

ISSN 1029-8940 (print)  
УДК 634.723.1:575.174.015.3

Поступила в редакцию 02.05.2015  
Received 02.05.2015

**О. А. Межнина, О. Ю. Урбанович**

*Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь*

### **АНАЛИЗ ВАРИАБЕЛЬНОСТИ МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ ЛОКУСОВ У ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА СМОРОДИНЫ (*RIBES* L.), ВЫРАЩИВАЕМЫХ В БЕЛАРУСИ**

С помощью 8 SSR-маркеров изучено генетическое разнообразие 86 представителей рода *Ribes*, выращиваемых в Республике Беларусь. Показано, что сорта смородины черной, смородины красной и крыжовника обыкновенного, выращиваемые в Республике Беларусь, характеризуются достаточно высоким разнообразием аллелей локусов микросателлитных последовательностей. Среднее количество аллелей на локус среди 86 образцов составило 12,1, среднее количество уникальных генотипов в расчете на маркер – 26,4. Значение дискриминационной силы для всех маркеров высокое (в среднем – 0,8). Образцы, относящиеся к разным видам, формируют отдельные кластеры на дендрограмме филогенетического сходства. Генетически наиболее близки смородине черной йоста, смородина золотистая, смородина альпийская. На большем генетическом расстоянии находится смородина красная. Сорта крыжовника формируют кластер, наиболее отдаленный от видов смородины. Анализ распределения аллелей показал, что сорта смородины красной и крыжовника обыкновенного имеют отличные от сортов смородины черной SSR-аллели по исследованным локусам микросателлитных последовательностей. Число аллелей, встречающихся только у сортов смородины красной и крыжовника обыкновенного, варьировалось от 1 (локусы *g2-G12*, *g1-M0*) до 5 (локус *E4D03*). На основании анализа полиморфизма SSR-локусов сформирован набор из 8 маркеров, позволяющий проводить ДНК-идентификацию генотипов представителей рода *Ribes*. При выборе набора учтен уровень информативности каждого маркера, частота встречаемости аллелей, выявляемых данным набором маркеров у сортов, а также удобство визуализации и анализа продуктов амплификации. Метод SSR-анализа с использованием указанного набора маркеров может успешно применяться для идентификации смородины черной, смородины красной и крыжовника обыкновенного на молекулярном уровне.

*Ключевые слова:* смородина черная, смородина красная, крыжовник, SSR-маркеры, генетическое разнообразие, ДНК-идентификация.

**O. A. Mezhnina, O. Yu. Urbanovich**

*Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus*

### **ANALYSIS OF MICROSATELLITE LOCI VARIABILITY *RIBES* L. REPRESENTATIVES GROWN IN BELARUS**

The study of the genetic diversity of 86 representatives of the genus *Ribes* cultivated in Belarus using 8 SSR markers was held. It is shown that the varieties of black currant, red currant and gooseberry grown in Belarus, is characterized by high diversity of microsatellite loci. The average number of alleles per locus among the 86 samples was 12.1. The average number of unique genotypes per marker was 26.4. The value of discriminatory power for all markers was high with average number 0.8. Samples belonging to different species formed distinct clusters in the dendrogram of phylogenetic similarity. Genetically closest to black currant were josta, Golden currant, Alpine currant. At a greater genetic distance were red currants. Varieties of gooseberries form a cluster that is most distant from currant species. Analysis of alleles distribution at the investigated loci of microsatellite sequences revealed that red currant and gooseberry varieties have different SSR-alleles from black currant varieties. The number of alleles detected only for red currant and gooseberry varieties ranged from 1 (loci *g2-G12*, *g1-M0*) to 5 (locus *E4D03*). Based on the analysis of SSR-locus polymorphism, a set of 8 markers was generated that allow DNA-identification of *Ribes* genotypes. For selection the set of markers the level of information value for each marker, the frequency of alleles occurrence and convenience of visualization and analysis of amplification products were taken into account. The method of SSR-analysis with using specified set of markers can be successfully applied for identification of black currant, red currant and gooseberry varieties at the molecular level.

*Keywords:* black currant, redcurrant, gooseberry SSR-markers, genetic variability, DNA-identification.

**Введение.** Род смородина (*Ribes*) включает более 150 видов, распространенных в умеренных широтах Восточной и Северной Европы, Северной Америки, некоторые виды произрастают в Южной Америке и Северо-Восточной Африке [1, 2]. На территории СНГ в диком виде встречается около 37 видов, наиболее распространенными из которых являются смородина черная

(*Ribes nigrum* L.), смородина колосистая (*Ribes spicatum* Robson (*R. Pubescens* (C. Hart.) Hedl.)), смородина альпийская (*Ribes alpinum* L.), смородина светлая (*Ribes lucidum* Kit), смородина красная (*Ribes rubrum* L.), смородина золотистая (*Ribes aureum* Pursh). Ранее род *Ribes* в систематической классификации относился к семейству Камнеломковые (*Saxifragaceae*), в настоящее время род смородина относится к семейству Крыжовниковые (*Grossulariaceae*) [3, 4].

Все виды *Ribes* имеют диплоидный геном, представленный 8 парами хромосом ( $2n = 2x = 16$ ). Размер генома, определенный с помощью проточной цитометрии, для *Ribes petraeum* Wulf., *Ribes rubrum* L., *Ribes uva-crispa* L. в среднем составляет  $2C = 1,91$  пг, содержание GC-пар – 40,4 % [5]. Для изучения генетического разнообразия смородины черной предложены молекулярные маркеры различных типов. В 2000 г. проведено исследование 12 представителей рода *Ribes* с использованием 180 RAPD и 151 ISSR-маркера. В данной работе показан высокий генетический полиморфизм изученных образцов [6]. Простота генерирования RAPD-маркеров позволяет использовать их для идентификации и дифференциации различных видов даже при отсутствии информации об их геноме [7–11]. Недостатком метода является необходимость использования высокоочищенной ДНК, поскольку применение коротких случайных праймеров может приводить к амплификации фрагментов различных организмов [12]. В 2002 г. исследование генотипов земляники садовой (*Fragaria x ananassa*), яблони (*Malus domestica*) и представителей рода *Ribes* (*R. nigrum*, *R. rubrum* и *R. grossularia*) с помощью RAPD и ISSR-маркеров показало, что значения генетического сходства при использовании ISSR-маркеров значительно выше, чем при использовании RAPD-маркеров. Так, данные, полученные с помощью ISSR-маркеров, позволили выявить группу представителей рода *Ribes* ('Greenfinch', 'Rolonda', 'Martlet', 'Hinomaki Rot', 'Karpaty', 'Niesluchowski'), имеющих степень генетического родства 85–95 %, в то время как при применении RAPD-маркеров выявлялась значительно меньшая степень генетического сходства (45–65 %) [13]. В 1999 г. с помощью RAPD-, ISSR- и AFLP-маркеров изучено генетическое разнообразие *Ribes grossularia*. Использование AFLP-маркеров позволило получить уникальный генетический профиль каждого из 20 образцов, в то время как с помощью RAPD, ISSR-маркеров невозможно было разделить генетически сходные сорта [14]. Необходимо отметить, что система идентификации с неспецифическими (RAPD) праймерами имеет определенные проблемы с воспроизводимостью в различных лабораториях. Этому недостатка лишены SSR-маркеры. Результаты, полученные с их помощью, легко интерпретируются и воспроизводятся. Помимо этого, микросателлитные маркеры наследуются по кодоминантному принципу и поэтому получили широкое применение при картировании генома и анализе генетической структуры популяции [15].

В 2002 г. Brennan [16] предложены 11 SSR-маркеров, которые при анализе преимущественно европейских сортов смородины черной, а также *R. dikuscha*, *R. nevadense*, *R. sanguineum*, *R. cereum*, *R. petraeum*, *R. grossularia* и двух межвидовых гибридов позволили выявить от 2 до 18 аллелей на locus, дискриминационная сила маркеров варьировалась от 0,18 до 0,91. В 2009 г. при анализе 41 сорта, принадлежащего к 4 различным видам рода *Ribes* (*Ribes nigrum*, *Ribes rubrum*, *Ribes missouriense* и *Ribes* × *nidigrolaria*), с использованием 12 SSR-маркеров выявлено 38 различных генотипов, от 7 до 15 аллелей на locus (в среднем 10,4) [17]. Данные о количестве обнаруженных аллелей на locus коррелируют со значениями, полученными при изучении других культур. Так, при исследовании генетического полиморфизма 36 сортов яблони для 9 SSR-маркеров данный показатель составил 10,9 аллелей на locus [18], при исследовании 78 генотипов фундука с использованием 16 SSR-маркеров – 9,4 [19], для представителей рода *Rubus* – 8,2 [20], для малины обыкновенной – 8,0 [21]. В 2013 г. L. Palmeri с соавт. [22] 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 получены новые сведения о структуре и организации генома ягодных культур рода *Ribes*, с помощью современных молекулярно-генетических методов уточнены схемы классификации и филогенетического происхождения многих видов. Вместе с тем имеются публикации о исследовании отдельных сортов зарубежной селекции, однако генетическое раз-

нообразии ягодных культур, выращиваемых на территории Беларуси, не изучалось. Отсутствует информация о генетическом потенциале как современных, так и стародавних сортов данного региона, не установлено, какие наборы маркеров позволяют эффективно их дифференцировать и идентифицировать. Изучение генетического разнообразия генофонда ягодных культур, выращиваемых на территории Беларуси, поможет выявить и сохранить уникальные генетические ресурсы, выделить генотипы, являющиеся ценными для селекционного процесса, уточнить родственные связи сортов, а также систематизировать коллекционный материал.

Цель данного исследования – изучение генетического разнообразия представителей рода *Ribes*, культивируемых в Республике Беларусь, и анализ эволюционных связей между видами.

**Материалы и методы исследования.** С целью молекулярного анализа была сформирована коллекция сортов и образцов представителей рода *Ribes*. Материал предоставлен Республиканским научно-производственным дочерним унитарным предприятием «Институт плодоводства» и фермерскими хозяйствами. Коллекция включала сорта, имеющие различное генетическое происхождение. Среди них сорта селекции Беларуси, России, Украины, Швеции, Литвы и других стран. В общей сложности в коллекции было представлено 63 сорта смородины черной (*Ribes nigrum* L. ( $2n = 16$ )), 11 сортов крыжовника обыкновенного (*Ribes uva-crispa* L. ( $2n = 16$ )), 9 сортов смородины красной (*Ribes rubrum* L. ( $2n = 16$ )), а также по 1 образцу смородины альпийской (*Ribes alpinum*) и смородины золотистой (*Ribes aureum*) и йошты (*Ribes* × *nidigrolaria*), являющейся гибридом смородины черной, крыжовника обыкновенного и крыжовника растопыренного.

Выделение тотальной ДНК из фрагмента листа отдельного растения осуществляли с помощью набора Genomic DNA Purification Kit (Thermo scientific, EC), согласно методике производителя.

Для анализа полиморфизма по SSR-маркерам использовали мультиплексную ПЦР с 4 парами праймеров в одной реакции. Каждая пара имела специфическую флуоресцентную метку (FAM, R6G, TAMRA, ROX). В исследовании использовали SSR-маркеры, специфичные для генома *Ribes* L. Название SSR-маркеров, длина и количество выявляемых аллелей и их локализация в геноме приведены в табл. 1. Праймеры синтезированы компанией «Праймтех» (Беларусь).

Т а б л и ц а 1. Название SSR-маркеров, длина и количество выявляемых аллелей и их локализация в геноме

Table 1. The name of the SSR markers, the length and number of detected alleles and their localization in the genome

Локус	Размер аллеля, п. н.	К-во аллелей	Хромосома
<i>g1-E03</i>	207, 223, 228, 230, 233, 236, 239, 241, 243, 247, 254, 262, 270, 280, 298	15	1
<i>g2-G12</i>	165, 167, 171, 173, 177, 179, 181, 183, 185, 187, 189, 191	12	7
<i>e1-001</i>	138, 140, 142, 144, 146, 148, 150, 152, 154, 160, 166	11	6
<i>g1-M07</i>	200, 202, 204, 206, 208, 210, 212, 214, 220, 226, 230	11	1
<i>g1-A01</i>	209, 211, 213, 217, 219, 223, 230, 234, 241, 245, 256	11	5
<i>g1-K04</i>	272, 284, 286, 288, 292, 294, 296, 298, 300, 302	10	1
<i>e3-B02</i>	151, 153, 159, 161, 163, 166, 168, 170, 183	9	5
<i>e4-D03</i>	170, 176, 179, 184, 192, 196, 198, 200, 202, 204, 206, 208, 210, 212, 214, 218, 220, 226	18	5

Разделение фрагментов ПЦР выполняли на генетическом анализаторе 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США). Размер фрагментов рассчитывали с помощью компьютерной программы GeneMapper® Software v4.1 относительно стандартных образцов ДНК известной длины. В качестве стандарта молекулярного веса использовали внутренний стандарт S450 («Синтол», РФ).

Расчет частоты аллелей, построение филогенетического дерева с помощью метода ближайших соседей (Neighbor-joining) на основе генетических дистанций между сортами, рассчитанных по формуле, предложенной М. Nei [23], и бутстреп-анализ (Bootstrap analysis) осуществлены при помощи компьютерной программы Treecon [24].

Значение уровня ожидаемой гетерозиготности вычисляли по формуле  $H_e = 1 - \sum(p_i)^2$ , где  $p_i$  – частота встречаемости  $i$ -го аллеля [25].

Уровень наблюдаемой гетерозиготности  $H_o$  рассчитывали как отношение гетерозиготных генотипов к общему количеству генотипов.

Число эффективных аллелей ( $N_e$ ) определяли по формуле  $N_e = 1/(1 - H_e)$ .

Индекс Райта (F) (Wright's fixation index) вычисляли по формуле  $F = 1 - H_o/H_e$  [26].

Дискриминационную силу маркера (PD) рассчитывали по формуле  $PD = 1 - \sum(g_i)^2$ , где  $g_i$  – частота встречаемости  $i$ -го генотипа [27].

**Результаты и их обсуждение.** Состав аллелей локусов микросателлитных последовательностей определяли для 86 представителей рода *Ribes* с помощью 8 SSR-маркеров, охватывающих разные участки генома *Ribes nigrum*. Наименее полиморфными оказались локусы *e3-B02* и *gl-K04*. Количество обнаруженных в них аллелей составило 9 и 10 соответственно. В локусах *e1-001*, *gl-M07* и *gl-A01* выявлено одинаковое количество аллелей – 11. В локусах *g2-G12* и *gl-E03* обна-

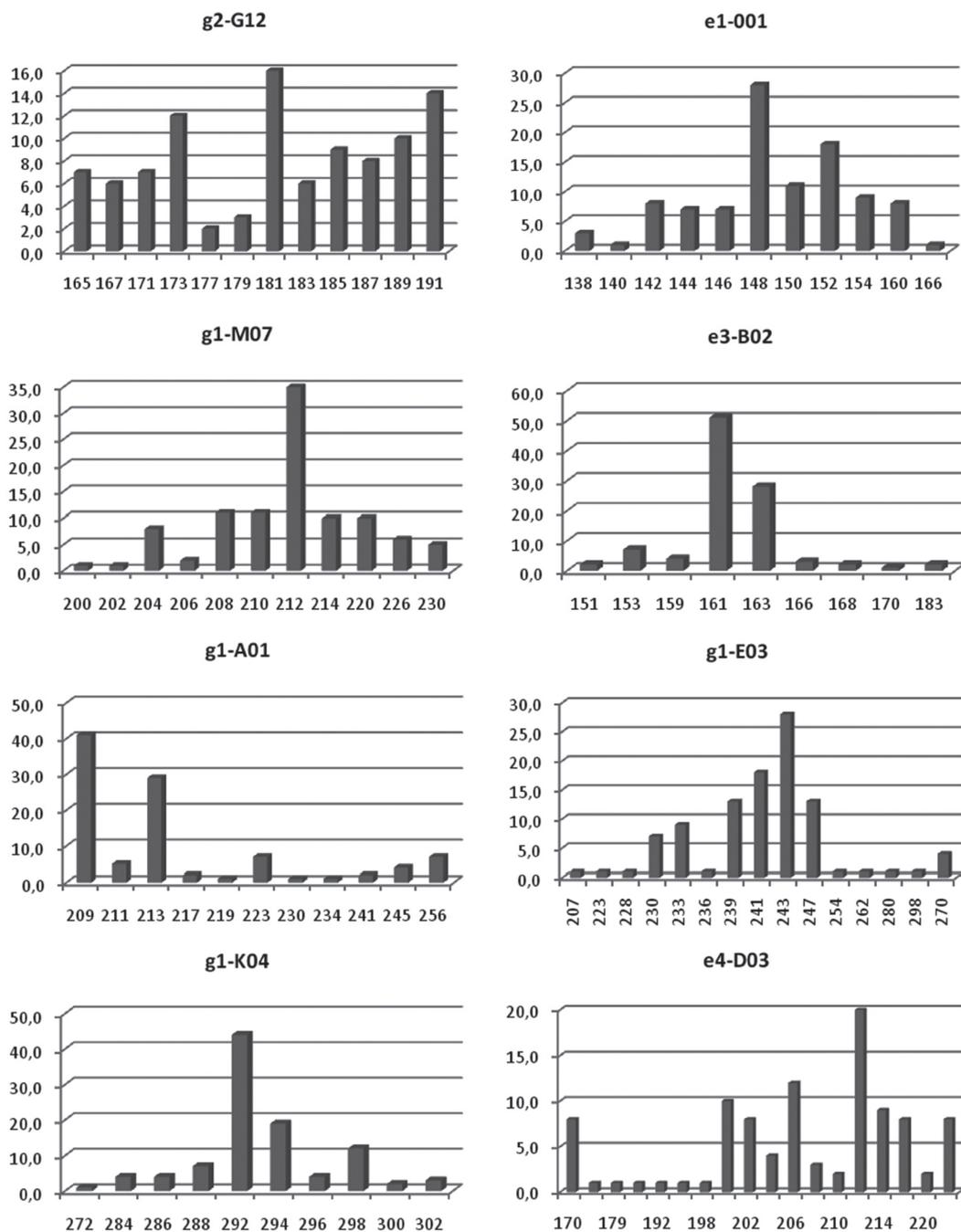


Рис. 1. Аллели локусов *g2-G12*, *e1-001*, *gl-M07*, *e3-B02*, *gl-A01*, *gl-E03*, *gl-K04* (ось X, п. н.), и их частота встречаемости (ось Y, %) среди 86 генотипов представителей рода *Ribes*

Fig. 1. Alleles of loci *g2-G12*, *e1-001*, *gl-M07*, *e3-B02*, *gl-A01*, *gl-E03*, *gl-K04* (X-axis, bp) and their frequency of occurrence (Y-axis, %), among 86 genotypes of *Ribes* representatives

ружено 12 и 15 аллелей соответственно. Максимальное количество аллелей выявлено в локусе *e4-D03* – 18 (табл. 1). В общей сложности среди 86 представителей рода *Ribes* с использованием 8 SSR-маркеров выявлено 97 полиморфных аллелей. Среднее значение количества аллелей на locus составило 12,1. Этот же показатель среди европейских представителей рода *Ribes*, определенный с использованием 11 SSR-маркеров, составил 10,4 [28]. Среднее количество аллелей на locus, определенное с помощью 14 маркеров для 27 образцов смородины черной из коллекции Всероссийского научно-исследовательского института селекции плодовых культур (ВНИИСПК), составило 4,9 [29]. Таким образом, выбранный в данном исследовании набор маркеров характеризуется высоким уровнем полиморфизма. Для каждого локуса определялись длина аллелей у конкретного сорта и количество полиморфных фрагментов. Частота встречаемости аллелей среди исследованных образцов представлена на рис. 1.

Как видно на рис. 1, в целом для всех маркеров характерны аллели со средней частотой встречаемости. Тем не менее, среди 86 образцов выявлено 33 редких аллеля (у 2 % образцов и менее). В зависимости от маркера количество редких аллелей составило от 1 до 8. Основным источником редких аллелей являлись сорта крыжовника и смородины красной, что обусловлено их генетической удаленностью от сортов смородины черной. Для отдельных аллелей отмечена высокая частота встречаемости. Так, в локусе *g1-M07* аллель длиной 212 п. н. встречался у 35 % образцов, в локусе *e3-B02* аллель длиной 161 п. н. обнаружен в геноме у 51 % образцов, в локусе *g1-A01* аллели 209 и 213 п. н. выявлены у 41 и 29 % образцов соответственно, в локусе *g1-K04* аллель длиной 292 п. н. встречался у 44 % образцов.

Результаты расчета количества и размера аллелей, количества и доли уникальных генотипов, уровня ожидаемой ( $H_e$ ) и наблюдаемой ( $H_o$ ) гетерозиготности, числа эффективных аллелей ( $N_e$ ), индексы Райта ( $F$ ), дискриминационной силы маркеров ( $PD$ ), которые были рассчитаны для 86 представителей рода *Ribes*, представлены в табл. 2.

Т а б л и ц а 2. Аллели микросателлитных локусов, количество и доля уникальных генотипов, уровень ожидаемой ( $H_e$ ) и наблюдаемой ( $H_o$ ) гетерозиготности, число эффективных аллелей ( $N_e$ ), индексы Райта ( $F$ ), дискриминационная сила маркера ( $PD$ ) 86 представителей рода *Ribes*

Table 2. Alleles of microsatellite loci, the number and proportion of unique genotypes, the level of expected ( $H_e$ ) and observed ( $H_o$ ) heterozygosity, the number of effective alleles ( $N_e$ ), Wright's index ( $F$ ), the discrimination power of markers ( $PD$ ) for 86 *Ribes* representatives

SSR-маркер	Варьирование размера фрагментов амплификации, п. н.	К-во аллелей	К-во уникальных генотипов	Доля уникальных генотипов, %	$H_e$	$H_o$	$N_e$	$F$	$PD$
<i>g2-G12</i>	167–191	12	34	0,4	0,898	0,709	9,8	0,21	0,90
<i>e1-001</i>	144–166	11	25	0,3	0,849	0,849	6,6	0,00	0,85
<i>g1-M07</i>	200–230	11	29	0,34	0,820	0,698	5,6	0,15	0,82
<i>e3-B02</i>	161–183	9	15	0,17	0,653	0,558	2,9	0,15	0,64
<i>g1-A01</i>	209–213	11	17	0,2	0,733	0,593	3,7	0,19	0,73
<i>g1-E03</i>	233–270	15	30	0,35	0,840	0,651	6,3	0,23	0,84
<i>g1-K04</i>	284–300	10	24	0,28	0,745	0,558	3,9	0,25	0,74
<i>E4D03</i>	200–226	18	37	0,43	0,898	0,756	9,8	0,16	0,89
Среднее значение		12,1	26,4	0,3	0,801	0,672	6,1	0,12	0,80

Уровень ожидаемой гетерозиготности варьировался от 0,653 до 0,898, среднее значение  $H_e$  – 0,801. Значение уровня наблюдаемой гетерозиготности ( $H_o$ ) для исследованной выборки варьировалось от 0,558 для маркеров *e3-B02* и *g1-K04* до 0,849 для маркера *e1-001* и в среднем составило 0,672. Значение числа эффективных аллелей ( $N_e$ ) составило от 2,9 для маркера *e3-B02* до 9,8 для маркеров *g2-G12* и *E4D03*. Среднее значение для всех маркеров составило 4,3. При этом выборка включала как генетически отдаленные сорта, так и имеющие общее происхождение. Для сравнения: при исследовании сортов смородины черной селекции ВНИИСПК с использованием 14 SSR-маркеров среднее значение  $H_e$  для выборки из 27 сортов составило 0,608 [20]. В исследованиях Savanna с соавт. [21] с использованием 11 SSR-маркеров среднее значение  $H_o$

для 41 представителя рода *Ribes* составило 0,596. Полученные в настоящем исследовании данные свидетельствуют о достаточно высокой степени гетерозиготности представителей рода *Ribes*, произрастающих в Беларуси.

Маркер *E4D03* позволил выявить максимальное количество уникальных генотипов среди сортов смородины черной – 37. Минимальное количество генотипов выявлено при использовании маркеров *e3-B02* и *gl-A01* – 15 и 17 соответственно. Среднее значение количества уникальных генотипов для 8 маркеров составило 26,4. Дискриминационная сила маркеров достаточно высокая – от 0,64 для маркера *e3-B02* до 0,9 для маркера *g2-G12*, среднее значение *PD* для 8 маркеров составило 0,8, что говорит о высокой диагностической ценности отобранных SSR-маркеров.

На основе рассчитанных генетических дистанций между сортами проведен кластерный анализ и сформировано единое консенсусное дерево, в каждом узле которого указан процент поддержки данного кластера (рис. 2). Как видно из представленной дендрограммы, все сорта отличаются друг от друга на генетическом уровне и имеют уникальный состав аллелей в локусах микросателлитных последовательностей. Генетические расстояния между образцами колеблются в пределах от 0,08 до 0,84.

В консенсусном дереве можно выделить несколько кластеров. На большом генетическом расстоянии находятся и образуют два отдельных кластера с высокими значениями бутстреп-поддержки сорта крыжовника обыкновенного (Неслуховский, Машека, Хиннонмаен пунайнен, Садко, Зеленый дождь. Малахит, Карпаты, Северный капитан, Кубанец, Краснославянский и Куршу Дзинтарс) и смородины красной (Ютерборгская, Голландская красная, Рондом, Смольяниновская, Белая Потапенко, Натали, Виксна, Йонкер ван Тетс, Красная Андрейченко). Анализ распределения аллелей среди исследованных образцов показал, что по исследованным локусам микросателлитных последовательностей сорта смородины красной и крыжовника обыкновенного имеют отличные от сортов смородины черной SSR-аллели (табл. 3).

Т а б л и ц а 3. Аллели, идентифицированные с помощью SSR-анализа в сортах смородины черной, смородины красной и крыжовника обыкновенного

Table 3. Alleles identified with using SSR-analysis for *Ribes nigrum*, *Ribes rubrum* and *Ribes uva-crispa* varieties

SSR-маркер	Детектируемые аллели (п. н.) в геноме представителей рода <i>Ribes</i> L.		
	Сорта смородины черной	Сорта смородины красной	Сорта крыжовника
<i>g2-G12</i>	167, 171, 173, 179, 181, 183, 185, 187, 189, 191	171, <b>177</b> , 181, 183	<b>165</b> , 167, 171
<i>e1-001</i>	144, 146, 148, 150, 152, 154, 160, 166	<b>138, 140, 142</b> , 144, 154	<b>142</b> , 144, 146, 148
<i>gl-M07</i>	200, 202, 204, 206, 208, 210, 212, 214, 220, 226, 230	208, 210, 212	210, 212, 214, 220
<i>e3-B02</i>	161, 163, 166, 183	<b>151, 159</b> , 161	<b>151, 153</b> , 161, 163, 166, <b>168, 170</b>
<i>gl-A01</i>	209, 211, 213	209, <b>217, 219, 223, 230</b>	209, <b>234, 241, 245, 256</b>
<i>gl-E03</i>	233, 239, 241, 243, 247, 254, 262	<b>223, 230</b> , 233, 243	<b>228, 230</b> , 233, <b>236, 280</b>
<i>gl-K04</i>	270, 284, 286, 292, 294, 298, 300	<b>288</b> , 300	284, 286, 292, 294, <b>296</b> , 300, <b>302</b>
<i>E4D03</i>	200, 202, 204, 206, 208, 212, 214, 218, 220, 226	<b>179, 198</b> , 202, 208, <b>210</b>	<b>170, 176, 179, 184</b>

Примечание. Полужирным шрифтом выделены аллели, характерные только для сортов смородины красной (*Ribes rubrum*) и крыжовника обыкновенного (*Ribes uva-crispa*).

Число аллелей, встречавшихся только у сортов смородины красной и крыжовника обыкновенного, варьировалось от 1 (локусы *g2-G12*, *gl-M0*) до 5 (локус *E4D03*). Среднее количество аллелей на локус для сортов смородины красной составило 3,9, для сортов крыжовника обыкновенного – 5,5. При этом сгруппированы вместе характеризующиеся наименьшим генетическим расстоянием сорта смородины красной Ютерборгская и Голландская красная, Смольяниновская и Белая Потапенко (см. рис. 1). Первая группа сортов имеет голландское происхождение, исходные родительские формы не известны. Из структуры дендрограммы можно предположить, что в их создании принимали участие близкие генотипы. Сорт Белая Потапенко произошел от скрещивания сортов Красный крест и Красная сибирячка, сорт Смольяниновская получен в результате межсортовых скрещиваний (исходные формы не известны). Отличительной особенностью является то, что оба сорта имеют белый цвет ягод. На большом генетическом расстоянии от

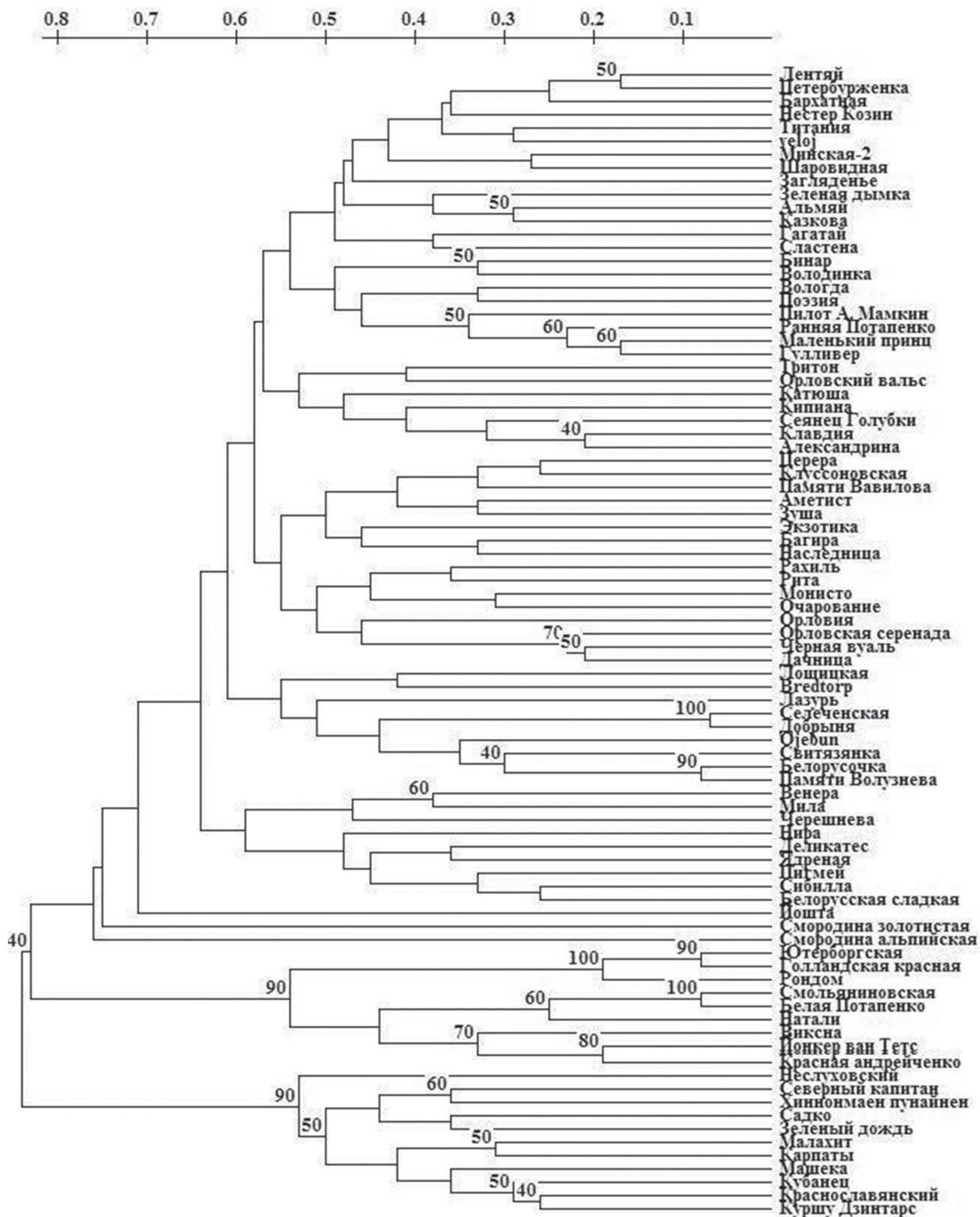


Рис. 2. Дендрограмма генетического сходства представителей рода *Ribes*, построенная на основе результатов SSR-анализа

Fig. 2. Dendrogram of genetic similarity of *Ribes* representatives, built on the basis of the results of SSR-analysis

культурных сортов смородины черной находятся смородина альпийская (*Ribes alpinum*), смородина золотистая (*Ribes aureum*) и йощта (*Ribes × nidigrolaria*), которые имеют уникальный состав аллелей по исследованным локусам. Разделение образцов рода *Ribes* на различные кластеры отмечалось и в работах исследователей, изучавших европейские сорта. В работе Savanna с соавт. [17]

показано расположение сортов смородины черной и смородины красной в разных кластерах на дендрограмме генетического сходства. Однако сорта крыжовника *Rokula*, *Invicta*, *Jonova* в данном исследовании объединены вместе с сортами смородины черной и могут быть выделены только на уровне подкластера. Исследование европейских сортов смородины черной, смородины красной и йошты выявило генетическую близость смородины черной и йошты, что говорит о преобладании у последней генома смородины черной. Сорта же смородины красной расположены на большом генетическом расстоянии и выделяются в отдельный кластер [22]. В исследовании не изучалось участие сортов крыжовника. В представленном исследовании проведен сравнительный анализ представителей 6 видов *Ribes*. Показано, что образцы, относящиеся к разным видам, формируют отдельные кластеры. При этом генетические расстояния между видами больше, чем внутривидовые. Генетически наиболее близки смородине черной йошта, смородина золотистая, смородина альпийская. На большем генетическом расстоянии находится смородина красная. Сорта крыжовника формируют кластер, наиболее отдаленный от видов смородины.

В целом культурные сорта смородины красной и крыжовника, выращиваемые в Республике Беларусь, характеризуются таким же высоким генетическим разнообразием, как и сорта смородины черной [29]. Коэффициенты попарного генетического сходства между ними варьировались от 0,08 до 0,64. Высокое генетическое разнообразие отмечено и для сортов европейской и российской селекции [15, 17, 18]. Вместе с тем для представителей видов *Ribes* характерна высокая гомология отдельных областей генома, что позволяет использовать для их анализа и идентификации единый набор SSR-маркеров.

**Заклучение.** С помощью 8 SSR-маркеров изучено генетическое разнообразие 86 представителей рода *Ribes*, выращиваемых в Республике Беларусь. Полученные результаты демонстрируют, что исследованные сорта смородины черной, смородины красной и крыжовника обыкновенного характеризуются достаточно высоким разнообразием аллелей локусов микросателлитных последовательностей. Определено, что среднее количество аллелей на локус среди 86 образцов составило 12,1, а среднее количество уникальных генотипов в расчете на маркер – 26,4. Значение дискриминационной силы для всех маркеров высокое (в среднем – 0,8). На основании анализа полиморфизма SSR-локусов сформирован набор из 8 маркеров, позволяющий проводить генетическую идентификацию генотипов представителей рода *Ribes*. Маркеры охватывают различные участки генома *Ribes* и расположены на разных хромосомах. При выборе набора учтен уровень информативности каждого маркера, частота встречаемости аллелей, выявляемых данным набором маркеров у сортов, а также удобство визуализации и анализа продуктов амплификации. Метод SSR-анализа с использованием указанного набора маркеров может успешно применяться для идентификации смородины черной, смородины красной и крыжовника обыкновенного на молекулярном уровне.

#### Список использованных источников

1. Brennan, R. M. Currants and gooseberries / R. M. Brennan // Temperate fruit Crop Breeding: Germplasm to Genomics ; ed. by J. F. Hancock. – Springer Netherlands, 2008. – Ch. 6. – P. 177–196.
2. Weigend, M. Phylogeny and classification of the genus *Ribes* (*Grossulariaceae*) based on 5S-NTS sequences and morphological and anatomical data / M. Weigend, O. Mohr, T. J. Motley // Bot. Jahrb. Syst. – 2002. – Vol. 124. – P. 163–182.
3. Cronquist, A. The evolution and classification of flowering plants / A. Cronquist // The New York Botanical Garden. – New York, 1988. – 555 p.
4. Sinnot, Q. P. A reversion of *Ribes* L. Subg. *Grossularia* (Mill.) pers. sect. *Grossularia* (Mill.) Nutt. (*Grossulariaceae*) in North America / Q. P. Sinnot // Rhodora. – 1985. – Vol. 87. – P. 198–286.
5. Genome size, heterocromatin organisation, and ribosomal gene mapping in four species of *Ribes* / J. Chiche [et al.] // Can. J. Bot. – 2003. – Vol. 81, N 11. – P. 1049–1057.
6. Lanham, P. G. Genetic diversity within a secondary pool for *Ribes nigrum* L. revealed by RAPD and ISSR markers / P. G. Lanham, A. Korycinska, R. M. Brennan // J. Hort. Sci. Biotech. – 2000. – Vol. 75, N 4. – P. 371–375.
7. Lanham, P. Fingerprinting of blackcurrant (*Ribes nigrum* L.) cultivars using RAPD analyses / P. Lanham, R. M. Brennan, R. J. McNicol // Theor. Appl. Genet. – 1995. – Vol. 90. – P. 166–172.
8. Identification of red raspberry cultivars and an assessment to their relatedness using fingerprints produced by random primers / J. Graham [et al.] // J. Hort. Sci. – 1994. – Vol. 69. – P. 123–130.
9. Isolation of molecular markers for tomato (*L. esculentum*) using random amplified polymorphic DNA (RAPD) / R. M. Klein-Lankhorst [et al.] // Theor. Appl. Genet. – 1991. – Vol. 83. – P. 108–114.
10. Moreno, S. The use of RAPD markers for identification of cultivated grapevine (*Vitis vinifera* L.) / S. Moreno, Y. Gogorcena, J. M. Ortiz // Sci. Hort. – 1995. – Vol. 62, N 4. – P. 237–243.

11. Paran, I. Identification of restriction fragment length polymorphism and random amplified polymorphic DNA markers linked to downy mildew resistance in lettuce using near-isogenic lines / I. Paran, R. Kesseli, R. Michelmore // *Genome*. – 1991. – Vol. 34. – P. 1021–1027.
12. Meunier, J. R. Factors affecting reproducibility of random amplified polymorphic DNA fingerprinting / J. R. Meunier, P. A. Grimont // *Res. Microbiol.* – 1993. – Vol. 144. – P. 373–379.
13. Korbin, M. Fruit plant germplasm characterisation using molecular markers generated in RAPD and ISSR-PCR / M. Korbin, A. Kuras, E. Zurawicz // *Cell. Mol. Biol. Lett.* – 2002. – Vol. 7. – P. 785–794.
14. Lanham, P. G. Genetic characterization of gooseberry (*Ribes* subgenus *Grossularia*) germplasm using RAPD, ISSR and AFLP markers / P. G. Lanham, R. M. Brennan // *J. Hort. Sci. Biotech.* – 1999. – Vol. 74, N 3. – P. 361–366.
15. Урбанович, О. Ю. Молекулярные маркеры идентификации и генотипирования яблони и груши / О. Ю. Урбанович. – Минск : Право и экономика, 2013. – 210 с.
16. Brennan, R. M. Future perspectives in black currant breeding / R. M. Brennan, S. L. Gordon // *Acta Hort.* – 2002. – Vol. 585. – P. 39–45.
17. Microsatellite-based evaluation of *Ribes* spp. germplasm / M. Cavanna [et al.] // *Genome*. – 2009. – Vol. 52, N 10. – P. 839–848.
18. Cavanna, M. Genetic diversity in ancient apple germplasm from northwest Italy / M. Cavanna, G. Bounous, R. Botta // *J. Hort. Sci. Biotech.* – 2008. – Vol. 83, N 5. – P. 549–554.
19. Boccacci, P. DNA typing and genetic relations among European hazelnut (*Corylus avellana* L.) cultivars using microsatellite markers / P. Boccacci, A. Akkak, R. Botta // *Genome*. – 2006. – Vol. 49, N 6. – P. 598–611.
20. Marulanda, M. L. Genetic diversity of wild and cultivated *Rubus* species in Colombia using AFLP and SSR markers / M. L. Marulanda, A. M. Lopez, S. B. Aguilar // *Crop Breeding and Appl. Biotech.* – 2007. – Vol. 7. – P. 242–252.
21. New insight into wild red raspberry populations using simple sequence repeat markers / J. Graham [et al.] // *J. Am. Soc. Hort. Sci.* – 2009. – Vol. 134. – P. 109–119.
22. Establishment of molecular markers for germplasm management in a worldwide provenance *Ribes* spp. collection / L. Palmieri [et al.] // *POJ*. – 2013. – Vol. 6, N 3. – P. 165–174.
23. Nei, M. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases / M. Nei, W. H. Li // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1979. – Vol. 76. – P. 5269–5273.
24. Van de Peer, Y. TREECON: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees / Y. Van de Peer, R. De Wachter // *Comput. Applic. Biosci.* – 1993. – Vol. 9. – P. 177–182.
25. Nei, M. Sampling variances of heterozygosity and genetic distance / M. Nei, A. K. Roychoudhury // *Genetics*. – 1974. – Vol. 76. – P. 379–390.
26. Wright, S. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating / S. Wright // *Evolution*. – 1965. – Vol. 19. – P. 395–420.
27. Kloosterman, A. D. PCR-amplification and detection of the human DIS 80 VNTR locus. Amplification condition, population genetics and application in forensic analysis / A. D. Kloosterman, B. Budowle, P. Daselaar // *Int. J. Leg. Med.* – 1993. – Vol. 105. – P. 257–264.
28. Microsatellite loci polymorphism in Russian black currant (*Ribes nigrum* L.) varieties from collection of All-Russian Research Institute of Breeding Fruit Crops / A. V. Pikunova [et al.] // *Agricult. Biol.* – 2015. – Vol. 50, N 1. – P. 46–54.
29. Межнина, О. А. Генетическое разнообразие сортов смородины черной (*Ribes nigrum*) в Беларуси / О. А. Межнина, О. Ю. Урбанович // *Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук.* – 2017. – № 1. – С. 62–69.

## References

1. Brennan R. M. Currants and gooseberries. Temperate fruit crop breeding: germplasm to genomics, in J. F. Hancock (ed.), Springer Netherlands, 2008, chapter 6, pp. 177–196. doi:10.1007/978-1-4020-6907-9.
2. Weigend M., Mohr O., Motley T. J. Phylogeny and classification of the genus *Ribes* (*Grossulariaceae*) based on 5S-NTS sequences and morphological and anatomical data. *Botanische Jahrbücher für Systematik, Pflanzengeschichte und Pflanzengeographie*, 2002, vol. 124, pp. 163–182.
3. Cronquist A. *The evolution and classification of flowering plants*. New York: The New York Botanical Garden, 1988, p. 555.
4. Sinnot Q. P. A reversion of *Ribes* L. Subg. *Grossularia* (Mill.) pers. sect. *Grossularia* (Mill.) Nutt. (*Grossulariaceae*) in North America. *Rhodora*, 1985, vol. 87, pp. 198–286.
5. Chiche J., Brown S. C., Leclerc J.-C., Siljak-Yakovlev S. Genome size, heterocromatin organisation, and ribosomal gene mapping in four species of *Ribes*. *Canadian Journal of Botany*, 2003, vol. 81, no. 11, pp. 1049–1057. doi: 10.1139/b03-088.
6. Lanham P. G., Korycinska A., Brennan R. M. Genetic diversity within a secondary pool for *Ribes nigrum* L. revealed by RAPD and ISSR markers. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 2000, vol. 75, pp. 371–375.
7. Lanham P., Brennan R. M., McNicol R. J. Fingerprinting of blackcurrant (*Ribes nigrum* L.) cultivars using RAPD analyses. *Theoretical and Applied Genetics*, 1995, vol. 90, pp. 166–172.
8. Graham J., McNicol R. J., Greig K., Van de Ven W. T. G. Identification of red raspberry cultivars and an assessment to their relatedness using fingerprintings produced by random primers. *The Journal of Horticultural Science*, 1994, vol. 69, pp. 123–130.
9. Klein-Lankhorst R. M., Vermunt A., Weide R., Liharska T., Zabel P. Isolation of molecular markers for tomato (*L. esculentum*) using random amplified polymorphic DNA (RAPD). *Theoretical and Applied Genetics*, 1991, vol. 83, pp. 108–114. doi:10.1007/BF00229232.
10. Moreno S., Gogorcena Y., Ortiz J. M. The use of RAPD markers for identification of cultivated grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Scientia Horticulturae*, 1995, vol. 62, no. 4, pp. 237–243.

11. Paran I., Kesseli R., Michelmore R. Identification of restriction fragment length polymorphism and random amplified polymorphic DNA markers linked to downy mildew resistance in lettuce using near-isogenic lines. *Genome*, 1991, vol. 34, pp. 1021–1027.
12. Meunier J. R., Grimont P. A. Factors affecting reproducibility of random amplified polymorphic DNA fingerprinting. *Research in Microbiology*, 1993, vol. 144, pp. 373–379.
13. 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, vol. 7, pp. 785–794.
14. Lanham P. G., Brennan R. M. Genetic characterization of gooseberry (*Ribes* subgenus *Grossularia*) germplasm using RAPD, ISSR and AFLP markers. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 1999, vol. 74, no. 3, pp. 361–366.
15. Urbanovich O. Yu. Molecular markers for identification and genotyping of apple and pear. Minsk, Pravo i ekonomika [Law and Economics], 2013. 210 p. (in Russian).
16. Brennan R. M., Gordon S. L. Future perspectives in black currant breeding. *Acta Horticulturae*, 2002, vol. 585, pp. 39–45.
17. Cavanna M., Marioni D. T., Beccaro G. L., Bounous G. Microsatellite-based evaluation of *Ribes* spp. Germplasm. *Genome*, 2009, vol. 52, no. 10, pp. 839–848. doi:10.1139/g09-057.
18. Cavanna M., Bounous G., Botta R. Genetic diversity in ancient apple germplasm from northwest Italy. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 2008, vol. 83, no. 5, pp. 549–554.
19. Boccacci P., Akkac A., Botta R. DNA typing and genetic relations among European hazelnut (*Corylus avellana* L.) cultivars using microsatellite markers. *Genome*, 2006, vol. 49, no. 6, pp. 598–611.
20. Marulanda M. L., Lopez A. M., Aguilar S. B. Genetic diversity of wild and cultivated *Rubus* species in Colombia using AFLP and SSR markers. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 2007, vol. 7, pp. 242–252.
21. Graham J., Woodhead M., Smith K., Russell J., Marshall B., Ramsay G., Squire G. New insight into wild red raspberry populations using simple sequence repeat markers. *The Journal of the American Society for Horticultural Science*, 2009, vol. 134, pp. 109–119.
22. 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, vol. 6, no. 3, pp. 165–174.
23. Nei M., Li W. H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1979, vol. 76, pp. 5269–5273.
24. Van de Peer Y., Wachter de R. TREECON: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees. *Computer Applications in the Biosciences*, 1993, vol. 9, pp. 177–182.
25. Nei M., Roychoudhury A. K. Sampling variances of heterozygosity and genetic distance. *Genetics*, 1974, vol. 76, pp. 379–390.
26. Kloosterman A. D., Budowle B., Daselaar P. PCR-amplification and detection of the human DIS 80 VNTR locus. Amplification condition, population genetics and application in forensic analysis. *The International Journal of Legal Medicine*, 1993, vol. 105, pp. 257–264.
27. 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, vol. 50, no. 1, pp. 46–54. doi: 10.15389/agrobiology.2015.1.46eng.
29. Mezhnina O. A., Urbanovich O. Yu. Study of genetic variability of blackcurrant varieties (*Ribes nigrum*) grown in Belarus. *Vestsi Natsyianal'nai akademii navuk Belarusi. Seriya biyalagichnykh navuk* [Proceedings of the National Academy of Science of Belarus. Biological series], 2017, no. 1, pp. 62–69. (in Russian).

### Информация об авторах

Межнина Ольга Анатольевна – мл. науч. сотрудник. Институт генетики и цитологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: olgamezhnina@gmail.com.

Урбанович Оксана Юрьевна – д-р биол. наук, заведующий лабораторией. Институт генетики и цитологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: O.Urbanovich@igc.by.

### Для цитирования

Межнина, О. А. Анализ вариабельности микросателлитных локусов у представителей рода смородины (*Ribes* L.), выращиваемых в Беларуси / О. А. Межнина, О. Ю. Урбанович // Вест. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2017. – № 3. – С. 45–54.

### Information about the authors

Mezhnina Volha Ananol'evna – Junior researcher. Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: olgamezhnina@gmail.com.

Urbanovich Oksana Yuryeuna – D. Sc. (Biol.), Head of the Laboratory. Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: O.Urbanovich@igc.by.

### For citation

Mezhnina O. A., Urbanovich O. Yu. Analysis of microsatellite loci variability *Ribes* L. representatives grown in Belarus. *Vestsi Natsyianal'nai akademii navuk Belarusi. Seriya biyalagichnykh navuk* [Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, biological series], 2017, no. 3, pp. 45–54.