



Разработка мультиплексного набора микросателлитных маркеров для генетической идентификации черной смородины (*Ribes nigrum* L.)

М. В. Модоров, О. А. Киселева, М. А. Полежаева, Е. М. Чеботок

Уральский федеральный аграрный научно-исследовательский центр, Екатеринбург, Россия

Автор, ответственный за переписку: Ольга Анатольевна Киселева, kiselevaolga@inbox.ru

Актуальность. Для черной смородины (*Ribes nigrum* L.) к настоящему времени не предложена эффективная технология генетической идентификации сортообразцов. В частности, существующие решения с использованием микросателлитных маркеров предполагают амплификацию отдельных локусов в нескольких пробирках, что относительно ресурсоемко и требует оптимизации. **Материалы и методы.** Проанализированы имеющиеся решения для генетической идентификации сортообразцов черной смородины с использованием микросателлитных локусов. Отобрано восемь маркеров, расположенных в различных группах сцепления (g1-K04, g2-J08, e4-D03, g2-L17, e3-B02, g1-A01, e1-O01 и g2-G12). В ходе работы оптимизированы набор маркеров с непересекающимися длинами фрагментов, состав и температурный профиль полимеразной цепной реакции (ПЦР), позволяющие проводить амплификацию данных маркеров «в одной пробирке». Методика была протестирована на 33 сортообразцах генетической коллекции черной смородины Свердловской селекционной станции садоводства. **Результаты.** Подобраны условия проведения ПЦР и флуорохромы, позволяющие проводить амплификацию данных маркеров «в одной пробирке» и получать неперекрывающиеся длины фрагментов. Получены генетические профили 33 сортообразцов, по которым можно провести их однозначную идентификацию. Число аллелей в отобранных локусах составило от трех до одиннадцати. **Заключение.** Впервые предложена мультиплексная реакция, которая позволяет проводить оценку изменчивости восьми локусов смородины черной «в одной пробирке». Интерес представляет тестирование предложенной технологии на широком спектре сортообразцов черной смородины, полученных в различных регионах мира, а также на других видах рода *Ribes*, используемых в селекции черной смородины.

Ключевые слова: SSR, микросателлиты, ПЦР, генетическая идентификация

Благодарности: Исследование выполнено на базе Уникальной научной установки коллекции живых растений открытого грунта «Генофонд плодовых, ягодных и декоративных культур на Среднем Урале» (Свердловская ССС ФГБНУ УрФАНИЦ УрО РАН г. Екатеринбург) в соответствии с темой государственного задания «Комплексная оценка генофонда ягодных культур с помощью молекулярно-генетических и биотехнологических методов в селекции на улучшение хозяйственно-ценных признаков на Урале» (FNUW-2024-0007)

Для цитирования: Модоров М.В., Киселева О.А., Полежаева М.А., Чеботок Е.М. Разработка мультиплексного набора микросателлитных маркеров для генетической идентификации черной смородины (*Ribes nigrum* L.). *Биотехнология и селекция растений*. 2024;7(4):68-81. DOI: 10.30901/2658-6266-2024-4-06

Прозрачность финансовой деятельности: Авторы не имеют финансовой заинтересованности в представленных материалах или методах. Авторы благодарят рецензентов за их вклад в экспертную оценку этой работы. Мнение журнала нейтрально к изложенным материалам, авторам и их месту работы.

© Модоров М.В., Киселева О.А., Полежаева М.А., Чеботок Е.М., 2024

Original article

DOI: 10.30901/2658-6266-2024-4-o6

Development of multiplex microsatellite markers set for black currant (*Ribes nigrum* L.) genetic identification

Makar V. Modorov, Olga A. Kiseleva, Maria A. Polezhaeva, Elena M. Chebotok

Ural Federal Agrarian Research Centre, Ekaterinburg, Russia

Corresponding author: Olga A. Kiseleva, kiselevaolga@inbox.ru

Background. At present, there is no effective technology for the genetic identification of black currant (*Ribes nigrum* L.) cultivars. Current solutions involve the amplification of genetic markers (microsatellites) in multiple tubes, which is relatively resource-intensive and require optimization. **Materials and methods.** The existing approaches for the genetic identification of black currant cultivars using microsatellite loci were analyzed. Eight markers located in different linkage groups, namely g1-K04, g2-J08, e4-D03, g2-L17, e3-B02, g1-A01, e1-O01 and g2-G12, were selected. Various combinations of polymerase chain reaction (PCR) mix composition, fluorophores, temperature and heating time were tested to find conditions that would allow amplification of these markers in one tube and produce non-overlapping fragment lengths. The method was tested on eight cultivars and further on 33 cultivars from the genetic collection of the Sverdlovsk Selection Station of Horticulture. **Results.** PCR conditions and fluorophores were chosen to amplify the selected markers in one tube and to get non-overlapping fragment lengths. Genetic profiles of 33 cultivars were obtained, allowing their unambiguous identification. The number of alleles at the selected loci ranged from three to eleven. **Conclusion.** For the first time, the multiplex reaction made it possible to assess the variability of eight black currant loci by one-tube multiplex PCR. It is of interest to test the proposed technology on a wide range of black currant cultivars obtained in different regions of the world, as well as on other species of the genus *Ribes* used in black currant breeding process.

Keywords: SSR, microsatellite, PCR, genetic identification

Acknowledgements: The study was carried out on the basis of the Unique Scientific Facility of the Open Ground Live Plant Collection “Gene Pool of Fruit, Berry and Ornamental Crops in the Middle Urals” (Sverdlovsk Selection Station of Horticulture of the Ural Federal Agrarian Research Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg) in accordance with the topic of the State Assignment “Comprehensive assessment of the gene pool of berry crops using molecular genetics and biotechnological methods in breeding to improve economically valuable traits in the Urals” (FNUW-2024-0007)

For citation: Modorov M.V., Kiseleva O.A., Polezhaeva M.A., Chebotok E.M. Development of multiplex microsatellite markers set for black currant (*Ribes nigrum* L.) genetic identification. *Plant Biotechnology and Breeding*. 2024;7(4):68-81. (In Russ.). DOI: 10.30901/2658-6266-2024-4-o6

Financial transparency: The authors have no financial interest in the presented materials or methods. The authors thank the reviewers for their contribution to the peer review of this work. The journal's opinion is neutral to the presented materials, the authors, and their employers.

© Modorov M.V., Kiseleva O.A., Polezhaeva M.A., Chebotok E.M., 2024

Введение

Определение сортовой принадлежности сельскохозяйственных культур важно для поддержки сортовой чистоты, идентификации образцов гибридного фонда, а главное – защиты прав оригинатора. Классические методы определения опираются на морфологические признаки растений, что не всегда удобно, поскольку для проведения анализа необходимо наблюдение и тщательное проведение морфометрических измерений растений в ходе целого вегетационного сезона, а также сопоставление признаков с номенклатурным стандартом. Кроме того, число фенотипических маркеров относительно невелико, что во многих случаях затрудняет дифференциацию родственных сортообразцов. Использование молекулярно-генетических методов может значительно облегчить и ускорить данную трудоемкую процедуру.

К настоящему времени для идентификации индивидов (включая клоны), либо их групп (популяций, этносов, пород, ряда сортов) в качестве генетических маркеров наиболее часто используют однонуклеотидные полиморфизмы (ОНП, single nucleotide polymorphisms, SNP), либо ядерные микросателлиты (simple sequence repeats, SSR) (ICAR guidelines, 2022; Testolin et al., 2022; Montanari et al., 2023). С учетом себестоимости проведения тестов и приборного оснащения лабораторий на территории РФ, разработка и совершенствование панелей микросателлитных маркеров для определения сортовой принадлежности сельскохозяйственных культур выглядит более востребованной технологией, нежели использование ОНП (Testolin et al., 2022).

Ядерные микросателлиты – участки ядерной ДНК, в которых повторяется мотив длиной от двух до девяти нуклеотидов, а число повторов, как правило, варьирует от пяти до 40. Аллельное разнообразие возникает за счет разницы в числе повторов, которое проявляется в различиях длин фрагментов ПЦР-продуктов. Анализ профилей индивидуальной аллельной изменчивости локусов осуществляется путем электрофоретического разделения фрагментов (Galinskaya et al., 2019). При разработке панели микросателлитных маркеров для сортовой идентификации необходимо учитывать несколько критериев. Требования, связанные непосредственно с объектом исследования, заключаются в подборе локусов, которые охватывают как можно большее количество групп сцеплений, производят отбор локусов, расположенных на разных хромосомах, либо в пределах одной хромосомы, но на значительном удалении друг от друга; количество локусов должно обладать достаточной дифференцирующей силой, чтобы разделять все или большинство сортообразцов в коллекции. Требования к технической стороне подготовки панели заключаются в оптимизации проведения процесса, чтобы сократить себестоимость анализа. Таким образом, для создания мультиплексной полимеразной цепной реакции (мультиплексной ПЦР), проводимой «в одной пробирке» (one-tube multiplex PCR)

необходимо подобрать локусы с неперекрывающимися длинами фрагментов ПЦР продуктов; сочетание флуорофоров с неперекрывающимися каналами детекции; подобрать условия ПЦР реакции, а именно подготовку смеси и температурный профиль так, чтобы избежать конкуренции разных праймеров и иметь стабильный выход продукта для каждого из локусов. Кроме того, следует тщательно подобрать концентрации меченых флуорофорами праймеров во избежание перекрывания пиков флуоресценции разных каналов детекции (в англоязычной литературе это явление называется pull-up peaks) с целью получения однозначно интерпретируемых электрофореграмм. Поиск технологий, отвечающих вышеприведенным требованиям, ведется для плодовых и ягодных культур, обладающих высокой экономической значимостью. Так мультиплексные наборы для генетической идентификации с использованием более восьми микросателлитных маркеров «в одной пробирке» разработаны для яблони (*Malus × domestica*) (Cmejlova et al., 2021), груши (род *Pyrus*) (Zurn et al., 2020), винограда (род *Vitis*) (Sekridova et al., 2022) и голубики (род *Vaccinium*) (Bassil et al., 2020).

Актуальность разработки подобной технологии для черной смородины (*Ribes nigrum* L.) обусловлена востребованностью культуры (плодов, листьев, почек) в пищевой, фармацевтической и вино-водочной промышленности (Petrova, Kuznetsova, 2014), а также наличием большого числа сортов, используемых для промышленного и любительского садоводства (Knyazev, Ogol'cova, 2004; Knyazev et al., 2016). Культурные формы черной смородины широко возделываются в Северном полушарии. Наиболее успешно селекционные программы реализуются в Польше, Англии, Белоруссии, Украине, Швеции, Литве, Финляндии, Румынии, Китае и России (Sazonov, 2018; Knyazev, Ogol'cova, 2004). Современный отечественный сортимент создается на основе межсортных, внутри- и межвидовых скрещиваний потомков европейского *Ribes nigrum* ssp. *europaeum* (Jancz.) и сибирского *R. nigrum* ssp. *sibiricum* (E.W.) подвидов смородины черной, смородины скандинавской *R. nigrum* ssp. *scandicum* Hedl., а также с привлечением других видов черноплодных смородин, а именно смородины дикуши *R. dikuscha* Fisch. ex Turcz., смородины малоцветковой *R. pauciflorum* Turcz. ex Pojark., смородины моховки *R. procumbens* Pall. и прочих (Gabysheva, 2019; Knyazev, Bakhotskaya, 2018). Несмотря на наличие разработанных генетических маркеров (Brennan et al., 2002; 2008), пригодных для индивидуальной идентификации сортообразцов черной смородины, технологии мультиплексного анализа этих маркеров до настоящего времени не предложено (Antonius et al., 2012; Brennan et al., 2002; 2008; Cavanna et al., 2009; Dolzhikova et al., 2020; Mezhnina, Urbanovich, 2017; Palmieri et al., 2013; Pikunova et al., 2015). В данной работе мы рассматриваем имеющиеся подходы к генетической идентификации сортообразцов черной смородины и предлагаем перспективный для решения данной задачи

способ мультиплексной ПЦР «в одной пробирке».

Обзор имеющихся решений для генетической идентификации сортообразцов черной смородины

В базе NCBI (National Center for Biotechnology Information, USA) представлены полные геномы хлоропластов *Ribes nigrum* (Sun et al., 2023), а также митохондрий (Lu et al., 2024), однако данные о последовательности ядерного генома данного вида весьма ограничены. Поэтому при выборе ядерных микросателлитных локусов мы ориентировались на ранее разработанные маркеры, для чего провели обзор данных литературы, посвященных генетической идентификации черной смородины, либо анализу филогении рода *Ribes*, включающему *R. nigrum*. По результатам поиска было отобрано восемь публикаций (Antonius et al., 2012; Brennan et al., 2002; 2008; Cavanna et al., 2009; Dolzhikova et al., 2020; Mezhnina, Urbanovich, 2017; Palmieri et al., 2013; Pikunova et al., 2015). Во всех этих работах для анализа генетической изменчивости черной смородины были использованы SSR-маркеры, предложенные в двух работах Р. Бреннана с соавторами, опубликованных в 2002 и 2008 годах (Brennan et al., 2002; 2008). Первая панель SSR-маркеров, разработанная для черной смородины, включала 11 локусов, обозначенных RJL-1(-11) (Brennan et al., 2002). Для этих локусов был описан мотив, ожидаемый размер фрагментов и число аллелей, полученных при анализе нескольких видов рода *Ribes*. В 2008 году опубликованы данные о локализации 40 микросателлитных локусов черной смородины в семи группах сцепления (Brennan et al., 2008). Для предложенных локусов была приведена информация о последовательностях праймеров, однако данные о числе аллелей и мотиве отсутствовали.

Названия локусов в публикациях Р. Бреннана с соавторами в 2002 и 2008 годов различаются, однако, проведенное нами сравнение последовательностей праймеров, предложенных для этих маркеров, показало, что в ряде случаев они полностью совпадают. В частности, для пар локусов g1-K04 и RJL-6, g1-M07 и RJL-7, g1-P08 и RJL-10 совпадают последовательности прямых «F» праймеров и обратно-комплементарные последовательности обратных «R» праймеров. У локусов g1-P05 и RJL-5 совпадают только последовательности «F» праймера. Для картированных в пятой хромосоме локусов g1-A01 и g1-L12 отмечены совпадения последовательностей праймеров, используемых для локусов RJL-11 и RJL-2 (табл. 1). Выявленные совпадения позволяют картировать часть локусов, предложенных Р. Бреннаном с соавторами в 2002 году (Brennan et al., 2002). В 2014 году методом генотипирования путем секвенирования (genotyping by sequencing) без прочтения референсного генома черной смородины были уточнены позиции генетических маркеров, описанных Р. Бреннаном с соавторами в 2008 году (Russell et al., 2014, см. табл. 1). Отметим, что сам вид смородина чер-

ная и большинство её сортообразцов имеют диплоидный набор хромосом ($2n=16$), а разработанные микросателлитные маркеры, представленные в таблице 1, локализованы в семи хромосомах. Микросателлитные маркеры восьмой хромосомы не описаны.

Одно из требований к генетическим маркерам, используемым при проведении популяционно-генетических исследований, заключается в их несцепленном наследовании. Игнорирование этого требования приводит к тому, что участки генома, представленные в исследовании несколькими сцепленно наследуемыми локусами, вносят непропорционально большой вклад в оценку величины различий между особями или группами особей. В случае филогенетического анализа это может привести к появлению результатов, невозможных при использовании иных панелей генетических маркеров. Сцепленное наследование приводит к снижению индексов индивидуальной идентификации особей (Hedrick, 2010). Важно отметить, что многие локусы, предложенные в работе Р. Бреннана с соавторами в 2008 году (Brennan et al., 2008), локализованы в пределах одной хромосомы на незначительном расстоянии друг от друга (см. табл. 1). Для решения задач генетической идентификации подобные локусы оправдано рассматривать как сцепленные и не использовать в одном анализе. В проведенной нами работе мы приняли, что локусы, расположенные на различных хромосомах, либо на одной хромосоме на удалении более 20 сМ (сантиморганов, % рекомбинации) наследуются несцепленно. Анализ позиций локусов, приведенных в таблице 1 показывает, что при установлении подобного требования 40 SSR-маркеров, предложенных Р. Бреннаном с соавторами (Brennan et al., 2008), локализованы в 10 группах сцепления (LG).

При выборе локусов для мультиплекса мы провели анализ методики и результатов ранее проведенных исследований изменчивости SSR-маркеров черной смородины (табл. 2). Внимание было обращено на перечисленные ниже показатели и особенности маркеров: во-первых, на наличие сложностей при работе с локусом, например, плохое качество электрофоретического разделения ПЦР-продукта, в особенности присутствие неспецифических фрагментов; во-вторых, на число аллелей в локусе: при выборе маркера предпочтение отдавали локусу с большим числом аллелей; в-третьих, на размер фрагментов – оценка показателя необходима для разделения в мультиплексе фрагментов, меченных одним флуорофором; в-четвертых, на температуру отжига праймеров, поскольку при высокой температуре отжига – при прочих равных условиях – количество образующихся неспецифических фрагментов ниже, что особенно важно в мультиплексной реакции (Rebrikov et al., 2023), поэтому интерес представляли локусы, для которых температура отжига составляла не менее 59°C; в-пятых, на величину мотива, наличие в локусе фрагментов, различающихся на одну пару нуклеотидов. Наличие подобных фрагментов услож-

Таблица 1. Микросателлитные маркеры смородины черной

Table 1. Microsatellite markers of black currant

№	Название локуса/ Locus name		Хромосома/ Chromosome	Позиция, сМ/ Position, cM	LG
	Brennan et al., 2008	Brennan et al., 2002**			
1	g1-O17	-	1	39,28	I
2	g1-K04	RJL-6 (F, R_RC)	1	39,78	
3	g2-P03	-	1	41,46	
4	e1-O20	-	1	45,62	
5	gr2-J05	-	1	46,62	
6	g2-D05	-	1	51,1	
7	g1-P05	RJL-5 (F)	1	53,54	
8	g1-M07	RJL-7 (F, R_RC)	1	55,91	
9	g1-E03*	-	1	45	
10	g1-G06	-	2	51,5	II
11	g1-B02	-	2	54,44	
12	g1-P01	-	2	54,47	
13	g2-J08	-	2	55,04	
14	gr1-F07	-	2	55,08	IIIa
15	e4-D03	-	3	0,5	
16	g2-B20	-	3	59,86	IIIb
17	g2-M19	-	3	60,09	
18	e3-M04	-	3	63,68	
19	g1-P08	RJL-10 (F, R_RC)	4	61,35	IV
20	gr2-N24	-	4	61,40	
21	g1-F04	-	4	61,43	
22	gr2-N15	-	4	61,47	
23	e1-O21	-	4	61,56	
24	g2-L17	-	4	62,30	
25	g2-H21	-	4	64,01	
26	e3-B02	-	5	6,70	Va
27	g2-N20	-	5	35,55	Vb
28	g1-H09	-	5	38,99	
29	g1-A01	RJL-11 (F), RJL-2 (R_RC)	5	40,68	
30	g1-L12	RJL-2 (F), RJL-11 (R_RC)	5	40,75	
31	g1-O02	-	5	54,95	
32	e2-L15*	-	5	53	
33	g1-D11	-	6	15,15	VIa
34	g1-I02	-	6	16,60	
35	e1-O01	-	6	16,61	
36	g1-P21	-	6	37,02	VIb
37	g2-G12	-	7	69,44	VII
38	g3-A17	-	7	69,51	
39	g1-G11	-	7	69,58	
40	g2-J11	-	7	69,60	

Примечание. Номер хромосомы и позиция приведены согласно Russell et al., 2014, группы сцепления (LG) выделены нами для решения задач данной работы (объяснения в тексте). * – в работе Russell et al., 2014 данные о позиции данных маркеров отсутствуют, позиция приведена согласно Brennan et al., 2008. ** – в работе Brennan et al., 2002 информация о локализации локусов в хромосомах не приведена, заключение о позиции маркеров сделано на основании полного совпадения последовательностей праймеров, приведенных в работах Brennan et al., 2002 и Brennan et al., 2008. Использованы обозначения F – прямой праймер, R_RC – последовательность, обратнo-комплементарная обратному праймеру R.

Note. The chromosome number and position are given according to Russell et al., 2014, linkage groups (LG) were identified by us to solve the problems of this work (see explanations in the text). * – the work of Russell et al., 2014 contains no data on the position of these markers; positions are given according to Brennan et al., 2008. ** – the work of Brennan et al., 2002 provides no information on the localization of loci in chromosomes; a conclusion on the position of markers is made on the basis of a complete match of the primer sequences provided in the works of Brennan et al., 2002 and Brennan et al., 2008. Designations used: F – forward primer, R_RC – sequence reverse complementary to reverse primer R.

няет расшифровку электрофореграмм и может свидетельствовать либо о присутствии нескольких мотивов в локусе, либо о наличии в локусе иной изменчивости, нежели различия числа мотивов. В любом случае, использование подобных локусов в мультиплексе нежелательно. Во всех упомянутых выше публикациях авторы не сообщают об использовании мультиплексной ПЦР-реакции, из чего можно сделать заключение, что оптимизации методики для мультилокусного анализа «в одной пробирке» не проводилось.

Температура отжига праймеров в одной серии работ (Cavanna et al., 2009; Pikunova et al., 2015; Dolzhikova et al., 2020) составляет от 50 до 56°C, в другой же публикации (Palmieri et al., 2013) был использован температурный градиент от 60°C до 55°C со снижением температуры на 0,5°C на цикл. В связи с этим при выборе маркеров мы ориентировались на панель локусов, использованную в последней публикации (Palmieri et al., 2013). На основании проанализированных данных для разрабатываемого мультиплекса нами было отобрано десять маркеров с высоким полиморфизмом, расположенных в различных группах сцепления (LG), и с учетом ожидаемых размеров фрагментов, потенциально способных быть объединенными в мультиплекс «в одной пробирке», а именно: g1-K04, g2-J08, e4-D03, e3-M04, e1-O21, g2-L17, e3-B02, g1-A01, e1-O01 и g2-G12. Два локуса, e1-O21 и g2-L17, которые располагаются в IV группе сцепления, были отобраны с тем расчетом, что по результатам предварительной работы будет выбран только один из них.

Материалы и методы

Для анализа были отобраны и высушены в силикагеле листья 33 сортообразцов из генетической коллекции черной смородины Свердловской селекционной станции садоводства – структурного подразделения ФГБНУ УрФАНИЦ УрО РАН. Выбранные сорта входят в реестровые списки селекционных достижений разных стран (Россия, Украина, Беларусь, Великобритания), различаются по происхождению и распространению (табл. 3).

ДНК выделяли по стандартному протоколу для растительных тканей, а именно использовали СТАВ-метод с модификацией в виде двойной очистки смесью с изомилхлороформом (Devey et al., 1996). Качество выделенной ДНК проверяли путем горизонтального электрофореза в агарозном геле. ПЦР проводили в реакционной смеси объемом 10 мкл содержащей 1 × Taq Turbo буфер, 1,25 единиц Taq ДНК-полимеразы (Евроген, РФ, кат. №PK113, буфер содержит $MgCl_2$), дополнительно 1,15 mM $MgCl_2$, 0,5 mM каждого dNTP, 5%DMSO, 50-100 нг ДНК. Финальный состав праймеров и их концентрации приведены в таблице 4. Как указано, 5' конец каждого прямого (F) праймера был помечен одним из четырех флуорофоров: FAM, R6G, TAMRA, ROX.

Финальные концентрации праймеров получены

в результате нескольких, не менее 10, последовательных этапов отбора. Выбранная смесь позволяет получать пики флуоресценции, относительно высокие и неперекрывающиеся в случае использования разных каналов детекции (англ. pull-up peaks). Заметные различия в финальных концентрациях праймеров отчасти связаны со способностью используемого генетического анализатора считывать значения свечения для различных флуорофоров, при прочих равных условиях интенсивность их флуоресценции снижается в ряду FAM – R6G – TAMRA – ROX. Поэтому концентрация праймеров, меченных ROX и TAMRA, выше, чем для FAM и R6G, что видно из таблицы 4. Помимо этого, различия концентраций праймеров могут быть обусловлены спецификой требований к условиям ПЦР: если условия не оптимальны, то это может быть компенсировано увеличением концентрации праймера.

На этапе отработки мультиплекса было рассмотрено несколько вариантов концентрации DMSO, BSA и $MgCl_2$. По результатам работы было сделано заключение, что добавление BSA не влияет на качество ПЦР, 5% DMSO дает наилучший результат реакции, увеличение его концентрации влияет на протекание ПЦР негативно, однако его исключение из смеси реагентов приводит к незначительному снижению выхода продукта ПЦР. Добавление $MgCl_2$ в концентрациях 1,15 mM, 3,3 mM, 4,45 mM не отражается на получаемых электрофореграммах, поэтому мы использовали наименьшую из этих концентраций.

Термоциклирование (ПЦР) проводили с использованием прибора CFX96 Touch (Bio-Rad, USA) по следующему протоколу: 95°C – 3 мин, затем 35 циклов [94°C – 30 сек, 59°C – 45 сек, 72°C – 30 сек], финальная элонгация в течение 30 минут при 68°C, скорость нагрева проб от 59 до 72°C устанавливали равной 0,3°C/сек. Длины амплифицированных фрагментов определяли на генетическом анализаторе Нанофор-05 (“Синтол”, РФ) в присутствии маркера молекулярной массы S-550 (“Гордиз”, РФ). Хроматограммы расшифровывали в программе GeneMapper® Software Version 4.0 (Applied Biosystems, USA).

На этапе отработки мультиплекса мы рассматривали несколько вариантов температуры отжига праймеров, а именно 59°C, 60°C, 61°C, 62°C. При прочих равных условиях реакции выход ПЦР продукта при 59°C был наилучшим. Регулирование скорости нагрева проб от 59 до 72°C не более 0,3°C/сек заимствовано нами из протокола для генотипирования крупного рогатого скота (CoReDIS Cattle, 2024). Подобный подход хорошо зарекомендовал себя при разработке мультиплексов (Modorov et al., 2020), поэтому был использован нами и в этой работе.

Были рассчитаны следующие показатели, характеризующие генетическую изменчивость выборки: среднее число аллелей на локус (N), эффективное число аллелей на локус (N_e), ожидаемая гетерозиготность (H_e). Дана оценка вероятности идентичности (PI от англ.

Таблица 2. Число аллелей и размеры фрагментов SSR-локусов *Ribes nigrum* L.
Table 2. Number of alleles and sizes of SSR loci fragments in *R. nigrum* L.

№	Название локуса/ Locus name	Chr.	Позиция, cM/ Position, cM	Размер фрагментов аллелей, пн (Число аллелей в локусе)/ Allele fragment size, bp (Number of alleles per locus)	Savanna et al., 2009*	Antonius et al., 2012**	Palmieri et al., 2013 ***	Pikunova et al., 2015 **	Mezhnina, Urbanovich, 2017**	Dolzhiikova et al., 2020**
1	g1-K04 (=RJL-6)	1	39,78	267-299 (10) RJL-6 NA	191-309	-	278-300 (4)	285-298 (4)	270-300 (7)	302-316
2	e1-O20	1	45,62	-	-	-	192-230 (4)	-	-	-
3	gr2-J05	1	46,62	-	-	-	158-185 (4)	-	-	169-200
4	g1-P05, рядом RJL-5	1	53,54	RJL-5 NA	205-304	-	-	-	-	-
5	g1-M07 (=RJL-7)	1	55,91	201-223 (9) RJL-7 NA	194-233	-	-	200-222 (7)	200-230 (11)	201-233
6	g1-E03	1*	45*	224-251 (9)	-	-	-	232-270 (7)	233-262 (7)	-
7	g1-B02	2	54,44	Более 2	-	-	-	203-207 (3)	-	-
8	g2-J08	2	55,04	142-184 (9)	-	-	140-178 (3)	158-164 (4)	-	-
9	e4-D03	3	0,5	165-211 (13)	-	-	164-242 (11)	197-224 (8)	200-226 (10)	-
10	g2-B20	3	59,86	-	-	-	-	147-185 (5)	-	-
11	e3-M04	3	63,68	293-334 (15)	-	-	294-340 (9)	-	-	-
12	g1-P08 (=RJL-10)	4	61,35	114-165 (7)	149-298	-	-	-	-	-
13	e1-O21	4	61,56	286-317 (11)	-	-	286-306 (4)	288-294 (3)	-	292-298
14	g2-L17	4	62,30	122-165 (10)	-	-	-	150-171 (6)	-	142-166
15	g2-H21	4	64,01	-	-	-	-	265-273 (3)	-	244-252
16	e3-B02	5	6,70	Более 2	-	-	145-176 (7)	188-194 (4)	161-183 (4)	165-170
17	g1-A01	5	40,68	204-243 (12)	-	-	-	-	209-213 (3)	207-222
18	RJL-11	-	-	113 (1)	205-229	-	-	-	-	-
19	RJL-2	-	-	WA	197-238	-	-	-	-	-
20	g1-L12	5	40,75	-	-	-	-	-	-	201-218
21	g1-D11	6	15,15	236-246	-	-	-	-	-	-
22	g1-I02	6	16,60	-	-	-	120-130 (3)	-	-	-
23	e1-O01	6	16,61	136-153 (9)	-	-	-	138-149 (6)	144-166 (8)	137-155
24	g2-G12	7	69,44	-	-	-	168-196 (7)	190-215 (7)	167-191 (10)	173-197
25	RJL-3	-	-	N/A	-	-	-	-	-	-

Примечание. Chr. – номер хромосомы черной смородины, * – данные для пяти видов рода *Ribes*, включая *R. nigrum*. ** – данные для *R. nigrum*. *** – размер фрагментов приведен для нескольких видов рода *Ribes*, а число аллелей только для черной смородины, N/A – продукт амплификации отсутствует. Более 2 – в ПЦР-продукте отмечено более двух бендов. WA – слабая амплификация (weak amplification). Прочерк обозначает отсутствие данных.

Note. Chr. – black currant chromosome number, * – data for five species of the genus *Ribes*, including *R. nigrum*. ** – data for *R. nigrum*. *** – fragment sizes are given for several species of the genus *Ribes*, and the number of alleles is only for black currant. «Более 2» – more than two bands are noted in the PCR product. WA – weak amplification. A dash indicates no data.

Таблица 3. Характеристика сортообразцов черной смородины для мультиплексного тестирования

Table 3. Characteristics of black currant cultivars for multiplex testing

Название сорта/ Cultivar name	Происхождение/ Origin	Оригинатор/ Originator organization
1. 'Поклон Борисовой'	Сеянец 'Голубки' × 'Лепаан Муста'*	НИИ садоводства Сибири имени М.А. Лисавенко (ФГБНУ «Федеральный Алтайский научный центр агробиотехнологий»), Россия
2. 'Козацька'	('Юность' × 'Зоя') × 'Минай Шмырёв'	Институт садоводства НААН, Украина
3. 'Баритон'	'Поклон Борисовой' × 'Triton'*	НИИ садоводства Сибири имени М.А. Лисавенко (ФГБНУ «Федеральный Алтайский научный центр агробиотехнологий»), Россия
4. 'Подарок Ильиной'	'Сеянец Голубки' × 'Brödtorp'*	Южно-Уральский НИИ плодовоовощеводства и картофелеводства (ФГБНУ УрФАНИЦ УрО РАН), Россия
5. 'Казкова'	'Ojebyn'* × 'Санюта' (('Юность' × 'Зоя') × 'Минай Шмырёв')	Институт садоводства НААН, Украина
6. 'Дабрадзья'	'Ben Lamond' × 'Катюша'	РУП "Институт плодководства", Белоруссия
7. 'Церера'	'Павлинка' × 'Пилот Александр Мамкин'	
8. 'Ben Sarek'	Сортосерия 'Ben'	Шотландский научно-исследовательский институт растениеводства (Scottish Crop Research Institute), Великобритания
9. 'Лучия'	от опыления формы ('Минай Шмырёв' × 'Brödtorp'*) смесью пыльцы сеянцев из семьи [('Диковинка' × 'Brödtorp'*) × 'Любимица Алтай']	НИИ садоводства Сибири имени М.А. Лисавенко (ФГБНУ «Федеральный Алтайский научный центр агробиотехнологий»), Россия
10. 'Валовая'	'Крупная' × (смесь пыльцы 'Brödtorp'* и 'Хлудовская')	ФГБНУ ФНИЦ Садоводства, Россия
11. 'Краса Львова'	'Загадка' ('Нина' × 'Соперник') × 'Лентяй' ('Минай Шмырёв' × 'Brödtorp'*)	Институт садоводства НААН, Украина
12. 'Вымпел'	('Ленинградский великан' × 'Минай Шмырёв') × 'Валовая'	Свердловская селекционная станция садоводства (ФГБНУ УрФАНИЦ УрО РАН), Россия
13. 'Глобус'	'Ленинградский Великан' × 'Минай Шмырёв'	
14. 'Подарок Астахова'	форма 66-28-105 × 'Селеченская 2' (42-7 × 4-1-116)	
15. 'Селеченская'	Сеянец 'Голубки' × 32-77 (сеянец 'Brödtorp'*)	ФГБНУ «ФНИЦ кормопроизводства и агроэкологии им. В.Р. Вильямса», Россия
16. 'Литвиновская'	Форма СН 6-28-105 × 'Селеченская 2' (42-7 × 4-1-116)	
17. 'Мавлади'	'Titania'* × 'Добрыня'	
18. 'Дар Смольяниновой'	4-15-90 × 42-7	
19. 'Память Калининой'	Неизвестно	
20. 'Алтайская поздняя'	(Сеянец 'Голубки' × 'Сложнокистная') × 'Клуссоновская'	
21. 'Спас'	'Ядреная' × 'Плотнокистная'	НИИ садоводства Сибири имени М.А. Лисавенко (ФГБНУ «Федеральный Алтайский научный центр агробиотехнологий»), Россия
22. 'Руслан'	'Сокровище' × сеянец 74-5-1 (от свободного опыления формы сибирского подвита)	
23. 'Ладушка'	('Белорусская сладкая' × 'Sunderbyn II'*) × 'Дачница'	
24. 'Десертная Огольцовой'	('Белорусская сладкая' × 'Sunderbyn II'*) × 'Дачница'	
25. 'Черноокая'	'Бинар' × 'Орловский вальс'	
26. 'Очарование'	1168 (27-3-63 × 'Sunderbyn II'*) × 'Экзотика'	
27. 'Креолка'	форма ('Белорусская сладкая' × 'Sunderbyn II'*) × 'Зуша'	ФГБНУ Всероссийский научно-исследовательский институт селекции плодовых культур, Россия

Название сорта/ Cultivar name	Происхождение/ Origin	Оригинатор/ Originator organization
28. 'Светлолистная'	'Brödtorp'* × 'Минай Шмырёв'	ФГБНУ ФНЦ им. И.В. Мичурина, ФГБОУ ВО Мичуринский ГАУ, Россия
29. 'Шалунья'	'Детскосельская' × 'Диковинка'	
30. 'Шаман'	'Глобус' × 'Валовая'	Свердловская селекционная станция садоводства (ФГБНУ УрФАНИЦ УрО РАН), Россия
31. 'Славянка'	'Fertodi'* × 'Зеленая Дымка'	
32. 'Доброхот'	'Валовая', свободное опыление	
33. 'Пилот'	'Валовая', свободное опыление	

Примечание. * – сорт скандинавского происхождения

Note. * – cultivar of Scandinavian origin

probability of identity), то есть вероятности того, что две особи в перекрестно размножающейся популяции случайно имеют идентичный генотип. Поскольку анализируемые сортообразцы смородины могли иметь общие аллели в связи с общностью их происхождения (см. табл. 3), мы оценили вариант индекса индивидуальной идентичности, а именно PIsibs (Waits et al., 2001). Этот индекс дает оценку, которую можно использовать в качестве консервативной верхней границы вероятности наблюдения идентичных мультилокусных генотипов у двух особей, отобранных из популяции. Расчеты индексов PI и PIsibs были проведены для каждого локуса по отдельности. При оценке эффективности индивидуальной идентификации с использованием всей панели маркеров значения вероятностей идентичности, полученные для каждого локуса, перемножали. Анализ выполнен в программе GenAlEx v. 6.51b2 (Peakall et al., 2006).

Результаты и обсуждение

Восемь локусов, а именно g1-K04, g2-J08, e4-D03, g2-L17, e3-B02, g1-A01, e1-O01 и g2-G12 (табл. 4) стало возможным использовать для мультилокусного анализа, а именно в одной пробирке были получены продукты амплификации необходимого качества для всех локусов, подобраны флуоресцентные метки, концентрации праймеров, состав иных реагентов ПЦР-смеси и условия проведения ПЦР. После первичного анализа проб образцы были зашифрованы и проанализированы повторно, расшифрованные генотипы совпали для семи локусов за исключением g2-L17, у которого отмечено выпадение длинных фрагментов в связи с малым количеством их копий и, соответственно, с незначительной высотой соответствующих им пиков.

Для локуса e3-M04 (см. табл. 1 и 2) продуктов амплификации получено не было. Степень амплификации локуса e1-O21 была незначительной, пики аллелей были слиш-

ком низкими. В связи со сложностью интерпретации данных локус e1-O21 был исключен из анализа.

В результате апробации нами были установлены оптимальные соотношения концентраций пар праймеров в мультиплексной реакции, что в итоге позволило получить высокое качество электрофореграмм. Концентрации праймеров приведены в таблице 4; пример электрофореграмм для восьми локусов в случае сортообразца 'Ben Sarek' представлен на рисунке, профили 33 проанализированных сортообразцов приведены в таблице 5. При определении размера мотива для каждого локуса мы ориентировались на минимальные различия длин фрагментов.

Характеристика изменчивости в локусах. В проанализированных локусах черной смородины было обнаружено от трёх до 11 аллелей, ожидаемая гетерозиготность составила от 0,49 до 0,81 (см. табл. 4). Значения индексов вероятности идентичности PI для отдельных локусов составили от 0,06 до 0,35, для всей панели маркеров $1,7 \times 10^{-7}$, таким образом вероятность совпадения генотипов двух особей, случайно отобранных из популяции, составляет 1,7 на 10 миллионов проведенных тестов. Значения индексов PIsibs значительно выше, чем индексов PI. Для проанализированных локусов они составили от 0,36 до 0,57 и $1,8 \times 10^{-3}$ для всей панели маркеров. Таким образом, даже для потомков одних родителей использование предложенной панели SSR-локусов покажет не более 1,8 совпадений генотипов на 1000 проведенных сравнений.

Локус g1-K04 (Chr. 1, LG I) представлен пятью аллелями с размерами фрагментов от 286-300 пн, размером мотива 2 пн. Локус g2-J08 (Chr. 2, LG II) имеет пять аллелей с диапазоном размеров фрагментов 156-166 пн, размер мотива 2 пн. Локус g2-G12 (Chr. 7, LG VII) представлен девятью аллелями с размерами фрагментов от 172 пн до 190 пн, размером мотива 2 пн. Интерпретация данных полученных для этих маркеров затруднений не вызвала.

Таблица 4. Особенности микросателлитных локусов мультиплексной панели маркеров и характеристика изменчивости выбранных локусов

Table 4. Features of microsatellite loci of a multiplex marker panel and characteristics of variability of selected loci

Локус/ Locus	Chr.	LG	Мотив, пн/ motif, bp	Флуорофор/ Fluorophore	N	Ne	He	PI	PIsibs	Диапазон длин фрагментов, пн/ Fragment length range	Концентрация праймеров, мкМ/ Primer concentration, μM
g1-K04	1	I	2	ROX	5	2,1	0,52	0,27	0,56	286-300	1,75
g2-J08	2	II	2	FAM	5	2,5	0,60	0,23	0,51	156-166	0,12
e4-D03	3	IIIa	2	ROX	11	5,0	0,80	0,06	0,37	202-250 (+205)	0,58
g2-L17	4	IV	2	TAMRA	9	4,4	0,77	0,09	0,39	147-171	0,70
e3-B02	5	Va	3	R6G	3	2,1	0,52	0,32	0,57	167-173	0,09
g1-A01	5	Vb	2	R6G	3	2,0	0,49	0,35	0,59	208-212	0,12
e1-O01	6	VIa	2	ROX	8	5,2	0,81	0,06	0,36	143-161	0,70
G2-G12	7	VII	2	FAM	9	5,2	0,81	0,07	0,36	172-190	0,18

Примечание. Chr. – номер хромосомы смородины черной, LG – группы сцепления, N – число аллелей, Ne – эффективное число аллелей на локус, He – ожидаемая гетерозиготность, PI – индекс вероятности идентичности особей, PIsibs – индекс вероятности идентичности для сибсов.

Note. Chr. – black currant chromosome number, LG – linkage groups, N – number of alleles, Ne – effective number of alleles per locus, He – expected heterozygosity, PI – probability of identity index for individuals, PIsibs – probability of identity between sibs

Локус e4-D03 (Chr. 3, LG IIIa) представлен 11 аллелями с размерами фрагментов 202-250 пн., 10 из этих аллелей имеют четный размер, мотив составляет 2 пн, у трех сортообразцов отмечен один аллель размером 205 пн, нечетный размер. Несмотря на это, интерпретация данных не вызвала трудностей.

Локус g2-L17 (Chr. 4, LG IV) представлен девятью аллелями с размерами фрагментов 147-171 пн, размер мотива 2 пн. Особенностью локуса является различие высот пиков коротких и длинных фрагментов, в результате которого при повторном анализе имеет место «отсев» длинных аллелей и возникают трудности с расшифровкой гетерозигот по аллелям, характеризующимся длинными фрагментами, в случае различия аллелей в один мотив.

Локус e3-B02 (Chr. 5, LG Va) представлен тремя аллелями с размерами фрагментов 167-173 пн, размер мотива 3 пн. Может иметь небольшой неспецифичный пик размером 172 пн. Известны сообщения о том, что в данном локусе может быть амплифицировано более двух аллелей у одного индивида (Savanna et al., 2009). Локус g1-A01 (Chr. 5, LG Vb) представлен тремя аллелями с размерами фрагментов 208-212 пн, размер мотива 2 пн. Интер-

претация данных, полученных для локуса, не вызвала затруднений. К особенностям можно отнести то, что пики аллелей данного локуса дублируются на синем канале (рисунок, отмечено стрелкой). В предложенном мультиплексе данные неспецифичные пики не мешают расшифровке, так как не совпадают с диапазоном какого-либо локуса, меченного синим красителем.

Локус e1-O01 (Chr. 6, LG VIa) представлен восемью аллелями с размерами фрагментов 143-161 пн, размером мотива 2 пн. У нескольких сортообразцов отмечен невысокий неспецифичный пик, совпадающий по длине с аллелем 143 пн. Несмотря на это интерпретация данных для локуса затруднений не вызвала.

Таким образом, большинство локусов могут быть просто и однозначно идентифицированы. Локус g2-L17 вызывает сложности при расшифровке и может быть охарактеризован как кандидат для исключения из мультиплекса. Данный маркер относится к группе сцепления LG IV, которая включает семь локусов (см. табл. 1). В связи с этим есть основание считать, что при совершенствовании методики маркер g2-L17 лучше исключить из дальнейшего анализа.

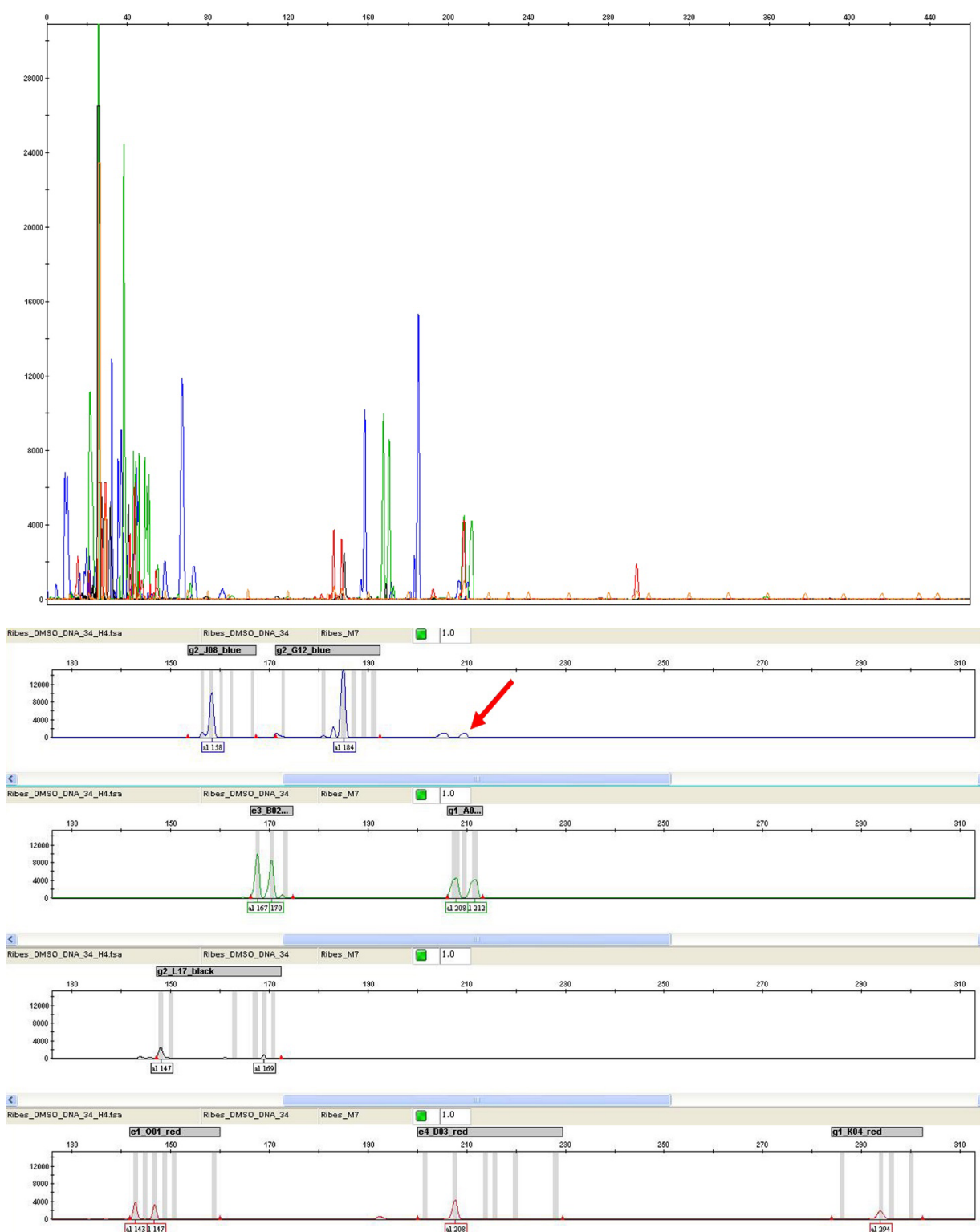


Рисунок. Результат электрофоретического разделения ПЦР-продукта мультиплексной реакции в случае сорта ‘Ben Sarek’.

Красной стрелкой показаны пики, дублирующие locus g1-A01

Figure. The result of electrophoretic separation of the PCR product after the multiplex reaction in the case of the cultivar ‘Ben Sarek’.

The red arrow points to the peaks that duplicate the g1-A01 locus

Таблица 5. Генетические профили сортообразцов черной смородины
Table 5. Genetic profiles of black currant cultivars

Сортообразец/ Cultivar	Локусы/ Loci							
	g1-K04	g2-J08	e4-D03	g2-L17	e3-B02	g1-A01	e1-O01	g2-G12
‘Поклон Борисовой’	294/296	158/160	208/220	149/149	167/170	208/208	143/145	184/186
‘Козацька’	294/294	158/166	202/220	167/167	167/170	208/212	151/159	190/190
‘Баритон’	286/294	156/158	208/216	163/171	167/173	212/212	147/159	180/190
‘Подарок Ильиной’	294/296	156/158	202/214	149/149	167/170	208/210	149/159	186/190
‘Казкова’	294/300	156/158	208/214	147/147	167/170	208/212	151/151	172/180
‘Дабрадзся’	294/294	158/160	220/220	167/167	167/170	208/212	147/151	180/188
‘Церера’	294/294	158/162	208/228	167/167	167/170	208/208	149/151	180/180
‘Ben Sarek’	294/294	158/158	208/208	147/169	167/170	208/212	143/147	184/184
‘Лучия’	294/300	158/158	208/214	161/171	167/167	208/210	147/149	184/186
‘Валовая’	294/296	158/160	208/214	161/161	167/170	208/208	149/159	184/186
‘Краса Львова’	294/296	158/158	202/214	161/171	170/170	212/212	147/151	172/186
‘Вымпел’	294/294	156/160	208/228	161/161	170/170	208/212	151/159	184/190
‘Глобус’	294/294	156/158	202/202	161/171	167/170	208/212	147/151	180/190
‘Подарок Астахова’	294/294	160/160	208/228	167/171	167/167	208/208	143/159	180/180
‘Селеченская’	294/300	160/160	202/208	149/171	167/167	208/208	143/151	180/190
‘Литвиновская’	294/300	160/160	208/228	167/171	167/167	208/208	143/159	186/190
‘Мавлади’	294/294	158/158	214/214	161/167	167/167	208/212	143/153	172/190
‘Дар Смольяниновой’	294/300	160/160	204/228	149/167	167/167	208/208	151/159	186/186
‘Память Калининой’	294/296	158/160	208/214	161/171	170/173	208/212	143/147	180/184
‘Алтайская поздняя’	288/300	156/158	210/214	161/161	167/167	212/212	147/159	172/180
‘Спас’	286/294	158/158	220/246	149/171	167/167	212/212	149/159	172/180
‘Руслан’	286/294	156/160	216/246	159/171	167/167	208/212	159/161	178/190
‘Ладушка’	294/300	160/160	205/208	167/171	167/173	208/208	147/149	186/190
‘Десертная Огольцовой’	294/294	156/160	205/214	161/167	167/167	208/208	147/149	180/190
‘Черноокая’	294/296	158/158	214/228	151/161	167/170	212/212	147/159	184/190
‘Очарование’	294/294	158/158	205/214	161/171	167/167	208/208	147/149	172/188
‘Креолка’	294/294	158/158	208/208	167/171	167/170	208/212	147/149	180/186
‘Светлолистная’	294/296	158/158	208/228	149/161	170/170	208/212	149/151	186/190
‘Шалунья’	286/294	158/158	208/250	161/171	167/170	212/212	143/151	180/190
‘Шаман’	294/296	158/160	208/208	161/161	167/167	208/208	159/159	184/186
‘Славянка’	294/294	158/158	214/214	161/171	170/170	208/208	149/151	188/190
‘Доброхот’	294/296	158/160	208/208	161/161	170/170	208/208	149/159	184/186
‘Пилот’	294/296	158/160	214/214	161/161	170/170	208/208	149/159	184/186

Локусы e4-D03, e1-O01 и G2-G12 имеют высокие показатели индексов, характеризующих генетическое разнообразие ($Ne > 4,9$) и низкие значения показателя вероятности идентичности ($PI < 0,10$) (см. табл. 4). Таким образом, именно они вносят наибольший вклад в способность мультиплекса идентифицировать сортообразцы. Наиболее низкие показатели генетического разнообразия показывают локусы g1-K04, e3-B02 и g1-A01 ($Ne < 2,2$, $PI > 0,26$). Маркер e3-B02 является единственным в LG Va, поэтому нет возможности заменить его на более информативный аналог. Оставшиеся низко информативные локусы имеют потенциальные замены в своих группах сцепления (см. табл. 1).

Индексы вероятностей идентичности для всей панели маркеров составляют $PI = 1,7 \times 10^{-7}$ и $PI_{sibs} = 1,8 \times 10^{-3}$.

Это означает, что при выявленном уровне генетической изменчивости вероятность случайного совпадения двух генотипов в перекрестно размножающейся популяции составляет 1,7 случаев на 10 миллионов сравнений, а в выборке сибсов 1,8 случаев на 1000 проведенных сравнений.

Заключение

Проведенное исследование показало, что локусы *Ribes nigrum*, расположенные в различных группах сцепления, а именно g1-K04, g2-J08, e4-D03, g2-L17, e3-B02, g1-A01, e1-O01 и g2-G12, могут быть использованы для мультиплексной реакции, которая позволяет проводить оценку изменчивости восьми локусов черной смородины

после амплификации «в одной пробирке» при температуре 59°C, относительно высокой для отжига праймеров. Наиболее трудным для интерпретации данных оказался локус g2-L17, воспроизводимость результатов для которого в повторных тестах не была абсолютной. Анализ 33-х сортообразцов черной смородины, отечественных и европейских, в том числе скандинавских сортов, по остальным семи локусам позволил дать однозначную интерпретацию результатов генотипирования. В каждом локусе выявлено от трех до одиннадцати аллелей. Таким образом, предложенный подход можно считать эффективным решением для проведения генетической идентификации культурных форм *Ribes nigrum*.

References/Литература

- Antonius K., Karhu S., Kaldmae H., Lacis G., Rugenius R., Baniulis D., Sasnauskas A., Schulte E., Kuras A., Korbin M., Gunnarsson A., Werlemark G., Ryliskis D., Todam-Andersen T., Kokk L., Jarve K. Development of the Northern European *Ribes* core collection based on a microsatellite (SSR) marker diversity analysis. *Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization*. 2012;10(1):70-73. DOI: 10.1017/S147926211000980
- Bassil N., Bidani A., Nyberg A., Hummer K., Rowland L.J. Microsatellite markers confirm identity of blueberry (*Vaccinium* spp.) plants in the USDA-ARS National Clonal Germplasm Repository collection. *Genetic resources and crop evolution*. 2020;67:393-409. DOI: 10.1007/s10722-019-00873-8
- Brennan R., Jorgensen L., Hackett C., Woodhead M., Gordon S., Russell J. The development of a genetic linkage map of black currant (*Ribes nigrum* L.) and the identification of regions associated with key fruit quality and agronomic traits. *Euphytica*. 2008;161:19-34. DOI: 10.1007/s10681-007-9412-8
- Brennan R., Jorgensen L., Woodhead M., Russell J. Development and characterization of SSR markers in *Ribes* species. *Molecular Ecology Notes*. 2002;2:327-330. DOI: 10.1046/j.1471-8286.2002.00233.x
- Cavanna M., Marinoni D.T., Beccaro G.L., Bounous G. Microsatellite-based evaluation of *Ribes* spp. germplasm. *Genome*. 2009;52(10):839-848. DOI: 10.1139/G09-057
- Cmejlova J., Rejlova M., Papstein F., Cmejla R. A new one-tube reaction kit for the SSR genotyping of apple (*Malus × domestica* Borkh.). *Plant science*. 2021;303:110768. DOI: 10.1016/j.plantsci.2020.110768
- CORDIS Cattle. Reagent kit for multiplex analysis of 15 microsatellite markers of cattle. LLC "GORDIZ". Moscow, Russia. Available from <https://gordiz.ru/en/products/animal-kits/cordis-cattle/> [accessed Sept. 6, 2024].
- Devey M.E., Bell J.C., Smith D.N., Neale D.B., Moran G.F. A genetic linkage map for *Pinus radiata* based on RFLP, RAPD and microsatellite markers. *Theoretical and applied genetics*. 1996;92:673-679. DOI: 10.1007/BF00226088
- Dolzhiyova M.A., Pikunova A.V., Tolpekina A.A., Knyazev S.D., Bakhotskaya A.Yu. Identification of blackcurrant varieties (*Ribes nigrum* L.) based on microsatellite locus polymorphism. *Vestnik of the Russian agricultural science*. 2020;3:26-29. [in Russian] (Должилова М.А., Пикунцова А.В., Толпекина А.А., Князев С.Д., Бахотская А.Ю. Идентификация сортов смородины черной (*Ribes nigrum* L.) на основании полиморфизма микросателлитных локусов. *Вестник Российской сельскохозяйственной науки*. 2020;3:26-29). DOI: 10.30850/vrsn/2020/3/26-29
- Gabyshcheva N.S. Evaluation of the initial breeding material of black currant. *Siberian Herald of Agricultural Science*. 2019;49(5):21-27. [in Russian] (Габышева Н.С. Оценка исходного селекционного материала смородины черной. *Сибирский вестник сельскохозяйственной науки*. 2019;49(5):21-27). DOI: 10.26898/0370-8799-2019-5-3
- Galinskaya T.V., Schepetov D.M., Lysenkov S.N. Prejudices against microsatellite studies and how to resist them. *Russian Journal of Genetics*. 2019;55(6):657-671. DOI: 10.1134/S1022795419060048
- Hedrick P.W. Genetics of populations. London; 2010.
- ICAR guidelines. Section 4 – DNA technology. Version: February 2022. [Available from: <https://www.icar.org/Guidelines/04-DNA-Technology.pdf> [accessed Sept. 13, 2024].
- Knyazev S.D., Bakhotskaya A.Yu. Genetic diversity of black currant varieties breeding of the Russian Research Institute of Fruit Crop Breeding. *Pomiculture and Small Fruits Culture in Russia*. 2018;54:47-51. [in Russian] (Князев С.Д., Бахотская А.Ю. Генетическое разнообразие смородины черной сортов селекции ВНИИСПК. *Плодоводство и ягодоводство России*. 2018;54:47-51). DOI: 10.31676/2073-4948-2018-54-47-51
- Knyazev S.D., Levgerova N.S., Makarkina M.A., Pikunova A.V., Salina E.S., Chekalin E.I., Yanchuk T.V., Shavyrkina M.A. Black currant breeding: methods, achievements, trends (Seleksiya chernoy smorodiny: metody, dostizheniya, napravleniya). Orel: VNIISPК; 2016. [in Russian] (Князев С.Д., Левгерова Н.С., Макаркина М.А., Пикунцова А.В., Салина Е.С., Чекалин Е.И., Янчук Т.В., Шавыркина М.А. Селекция черной смородины: методы, достижения, направления. Орел: ВНИИСПК; 2016).
- Knyazev S.D., Ogol'cova T.P. Black currant breeding at the present stage (Seleksiya chernoy smorodiny na sovremennom etape). Orel: Orel State Agrarian University named after N.V. Parakhin; 2004. [in Russian] (Князев С.Д., Огольцова Т.П. Селекция черной смородины на современном этапе. Орел: Орловский государственный аграрный университет имени Н.В. Парахина; 2004).
- Modorov M., Monakhov V., Mikryukov V., Erokhin N., Tkachenko I., Polezhaeva M., Ranyuk M. Microsatellite multiplex assay for sable (*Martes zibellina*) and pine marten (*Martes martes*). *Mammal research*. 2020;65(4):855-862. DOI: 10.1007/s13364-020-00529-4
- Lu G., Wang W., Zhang S., Yang G., Zhang K., Que Y., Deng L. The first complete mitochondrial genome of Grossulariaceae: Molecular features, structure recombination, and genetic evolution. *BMC Genomics*. 2024;25:744. DOI: 10.1186/s12864-024-10654-y
- Mezhnina O.A., Urbanovich O.Yo. Analysis of microsatellite loci variability *Ribes* L. representatives grown in Belarus. *Proceedings of the National academy of sciences of Belarus. Biological series*. 2017;3:45-54. [in Russian] (Межнина О.А., Урбанович О.Ю. Анализ вариативности микросателлитных локусов у представителей рода смородины (*Ribes* L.), выращиваемых в Беларуси. *Весті Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Серыя біялагічных навук*. 2017;3:45-54).
- Montanari C., Deng C., Koot E., Bassil N.V., Zurn J.D., Morrison-Whittle P., Worthington M.L., Aryal R., Ashrafi H., Pradelles J., Wellenreuther M., Chagné D. A multiplexed plant-animal SNP array for selective breeding and species conservation applications. *G3: Genes|genomes|genetics*. 2023;13(10):2160-1836. DOI: 10.1093/g3journal/jkad170
- Palmieri L., Grando M.S., Sordo M., Grisenti M., Martens S., Giongo L. Establishment of molecular markers for germplasm management in a worldwide provenance *Ribes* spp. collection. *Plant Omics*. 2013;6(3):165-174.
- Peakall R., Smouse P.E. GenA1Ex 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular ecology notes*. 2006;6:288-295. DOI: 10.1111/j.1471-8286.2005.01155.x
- Petrova S.N., Kuznetsova A.A. Composition of fruits and leaves of black currant *Ribes nigrum* (review). *Chemistry of Plant Raw Material = Khimija rastitel'nogo syr'ya*. 2014;4:43-50. [in Russian] (Петрова С.Н., Кузнецова А.А. Состав плодов и листьев смородины черной *Ribes nigrum* (обзор). *Химия растительного сырья*. 2014;4:43-50). DOI: 10.14258/jcpm.201404221
- Pikunova A.V., Knyazev S.D., Bakhotskaya A.Yu., Kochumova A.A. Microsatellite loci polymorphism in Russian black currant (*Ribes nigrum* L.) varieties from collection of All-Russian Research Institute of Breeding Fruit Crops. *Agricultural biology*. 2015;50(1):46-54. [in Russian] (Пикунцова А.В., Князев С.Д., Бахотская А.Ю., Кочумова А.А. Полиморфизм микросателлитных локусов у сортов черной смородины (*Ribes nigrum* L.) из коллекции ВНИИСПК.

- Сельскохозяйственная биология.* 2015;50(1):46-54. DOI: 10.15389/agrobiology.2015.1.46rus
- Rebrikov D.V., Samatov G.A., Trofimov D.Yu. Real-time PCR (PTsR v real'nom vremeni). Rebrikov D.V. (ed.). Moscow: Laboratoriya znaniy; 2023. [in Russian] (Ребриков Д.В., Саматов Г.А., Трофимов Д.Ю. ПЦР в реальном времени / под ред. Д.В. Ребрикова. Москва: Лаборатория знаний; 2023).
- Russell J., Hackett Ch., Hedley P., Liu H., Milne L., Bayer M., Marshall D., Jorgensen L., Gordon S., Brennan R. The use of genotyping by sequencing in black currant (*Ribes nigrum*): developing high-resolution linkage maps in species without reference genome sequences. *Molecular breeding: new strategies in plant improvement*. 2014;33:835-849. DOI: 10.1007/s11032-013-9996-8
- Sazonov F.F. Breeding of black currant in the conditions of the southwestern part of the Non-Chernozem zone of Russia (Seleksiya smorodiny chornoy v usloviyakh yugo-zapadnoy chasti Nechernozemnoy zony Rossii). Moscow: All-Russian Breeding and Technological Institute of Horticulture and Nursery of the Russian Academy of Agricultural Sciences; 2018. [in Russian] (Сазонов Ф.Ф. Селекция смородины черной в условиях юго-западной части Нечерноземной зоны России. Москва: Всероссийский селекционно-технологический институт садоводства и питомниководства Российской академии сельскохозяйственных наук; 2018).
- Sekridova A.V., Shilov I.A., Kislin E.N., Malyuchenko O.P., Kharchenko P.N. The technology of genetic identification of varieties and wild-growing forms of grapes based on multilocus microsatellite analysis. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2022;58(9):1050-1059. DOI: 10.1134/S0003683822090083
- Sun X., Zhan Y., Li S., Liu Y., Fu Q., Quan X., Xiong J., Gang H., Zhang L., Qi H., Wang A., Huo J., Qin D., Zhu C. Complete chloroplast genome assembly and phylogenetic analysis of black currant (*Ribes nigrum*), red and white currant (*Ribes rubrum*), and gooseberry (*Ribes uva-crispa*) provide new insights into the phylogeny of Grossulariaceae. *PeerJ*. 2023;11:e16272. DOI: 10.7717/peerj.16272
- Testolin R., Messina R., Cipriani G., De Mori G. SSR-based DNA fingerprinting of fruit crops. *Crop Science*. 2022;63:390-459. DOI: 10.1002/csc2.20896
- Waits L.P., Luikart G., Taberlet P. Estimating the probability of identity among genotypes in natural populations: cautions and guidelines. *Molecular Ecology*. 2001;10(1):249-256. DOI: 10.1046/j.1365-294X.2001.01185.x
- Zurn J.D., Nyberg A., Montanari S., Postman J., Neale D., Bassil N. A new SSR fingerprinting set and its comparison to existing SSR- and SNP-based genotyping platforms to manage *Pyrus* germplasm resources. *Tree Genetics & Genomes*. 2020;16:72. DOI: 10.1007/s11295-020-01467-7

Информация об авторах

Макар Васильевич Модоров, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, лаборатория молекулярно-генетической экспертизы, Уральский федеральный аграрный научно-исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук (ФГБНУ УрФАН ИЦ УрО РАН), 620142 Россия, Екатеринбург, ул. Белинского, 112а, mmodorov@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-6182-233X>

Ольга Анатольевна Киселева, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, Свердловская селекционная станция садоводства, Уральский федеральный аграрный научно-исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук (ФГБНУ УрФАН ИЦ УрО РАН), 620142 Россия, Екатеринбург, ул. Белинского, 112а, kiselevaolga@inbox.ru, <https://orcid.org/0000-0002-8619-6416>

Мария Алексеевна Полежаева, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, Свердловская селекционная станция садоводства, Уральский федеральный аграрный научно-исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук (ФГБНУ УрФАН ИЦ УрО РАН), 620142 Россия, Екатеринбург, ул. Белинского, 112а, polezhaevam@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-9729-2617>

Елена Михайловна Чеботок, кандидат сельскохозяйственных наук, старший научный сотрудник, Свердловская селекционная станция садоводства, Уральский федеральный аграрный научно-исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук (ФГБНУ УрФАН ИЦ УрО РАН), 620142 Россия, Екатеринбург, ул. Белинского, 112а, sadovodnauka@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-5942-6178>

Information about the authors

Makar V. Modorov, Cand. Sci. (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Molecular Genetic Expertise, Ural Federal Agrarian Scientific Research Centre, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, 112a, Belinsky Street, Ekaterinburg, 620142 Russia, mmodorov@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-6182-233X>

Olga A. Kiseleva, Cand. Sci. (Biology), Senior Researcher, Sverdlovsk Selection Station of Horticulture, Ural Federal Agrarian Scientific Research Centre, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, 112a, Belinsky Street, Ekaterinburg, 620142 Russia, kiselevaolga@inbox.ru, <https://orcid.org/0000-0002-8619-6416>

Maria A. Polezhaeva, Cand. Sci. (Biology), Senior Researcher, Sverdlovsk Selection Station of Horticulture, Ural Federal Agrarian Scientific Research Centre, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, 112a, Belinsky Street, Ekaterinburg, 620142 Russia, polezhaevam@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-9729-2617>

Elena M. Chebotok, Cand. Sci. (Agriculture), Senior Researcher, Sverdlovsk Selection Station of Horticulture, Ural Federal Agrarian Scientific Research Centre, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, 112a, Belinsky Street, Ekaterinburg, 620142 Russia, sadovodnauka@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-5942-6178>

Вклад авторов: все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

Contribution of the authors: the authors contributed equally to this article.

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interests: the authors declare no conflicts of interests.

Статья поступила в редакцию 14.09.2024; одобрена после рецензирования 14.11.2024; принята к публикации 05.12.2024.

The article was submitted on 14.09.2024; approved after reviewing on 14.11.2024; accepted for publication on 05.12.2024.