* L. [24]. В результате каждый образец был охарактеризован уникальным набором RAPD-фрагментов. При этом были идентифицированы фрагменты, специфичные как для отдельных образцов, так и для представителей определенных таксонов. При исследовании полиморфизма крыжовника (12 образцов) Lanham и Brennan [10] использовали маркеры RAPD, ISSR и AFLP. По средним подсчетам один RAPD-праймер амплифицировал два полиморфных фрагмента (без учета не полиморфных), ISSR-праймер – 18 полиморфных фрагментов, одна комбинация праймеров AFLP – 23 полиморфных фрагмента. При этом только AFLP-маркеры позволили получить уникальные профили для каждого из образцов. ISSR-анализ не различал три генотипа из 12, RAPD-анализ – 2.

AFLP-анализ – маркеры полиморфизма длин амплифицированных фрагментов ДНК [25]. Включает несколько этапов, в том числе рестрикцию, лигирование адаптеров, две последовательные ПЦР. Разделение фрагментов ДНК проводят в полиакриламидном геле с радиоактивной или с флуоресцентной меткой. Сложнее по техническому исполнению по сравнению RAPD, но не уступает, а, как правило, превосходит его по производительности, требуется специальное оборудование для детекции.

ISSR – анализ полиморфизма участков, находящихся между микросателлитными локусами [26]. Сравнительно быстрый и дешевый метод. Характеризуется улучшенной воспроизводимостью по сравнению с RAPD в связи с большей длиной праймера и более высокой температурой отжига.

RAPD и ISSR использовали для поиска ДНК-маркеров зеленого и черного цвета ягод. При этом из 29 праймеров 9 амплифицировали мономорфные паттерны [27].

Тестирование маркеров RAPD, AFLP и SSR в различных лабораториях Европы показало сложности в воспроизведении результатов RAPD-ана-

лиза, различия в единичных фрагментах в одном пробеге при AFLP и небольшие различия в размерах полученных фрагментов при SSR [28].

Следует отметить, что низкая воспроизводимость RAPD-анализа является основной преградой для широкого использования в области идентификации организмов, где ему на смену приходят хорошо воспроизводимые типы ДНК-маркеров, такие как микросателлитные локусы.

SSR (микросателлитные) маркеры – амплифицируют тандемные повторы коротких мотивов (от 1 до 10 пн), для амплификации используются достаточно длинные пары праймеров (около 18–20 пн), что повышает специфичность амплификации. В зависимости от методов выявления различают геномные SSR и EST (expressed sequence tag)–SSR. EST–SSR находятся в транскрибируемых регионах генома. SSR используются как в фундаментальных исследованиях для оценки генетического полиморфизма, изучения филогенетических отношений, построения генетических карт для групп сцепления, так и в прикладных целях – для проверки родословных, при разработке систем идентификации и паспортизации, поиске маркеров, связанных с хозяйственно полезными признаками, при маркер-вспомогательном отборе интересующих генотипов на ранних стадиях развития растений [29].

Для изучения смородины первые микросателлитные маркеры были разработаны шотландскими учеными [11, 30]. Более 200 пар праймеров тестировали на гибридной популяции при составлении генетической карты черной смородины, в результате 49 микросателлитных локусов были локализованы на разных хромосомах [12, 31]. SSR-маркеры применялись также для оценки разнообразия генетических коллекций *Ribes* в Италии и Северной Европе [32, 33].

Необходимо отметить значение научных сообществ в проведении молекулярно-генетических исследований, требующих, с одной стороны, привлечения современного дорогостоящего оборудования, а с другой – наличия разнообразного растительного материала и, зачастую, накопления фенотипических данных. В настоящее время крупные проекты осуществляются в рамках международных сообществ, объединяющих молекулярных генетиков, селекционеров, производителей. Одним из таких проектов был RIBESCO, направленный на углубленное изучение и сохранение генофонда представителей рода *Ribes* L. Северной и Центральной Европы. В рамках проекта более 800 сортообразцов были генотипированы с помощью микросателлитных маркеров, на основании полученных данных вкуче с фенотипическими были отобраны образцы для дальнейшей криоконсервации. Кроме того, проведенное генотипирование помогло выявить ошиб-

ки в названиях сортов, содержащихся в разных коллекциях [33].

В наших исследованиях впервые в России были использованы микросателлитные маркеры для оценки межсортового полиморфизма, определения генетического сходства и проверки родословных между сортообразцами черной смородины [34]. Был проведен анализ 14 микросателлитных локусов у 27 сортообразцов смородины.

Ожидаемая, или теоретическая, гетерозиготность изученных нами локусов в среднем составила 0.652, в то время как наблюдаемая гетерозиготность – 0.608. Таким образом, значительной потери гетерозиготности не наблюдается, что, вероятно, обусловлено природой изучаемого объекта и особенностями селекции. Как известно, перекрестноопыляемые растения, к которым относится черная смородина, характеризуются большей гетерозиготностью по сравнению с самоопыляемыми [35]. Генетическое разнообразие сортов черной смородины также объясняется вовлечением в селекцию генетически отдаленных родственников (крыжовника, смородины клейкой и др). К тому же вегетативное размножение культуры позволяет закрепить гетерозиготное состояние генотипа независимо от того, насколько стабильным будет проявление признаков в первом поколении. Поэтому к отличительным особенностям таких культур относится высокая гетерозиготность. Однако в некоторых локусах наблюдаемая гетерозиготность значительно отличается от ожидаемой (теоретической), что может свидетельствовать о влиянии селекции на эти локусы, наличии позитивного или негативного отбора определенных аллелей, которые связаны с проявлением жизненно важных или селекционных признаков.

Микросателлитные маркеры можно считать одним из типов маркеров, наиболее подходящих для разработки системы генетического маркирования в целях идентификации генотипов и уточнения генетического происхождения. В связи с этим важен подбор наиболее полиморфных и информативных локусов, способных различать близкородственные генотипы.

На основании полученных данных нами был проведен анализ потока аллелей через родословные у родственных сортов, задействованных в анализе. В большинстве случаев распределение аллелей между родственными сортами не противоречило родословным; так, родительский сорт Лентяй и его производные в первом поколении (сорта Ажурная, Орловский вальс, Сластена) имели хотя бы один общий аллель по всем протестированным микросателлитным локусам. То же происходило с сортом Минай Шмырев и с сортами, полученными от него в первом поколении (Зуша, Лентяй, Орловская серенада), а также с сортом Экзотика и потомками этого сорта в пер-

вом поколении (сорта Кипиана, Гамма, Грация). Однако у сорта Очарование, для которого по родословной сорт Экзотика служил отцовской формой, в трех локусах (e4-D03, g1-E03, g2-B20) не было общих аллелей с сортом Экзотика. Такое несоответствие, вероятно, связано с тем, что в действительности произошло опыление другой пыльцой, нельзя также исключить ошибку при размножении, пересадке или отборе, а также мутации в данных локусах. Сорт Бинар (Оджебин × Нарядная) также не имел с сортом Оджебин общих аллелей в двух микросателлитных локусах (g1-M07, g1-E03) [34].

Подобные результаты были получены с использованием 11 микросателлитных локусов при уточнении происхождения у сортов яблони, выведенных в Dresden-Pillnitz [36]. В результате в ряде случаев выяснили, какой именно сорт участвовал в гибридизации при опылении смесью пыльцы разных сортов, а для некоторых сортов установлена недостоверность родословных как по материнской, так и по отцовской форме. При генотипировании микросателлитных локусов у коллекционных сортов черной смородины из Северной Европы в ряде случаев не удалось подтвердить генетическую идентичность одноименных образцов из разных коллекций, например, один из 10 сортообразцов сорта Оджебин оказался не идентичен остальным [33].

В наших исследованиях минимальный набор из четырех локусов (e4-D03, g1-M07, g1-E03, g2-B20) позволил различить 27 сортообразцов, т.е. для каждого образца был получен уникальный мультилокусный профиль [34]. В работе Palmieri et al. [16] 91 образец различных представителей рода смородина был проанализирован на полиморфизм 10 микросателлитных локусов. Практически для всех образцов (87 штук) получены уникальные мультилокусные профили. Благодаря маркерам выявлены случаи неверной маркировки образцов, подтверждающие возможность использования микросателлитных маркеров для контроля верности маркировки, различения сортов со схожими названиями, обнаружения идентичных сортов под разными названиями.

SSR-анализ использовали для изучения ягодных культур рода *Ribes* L., возделываемых в республике Беларусь (всего 83 образца). На основании полиморфизма восьми микросателлитных локусов разработаны методы ДНК-идентификации сортов смородины черной, смородины красной и крыжовника обыкновенного, применимые для практического использования и обладающие достаточной степенью информативности для определения сортовой принадлежности, а также установления родословных сортов [37].

SSR-анализ использовали для практической цели – проверки идентичности одноименных

сортообразцов сорта Консорт, показавших различную реакцию на искусственную инокуляцию столбчатой ржавчиной (*Cronartium ribicola* J.). В одном из шести протестированных микросателлитных локусов обнаружен полиморфизм и сделан вывод, что данные клоны, вероятно, генетически связаны, но различаются [38].

Остановимся отдельно на филогенетических исследованиях смородины, в том числе с применением ДНК-маркирования. Молекулярная филогенетика как способ установления родственных связей между живыми организмами на основании изучения структуры полимерных макромолекул — ДНК, РНК и белков представляет дополнительную информацию как альтернативу морфологическим данным.

Наиболее разработанными на сегодняшний день являются таксономические классификации рода *Ribes*, основанные на его морфологических особенностях [39] и скрещиваемости видов [40]. Ряд систематиков выделяли два рода: *Ribes* (виды смородины) и *Grossularia* Hill. (виды крыжовника) [41–43]. Однако, по мнению Brennan [44], Hummel и Varney [2], в настоящее время наиболее общепринятой является концепция одного рода *Ribes*, сформулированная еще Janczewski [45] и далее развиваемая Sinnott [46], и др. Единство рода косвенно подтверждалось получением смородинно-крыжовниковых гибридов. Тем не менее некоторые современные авторы придерживаются классификаций, выделяющих два рода [47, 48]. Также окончательно не определено таксономическое положение отдельных видов и групп видов, например, красных смородин. Так, Janczewski [45], разделяя род *Ribes* на шесть подродов, наряду с подродом *Coreosma* (Spach) Jansz. — черная смородина, *Grossularia* Rich. — крыжовник, предложил выделить виды красной смородины в отдельный подрод *Ribesia* Berl. В то время как Rehder [39], выделяя четыре подрода, объединяет красную и черную смородину в один подрод *Ribesia*. Keer [40] на основании данных о скрещиваемости и возможности получения межвидовых гибридов предлагает увеличить число подродов до девяти, также выделяя красную смородину в отдельный подрод. Weigend [14] выделяет семь подродов и допускает возможность рассматривать данные подроды на уровне родов, но считает это излишним в силу общего морфологического единства рода. Очевидно, что классическая систематика рода смородина имеет ряд спорных вопросов.

При помощи различных методов молекулярно-генетического анализа полиморфизма ядерной и хлоропластной ДНК, таких как полиморфизм рестрикционных сайтов двух регионов хлоропластной ДНК [7], *psbA-trnH* спейсера хлоропластной ДНК и анализа нуклеотидного полиморфизма внутренних и

внешних транскрибируемых спейсеров (ITS и ETS) рибосомного оперона ядерной ДНК [49], анализа нуклеотидного полиморфизма внутренних транскрибируемых спейсеров ядерной ДНК [50], было установлено, что все исследованные образцы видов смородин и крыжовника объединяются вместе, что свидетельствует о спорности родового статуса *Grossularia* и возможности включения его в состав рода *Ribes* в ранге подрода. В наших исследованиях с применением RAPD-анализа полученные результаты говорят о том, что таксоны крыжовника, черной смородины и красной смородины являются таксонами одного уровня, что свидетельствует в пользу классификаций, выделяющих их в отдельные подроды [24].

СТРУКТУРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ГЕНОМА СМОРОДИНЫ. ГЕНЕТИЧЕСКОЕ КАРТИРОВАНИЕ. ЛОКУСЫ КОЛИЧЕСТВЕННЫХ ПРИЗНАКОВ

Составление карт генома является важным этапом изучения генома. Различают генетические и физические карты. Генетическая карта (ГК) — схема взаимного расположения структурных генов, регуляторных элементов и генетических маркеров на хромосоме (группе сцепления). Расстояние на ГК определяется в условных единицах — сантиморганах (сМ), условно отражающих частоту рекомбинаций. Эта условная единица зависит от ряда факторов, в том числе и от числа индивидов картируемой популяции: чем больше популяция, тем точнее генетическая карта. ГК дают представление, на каком относительном расстоянии участки хромосомы (локусы) находятся друг от друга, в какой последовательности расположены. Реальными единицами измерения оперируют физические карты, на которых расстояние между локусами измеряется в парах нуклеотидов. Однако составление физических карт требует предварительного частичного или полного секвенирования генома. Для смородины есть пока лишь фрагментарные сиквенсы, представленные в базах данных, таких как NCBI [51]. Карты могут включать не только ДНК-маркеры, но и морфологические признаки.

На данный момент генетическое картирование применялось лишь к черной смородине — как наиболее значимой культуре рода. Первая генетическая карта для черной смородины была создана шотландскими учеными. 125 гибридов семьи 9328 и их родители (SCRI S36/1/100 (cv. BenAlder × cv. Ben Loyal) × EMRS B1834: (EMRS B1426 × cv. Ben Lomond)) стали основой для картирования. ГК была составлена с помощью SSR (картировано 43 маркера, в том числе геномные и EST), AFLP (107 маркеров) и SNP (16 шт.) маркеров (рис. 1). В результате так же было установлено местоположение в геноме гена *Se*

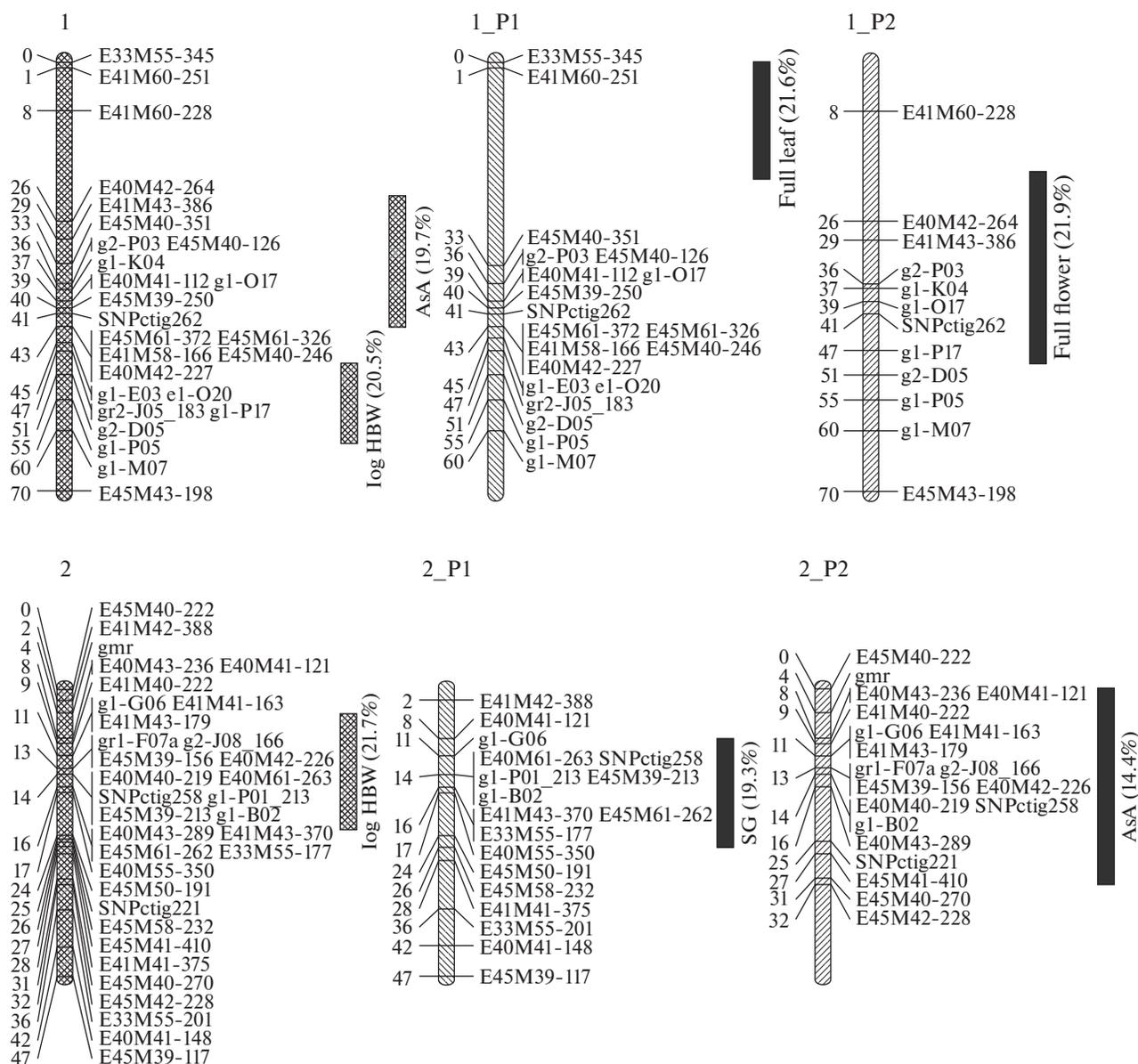


Рис. 1. Фрагмент генетической карты черной смородины [36]. Представлены 1-е и 2-е группы сцепления. Слева направо: объединенная генетическая карта, затем ГК каждого из родителей. По вертикали указано положение QTL и % вариации признака. Расшифровка сокращенных названий признаков: AsA – аскорбиновая кислота, HBW – вес ста ягод, SG (Specific gravity) – удельный вес выжатого сока, full leaf – полное распускание листьев, full flower – полное цветение.

устойчивости к почковому клещу и ряда локусов хозяйственно полезных признаков (QTL, Quantitative trait loci). Ген *Ce* был картирован на второй группе сцепления. Интересно отметить, что гибриды семьи 9328 по данным ДНК-маркеров разделились на две группы, в одну из них вошли гибриды, у которых не было специфических аллелей от отца, т.е. они образовались от самоопыления (selfs) [31].

Изначальная генетическая карта для черной смородины постепенно насыщалась новыми мар-

керами, полученными в результате использования современных подходов с применением секвенирования нового поколения (New Generation Sequencing). Главное отличие секвенирования по саргенту (более старая методика) и секвенирования нового поколения – это большие объемы секвенирования, соответственно более высокая воспроизводимость и, в конечном счете, дешевизна анализа. В 2011 г. Russel et al. [12] опубликовали вторую версию генетической карты черной смородины, увеличив число гибридов популяции 9328 до 311 штук и используя для картирования еще одну гибридную

семью MP7 (95 гибридов, Ben Finlay × Hedda). В данной работе посредством секвенирования транскриптомов родителей гибридной популяции с использованием секвенатора 454 (Life Science) были обнаружены новые SNP (около 7 тыс. шт.) и SSR (около 3 тыс. шт.) маркеры. Однако, вероятно в связи с дороговизной анализа, только 384 SNP были проанализированы на популяциях (в итоге 189 картированы в популяции 9328 и 118 в популяции MP7). Всего 10 SSR протестировали на популяциях, 6 штук картировали, при этом AFLP-маркеры были исключены из анализа [12]. Общая длина карты составила 605 сМ для популяции 9328 и 355 сМ для популяции MP7.

Несколько позднее была опубликована третья версия генетической карты черной смородины. В ней метод генотипирования по сиквенсу (genotyping by sequencing) использовали для выявления новых SNP-маркеров в семье 9328 [21]. Авторы отмечают преимущества этого метода – возможность одновременного выявления, детекции и проверки маркеров. В итоге была получена подробная карта высокого разрешения (high-resolution linkage map) общей длиной 771 сМ, включающая SNP (более 1300 шт.) и SSR (49 шт.) маркеры. При этом картированы SNP, обнаруженные разными способами: 1) путем 454-секвенирования родителей (из работы [12]), 2) с помощью программы Tassel (Trait Analysis by Association, Evolution and Linkage), 3) посредством сборки, основанной на транскриптом (reference transcriptome assembly).

Прием генетического картирования использовали для локализации гена *P* устойчивости к почковому клещу ученые из Польши. На карте были локализованы 43 AFLP и 19 микросателлитных маркеров [52].

Наибольший практический интерес от составления генетических карт – это локализация хозяйственно полезных признаков. Хочется отметить, что в настоящее время различают локусы количественных признаков (quantitative trait loci, QTL), подразумевая полигенное наследование, и локусы качественных признаков (Mendelian trait loci, MTL) в случаях классического менделевского расщепления признака.

На генетической карте черной смородины локализованы локусы целого ряда количественных признаков (табл. 1). Важно отметить, что обнаруженные локусы количественных признаков объясняют лишь определенную долю варьирования их морфологического проявления. Можно предположить также, что у генетически отдаленных родственников могут быть различные механизмы, обуславливающие схожее проявление признаков. Поэтому для разработки методов маркерного отбора для селекционной практики на эти признаки требуются дополнительные исследова-

ния и проверка на конкретном селекционном материале.

Помимо указанных в табл. 1 признаков на первой ГК по однолетним данным были локализованы QTL следующих фенологических дат: дата полного раскрытия листа (date of Full leaf), полного цветения (Date of Full Flower), начала цветения/раскрытия первого цветка (First open Flower). Для каждого из признаков обнаружено по несколько QTL, объясняющие небольшую долю вариации признака (от 14.6 до 21.9%) [31].

При этом важно отметить, что подход к обработке фенотипических данных и данных полиморфизма ДНК-маркеров, в том числе статистическая модель, влияют на локализацию локусов количественных признаков и их значимость [53]. Так, изначально на первой генетической карте черной смородины не было обнаружено QTL, связанных с содержанием антоцианов [31], использование иного статистического подхода к обработке тех же данных привело к выявлению нескольких QTL на различных группах сцепления [53].

Интересен тот факт, что на первой генетической карте черной смородины был локализован целый ряд QTL по девяти параметрам [31], однако только о двух из них (вес 100 ягод и содержание растворимых сухих веществ, таких как сахара) говорится в последней наиболее насыщенной карте черной смородины [21].

Локализация QTL – важный этап изучения генома, однако он не всегда является залогом последующей локализации генов кандидатов в этой позиции. Порою, первоначальная локализация QTL может быть не точна или даже ошибочна, что может быть связано со слишком субъективными методами фенотипирования, ошибками на этапе детекции ДНК-маркеров, статистическими подходами к анализу данных.

Усилиями мирового сообщества селекционеров идентифицирован ряд генов, контролирующих хозяйственно полезные признаки черной смородины, среди них гены устойчивости к болезням и вредителям (почковому клещу, столбчатой ржавчине, листовой галлице, американской мучнистой росе, антракнозу, септориозу), морфологические признаки (окраска кожицы ягод, форма листовой пластинки), а также фенологические даты, летальные гены, цитоплазматическую мужскую стерильность, блокировку биосинтеза антоцианов. Однако Огольцова в своей работе отмечает, что этих сведений явно недостаточно, чтобы дать генетическую модель идеального сорта [54].

Несмотря на то, что в селекции крыжовника и красной смородины выделены доноры целого ряда хозяйственно полезных признаков (таких как устойчивость к болезням и вредителям, крупноплодность, самоплодность, раннеспелость, бес-

Таблица 1. Локусы количественных признаков (QTL), картированные на генетической карте черной смородины

Признак	Группа сцепления	Степень влияния обнаруженного генетического полиморфизма на фенотипическое проявление	Ссылка
Средний вес 100 ягод (НВW)	1 5	Полиморфизм в этих локусах объясняет от 20 до 34.7% изменчивости признака в зависимости от года изучения	[21, 31]
Содержание растворимых сухих веществ, таких как сахара (soluble solids such as sugars)	2 3	Полиморфизм в этих локусах объясняет от 16.7 до 43.9% изменчивости признака в зависимости от года изучения	[21]
Содержание аскорбиновой кислоты* (Ascorbic acid)	1 2	19.7% изменчивости признака 14.1% изменчивости признака	[31]
Содержание антоцианов в плодах (anthocyanin)	6 3 5	Среднее содержание антоцианов на 0.073 (при стандартной ошибке 0.024) ниже у гибридов с маркером E40M39-125 Среднее содержание антоцианов на 0.075 (при стандартной ошибке 0.027) выше у гибридов с маркером E45M58-334 Среднее содержание антоцианов выше у гибридов с маркером E40M39-149, при этом разница в содержании антоцианов варьирует по годам	[53]
Даты раскрытия почек (Time of Budbreak)	3 8 4	В среднем на 3.6 дней (стандартная ошибка 0.93 дня) раньше В среднем на 2.1 день (стандартная ошибка 0.84 дня) раньше В среднем на 2.1 дней (стандартная ошибка 0.89 дня) раньше	[31, 53]
Титруемая кислотность сока* (Eitratable juice acidity)	3 6 7	Полиморфизм в этом локусе объясняет 26.6% изменчивости признака 24.8% изменчивости признака 15.7% изменчивости признака	[31]
Удельный вес выжатого сока* (Specific gravity of the extracted juice)	2 3	Полиморфизм в этом локусе объясняет 19.3% изменчивости признака 15.8% изменчивости признака	[31]
pH сока*	3 7	Полиморфизм в этом локусе объясняет 28.4% изменчивости признака 16.3% изменчивости признака	[31]

* Для QTL анализа брали среднее значение данных за три года.

шипость у крыжовника и т.д.) и ведется селекция, генетика большинства из них изучена крайне слабо [4]. У видов *G. watsonoana*, *G. leptantha* идентифицирован ген *Sph1*, контролирующий иммунитет к мучнистой росе (*Sphaerotheca morsuvae* Schwein) [55].

Для локализации генов методами построения генетических карт необходимы соответствующие популяции от скрещивания контрастных по определенным признакам генотипов. Очевидно, что среди видов рода смородина наиболее изуче-

на в генетическом и молекулярно-генетическом плане смородина черная.

МАРКЕР-ВСПОМОГАТЕЛЬНАЯ СЕЛЕКЦИЯ

Одним из прикладных направлений применения молекулярных маркеров является маркер-вспомогательная селекция (МВС, Marker-assisted selection) [56]. Принцип метода заключается в отборе генотипов, несущих целевой ген на основании данных о присутствии ДНК-маркеров, тесно

сцепленных с ним. Рекомендуется использовать маркеры, расположенные в непосредственной близости к гену (в пределах 5 сМ). При этом надежность маркерного отбора возрастает при использовании фланкирующих (окружающих ген с двух сторон) маркеров или внутригенного маркера, напрямую идентифицирующего нужный аллель.

Выделяют несколько целей использования маркер-опосредованной селекции растений, включая оценку селекционного материала с помощью молекулярных маркеров; ускоренное получение бек-кроссов с помощью молекулярных маркеров; совмещение нескольких интересующих генов в одном генотипе; отслеживание интересующих аллелей (доминантных или рецессивных) через поколения с тем, чтобы накопить желательные аллели; выявление наиболее подходящих индивидуумов в расщепляющейся популяции, основанное на оценке аллельной композиции части или всего генома; разрыв возможной связи желательных аллелей и нежелательных локусов и др. [56, 57].

На данный момент для черной смородины опубликовано всего несколько методик, рекомендованных для маркер-вспомогательной селекции: маркеры черной и зеленой окраски ягод [27], маркеры генов *Se* и *P* устойчивости к почковому клещу [52, 58].

Работая над созданием простой методики точного выявления генотипов черной смородины с зеленым и черным цветом ягод на ранних этапах развития растений, польские ученые обнаружили RAPD-маркер размером 700 пн, амплифицируемый парой праймеров OPA-01 только у растений с доминантным аллелем черного цвета, а также ISSR-маркер размером 1200 пн, амплифицируемый праймером 818 только у растений с рецессивным зеленым аллелем [27]. Следует отметить, что зеленоплодные сорта черной смородины, насколько нам известно, мало интересны для производства, так как содержат меньше полезных для здоровья веществ.

Существенным недостатком смородины черной, как и всех ягодных культур, является высокая восприимчивость к болезням и вредителям. К настоящему времени идентифицировано два гена устойчивости к почковому клещу, ген *P* у потомков сибирского подвида смородины черной [59] и ген *Se*, который передан смородине от крыжовника и унаследован производными смородины клейкой, которые интенсивно использовали в качестве доноров устойчивости к мучнистой росе [60].

В работе литовских исследователей Mazeikiene et al. [52] с помощью AFLP и микросателлитных ДНК-маркеров была построена генетическая карта и локализован ген *P*. Обнаружен ДНК-маркер — AFLP-фрагмент СТА-АСС-107, сцепленный с геном. Несмотря на то, что на карте маркер расположен в 14.2 сМ от гена, он показал хорошее

сцепление с геном в генетически разнородном материале, не задействованном в картировании (в т.ч. 20 сортов, дикая форма, гибриды), и авторы резюмируют, что он может быть использован для ранней диагностики устойчивости к почковому клещу у гибридов. В дальнейшей работе [61] данный маркер вместе с ДНК-маркером гена *Se* используют для анализа различных видов и выявления межвидовых гибридов, совмещающих два гена устойчивости.

Ген *Se* устойчивости черной смородины к почковому клещу, переданный ей от крыжовника, был локализован шотландскими учеными на 2-й группе сцепления вместе с AFLP и SSR ДНК-маркерами. На основании лучшего AFLP-маркера был разработан доминантный SCAR-маркер, который у устойчивых (проверено на инфекционном участке) генотипов с геном *Se* выявлял фрагмент размером 130 пн и ничего не амплифицировал у восприимчивых генотипов. Разработчики успешно проверили маркер на 155 генотипах (включая сорта, селекционные формы и гибридные сеянцы) [58].

Интересно отметить, что, амплифицировав ДНК-маркер гена *Se* на ДНК крыжовника, смородины кроваво-красной (*R. sanguineum*) и смородины золотистой (*R. aureum*) и секвенировав ампликоны, ученые из Литвы обнаружили высокий уровень сходства нуклеотидных последовательностей. На основании этого авторы приходят к выводу, что, возможно, устойчивость к почковому клещу смородины кроваво-красной и золотистой, так же как и у крыжовника, обусловлена геном *Se* [61].

Маркеры, разработанные на одной популяции, не обязательно будут столь же эффективны на другой. Поэтому необходима проверка маркеров на различном селекционном материале. В связи с чем нашей первоначальной задачей была оценка возможности использования SCAR-маркера гена *Se*, амплифицируемого парой праймеров GMresa [62], для отбора устойчивых к почковому клещу генотипов при работе с отечественным селекционным материалом. Для чего был проведен скрининг выборки образцов (включая черную смородину, крыжовник, смородино-крыжовниковые гибриды) из коллекции ВНИИСПК на присутствие вышеупомянутого ДНК-маркера. SCAR-маркер во всех случаях верно определил наличие или отсутствие гена в соответствии с данными родословных и наблюдениями за устойчивостью. SCAR-маркер амплифицирует только доминантный аллель и не дает никаких ПЦР-продуктов у генотипов без гена *Se*. В связи с этим для исключения ложноотрицательных результатов (отсутствия ПЦР-продуктов в связи с неудовлетворительным для ПЦР-качеством ДНК) ДНК всех сортообразцов предварительно тести-

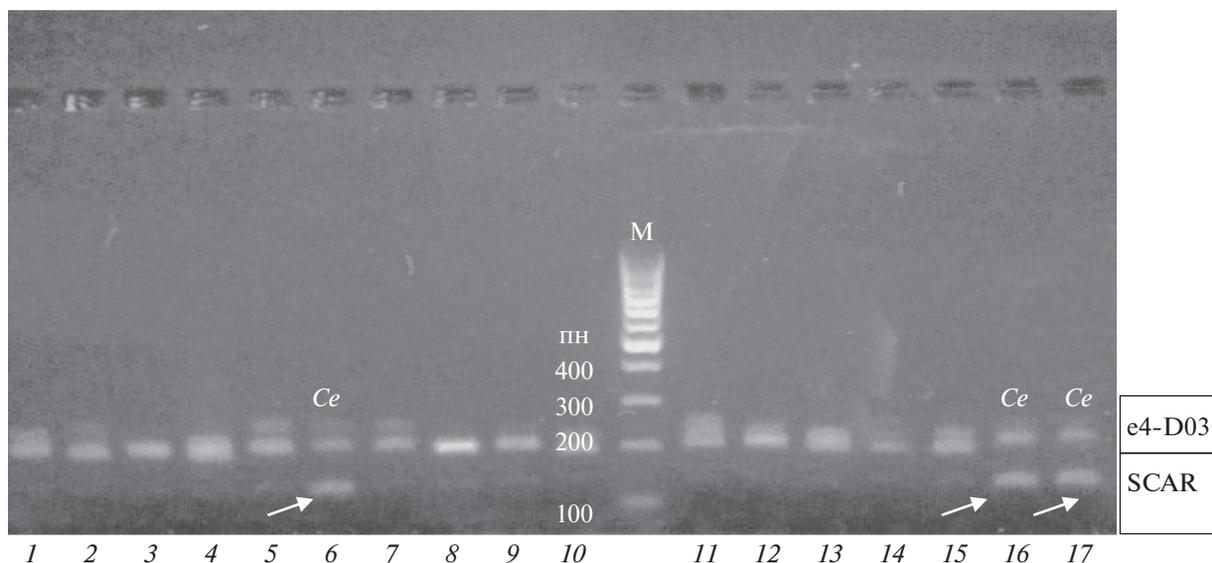


Рис. 2. Выявление SCAR-маркера гена *Ce* по усовершенствованной методике одновременной амплификации с микросателлитным локусом e4-D03. Надпись *Ce* указывает присутствие или отсутствие гена *Ce* у образца черной смородины по данным селекционных наблюдений; стрелка указывает на SCAR-маркер гена *Ce* (фрагмент размером 130 пн). М – маркер молекулярного веса (110, 200...1000 пн), 1...17 – сорта Рита, Памяти Правика, Чародей, Сластина, Алтаянка, Кипиана, Лана, Tisli, Ажурная, Hildur, Орловская серенада, Заря Галицина, Лентяй, Оазис, Чудное мгновение, Гамма, 4934-5.

ровалась путем амплификации с микросателлитными праймерами, чтобы подтвердить удовлетворительное качество и концентрацию ДНК. Таким образом, скрининг проходил в два этапа.

На стадии внедрения данного метода в целях маркер-вспомогательной селекции в гибридных семьях возникла задача упрощения двухступенчатой методики при анализе большого объема материала. В практике нашей лаборатории задача была решена путем подбора микросателлитного локуса для проведения одновременной ПЦР вместе с парой праймеров GMresa. Изначальные требования по микросателлитному локусу: 1) температура отжига, близкая с парой праймеров GMresa (58°C), 2) размеры ПЦР-фрагментов более 200 пн, т.е. в ином диапазоне нежели ПЦР-продукт пары праймеров GMresa – 130 пн.

Семнадцать сортов и селекционная форма были использованы для проверки методики (рис. 2). ПЦР-фрагменты микросателлитного локуса e4D03 не мешают оценке амплификации пары праймеров GMresa и являются внутренним контролем качества ДНК. Данная усовершенствованная методика также была использована при МВС в гибридных семьях.

Разработанные методики маркер-вспомогательной селекции генов устойчивости к почковому клещу в настоящее время внедряются в селекционную практику. SCAR-маркер гена *Ce*, амплифицируемый парой праймеров GMresa, используется в селекционной программе SCRI для выявления устойчивых генотипов [58], маркеры гена *P* и гена

Ce используются для анализа межвидовых гибридов и отбора гибридов с двумя генами в Institute of Horticulture Lithuanian Research Centre for Agriculture and Forestry, Литва [61]. Внедрение маркер-вспомогательной селекции в школке сеянцев было начато и во ВНИИ селекции плодовых культур, Орел. Девяносто три гибрида из одиннадцати семей были протестированы на присутствие SCAR-маркера гена *Ce* [63].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Для изучения рода смородина *Ribes* L. использовались различные типы ДНК-маркеров (RAPD, AFLP, ISSR, SSR) в исследованиях по генетическому разнообразию, идентификации сортов, молекулярной филогении и систематике. Для разработки систем идентификации сортов различными научными коллективами успешно использовались микросателлитные ДНК-маркеры. Наиболее глубоко изучена с применением ДНК-маркеров смородина черная. Для нее составлено несколько генетических карт групп сцепления с применением маркеров AFLP, SSR, SNP, локализован ряд локусов количественных признаков. На данный момент нет секвенированных и аннотированных геномов представителей рода смородина.

В настоящее время в рамках маркер-вспомогательной селекции для смородины черной опубликовано только несколько методик, позволяющих отбирать генотипы с заданными параметрами на ранних стадиях развития – отбор устойчивых к

почковому клещу генотипов с генами *Ce* и *P*, отбор растений с черным и зеленым окрасом ягод.

В целом молекулярно-генетические исследования смородины отстают от уровня культур семейства Розоцветные (таких как яблоня, земляника), однако, учитывая наличие генетической карты черной смородины и локализацию целого ряда QTL, молекулярно-генетические исследования смородины переходят на стадию выявления генов хозяйственно полезных признаков, что позволит разрабатывать новые методы маркер-вспомогательной селекции, а также даст возможность для развития других прикладных подходов в усовершенствовании генома, таких как транс- и цисгенез, геномное редактирование.

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ “Изучение генома смородины (*Ribes* L.) с помощью ДНК маркеров” № 18-76-0032.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием в качестве объекта животных.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием в качестве объекта людей.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Князев С.Д., Огольцова Т.П. Селекция смородины черной на современном этапе. Орел: Изд-во ОрелГАУ, 2004. 238 с.
2. Hummer K.E., Barney D. Currants // HortTechnol. 2002. V. 12. № 3. P. 377–387.
3. Малиновский Б. 2017 <https://propozitsiya.com/krasnaya-smorodina-priznana-samoy-rentabelnoy-nishevoy-yagodoy>. <https://doi.org/10.1051/fruits/2011049> www.fruits-journal.org
4. Помология. Т. IV. Смородина. Крыжовник / Под ред. Седова Е.Н. Орел: ВНИИСПК, 2009. С. 468.
5. Bauer R. “True breeding” for combined resistance to leaf, bud and shoot diseases // Jugoslovensko Vocarstvo. 1973. V. 7. № 25/26. P. 17–19.
6. Chiche J., Brown S.C., Leclerc J.-L. et al. Genome size, heterochromatin organization and ribosomal gene mapping in four species of *Ribes* // Can. J. Bot. 2003. V. 81. P. 1049–1057. <https://doi.org/10.1139/b03-088>
7. Messinger W., Liston A., Hummer K. Ribes phylogeny as indicated by restriction-site polymorphisms of PCR-amplified chloroplast DNA // Plant Systemat. Evol. 1999. V. 217. P. 185–195.
8. Doyle J.J., Doyle J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue // Phytochem. Bull. 1987. V. 19. P. 11–15.
9. Rowland L.J., Nguyen B.I.N.H. Use of polyethylene glycol for purification of DNA from leaf tissue of woody plants // BioTechniques. 1993. V. 14(5). P. 734–736.
10. Lanham P.G., Brennan R.M. Genetic characterization of gooseberry (*Ribes grossularia* subgenus *Grossularia*) germplasm using RAPD, ISSR and AFLP markers // J. Hortic. Sci. Biotechnol. 1999. V. 74. P. 361–366. <https://doi.org/10.1080/14620316.1999.11511122>
11. Brennan R., Jorgensen L., Woodhead M. et al. Development and characterization of SSR markers in *Ribes* species // Mol. Ecol. 2002. № 2(3). P. 327–330. <https://doi.org/10.1046/j.1471-8286.2002.00233.x>
12. Russell J.R., Bayer M., Booth C. et al. Identification, utilisation and mapping of novel transcriptome-based markers from blackcurrant (*Ribes nigrum*) // BMC Plant Biol. 2011. № 11(1). P. 147. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-11-147>
13. Milligan B.G. Plant DNA isolation // Molecular Genetics of Populations // Molecular Analysis of Population: A Practical Approach. Oxford, UK: IRL Press, 1992. P. 59–68.
14. Weigend M., Flowering plants. Eudicots // Families and Genera of Vascular Plants. 2007. V. 9. P. 168–176.
15. Struwe L.M., Thiv J.W., Kadereit A.S.-R. et al. Saccifolium an endemic of Sierra de La Neblina on the Brazilian-Venezuelan frontier is related to a temperate alpine lineage of Gentianaceae // Harvard Papers Bot. 1998. V. 3. P. 199–214.
16. Palmieri L., Grando M.S., Sordo M. et al. Establishment of molecular markers for germplasm management in a worldwide provenance *Ribes* spp. Collection // Plant Omics. 2013. V. 6(3). P. 165–174.
17. Puchooa D. A simple, rapid and efficient method for the extraction of genomic DNA from lychee (*Litchinensis* Sonn.) // African J. Biotechnol. 2004. V. 3. № 4. P. 253–255. <https://doi.org/10.5897/AJB2004.000-2046>
18. Doyle J.J., Doyle J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue // Focus. 1990. V. 12. P. 13–15.
19. Lanham P., Brennan R.M., Hackett C. et al. RAPD fingerprinting of blackcurrant (*Ribes nigrum* L.) cultivars // Theor. Appl. Genetics. 1995. V. 90. P. 166–172. <https://doi.org/10.1007/BF00222198>
20. Lanham P.G., Korycinska A., Brennan M. Genetic diversity within a secondary gene pool for *Ribes nigrum* L. revealed by RAPD and ISSR markers // J. Horticultural Sci. Biotechnol. 2000. V. 75(4). P. 371–375. <https://doi.org/10.1080/14620316.2000.11511253>
21. Russell J., Hackett C., Hedley P. et al. The use of genotyping by sequencing in blackcurrant (*Ribes nigrum*): developing high-resolution linkage maps in species without reference genome sequences // Mol. Breeding. 2014. V. 33(4). P. 835–849. <https://doi.org/10.1007/s11032-013-9996-8>
22. Хавкин Э.Е. Молекулярная селекция растений: ДНК-технологии создания новых сельскохозяйственных сортов // С.-х. биол. 2003. № 3. С. 26–41.
23. Чесноков Ю.В. ДНК-фингерпринтинг и анализ генетического разнообразия у растений // С.-х. биология. 2005. Т. 40. № 1. С. 20–40.
24. Пикунова А.В. Использование молекулярных маркеров для оценки исходного селекционного материала ягодных культур // Вестн. Орлов. гос. аграр. ун-та. 2011. № 3(30). С. 29–32.

25. Vos P., Hogers R., Bleeker M. et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting // Nucl. Acids Res. 1995. V. 23(21). P. 4407–4414. <https://doi.org/10.1093/nar/23.21.4407>
26. Zietkiewicz E., Rafalski A., Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification // Genomics. 1994. V. 20. P. 176–183. <https://doi.org/10.1006/geno.1994.1151>
27. Keller-Przybylkowicz S., Korbin M., Gwozdecki J. RAPD and ISSR markers of black and green colour of blackcurrant (*Ribes nigrum*) fruits // J. Fruit and Ornamental Plant Res. 2006. V. 14. P. 45–52.
28. Jones C.J., Edwards K.J., Castaglione S. et al. Reproducibility testing of RAPD, AFLP and SSR markers in plants by a network of European laboratories // Mol. Breed. 1997. V. 3. № 5. P. 381–390. <https://doi.org/10.1023/A:1009612517139>
29. Kalia R.K., Rai M.K., Kalia S. et al. Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants // Euphytica. 2011. № 177(3). P. 309–334. <https://doi.org/10.1007/s10681-010-0286-9>
30. <http://www.fruitbreeding.co.uk/RibesGenomicsSSRs.asp>.
31. Brennan R., Jorgensen L., Hackett C. et al. The development of a genetic linkage map of blackcurrant (*Ribes nigrum* L.) and the identification of regions associated with key fruit quality and agronomic traits // Euphytica. 2008. V. 161. P. 19–34. <https://doi.org/10.1007/s10681-007-9412-8>
32. Cavanna M., Marinoni D.T., Beccaro G.L. et al. Microsatellite-based evaluation of *Ribes* spp. germplasm // Genome. 2009. V. 52. № 10. P. 839–848. <https://doi.org/10.1139/G09-057>
33. Antonius K., Karhu S., Kaldm H. et al. Development of the Northern European *Ribes* core collection based on a microsatellite (SSR) marker diversity analysis // Plant Genet. Resources: Characterization and Utilization. 2012. P. 70–73. <https://doi.org/10.1017/S1479262111000980>
34. Пикунова А.В., Князев С.Д., Бахотская А.Ю. и др. Полиморфизм микросателлитных локусов у сортов черной смородины (*Ribes nigrum* L.) из коллекции ВНИИСПК // С.-х. биол. 2015. Т. 50. № 1. С. 46–54. <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2015.1.46rus>
35. Гаевский Н.А. Знакомство с эволюционной генетикой. Красноярск. 2002. 52 с.
36. Reim S., Flachowsky H., Hanke M.V. et al. Verifying the parents of the Pillnitzer apple cultivars // Acta Horticulture. 2009. V. 814. P. 319–323. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2009.814.50>
37. Межнина О.А. Оценка генетического разнообразия и разработка методов ДНК-идентификации сортов и представителей видов ягодных культур FRAGARIA L. и RIBES L.: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. 2017. 25 с.
38. Burnes T.A., Blanchette R.A., Smith J.A. et al. Black currant clonal identity and white pine blister rust resistance // HortScience. 2008. V. 43(1). P. 200–202.
39. Rehder A. Manual of Cultivated Trees and Shrubs. Toronto: MacMillan and Co., 1954. 999 p.
40. Keep E. Interspecific hybridization in *Ribes* // Genetica. 1962. V. 33. P. 1–23.
41. Coville F.V., Britton N.L. Grossulariaceae // North Amer. Flora. 1908. V. 22. P. 193–225.
42. Berger A. A taxonomic review of currants and gooseberries // N.Y. Agric. Exptl Sta. Techn. Bull. 1924. V. 109. P. 1–118.
43. Komarov V.L. Flora of the (former) USSR // Ribesioideae Engl. London: Keter, 1971. V. IX. P. 175–208.
44. Brennan R.M. Currants and gooseberries // Temperate Fruit Crop Breeding. Dordrecht: Springer, 2008. P. 177–196.
45. Janczewski E. Monograph of the currants *Ribes* L. // Mem. Soc. Phys. Hist. Nat. Geneve, 1907. V. 35. P. 199–517.
46. Sinnott Q.P. A revision of *Ribes* L. subg. *grossularia* (Mill.) per. Sect. *Grossularia* (Mill.) Nutt. (Grossulariaceae) in North America // Rhodora. 1985. V. 87. P. 189–286.
47. Еремин Г.В., Исачкин А.В., Казаков И.В. и др. Общая селекция и сортоведение плодовых и ягодных культур. М.: Мир, 2004. 422 с.
48. Самигуллина Н.С. Практикум по селекции и сортоведению плодовых и ягодных культур: уч. изд. Мичуринск: Изд-во Мичурин. гос. ун-та, 2006. С. 197.
49. Schultheis L.M., Donoghue M.J. Molecular phylogeny and biogeography of *Ribes* (Grossularia) with an emphasis of gooseberry (subg. *grossularia*) // Systemat. Bot. 2004. V. 29. № 1. P. 77–96. <https://doi.org/10.1600/036364404772974239>
50. Sinters A.E., Soltis D.E. Phylogenetic relationships in *Ribes* (Grossulariaceae) inferred from ITS sequence data // TAXON. 2003. V. 52. P. 51–66.
51. NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore>).
52. Mazeikiene I., Bendokas V., Stanys V. et al. Molecular markers linked to resistance to the gall mite in blackcurrant // Plant Breeding. 2012. V. 131(6). P. 762–766. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0523.2012.01995.x>
53. Hackett C.A., Russell J., Jorgensen L. et al. Multi-environment QTL mapping in blackcurrant (*Ribes nigrum* L.) using mixed models // Theor. Appl. Genet. 2010. V. 121(8). P. 1483–1488. <https://doi.org/10.1007/s00122-010-1404-8>
54. Огольцова Т.П. Селекция черной смородины – прошлое, настоящее, будущее. Тула: Приок. кн. изд-во, 1992. 384 с.
55. Keep E. Breeding for resistance to American gooseberry mildew, *Sphaerotheca mors-uvae*, in the gooseberry (*Ribes grossularia*) // Ann. Appl. Biol. 1974. V. 76(1). P. 131–135. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1974.tb01363.x>
56. Collard B.C. Marker-assisted selection: an approach for precision plant breeding in the twenty-first century // Phil. Transact. R. Soc. L. Ser B. Biol. Sci. 2008. V. 363. P. 557–572. <https://doi.org/10.1098/rstb.2007.2170>
57. Francia E. Marker assisted selection in crop plants // Plant Cell. Tissue and Organ Culture. 2005. V. 82. P. 317–342. <https://doi.org/10.1007/s11240-005-2387-z>

58. Brennan R., Jorgensen L., Gordon S.L. et al. The development of a PCR-based marker linked to resistance to the blackcurrant gall mite (*Cecidophyopsis ribis* Acari: Eriophyidae) // Theor. Appl. Genet. 2009. V. 118. P. 205–211.
https://doi.org/10.1007/s00122-008-0889-x
59. Anderson M.M. Resistance to gall mite (*Phytoptus ribes* Nal.) in the Eucorcosma section of *Ribes* // Euphytica. 1971. V. 20. P. 422–426.
60. Knight R.L. Transference of resistance to black currant gall mite *Cecidophyopsis ribis* from gooseberry to black currant // Ann. Appl. Biol. 1974. V. 76. P. 123–130.
https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1974.tb01362.x
61. Mazeikiene I., Bendokas V., Baniulis D. et al. Genetic background of resistance to gall mite in *Ribes* species // Agricultur. Food Sci. 2017. V. 26(2). P. 111–117.
https://doi.org/10.23986/afsci.59410
62. Пикунова А.В. Оценка генетического разнообразия исходного и селекционного материала ягодных культур с помощью молекулярных маркеров. Дис. ... канд. биол. наук. 2011. 148 с.
63. Шавыркина М.А., Князев С.Д., Пикунова А.В. Молекулярно-генетические методы отбора устойчивых к почковому клещу (*Cecidophyopsis ribis*) генотипов черной смородины // Современное садоводство. 2015. № 4(16). С. 31–35.

Genome Study by Means of DNA-Markers of the Black Currant

A. V. Pikunova^{a,*}, S. D. Knyazev^a, O. D. Golyaeva^a, A. U. Bahotskaya^a, and O. V. Kalinina^a

^aRussian Research Institute of Fruit Crop Breeding, Oryol oblast, Zhilina village, 302530 Russia

*e-mail: pikunanna84@mail.ru

The paper provides an overview of foreign and Russian studies of the genus *Ribes* genome by means of DNA-markers. A list of techniques for DNA extraction from currants is given. There are researches on the use of different types of DNA markers (RAPD, AFLP, ISSR, SSR) for genetic diversity, identification of varieties, molecular phylogeny and systematic are represented. In the works of various research teams, high level of polymorphism revealed by microsatellite markers are shown. Examples and prospects for their use in development of identification tools, pedigrees validations and collection management are represented. Paper describes genetic maps of blackcurrant developed by means of AFLP, SSR, SNP DNA markers. A list of QTL (quantitative trait loci) localized on genetic maps is represented. The published techniques for marker-assisted selection are described: DNA-markers of gene *Ce* and gene *P* of black currant resistance to gall mite and DNA-markers of green and black color of berries. Improved by authors method of gene *Ce* detection is described. Black currant is the most widely studied by means of DNA markers currant. The prospects for further development of currants genome studies and the possibilities that these studies will open for further human-directed improvement of these economically important crops are considered.

Keywords: currants, genome, DNA-markers, linkage map, Marker-Assisted Selection, *Ribes* L.