

## ДНК-МАРКЕРЫ В ИЗУЧЕНИИ ГЕНОМА СМОРОДИНЫ КРАСНОЙ

М.А. Должикова , аспирант

*ФГБНУ ВНИИ селекции плодовых культур, 302530, Россия, Орловская область, Орловский район, д. Жилина, ВНИИСПК, dolzhikova@vniispk.ru*

### Аннотация

Целью данной работы является обобщение исследований отечественных и зарубежных ученых в изучении генома смородины красной. В зарубежных и отечественных работах проведены исследования рода *Ribes* с применением ДНК-маркеров по идентификации, по изучению полиморфизма и структурной организации генома. В исследованиях смородины красной были задействованы следующие типы ДНК-маркеров: SSR, RAPD, SNP и AFLP для изучения генетического разнообразия, генетической идентификации генотипов и для определения генетического сходства. Однако основное внимание уделялось исследованиям смородины черной, в то время как красная смородина изучена сравнительно мало. Например, для чёрной смородины построена генетическая карта с применением SSR и SNP ДНК-маркеров, разработан ряд методик маркер-вспомогательной селекции. Генетической карты красной смородины, на сегодняшний день, насколько нам известно, не опубликовано. Следовательно, ДНК-маркирование в изучении генетического разнообразия и структурной организации генома смородины красной *Ribes rubrum* L. на сегодняшний день является актуальной задачей.

**Ключевые слова:** геном, *Ribes rubrum*, смородина красная, ДНК-идентификация, молекулярные маркеры, SSR, SNP, RAPD-анализ, генетическая карта

## DNA-MARKERS IN THE STUDY OF THE RED CURRANT GENOME

M.A. Dolzhikova , postgraduate student.

*Russian Research Institute of Fruit Crop Breeding, 302530, Russia, Orel region, Orel district, Zhilina, VNIISPК, dolzhikova@vniispk.ru*

### Abstract

To achieve significant results in improving the genetic properties of agricultural plants, in particular red currants, it is necessary to maximize the use of genetic resources. Modern molecular genetics methods for studying the genome, localization on the chromosomes (genetic maps) of genes and loci of quantitative and qualitative traits are based on the classical principles of genetics, qualitative phenotypic assessment, crossbreeding, selection of parental pairs, etc. In foreign and national works, studies of the genus *Ribes* were carried out using DNA markers for identification, for the study of polymorphism and structural organization of the genome. The following types of DNA markers were used to study redcurrants: SSR, RAPD, SNP, and AFLP for studying genetic diversity, genetic identification of genotypes, and for determining the genetic similarity of

representatives of the genus *Ribes*. However, mainly due attention was paid to the studies of blackcurrants, while redcurrants were studied relatively little. For example, for blackcurrants, a genetic map was constructed using SSR and SNP DNA markers; a number of marker assisted selection methods were developed. The genetic map of red currants, to date, as far as we know, has not been published. Hence, DNA marking in the study of genetic diversity and structural organization of the genome of *Ribes rubrum* L. is an urgent task today.

**Key words:** genome, *Ribes rubrum* L., red currants, DNA, DNA identification, molecular markers, SSR, SNP, RAPD-analysis, genetic map of linkage groups

### Введение

Для достижения весомых результатов в улучшении генетических свойств сельскохозяйственных растений, в частности смородины красной, необходимо максимально использовать генетические ресурсы. Современные молекулярно-генетические методы изучения генома, локализации на хромосомах (генетических картах) генов и локусов количественных и качественных признаков основываются на классических принципах генетики, качественной фенотипической оценке, скрещивании, подборе родительских пар и др.

Род смородины *Ribes* L. включает в себя более 150 кустарниковых видов, произрастающих главным образом в умеренной зоне северного полушария.

В садоводстве смородина красная занимает важное место как зимостойкая, высокоурожайная, скороплодная и раннеспелая культура, ягоды которой богаты биологически активными веществами (БАВ), служат ценным сырьем для переработки (Макаркина, Голяева, 2013). Неприхотливость, устойчивость к вредителям и болезням делают красную смородину незаменимой культурой в народном хозяйстве (Коробкова, Сабарайкина, 2008).

Селекция красной смородины во Всероссийском НИИ селекции плодовых культур (ВНИИСПК) начата в 1984 г. кандидатом сельскохозяйственных наук Л.В. Баяновой (Голяева, 2014) и в настоящее время продолжается под руководством кандидата сельскохозяйственных наук Голяевой О.Д.

Коллекция красной смородины Всероссийского научно-исследовательского института включает более 80 сортов отечественной и зарубежной селекции, которая систематически пополняется новыми сортами, изучаемыми по наиболее важным хозяйственно-ценным показателям и по адаптивности к местным почвенно-климатическим и метеоусловиям (Голяева, 2015).

Современный этап развития селекции рассматривают как этап адаптивной селекции с использованием генных технологий. 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 (Пикунова и др., 2019).

Создание новых сортов должно базироваться на знаниях структурной и функциональной организации генома красной смородины. ДНК-маркирование в изучении генетического разнообразия и структурной организации генома смородины красной *Ribes rubrum* L. на сегодняшний день является актуальной задачей.

### **ДНК-маркеры как инструмент изучения генома. Направления использования ДНК-маркеров**

Методы молекулярного ДНК-маркирования играют важную роль в оценке генетического разнообразия, паспортизации и классификации сортов, картировании и генетическом мониторинге в селекции и генетике культурных растений (Боронникова, 2009).

Условно можно выделить основные направления использования молекулярных маркеров при работе с генетическим материалом растений:

- поиск новых генотипов для привлечения в коллекцию;
- филогенетические исследования;
- исследование генетического разнообразия;
- анализ межвидовых связей и анализ родства видов и генотипов;
- создание коллекций на основе использования молекулярных маркеров: идентификация и регистрация образцов коллекции;
- охрана авторских прав: решение спорных вопросов авторства сортов и образцов растений;
- составление молекулярных карт хромосом и геномов;
- картирование генов и QTL;
- маркирование генов, хромосом и геномов;
- геномная селекция (Хлесткина, 2015).

### **Типы ДНК-маркеров. Изучение генетического разнообразия**

Существующие на сегодня методические подходы ДНК-типирования, используемые для выявления изменений нуклеотидных последовательностей, могут быть условно разделены на 3 группы.

Первая группа включает в себя методы, известные как сканирующие, которые применяются для поиска неизвестных мутаций в заранее известных последовательностях.

Вторая группа включает в себя диагностические методы, используемые для анализа мутаций и изменений в определенных позициях. Это такие методы, как секвенирование горячих точек мутаций и полиморфизм на уровне единичных нуклеотидов (Single Nucleotide Polymorphism – SNP). Поскольку SNP встречается гораздо чаще чем мутации в горячих точках генома, то основные усилия на сегодняшний день сосредоточены, в основном, на определении изменений на уровне SNP, т. е. на уровне единичных нуклеотидов.

Третья группа методов объединяет технологии секвенирования, которые могут быть задействованы для выявления всех видов изменчивости, происходящих на молекулярном уровне, вне зависимости от того идентифицированы и/или локализованы в геноме эти молекулярные изменения или нет (Смарагдов, 2009).

ДНК-маркеры привлекли внимание к себе тем, что с их помощью можно выявить различия между двумя особями одного или разных видов, что зачастую не удается сделать с помощью иных типов маркеров. Маркеры, позволяющие выявлять различия между анализируемыми особями, называются полиморфными, тогда как маркеры, не позволяющие этого сделать являются мономорфными (Чесноков, 2017).

Генетический полиморфизм, выявляемый с помощью молекулярных маркеров, является центральным звеном в современном генетическом анализе. Как правило, внутри каждого типа молекулярно-генетического маркера отдельные локусы существенно отличаются друг от друга по полиморфизму, сложности и воспроизводимости их выявления (Календарь, 2002). Классификация основных ДНК-маркеров представлена в таблице (таблица 1) (Хлесткина, 2015).

Таблица 1 – Классификация ДНК-маркеров (по Хлесткиной Е.К., 2015)

Классификация	Молекулярные маркеры	Мультилокусные маркеры
Методы, основанные на блот-гибридизации	<b>RELP</b> – полиморфизм длины рестрикционных фрагментов	Минисателлиты
Методы, основанные на ПЦР	<b>SSR</b> – простые повторяющиеся последовательности (микросателлиты) <b>STS</b> – нуклеотидные последовательности, характеризующие locus <b>SCAR</b> – нуклеотидная последовательность, характеризующая амплифицированную область <b>SSCP</b> – конформационный полиморфизм одноцепочечной ДНК <b>CAPS</b> – расщепленные амплифицированные полиморфные последовательности	<b>RAPD</b> – случайно амплифицированная полиморфная ДНК <b>ISSR</b> – межмикросателлитные полиморфизм <b>IRAP</b> – полиморфизм амплифицированных последовательностей между ретротранспозонами <b>AFLP</b> – полиморфизм длины амплифицированных последовательностей <b>SSAP</b> – полиморфизм специфично амплифицированных последовательностей
Методы, основанные на применении ДНК-чипов	<b>SNP</b> – однонуклеотидный полиморфизм	<b>DarT</b> – ДНК-чиповая технология для изучения генетического разнообразия
Тип наследования	Кодоминантный тип	Доминантный тип

Посредством комбинирования генетических и молекулярных критериев, можно получить четыре группы маркеров, используемых для идентификации генетического разнообразия, совокупность которых получила название «ДНК-фингерпринтинг» (DNA fingerprinting).

RAPD (random amplified polymorphic DNA) – метод амплификации ДНК сегментов с использованием случайных праймеров (Korbin, 2002). Он характеризует полиморфизм длин случайным образом амплифицированных фрагментов (Хавкин, 1997; Чесноков, 2007). Суть метода заключается в амплификации фрагментов ДНК с использованием единичного короткого праймера с низкой температурой отжига в реакции ПЦР (Сулимова, 2014). 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, то есть амплифицируются как два аллеля различного размера и помогают различить гомозиготу от гетерозиготы. Позже RAPD метод всё чаще используется только на предварительной стадии изучения полиморфизма ДНК (Kalía, 2011).

P.G. Lanham с соавторами в 1995 году впервые использовали RAPD анализ, для фингерпринтинга сортов черной смородины (Lanham, 1995).

Группой ученых из института селекции плодовых культур (ВНИИСПК) был применен RAPD-анализ для изучения генетического полиморфизма и филогенетических связей у представителей рода *Ribes* L. Молекулярный метод RAPD-анализа был впервые использован для анализа образцов коллекции рода *Ribes* генбанка ВНИИСПК (г. Орел). Целью исследования являлось изучение межвидового и внутривидового полиморфизма и филогенетических отношений у культивируемых видов (черная смородина, красная смородина, крыжовник), а также уточнения существующих таксономических категорий представителей рода. Был проведен RAPD-анализ рода *Ribes*, таких как смородина черная, смородина красная, золотистая и кроваво-красная, крыжовник, а также сорта и гибридные формы отечественной селекции. Метод RAPD-анализа выявил достаточно высокий уровень полиморфизма генома и позволил идентифицировать близкородственные сорта. Полученные результаты говорят о том, что таксоны красной смородины,

крыжовника и черной смородины являются таксонами одного уровня, что свидетельствует в пользу классификаций, выделяющих их в отдельные подроды, например, классификация Янчевского (1907), выделяющего 6 подродов, в т.ч. *Coreosma (Spach) Jancz.* – черная смородина, *Grossularia Rich.* – крыжовник, *Ribesia Berl* – красная смородина (Пикунова, 2011).

AFLP анализ (Amplified Fragment Length Polymorphism) – полиморфизм длин амплифицированных фрагментов ДНК (Vos et al., 1995). Включает несколько этапов, в т.ч. рестрикция, легирирование адаптеров, две последовательные ПЦР. Сложнее по техническому исполнению по сравнению RAPD, но не уступает, а как правило превосходит его по выявляемому уровню полиморфизма. Примером использования метода AFLP в филогенетических исследованиях является работа V. Gobert с соавторами (2006). В данном исследовании метод AFLP был использован совместно с анализом ISSR маркеров, а также сиквенсов ITS для выяснения родства между дикими видами и культурными формами мяты (*Minta*).

Исследования турецких ученых с применением AFLP анализа показали, что красная и черная смородина генетически различны и имеют очень небольшую долю общих AFLP фрагментов. С использованием программы TREE NTSYSpc была построена дендрограмма, которая показывала предполагаемое сходство генотипов смородины. В статье говорится о том, что высокая степень генетического разнообразия, вероятно, обусловлена принадлежностью черной и красной смородины к различным видам. В то время как черная смородина принадлежит к виду *Ribes nigrum*, в происхождении сортов красной смородины могут быть задействованы *Ribes sativum*, *Ribes rubrum*, *Ribes petraeum*. Тем не менее, генетическое разнообразие в черной смородине (в пределах вида) было низким, что позволяет предположить, что генотипы черной смородины, проанализированные в этом исследовании, имеют общий генетический фон (Ipek et al., 2010).

ISSR анализ (Inter Simple Sequence Repeats) – анализ полиморфизма участков, находящихся между микросателлитными локусами. Сравнительно быстрый и дешевый метод.

Польские ученые из научно-исследовательского института садоводства проводили исследования при помощи ДНК-маркеров (RAPD, ISSR) на местных видах *Ribes (R. nigrum, R. rubrum u R. glossularia)*. На основе данных исследований была определена генетическая дистанция между генотипами и оценено их родство. Генетическое сходство, основанное на данных ISSR значительно выше, чем значения, полученные при помощи RAPD-анализа (Mazeikiene, 2012).

При помощи различных методов молекулярного анализа полиморфизма ядерной и хлоропластной ДНК, таких как полиморфизм рестрикционных сайтов двух регионов хлоропластной (ХП) ДНК (Messinger et al., 1999), psbA-trnH спейсера ХП ДНК и анализа нуклеотидного полиморфизма внутренних и внешних транскрибируемых спейсеров (ITS и ETS) рибосомного оперона ядерной ДНК (Schultheis, Donoghue, 2004), анализа нуклеотидного полиморфизма внутренних транскрибируемых спейсеров ядерной ДНК (Senters, Soltis, 2003) 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.

SSR (simple sequence repeat) – маркеры, ограничивающие повторы простых последовательностей ДНК. Повторы простых последовательностей (SSR) – это последовательности ДНК, размер повторяющейся единицы которых находится в пределах 1-10 пар нуклеотидов. Метод успешно применяется для выявления внутривидового

полиморфизма генома растений (Hayes et al., 2001). Применение SSR-маркеров основано на определении длины повторяющихся последовательностей в геноме анализируемых образцов. Повторяющаяся последовательность выявляется в результате полимеразной цепной реакции с фланкирующими её праймерами (Palombi, Damiano, 2002).

Особенностью SSR-метода является то, что к каждому виду растения необходимо разрабатывать свои SSR-маркеры. При создании SSR-маркеров праймеры подбираются таким образом, чтобы они были высокоспецифичными и, желательно, чтобы имели один сайт связывания в геноме исследуемого вида, то есть были монолокусными. Многие SSR-маркеры, созданные для одного вида, могут применяться для близкородственных видов благодаря консервативности их генома. SSR-аллели наследуются как кодоминантные маркеры (Гостимский и др., 1999). Некоторые SSR-маркеры, используемые для ДНК-идентификации сортов и сортообразцов, сцеплены с хозяйственно-ценными признаками. Однако не всегда удается найти связь между молекулярными маркерами SSR-типа и отдельными хозяйственно-ценными признаками (Мухина, 2012).

Тестирование RAPD, AFLP и SSR-маркеров в различных лабораториях Европы показывало сложности в воспроизведении результатов RAPD-анализа, различия в единичных фрагментах в одном пробеге при AFLP-анализе (Jones et al., 1997).

Ученые из Шотландского института селекции сельскохозяйственных культур стали первыми, 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 в исследованиях смородины (Lanham et al., 1995, 1998; Brennan et al., 2002, 2009; Russell et al., 2011, 2014).

Для изучения смородины первые микросателлитные маркеры были разработаны шотландскими учеными (Brennan et al., 2002, <http://www.fruitbreeding.co.uk/RibesGenomicsSSRs.asp>).

SSR-маркеры применялись так же для оценки разнообразия генетических коллекций *Ribes* в Италии и Северной Европе (Cavanna et al., 2009; Antonius et al., 2012; Palmieri et al., 2013).

В 2002 г. R. Brennan предложены 11 SSR-маркеров, которые при анализе в основном европейских сортов смородины черной, *R. dikuscha*, *R. nevadense*, *R. sanguineum*, *R. cereum*, *R. petraeum*, *R. grossularia* и двух межвидовых гибридов позволили выявить от 2 до 18 аллелей на локус, дискриминационная сила маркеров варьировала от 0,18 до 0,91.

В исследованиях M. Cavanna с соавт. (2009) 20 SSR-маркеров были проверены на амплификацию и полиморфизм на 41 образце представителей рода *Ribes*, 13 самых полиморфных локусов были отобраны и использованы для исследований на всех сортах. Микросателлитный анализ позволил идентифицировать 38 генотипов представителей рода *Ribes*. С использованием 13 SSR-маркеров среднее значение уровня наблюдаемой гетерозиготности составило 0,596.

Однако, стоит отметить, что в большинстве проводимых исследований рода *Ribes* основное внимание уделяется исследованиям черной смородины (*Ribes nigrum* L.), смородина красная изучается сравнительно мало.

Так же хотелось бы отметить, что для идентификации генов наибольшую ценность представляют не сцепленные с признаком молекулярные маркеры, которыми в большинстве являются SSR, а маркеры, позволяющие непосредственно идентифицировать ген. Среди них маркеры типа SNP (single nucleotide polymorphism) и другие.

SNP (Single Nucleotide Polymorphism) – однонуклеотидный полиморфизм. Известно, что однонуклеотидный полиморфизм (ОНП) лежит в основе возникновения новых аллелей (Brookes, 1999).

В последние годы SNP-маркеры находят широкое применение в молекулярно-генетических исследованиях. Высокая встречаемость SNP в геномах растений (в том числе, в кодирующих областях), а также возможность автоматизации процесса анализа полиморфизма в SNP-локусах создают перспективу применения данного класса маркеров для создания молекулярно-генетических карт высокой плотности, молекулярного диагностирования признаков и так далее (Vignal et al., 2002).

#### **Идентификация генотипов с применением анализа микросателлитных маркеров**

В 2013 г. L. Palmieri с соавт. (2013) при исследовании 91 образца рода *Ribes* (включая *R. nigrum*, *R. rubrum*, *R. niveum*, *Ribes* × *nidigrolaria*) с использованием 10 SSR-маркеров смогли выявить 87 уникальных генотипов. Данная работа показала, что даже небольшое количество SSR-маркеров может эффективно применяться для изучения генетического разнообразия смородины черной.

Проведенный анализ литературных данных показывает, что за последние годы с помощью современных молекулярно-генетических методов уточнены схемы классификации и филогенетического происхождения ряда видов рода смородина.

Европейским научным сообществом был осуществлён проект 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 в купе с фенотипическими были отобраны образцы для дальнейшей криоконсервации. Кроме того, проведенное генотипирование помогло выявить ошибки в названиях сортов, содержащихся в разных коллекциях (Antonius et al., 2012).

Имеются публикации о исследовании отдельных сортов зарубежной селекции, однако генетическое разнообразие культуры красной смородины изучалось сравнительно мало.

Так, анализом вариабельности микросателлитных локусов у представителей рода смородины *Ribes* L. занимается научный коллективный республики Беларусь под руководством О. Ю. Урбанович. С помощью 8 SSR – маркеров было изучено генетическое разнообразие 86 представителей коллекции рода *Ribes*, выращиваемых на территории Республики Беларусь, включающие сорта селекции Беларуси, России, Украины, Швеции, Литвы и других стран. Из них было вовлечено в исследование 9 сортов смородины красной (*Ribes Rubrum* L.). В общей сложности, выявлено 97 полиморфных аллелей. Основным источником редких аллелей являлись сорта крыжовника и смородины красной, это обусловлено их генетической удаленностью. Полученные результаты показывают высокое разнообразие аллелей локусов микросателлитных последовательностей исследованных сортов смородины черной, смородины красной и крыжовника обыкновенного (Урбанович, 2017).

Учеными из ВНИИСПК впервые в России проведено генотипирование микросателлитных локусов смородины черной. Был проведен анализ 14 микросателлитных локусов у 27 сортообразцов смородины. Ожидаемая или теоретическая гетерозиготность изученных локусов в среднем составила 0,652, в то время как наблюдаемая гетерозиготность 0,608. Показана возможность проверки родства образцов на основе анализа распределения микросателлитных аллелей. Был установлен высокий полиморфизм микросателлитных локусов, были выявлены редкие и уникальные аллели, что позволило получить для каждого исследуемого образца уникальный мультилокусный профиль (Пикунова и др., 2015).

Так же в работах М. Саванна с соавт. (2009) изучавших европейский сорта, изучено и показано расположение сортов черной и красной смородины в разных кластерах на

дендрограмме генетического сходства. Сорта смородины красной в данных исследованиях расположены на большом генетическом расстоянии и выделяются в отдельный кластер.

Вместе с тем имеются публикации о исследовании отдельных сортов зарубежной селекции, однако генетическое разнообразие отечественных сортов смородин изучалось сравнительно мало.

### **Изучение структурной организации генома, построение генетических карт**

Виды *Ribes* имеют диплоидный геном, представленный 8 парами хромосом ( $2n=2x=16$ ). Размер генома, определенный с помощью проточной цитометрии, для *Ribes petraeum* Wulfen., *Ribes rubrum* L., *Ribes uva-crispa* L. в среднем составляет  $2C=1,91$  пг, содержание GC-пар – 40,4 %2 (Chiche et al, 2003).

Составление генетических карт является важным этапом изучения генома. Генетическая карта сцепления (*linkage map, genetic map*) – одномерная схема взаиморасположения локусов генов (генетических маркеров) в группах сцепления данного организма с указанием расстояний между ними в парах нуклеотидов или в сантиморганах (cM), определенных с помощью секвенирования, установленных по частоте кроссинговера.

В настоящее время генетическое картирование применялось только лишь к черной смородине. Первая генетическая карта для черной смородины была создана шотландскими учеными. Генетическая карта была составлена с помощью SSR (43 маркера), AFLP (107 маркеров) и SNP (16 шт.) маркеров. В результате так же было установлено местоположение в геноме гена *Se* устойчивости к почковому клещу и ряда локусов хозяйственно-полезных признаков (QTL, Quantitative trait loci) (Brennan et al, 2008).

Изначальная генетическая карта для черной смородины постепенно насыщалась новыми маркерами, полученными в результате использования современных подходов с применением секвенирования нового поколения (New Generation Sequencing). Главное отличие секвенирования по Сэнгеру (более старая методика) и секвенирования нового поколения – это большие объемы секвенирования, соответственно, более точный метод секвенирования. В 2011 году J.R. Russell с соавторами 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 только 384 SNP были проанализированы на популяциях (в итоге 189 картированы в популяции 9328 и 118 в популяции MP7). Всего 10 SSR-маркеров протестировали на популяциях, 6 штук картировали, при этом AFLP-маркеры были исключены из анализа. Общая длина карты составила 605 cM для популяции 9328 и 355 cM для популяции MP7 (Russell et al, 2011).

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 (Russell et al, 2014).

Наибольший практический интерес от составления генетических карт – это локализация маркеров хозяйственно-полезных признаков. Хотелось 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.

Прием генетического картирования использовали для локализации гена *P* устойчивости к почковому клещу ученые из Литвы. На карте были локализованы 43 AFLP и 19 микросателлитных маркеров (Mazeikiene, 2012).

Также в работе литовских ученых с помощью AFLP и микросателлитных ДНК-маркеров была построена генетическая карта и локализован ген *P*. Обнаружен ДНК-маркер - AFLP фрагмент СТА-ACC-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), он может быть использован для ранней диагностики устойчивости к почковому клещу у гибридов. В дальнейшей работе, данный маркер вместе с ДНК-маркером гена *se* используют для анализа различных видов и выявления межвидовых гибридов, совмещающих два гена устойчивости (Mazeikiene et al., 2017).

Важно отметить, что генетическая карта красной смородины отсутствует.

### **Маркер вспомогательная селекция**

Молекулярные маркеры с момента их разработки в 1980-х гг. определили бурное развитие молекулярной генетики и селекции растений. Применение молекулярных маркеров в практической селекции обозначается термином MAS (marker assisted selection), который в русскоязычной литературе имеет несколько вариантов перевода, таких как «маркер-вспомогательная селекция», «молекулярная селекция» либо «селекция с использованием молекулярных маркеров».

Принцип MAS заключается в идентификации тесного сцепления между маркером и геном, контролирующим признак, и использовании ассоциаций маркер–признак в практических целях для создания новых сортов и селекционных линий. После того как ассоциации маркер–признак установлены, создание новых генотипов может идти с привлечением традиционных методов селекции (скрещивание, беккроссирование, самоопыление и отбор).

В настоящее время для смородины, в частности для смородины черной, опубликованных и рекомендованных для использования имеется всего несколько методик, которые рекомендованы для маркер-вспомогательной селекции: маркеры генов *Se* и *P* устойчивости к почковому клещу (Brennan et al., 2009; Mazeikiene et al., 2012) и маркеры черной и зеленой окраски ягод (Keller-Przybylkowicz et al., 2006).

Так, ученые из Литвы, проводившие амплификацию ДНК-маркера гена *Se* на смородине кроваво-красной (*R. sanguineum*), смородины золотистой (*R. aureum*) и крыжовника обнаружили высокий уровень сходства нуклеотидных последовательностей. На основании полученных результатов, авторы сделали вывод, что устойчивость к почковому клещу смородины кроваво-красной и золотистой, обусловлена геном *Se* (Mazeikiene et al., 2017).

В связи с этим, коллективом ученых ВНИИСПК (Пикунова и др, 2015) была поставлена задача оценки возможности использования SCAR маркера гена *Se*, амплифицируемого парой праймеров GMresa (Brennan et al., 2008), для отбора устойчивых к почковому клещу генотипов при работе с отечественным селекционным материалом. Для решения вышеуказанной задачи был проведен скрининг выборки образцов (черной смородины, крыжовника и смородино-крыжовниковых гибридов) из коллекции ВНИИСПК на присутствие вышеупомянутого ДНК маркера.

### **Заключение**

В настоящее время для изучения генома рода смородины красной *Ribes* L. активно используются 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 и используются микросателлитные ДНК-маркеры.

Актуальной остается задача составления генетических и физических карт генома смородины красной, локализация генов и QTL хозяйственно-полезных признаков, разработка практических методик для повышения эффективности селекции.

Проведенный анализ литературных данных показывает, что за последние годы получены новые данные и сведения о структурной организации генома ягодных культур рода *Ribes*. Силами различных научных сообществ продолжают исследования с применением наиболее точных молекулярно-генетических методов для более глубокого изучения генома рода *Ribes rubrum* L., для уточнения филогенетических связей и наиболее точного уточнения схемы классификации.

### **Благодарности**

Выражаю благодарность ведущему научному сотруднику лаборатории биохимического генетики, кандидату биологических наук Пикуновой А.В. и зав. отделом селекции, сортоизучения и сортовой агротехники ягодных культур, кандидату сельскохозяйственных наук Голяевой О.Д. за консультативную помощь и редактирование манускрипта.

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

### **Литература**

1. Боронникова С.В. Молекулярное маркирование и генетическая паспортизация ресурсных и редких видов растений с целью оптимизации сохранения их генофондов // Аграрный вестник Урала. 2009. № 2 (56). С. 57-59.
2. Голяева О.Д. Приоритетные направления и совершенствование сортимента смородины красной // Селекция и сорторазведение садовых культур. Орел: ВНИИСПК. 2014. С. 212-223.
3. Голяева О.Д. Результаты 30-летней селекционной работы по красной смородине во Всероссийском НИИ селекции плодовых культур // Современное садоводство – Contemporary horticulture. 2015. № 2. 12 с. URL: <http://journal-vniispk.ru/pdf/2015/2/25.pdf>
4. Гостимский С.А., Кокаева З.Г., Боброва В.К. Использование молекулярных маркеров для анализа генома растений // Генетика. 1999. Т.35. №11. С. 1538–1549.
5. Календарь Р.Н., Глазко В.И. Типы молекулярно-генетических маркеров и их применение // Физиология и биохимия культурных растений. 2002. Т.34. №4. С. 279–296.
6. Коробкова Т.С., Сабарайкина С.М., Сорокопудов В.Н. Красная смородина в Якутии. Белгород: БелГУ. 2008. С. 456-478.
7. Макаркина М.А., Голяева О.Д. Селекция смородины красной *Ribes rubrum* L. на улучшенный химический состав ягод // Сельскохозяйственная биология. 2013. №. 3. С. 18-27.
8. Межнина О.А. Оценка генетического разнообразия и разработка методов ДНК-идентификации сортов и представителей видов ягодных культур *Fragaria* L. и *Ribes* L.: автореф...канд. б.н. Беларусь, 2017. 22 с.
9. Межнина О.А., Урбанович О.Ю. Изучение генетического разнообразия представителей рода *Ribes* L., выращиваемых в Беларуси // Цитология и генетика. 2017. Т. 51. №. 6. С. 32-40.
10. Мухина Ж.М. Эффективность методов молекулярного маркирования в селекции, семеноводстве сельскохозяйственных культур и для изучения биоразнообразия растительных ресурсов: автореферат дис... докт. биол. наук, Краснодар, 2012. 286 с.

11. Пикунова А.В., Князев С.Д., Голяева О.Д., Бахотская А.Ю., Калинина О.В. Исследование генома с применением ДНК-маркеров у смородины // Генетика. 2019. Т. 55. №. 9. С. 998-1010. <https://doi.org/10.1134/S001667581909011X>
12. Пикунова 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. №. 1. С. 46-54.
13. Пикунова А.В., Мартиросян Е.В., Князев С.Д., Рыжова Н.Н. Применение RAPD-анализа для изучения полиморфизма и филогенетических связей у представителей рода *Ribes* L // Экологическая генетика. 2011. Т. 9. №.2. С. 34-44.
14. Смарагдов М.Г. Тотальная геномная селекция с помощью SNP как возможный ускоритель традиционной селекции // Генетика. 2009. Т. 45. №. 6. С. 725-728.
15. Сулимова Г.Е. ДНК-маркеры в генетических исследованиях: типы маркеров, их свойства и области применения // Успехи современной биологии. 2004. Т. 124. №.3. С. 260-271.
16. Хавкин Э.Е. Молекулярные маркеры в растениеводстве // Сельскохозяйственная биология. 1997. Т. 5. С. 3-21.
17. Хлесткина Е.К. Молекулярные маркеры в генетических исследованиях и в селекции // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2015. №. 4/2. С. 1044-1054.
18. Чесноков Ю.В., Драгавцев В.А., Борхсениус С.Н. Молекулярно-генетические маркеры и их использование в предселекционных исследованиях. СПб: АФИ. 2017. С. 110-116.
19. Чесноков Ю.В. Генетические ресурсы растений и современные методы ДНК-типирования. СПб : ВИР, 2007. 80 с.
20. Antonius K., Karhu S., Kaldmäe H., Laciš G., Rugenius R., Baniulis D., Gunnarsson A. Development of the Northern European *Ribes* core collection based on a microsatellite (SSR) marker diversity analysis // Plant Genetic Resources. 2012. V. 10. №. 1. P. 70-73. <https://doi.org/10.1017/S1479262111000980>
21. Brennan R., Jorgensen L., Gordon S., Loades K., Hackett C., Russell J. The development of a PCR-based marker linked to resistance to the blackcurrant gall mite (*Cecidophyopsis ribis* Acari: Eriophyidae) // Theoretical and applied genetics. 2009. V. 118. №. 2. P. 205-211. <https://doi.org/10.1007/s00122-008-0889-x>
22. Brennan R., Jorgensen L., Hackett C., Woodhead M., Gordon S., Russell J. 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. №. 1-2. P. 19-34. <https://doi.org/10.1007/s10681-007-9412-8>
23. Brennan R., Jorgensen L., Woodhead M., Russell J. Development and characterization of SSR markers in *Ribes* species // Molecular Ecology Notes. 2002. V. 2. №. 3. P. 327-330. <https://doi.org/10.1046/j.1471-8286.2002.00233.x>
24. Brookes A. J. The essence of SNPs // Gene. 1999. V. 234. №. 2. P. 177-186. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(99\)00219-X](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(99)00219-X)
25. Cavanna M., Torello Marinoni D., Beccaro G.L., Bounous G. Microsatellite-based evaluation of *Ribes* spp. germplasm // Genome. 2009. V. 52. №. 10. P. 839-848. <https://doi.org/10.1139/G09-057>
26. Chiche J., Brown S.C., Leclerc J.C., Siljak-Yakovlev S. (Genome size, heterochromatin organisation, and ribosomal gene mapping in four species of *Ribes* // Canadian journal of botany. 2003. V. 81. №. 11. P. 1049-1057. <https://doi.org/10.1139/b03-088>
27. Gobert V., Moja S., Taberlet P., Wink M. Phylogenetic relationships and genetic exchanges between cultivated and wild mints (*Mentha*; Lamiaceae) revealed by nucleotide sequences of ncDNA (ITS I, ITS II), cpDNA and genomic fingerprinting (AFLP, ISSR) // Plant Biology. 2006. V. 8. P. 470-485

28. Hayes B.J., Goddard M.E. Prediction of total genetic value using genome-wide dense marker maps // *Genetics*. 2010. № 157(4), P. 1819-1829.
29. Ipek A., Barut E., Gulen H., Ipek M. Genetic diversity among some currants (*Ribes* spp.) cultivars as assessed by AFLP markers // *Pak. J. Bot.* 2010. V. 42. №. 2. P. 1009-1012.
30. Jones C.J., Edwards K.J., Castaglione S., Winfield M.O., Sala F., Van de Wiel C., Brettschneider, R. Reproducibility testing of RAPD, AFLP and SSR markers in plants by a network of European laboratories // *Molecular breeding*. 1997. V. 3. №. 5. P. 381-390. <https://doi.org/10.1023/A:1009612517139>
31. Kalia R.K., Rai M.K., Kalia S., Singh R., Dhawan A.K. Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants // *Euphytica*. 2011. V. 177. №. 3. P. 309-334. <https://doi.org/10.1007/s10681-010-0286-9>
32. Keller-Przybylkowicz S., Korbin M., Gwozdecki J. RAPD and ISSR markers of black and green colour of blackcurrant (*Ribes nigrum*) fruits // *Journal of fruit and ornamental plant research*. 2006. V. 14. P. 45.
33. Korbin M., Kuras A., Zurawicz E. Fruit plant germplasm characterisation using molecular markers generated in RAPD and ISSR-PCR // *Cellular and Molecular Biology Letters*. 2002. V. 7. №. 2B. P. 785-794.
34. Lanham P.G., Brennan R.M. Genetic characterisation of *Ribes nigrum*, *Ribes rubrum* and *Ribes grossularia* using molecular markers // *Acta Horticulturae*. 1998. Vol. 505. P. 385-392. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1999.505.53>
35. Lanham P.G., Brennan R.M., Hackett C., McNicol R.J. RAPD fingerprinting of blackcurrant (*Ribes nigrum* L.) cultivars // *Theoretical and applied genetics*. 1995. V. 90. №. 2. P. 166-172. <https://doi.org/10.1007/BF00222198>
36. Mazeikiene I., Bendokas V., Baniulis D. Genetic background of resistance to gall mite in *Ribes* species // *Agricultural and Food Science*. 2017. № 26(2). P. 111-117. <https://doi.org/10.23986/afsci.59410>
37. Mazeikiene I., Bendokas V., Stanys V., Siksnianas T. 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>
38. Messinger W., Liston A., Hummer K. *Ribes* phylogeny as indicated by restriction-site polymorphisms of PCR-amplified chloroplast DNA // *Plant Systematics and Evolution*. 1999. V. 20. P. 185-195. <https://doi.org/10.1007/BF00984364>
39. 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. № 6(3). P. 165-174.
40. Palombi M., Damiano C. Comparison between RAPD and SSR molecular markers in detecting genetic variation in kiwifruit (*Actinidia deliciosa* A. Chev) // *Plant Cell Reports*. 2002. V. 20. №. 11. P. 1061-1066. <https://doi.org/10.1007/s00299-001-0430-z>
41. Russell J.R., Bayer M., Booth C. et al. Identification, utilisation and mapping of novel transcriptome-based markers from blackcurrant (*Ribes nigrum*) // *BMC Plant Biology*. 2011. № 11(1). P. 147. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-11-147>
42. 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 // *Molecular breeding*. 2014. №33(4). P. 835-849. <https://doi.org/10.1007/s11032-013-9996-8>
43. Sinters A.E., Soltis D.E. Phylogenetic relationships in *Ribes* (Grossulariaceae) inferred from ITS sequence data // *Taxon*. 2003. V. 52. №. 1. P. 51-66. <https://doi.org/10.2307/3647437>

44. Schultheis L.M., Donoghue M.J. Molecular phylogeny and biogeography of *Ribes* (Grossularia) with an emphasis of gooseberry (subg. Grossularia) // *Systematic Botany*. 2004. V. 29. № 1. P. 77–96. <https://doi.org/10.1600/036364404772974239>
45. Vignal A., Milan D., SanCristobal M., Eggen A. A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics // *Genetics Selection Evolution*. 2002. V. 34. №. 3. P. 275. <https://doi.org/10.1186/1297-9686-34-3-275>
46. Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., Lee T.V.D., Hornes M., Zabeau M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting // *Nucleic acids research*. 1995. V. 23. №. 21. P. 4407-4414. <https://doi.org/10.1093/nar/23.21.4407>

## References

1. Boronnikova, S.V. (2009). Molecular labeling and genetic certification of resource and rare plant species in order to optimize the conservation of their gene pools. *Agrarian Bulletin of the Urals*, (2), 57-59. (In Russian).
2. Golyaeva, O.D. (2014). Priority trends and improvement of the assortment of red currants. In *Breeding and variety cultivation of fruit and berry crops*. (pp. 212-223). (In Russian).
3. Golyaeva, O.D. (2015). The results of 30 years of red currant breeding at the All-Russian Research Institute for Fruit Crop Breeding. *Sovremennoe sadovodstvo - Contemporary Horticulture*, 2, 12. (In Russian, English abstract).
4. Gostimsky, S.A., Kokaeva, Z.G., & Bobrova, V.K. (1999). The use of molecular markers for plant genome analysis. *Russian Journal of Genetics*, 35 (11), 1538-1549. (In Russian).
5. Calendar, R.N., & Glazko, V.I. (2002). Types of molecular genetic markers and their use. *Physiology and Biochemistry of Cultivated Plants*, 34 (4), 279-296. (In Russian).
6. Korobkova, T.S., Sabaraikina, S.M., & Sorokopudov, V.N. (2008) *Red currant in Yakutia*. Belgorod: Belgorod State University. 456-478. (In Russian).
7. Makarkina, M.A., & Golyaeva, O.D. (2013). Breeding of red currant *Ribes rubrum* L. for improved chemical composition of berries. *Agricultural Biology*, (3). (In Russian).
8. Mezhnina, O.A. (2017). *Assessment of genetic diversity and development of DNA identification methods for varieties and representatives of the species of berry crops *Fragaria L.* and *Ribes L.** (Biol. Sci. Doc. Thesis), Belarus.
9. Mezhnina, O.A., & Urbanovich, O.Yu. (2017). Study of the genetic diversity of representatives of the genus *Ribes L.* grown in Belarus. *Cytology and Genetics*, 51 (6), 32-40.
10. Mukhina, J.M. (2012). *The effectiveness of molecular labeling methods in breeding, seed production of agricultural crops and for the study of biodiversity of plant resources* (Biol. Sci. Doc. Thesis), Krasnodar. (In Russian).
11. Pikunova, A.V., Knyazev, S.D., Golyaeva, O.D., Bakhotskaya, A.Yu., & Kalinina, O.V. (2019). Genome Studies by Means of DNA Markers of the Blackcurrant. *Russian Journal of Genetics*, 55(9), 998-1010. <https://doi.org/10.1134/S1022795419090102>
12. Pikunova, A.V., Knyazev, S.D., Bakhotskaya, A.Yu., & Kochumova, A.A. (2015). Polymorphism of microsatellite loci in blackcurrant varieties (*Ribes nigrum* L.) from the VNIISPK collection. *Agricultural Biology*, (1). (In Russian).
13. Pikunova, A.V., Martirosyan, E.V., Knyazev, S.D., & Ryzhova, N.N. (2011). The use of RAPD analysis to study genetic polymorphism and phylogenetic relationships in representatives of the genus *Ribes L.* *Russian Journal of Genetics: Applied Research*, 9 (2). (In Russian).
14. Smaragdov, M.G. (2009). Total genomic selection with using SNP as a possible accelerator of traditional selection. *Russian Journal of Genetics*, 45 (6), 725-728. (In Russian).
15. Sulimova, G.E. (2004). DNA markers in genetic research: types of markers, their properties and applications. *Biology Bulletin Reviews*, 124 (3), 260-271. (In Russian).

16. Khavkin, E.E. (1997). Molecular markers in crop production. *Agricultural Biology*, 5, 3-21. (In Russian).
17. Khlestkina, E.K. (2015). Molecular markers in genetic research and in breeding. *Vavilov journal of genetics and breeding*, 17 (4/2), 1044-1054. (In Russian).
18. Chesnokov, Yu.V., Dragavtsev, V.A., & Borchsenius, S.N. (2013). *Molecular genetic markers and their use in preselection studies* (pp 110-116). Saint-Petersburg: Agrophysical Research Institute. (In Russian).
19. Chesnokov, Yu.V. (2007) *Plant genetic resources and modern DNA typing methods*. Saint Petersburg: VIR. (In Russian).
20. Antonius, K., Karhu, S., Kaldmäe, H., Lacis, G., Rugenius, R., Baniulis, D., & Gunnarsson, Å. (2012). Development of the Northern European *Ribes* core collection based on a microsatellite (SSR) marker diversity analysis. *Plant Genetic Resources*, 10(1), 70-73. <https://doi.org/10.1017/S1479262111000980>
21. Brennan, R., Jorgensen, L., Gordon, S., Loades, K., Hackett, C., & Russell, J. (2009). The development of a PCR-based marker linked to resistance to the blackcurrant gall mite (*Cecidophyopsis ribis* Acari: Eriophyidae). *Theoretical and applied genetics*, 118(2), 205-211. <https://doi.org/10.1007/s00122-008-0889-x>
22. Brennan, R., Jorgensen, L., Hackett, C., Woodhead, M., Gordon, S., & Russell, J. (2008). 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*, 161(1-2), 19-34. <https://doi.org/10.1007/s10681-007-9412-8>
23. Brennan, R., Jorgensen, L., Woodhead, M., & Russell, J. (2002). Development and characterization of SSR markers in *Ribes* species. *Molecular Ecology Notes*, 2(3), 327-330. <https://doi.org/10.1046/j.1471-8286.2002.00233.x>
24. Brookes, A.J. (1999). The essence of SNPs. *Gene*, 234(2), 177-186. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(99\)00219-X](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(99)00219-X)
25. Cavanna, M., Torello Marinoni, D., Beccaro, G.L., & Bounous, G. (2009). Microsatellite-based evaluation of *Ribes* spp. germplasm. *Genome*, 52(10), 839-848. <https://doi.org/10.1139/G09-057>
26. Chiche, J., Brown, S.C., Leclerc, J.C., & Siljak-Yakovlev, S. (2003). Genome size, heterochromatin organisation, and ribosomal gene mapping in four species of *Ribes* / *Canadian journal of botany*, 81(11), 1049-1057. <https://doi.org/10.1139/b03-088>
27. Gobert, V., Moja, S., Taberlet, P., & Wink, M. (2006). Phylogenetic relationships and genetic exchanges between cultivated and wild mints (*Mentha*; Lamiaceae) revealed by nucleotide sequences of ncDNA (ITS I, ITS II), cpDNA and genomic fingerprinting (AFLP, ISSR). *Plant Biology*, 8, 470-485.
28. Hayes, B.J., & Goddard, M.E. (2001). Prediction of total genetic value using genome-wide dense marker maps. *Genetics*, 157(4), 1819-1829.
29. Ipek, A., Barut, E., Gulen, H., & Ipek, M. (2010). Genetic diversity among some currants (*Ribes* spp.) cultivars as assessed by AFLP markers. *Pak. J. Bot.*, 42(2), 1009-1012.
30. Jones, C.J., Edwards, K.J., Castaglione, S., Winfield, M.O., Sala, F., Van de Wiel, C., ... & Brettschneider, R. (1997). Reproducibility testing of RAPD, AFLP and SSR markers in plants by a network of European laboratories. *Molecular breeding*, 3(5), 381-390. <https://doi.org/10.1023/A:1009612517139>
31. Kalia, R.K., Rai, M.K., Kalia, S., Singh, R., & Dhawan, A.K. (2011). Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants. *Euphytica*, 177(3), 309-334. <https://doi.org/10.1007/s10681-010-0286-9>

32. Keller-Przybylkowicz, S., Korbin, M., & Gwozdecki, J. (2006). RAPD and ISSR markers of black and green colour of blackcurrant (*Ribes nigrum*) fruits. *Journal of fruit and ornamental plant research*, 14, 45.
33. Korbin, M., Kuras, A., & Zurawicz, E. (2002). Fruit plant germplasm characterisation using molecular markers generated in RAPD and ISSR-PCR. *Cellular and Molecular Biology Letters*, 7(2B), 785-794.
34. Lanham, P.G., & Brennan, R.M. (1998, January). Genetic characterisation of *Ribes nigrum*, *Ribes rubrum* and *Ribes grossularia* using molecular markers. *Acta Horticulturae*, 505, 385-392. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1999.505.53>
35. Lanham, P.G., Brennan, R.M., Hackett, C., & McNicol, R.J. (1995). RAPD fingerprinting of blackcurrant (*Ribes nigrum* L.) cultivars. *Theoretical and applied genetics*, 90(2), 166-172. <https://doi.org/10.1007/BF00222198>
36. Mazeikiene, I., Bendokas, V., Baniulis, D., Staniene, G., Juskyte, D.A., Sasnauskas, A., ... & Siksnianas, T. (2017). Genetic background of resistance to gall mite in *Ribes* species. *Agricultural and Food Science*, 26(2), 111-117. <https://doi.org/10.23986/afsci.59410>
37. Mazeikiene, I., Bendokas, V., Stanys, V., & Siksnianas, T. (2012). Molecular markers linked to resistance to the gall mite in blackcurrant. *Plant breeding*, 131(6), 762-766. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0523.2012.01995.x>
38. Messinger, W., Hummer, K., & Liston, A. (1999). *Ribes* (Grossulariaceae) phylogeny as indicated by restriction-site polymorphisms of PCR-amplified chloroplast DNA. *Plant Systematics and Evolution*, 217(3-4), 185-195. <https://doi.org/10.1007/BF00984364>
39. Palmieri, L., Grando, M. S., Sordo, M., Grisenti, M., Martens, S., & Giongo, L. (2013). Establishment of molecular markers for germplasm management in a worldwide provenance *Ribes* spp. collection. *Plant Omics*, 6(3): 165-174. Retrieved from: [https://www.pomics.com/palimeri\\_6\\_3\\_2013\\_165\\_174.pdf](https://www.pomics.com/palimeri_6_3_2013_165_174.pdf)
40. Palombi, M., & Damiano, C. (2002). Comparison between RAPD and SSR molecular markers in detecting genetic variation in kiwifruit (*Actinidia deliciosa* A. Chev). *Plant Cell Reports*, 20(11), 1061-1066. <https://doi.org/10.1007/s00299-001-0430-z>
41. Russell, J.R., Bayer, M., Booth, C., Cardle, L., Hackett, C.A., Hedley, P.E., ... & Brennan, R.M. (2011). Identification, utilisation and mapping of novel transcriptome-based markers from blackcurrant (*Ribes nigrum*). *BMC Plant Biology*, 11(1), 147. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-11-147>
42. Russell, J., Hackett, C., Hedley, P., Liu, H., Milne, L., Bayer, M., ... & Brennan, R. (2014). The use of genotyping by sequencing in blackcurrant (*Ribes nigrum*): developing high-resolution linkage maps in species without reference genome sequences. *Molecular Breeding*, 33(4), 835-849. <https://doi.org/10.1007/s11032-013-9996-8>
43. Sinters, A.E., & Soltis, D.E. (2003). Phylogenetic relationships in *Ribes* (Grossulariaceae) inferred from ITS sequence data. *Taxon*, 52(1), 51-66. <https://doi.org/10.2307/3647437>
44. Schultheis, L.M., & Donoghue, M.J. (2004). Molecular phylogeny and biogeography of *Ribes* (Grossulariaceae), with an emphasis on gooseberries (subg. *Grossularia*). *Systematic Botany*, 29(1), 77-96. <https://doi.org/10.1600/036364404772974239>
45. Vignal, A., Milan, D., SanCristobal, M., & Eggen, A. (2002). A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. *Genetics Selection Evolution*, 34(3), 275. <https://doi.org/10.1186/1297-9686-34-3-275>
46. Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Lee, T.V.D., Hornes, M., & Zabeau, M. (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic acids research*, 23(21), 4407-4414. <https://doi.org/10.1093/nar/23.21.4407>