

© А. В. Пикунова¹,
Е. В. Мартиросян², С. Д. Князев¹,
Н. Н. Рыжова²

¹ Орловский государственный
аграрный университет, Орёл

² Центр «Биоинженерия» Россий-
ской академии наук, Москва

✿ **RAPD-анализ был использован для изучения вариабельности генома и филогенетических отношений у представителей рода *Ribes* L. Оценен межвидовой, внутривидовой и межсортовой полиморфизм 47 образцов. Выявленный полиморфизм позволил различить близкородственные сорта. Идентифицированы фрагменты, специфичные как для отдельных образцов, так и для таксономических групп. Рассчитанные коэффициенты генетических различий и топология дендрограммы поддерживают выделение красных смородин, черных смородин и крыжовника и как таксонов одного уровня. Смородинно-крыжовниковые гибриды показали большее сходство с представителями черной смородины, чем с крыжовниками.**

✿ **Ключевые слова:** RAPD; филогения; полиморфизм; смородина; крыжовник; *Ribes* L.; молекулярные маркеры.

ПРИМЕНЕНИЕ RAPD-АНАЛИЗА ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКОГО ПОЛИМОРФИЗМА И ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИХ СВЯЗЕЙ У ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА *RIBES* L.

Род смородина *Ribes* L. включает в себя более 150 кустарниковых видов, произрастающих главным образом в умеренной зоне северного полушария. Хозяйственное значение имеют смородина черная (*Ribes nigrum* L.), смородина красная (*Ribes rubrum* L.) и крыжовник (*Ribes uva-crispa* L.). При этом смородина черная — ведущая ягодная культура в России (Князев и Огольцова, 2004).

Наиболее разработанными на сегодня являются таксономические классификации рода *Ribes*, основанные на его морфологических особенностях (Rehder, 1954) и скрещиваемости видов (Keep, 1962). Ряд систематиков выделяли два рода: *Ribes* (виды смородины) и *Grossularia* Hill. (виды крыжовника) (Berger, 1924; Coville and Britton, 1908; Komarov, 1971). Однако, по мнению Р. Бреннана (Brennan et al, 2008), К. Наммера и Д. Барнея (Hummer and Barney, 2002), в настоящее время наиболее общепринятой является концепция одного рода *Ribes* сформулированная еще Э. Янчевским (Janczewski, 1907), и далее развиваемая Синнот (Sinnott, 1985) и др. (Rehder, 1954; Keep, 1962). Единство рода косвенно подтверждалось получением смородинно-крыжовниковых гибридов. Тем не менее, некоторые современные авторы придерживаются классификаций, выделяющих два рода (Еремин и др., 2004, Самигуллина, 2006). Также окончательно не определено таксономическое положение отдельных видов и групп видов, например, красных смородин. Так, Эдуард Янчевский (Janczewski, 1907), разделяя род *Ribes* на 6 подродов, наряду с подродом *Coreosma* (Spach) Jancz. — черная смородина, *Grossularia* Rich. — крыжовники предложил выделить виды красной смородины в отдельный подрод *Ribesia* Berl, в то время как Альфред Редер (Rehder, 1954), выделяя 4 подрода, объединяет красную и черную смородины в один подрод *Ribesia*. Элизабет Кип (Keep, 1962) на основании данных о скрещиваемости и возможности получения межвидовых гибридов предлагает увеличить число подродов до 9, также выделяя красную смородину в отдельный подрод. М. Веигенд (Weigend, 2007) выделяет семь подродов и допускает возможность рассматривать данные подроды на уровне родов, но считает это излишним в силу общего морфологического единства рода.

Кроме того до настоящего времени в систематике *Ribes* помимо проблем связанных с делением на подроды, существует ряд неоднозначных взглядов на видовой состав рода. Данные факты свидетельствуют о том, что таксономия и филогения рода *Ribes* окончательно не определены.

В настоящее время представители рода *Ribes* исследуются довольно интенсивно, в том числе и с использованием молекулярных маркеров. 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 and Donoghue, 2004), анализа нуклеотидного полиморфизма внутренних транскрибируемых спейсеров ядерной ДНК (Sinters and 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. Отдельный интерес представляет определение уровня внутривидового полиморфизма у *R. nigrum*, являющейся ведущей ягодной культурой рода, а также межвидового полиморфизма видов, потенциально важных для селекции новых сортов смородины. Согласно RAPD-анализу, геномная вариабель-

Поступила в редакцию 04.08.2010
Принята к публикации 30.12.2010

ность 21 образца черной смородины европейской селекции оказалась гораздо ниже, чем предполагалось по результатам анализа родословных (Lanham et al., 1995). В то время как полиморфизм видов, используемых в селекционных программах, по данным RAPD- и ISSR-анализов был достаточно высок (Lanham et al., 2000).

В настоящей работе 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) и видов, составляющих вторичный генетический пул культурных видов, а также уточнения существующих таксономических категорий представителей рода.

Для этого были выделены следующие задачи: 1) оценка геномного разнообразия представителей рода *Ribes*, наиболее часто используемых в селекции современных сортов; 2) получение молекулярных данных о сходстве геномов гибридных и родительских форм смородины и крыжовника; определение их филогенетического родства; 3) оценка геномного разнообразия сортов отечественной селекции.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Растительный материал

Для молекулярного анализа были подобраны 47 образцов из коллекции ВНИИСПК подродов *Grossularia* (крыжовники) и *Ribesia* (смородина) рода *Ribes*, последний из которых был представлен четырьмя секциями (*Eucoreosma Jancz.*, *Colobotrya Spach*, *Symphocalyx Berl.*, *Ribesia Berl.*, *emend Jancz.*), включая дикорастущие формы и сорта, имеющие разное происхождение (Дальний Восток, Америка, Европа) (табл. 1).

Вид *R. nigrum*, являющийся основой современных сортов черной смородины, был представлен в анализе 9 образцами 3 подвидов. Также в анализ были включены такие родственные *R. nigrum* виды из секции *Eucoreosma* (черной смородины), как *R. ussuriense Jancz.* (С. уссурийская), *R. dikusha Fisch. ex Turcz.* (С. дикуша), *R. hudsonianum Rich.* (С. гудзонская), *R. bracteosum Dougl.* (С. прицветниковая), *R. pauciflorum Turcz. ex Pojark.* (С. малоцветковая) и *R. procumbens Pall.* (С. моховая), которые также присутствовали в составе гибридных форм и сортов смородины. Данные виды являются донорами устойчивости к различным фитопатогенам и используются для улучшения современных сортов смородины черной. Кроме того, в работу были включены 4 комплексных гибрида (B1613/17, Кипиана, Гамма и Грация), в родословной которых присутствовали виды *Ribes*, относимые Редером к трем различным секциям: *Eugrossularia Engl.*, *Eucoreosma* и *Colobotrya*.

Секция *Ribesia* (смородина красная) была представлена в анализе шестью видами: *R. rubrum* (С. красная), *R. sativum Syme* (С. обыкновенная), *R. warszewiczii Jancz.* (С. Варшевича), *R. palczewskii (Jancz.) Pojark.*

(С. Пальчевского), *R. petraeum Wulf. var. atropurpureum* (С. Темно-пурпуровая), *R. multiflorum Kit.* (С. Многоцветковая), а также двумя гибридными формами (970-18-41 и 1002-17-110). Кроме того, в работу были взяты представители секции *Colobotrya* — *R. sanguineum Purch.* (С. кроваво-красная), секции *Symphocalyx* — *R. aureum Purch.* (С. золотистая) и секции *Eugrossularia* — *Ribes uva-crispa* (= *R. grossularia* L., крыжовник), а также смородинно-крыжовниковые гибриды (Йошта и 203029-61).

Некоторые сорта (Оджебин, Виктория и др.) были созданы путем отбора из диких популяций определенных видов и поэтому в данной работе рассматриваются как представители этих видов.

В качестве существенно отличающегося генотипа — внешней группы нами выбран *Philadelphus pallidus Hayek.*, семейство гортезиевые (*Hydrangeaceae*). Как отмечает А. Г. Еленевский (2001), ранее семейства крыжовниковые (*Grossulariaceae*) и гортезиевые рассматривались в составе семейства камнеломковые (*Saxifragaceae*). В таксономической системе классификации цветковых растений Кронквиста (Cronquist, 1988) семейство гортезиевые, так же как и крыжовниковые, отнесено к порядку розоцветные (*Rosales*).

Экстракция ДНК

Выделение растительной ДНК производили из молодых листьев по методике для растительного материала с высоким содержанием полифенольных соединений, предложенной Д. Пучооа (Puchooa, 2004).

PCR-анализ

Для PCR-анализа были использованы праймеры серий ОРА, ОРД, ОРЕ, ОРН, ОРК, ОРП («Operon Technologies», США). Реакцию амплификации проводили в реакционной смеси объемом 15 мкл, содержащей 2,5 мМ MgCl₂, 0,2 мМ каждого dNTP; 0,5 мкМ праймера; 0,3 единицы Taq полимеразы, 1х буфер из соответствующего набора («Диалат ЛТД», Москва), и 100 нг геномной ДНК, в термоцикле GeneAmp PCR System 2700 («Applied Biosystems», США) в режиме: денатурация — 30 с при 94°C; отжиг праймера — 45 с при 37°C; синтез ДНК — 1 мин при 72°C с числом циклов — 36 и предварительной денатурацией — 5 мин (94°C). Продукты реакции амплификации разделяли электрофорезом в 1,7% агарозном геле (High resolution, «Sigma») в 1хTBE буфере, с последующим окрашиванием бромистым этидием. При разделении фрагментов на геле использовали GeneRuler™ 100bp DNK Ladder Plus (Fermentas, Литва) маркер молекулярных масс.

Статистический анализ

В статистический анализ были включены только четкие фрагменты размером от 300 до 2000 п. н. Величины геномного полиморфизма рассчитывались как процент полиморфных фрагментов от общего числа фрагментов в отдельной таксономической группе.

Таблица 1

Взяты в анализ образцы рода *Ribes*, их таксономическая принадлежность (основана на классификации Редера (Rehder, 1954))

№ в анализе	Название образца	Вид/разновидность	Подрод	Секция	Виды и формы, присутствующие в родословной	Оригинатор
1	2	3	4	5	6	7
2	258	<i>R. grossularia</i> L.	<i>Grossularia</i> Rich.	<i>Eugrossularia</i> Engl.		ВНИИСПК, Орел
3	250					
4	Гроссуляр	<i>R. grossularia</i> L.				
5	13-15-3					
6	Йошта	Гибрид <i>Ribes</i> × <i>nidigrolaria</i> Rud. Bauer & A. Bauer	<i>Grossularia</i> Rich. × <i>Ribesia</i> Berl.	<i>Eugrossularia</i> Engl. × <i>Eucoreosma</i> Jancz.	<i>R. grossularia</i> L. <i>R. divaricatum</i> Dougl.	ФРГ
7	203029-61				<i>R. nigrum</i> L.	Россия
8	B1613/17	Комплексный гибрид, включает:				Великобритания (Ист-Молингский институт)
		<i>Grossularia</i> Rich.	<i>Eugrossularia</i> Engl.	<i>R. oxycanthoides</i> L.		
					<i>Ribesia</i> Berl.	
		<i>Colobotrya</i> Spach	<i>R. glutinosum</i> Benth.			
<i>Ribesia</i> Berl.	<i>Eucoreosma</i> Jancz.			<i>R. nigrum</i> L. var. <i>sibiricum</i> W. Wolf <i>R. nigrum</i> L. var. <i>scandinavicum</i> <i>R. nigrum</i> L. var. <i>europaeum</i> Jancz.		
		<i>Colobotrya</i> Spach	<i>R. glutinosum</i> Benth.			
9 29 35	Кипиана Гамма Грация			Комплексный гибрид, включает:		
		<i>Grossularia</i> Rich.	<i>Eugrossularia</i> Engl.	<i>R. oxycanthoides</i> L.		
<i>Ribesia</i> Berl.	<i>Eucoreosma</i> Jancz.				<i>R. dikusha</i> Fisch.	
		<i>Colobotrya</i> Spach	<i>R. glutinosum</i> Benth.			
10	Буряя сладкая			<i>R. nigrum</i> L. var. <i>sibiricum</i> W. Wolf	<i>Ribesia</i> Berl.	<i>Eucoreosma</i> Jancz.
11	Памяти Правику	<i>R. nigrum</i> L. var. <i>sibiricum</i> W. Wolf <i>R. nigrum</i> L. var. <i>europaeum</i> Jancz.	<i>Ribesia</i> Berl.	<i>Eucoreosma</i> Jancz.		СССР, Украина
12	Ртищевская	<i>R. nigrum</i> L. var. <i>europaeum</i> Jancz.	<i>Ribesia</i> Berl.	<i>Eucoreosma</i> Jancz.		СССР, Саратов
16	Веллингтон-30					Великобритания
13	Отелло	<i>R. nigrum</i> L. var. <i>europaeum</i> Jancz. X ?*	<i>Ribesia</i> Berl.	<i>Eucoreosma</i> Jancz.		Чехословакия, Бойнице
14	Северянка					СССР, Киров
15	Силго					ФРГ, Кельн
17	Бен Сарек	<i>R. nigrum</i> L. var. <i>europaeum</i> Jancz. <i>R. nigrum</i> L. var. <i>scandinavicum</i>	<i>Ribesia</i> Berl.	<i>Eucoreosma</i> Jancz.		Великобритания, Шотландия

Таблица 1 (продолжение)

Взятые в анализ образцы рода *Ribes*, их таксономическая принадлежность (основана на классификации Редера (Rehder, 1954))

№ в анализе	Название образца	Вид/разновидность	Подрод	Секция	Виды и формы, присутствующие в родословной	Оригинатор
18	Бен Ломонд	гибрид	<i>Ribesia</i> Berl.	<i>Eucoreosma</i> Jancz.	<i>R. nigrum</i> L. var. <i>europaeum</i> Jancz.	Великобритания, Шотландия
					<i>R. nigrum</i> L. var. <i>scandinavicum</i>	
					<i>R. ussuriense</i> Jancz.	
19	Оджебин	<i>R. nigrum</i> L. var. <i>scandinavicum</i>	<i>Ribesia</i> Berl.	<i>Eucoreosma</i> Jancz.		Северная Швеция
20	Титания	гибрид	<i>Ribesia</i> Berl.	<i>Eucoreosma</i> Jancz.	<i>R. nigrum</i> L. var. <i>sibiricum</i> W. Wolf	Швеция
					<i>R. nigrum</i> L. var. <i>scandinavicum</i> <i>R. nigrum</i> L. var. <i>europaeum</i> Jancz.	
					<i>R. ussuriense</i> Jancz.	
21	Сластена	гибрид	<i>Ribesia</i> Berl.	<i>Eucoreosma</i> Jancz.	<i>R. nigrum</i> L. var. <i>sibiricum</i> W. Wolf <i>R. nigrum</i> L. var. <i>scandinavicum</i> <i>R. nigrum</i> L. var. <i>europaeum</i> Jancz. <i>R. dikusha</i> Fisch.	ВНИИСПК, Орел
22	Памятная					Украина
25	Ажурная					ВНИИСПК, Орел
24	Орловская серенада					ВНИИСПК, Орел
27	Ладушка					ВНИИСПК, Орел
28	Очарование					ВНИИСПК, Орел
30	Черная вуаль					ВНИИСПК, Орел
31	Блакестон					ВНИИСПК, Орел
32	Монисто					ВНИИСПК, Орел
33	Искушение					ВНИИСПК, Орел
26	Дачница					ВНИИСПК, Орел
23	DikXNud 38	гибрид	<i>Ribesia</i> Berl.	<i>Eucoreosma</i> Jancz.	<i>R. hudsonianum</i> Rich.	
					<i>R. dikusha</i> Fisch.	
34	Чудное мгновение	гибрид	<i>Ribesia</i> Berl.	<i>Eucoreosma</i> Jancz.	<i>R. nigrum</i> L. var. <i>sibiricum</i> W. Wolf	ВНИИСПК, Орел
					<i>R. nigrum</i> L. var. <i>scandinavicum</i> <i>R. nigrum</i> L. var. <i>europaeum</i> Jancz.	
					<i>R. dikusha</i> Fisch.	
					<i>R. pauciflorum</i> Turcz. ex Pojark.	
36	Уссури	<i>R. ussuriense</i> Jancz.	<i>Ribesia</i> Berl.	<i>Eucoreosma</i> Jancz.		Дальневосточная станция ВИР

Таблица 1 (окончание)

Взяты в анализ образцы рода *Ribes*, их таксономическая принадлежность (основана на классификации Редера (Rehder, 1954))

№ в анализе	Название образца	Вид/разновидность	Подрод	Секция	Виды и формы, присутствующие в родословной	Оригинатор
37	3864-46-62	гибрид	<i>Ribesia</i> Berl.	<i>Eucoreosma</i> Jancz.	<i>R. nigrum</i> L. var. <i>sibiricum</i> W. Wolf <i>R. nigrum</i> L. var. <i>euro-paeum</i> Jancz. <i>R. procumbens</i> Pall.	ВНИИСПК
38	Кроваво-красная	<i>R. sanguineum</i> Pursh.	<i>Ribesia</i> Berl.	<i>Colobotrya</i> Spach		Дикая форма
39	Приморская форма	<i>R. multiflorum</i> Kit. или <i>R. mandshuricum</i> (Maxim.) Kom. **	<i>Ribesia</i> Berl.	<i>Ribesia</i> Berl., emend. Jancz.		Дикая форма
40	1002-17-110	гибрид	<i>Ribesia</i> Berl.	<i>Ribesia</i> Berl., emend. Jancz.	<i>R. multiflorum</i> Kit. <i>R. sativum</i> Syme var. <i>macrocarpum</i> Jancz. <i>R. petraeum</i> Wulf. var. <i>atropurpureum</i> (C. A. May.)	ВНИИСПК, Орел
41	Смородина Темно-пурпуровая	<i>R. petraeum</i> Wulf. var. <i>atropurpureum</i> (C. A. May.)	<i>Ribesia</i> Berl.	<i>Ribesia</i> Berl., emend. Jancz.		Дикая форма
42	970-18-41		<i>Ribesia</i> Berl.	<i>Ribesia</i> Berl., emend. Jancz.	<i>R. sativum</i> Syme <i>R. rubrum</i> L. <i>R. petraeum</i> Wulf. var. <i>atropurpureum</i> (C. A. May.)	ВНИИСПК, Орел
43	Виктория	<i>R. rubrum</i> L.	<i>Ribesia</i> Berl.	<i>Ribesia</i> Berl., emend. Jancz.		Европа
44	Голландская белая	<i>R. sativum</i> Syme	<i>Ribesia</i> Berl.	<i>Ribesia</i> Berl., emend. Jancz.		Европа
45	Файя плодородная	<i>R. sativum</i> Syme var. <i>macrocarpum</i> Jancz.	<i>Ribesia</i> Berl.	<i>Ribesia</i> Berl., emend. Jancz.		Американское происхождение
46	Красная Виксне	<i>R. warszewiczii</i> Jancz.	<i>Ribesia</i> Berl.	<i>Ribesia</i> Berl., emend. Jancz.		Прибалтика
47	Скороспелая	<i>R. palczewskii</i> (Jancz.) Pojark.	<i>Ribesia</i> Berl.	<i>Ribesia</i> Berl., emend. Jancz.		
48	Ляйсан	<i>R. aureum</i> Pursh.	<i>Ribesia</i> Berl.	<i>Symphocalyx</i> Berl.		

* — родословную некоторых сортов невозможно установить точно, данные утеряны;

** — дикая форма, к какому именно виду принадлежит, не установлено.

Статистическую обработку данных, расчет генетических расстояний (GD) с использованием коэффициента различий и кластерный UPGMA анализ проводили с использованием программ STATISTICA-6.0 и TREECON (Van de Peer and de Wachter, 1994)/PAUP 4.0b.

Близость между образцами по данным родословных подсчитывалась, как описано в работе П. Ланхема и др. (Lanham et al., 1995). Условно принималось, что генотипы родителей определенного образца составляют по 50 % его генотипа, соответственно генотипы предков родителей — по 25 % и т. д. Наименьшее процентное

Таблица 2

Образец специфичные RAPD-фрагменты

№ в анализе	Название образца	Специфичные фрагменты	
		Кол-во	Название праймера и размер фрагмента
36	<i>R. ussuriense</i> Jancz.	1	OPN14-740
37	<i>R. nigrum</i> L. / <i>R. procumbens</i> Pall.	4	OPN8-510, OPN 14-550, OPN14-750, OPD6-590
38	<i>R. sanguineum</i> Pursh.	5	OPE2-1000, OPE2-1450, OPN14-1320, OPE3-670, OPD3-1150
39	<i>R. multiflorum</i> Kit. или <i>R. mandshuricum</i> (Maxim.) Kom.	5	OPE2-700, OPN19-530, OPN19-710, OPE3-1350, OPD6-640
4	<i>R. grossularia</i> L. (сорт Гроссуляр)	1	OPD3-1170
45	<i>R. sativum</i> Syme var. <i>macrocarpum</i> Jancz.	1	OPN8-500
11	<i>R. nigrum</i> L. var. <i>sibiricum</i> W. Wolf / <i>R. nigrum</i> L. var. <i>europaeum</i> Jancz.	1	OPD3-6
48	<i>R. aureum</i> Pursh.	4	OPN8-600, OPE1-790, OPE2-530, OPN14-720
23	<i>R. dikusha</i> Fisch. / <i>R. hudsonianum</i> Rich.	3	OPE5-430, OPD6-600, OPD6-810
42	<i>R. sativum</i> Syme / <i>R. rubrum</i> L. / <i>R. petraeum</i> Wulf. var. <i>atropurpureum</i> (C. A. May.)	1	OPD6-650

содержание общих генотипов, присутствующих в родословных обоих образцов, суммировалось.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование генетического полиморфизма образцов рода *Ribes* L.

В результате предварительной работы на ограниченной выборке образцов было протестировано 18 олигонуклеотидных RAPD-праймеров. Из них было отобрано 9 (OPD6, OPD3, OPN14, OPN8, OPN19, OPE1, OPE3, OPE5, OPE2) наиболее информативных, позволивших получить высоко полиморфные (97–100 %) спектры ДНК-фрагментов геномов смородины и крыжовника. В работе П. Ланхема и др. (Lanham et al., 1995) при анализе генома образцов черной смородины только 26 % амплифицированных фрагментов были полиморфны, что, видимо, можно объяснить тем, что авторы не проводили предварительного отбора праймеров при проведении RAPD-маркирования.

Использование 9 отобранных праймеров для молекулярного RAPD-анализа 47 образцов рода *Ribes* позволило детектировать 274 фрагмента размером от 330 до 2000 п. н., из которых 270 были полиморфными. Число фрагментов варьировалось от 22 (OPD6) до 40 (OPN14) и в среднем в пересчете на праймер составило 30. В результате каждый образец был охарактеризован уникальным набором RAPD-фрагментов. При этом были идентифицированы фрагменты, специфичные как для отдельных образцов, так и для представителей определенных таксонов. Выявлено от 1 до 5 генотипспецифичных фрагментов (табл. 2). Один генотипспецифичный фрагмент обнаружен у сортов Гроссуляр — *R. grossularia*, Файя Плодородная — *R. sativum* Syme var. *macrocarpum* Jancz., Памяти Правика — *R. nigrum* L. var. *Sibiricum* W. Wolf. × *R. nigrum* L.

var. *europaeum* Jancz. и др., наибольшее количество специфичных фрагментов (5) у смородины кроваво-красной — *R. sanguineum* и Приморской формы — предположительно *R. multiflorum* Kit. или *R. mandshuricum*).

Данные проведенного RAPD-анализа были использованы для оценки межсортовой, внутривидовой, межвидовой, межсекционной и межподродовой вариабельности ядерного генома и сходства геномов различных таксонов рода *Ribes* (табл. 3). В результате было установлено, что у исследованных образцов рода *Ribes* диапазон генетических различий варьировался в пределах от 0,01 (между двумя сортами черной смородины, представителями европейского подвида — Северянка и Отелло) до 0,23 (между *R. aureum* секции *Symphocalyx* и *R. sanguineum* секции *Colobotrya*).

В целом диапазон генетических различий 27 сортов и гибридов черной смородины секции *Eucoresma*, включая образцы, в родословных которых присутствовали другие виды секции *Eucoresma* (*R. brateosum*, *R. pauciflorum*, *R. dikusha*, *R. ussuriense* и др.), секции *Colobotrya* (*R. glutinosum* Benth.), подрода *Grossularia* (*R. oxycanthoides* L.) составил 0,01–0,07 и был ниже, чем у пяти образцов красной и белой смородин секции *Ribesia* — 0,04–0,09, в родословных которых присутствовали только виды секции *Ribesia* *R. rubrum*, *R. sativum*, *R. warszewiczii*, *R. palczewskii*. Выявленные особенности, по всей видимости, могут быть связаны с тем, что в селекции сортов черной смородины преимущественно используются подвиды *R. nigrum* (С. черная), в то время как в селекции красной и белой смородин в равной мере задействованы 3 вида *R. rubrum* (С. красная), *R. sativum* (С. обыкновенная), *R. petraeum* (С. скалистая) (Brennan, 2008).

Генетические различия для представителей *Eucoresma* (черная смородина) и селекционных форм на основе *R. nigrum* составили 0,01–0,08; для представителей

Таблица 3

Показатели генетических расстояний представителей рода *Ribes* L., рассчитанные на основе RAPD данных

Группа образцов	Вариабельность внутри группы	Среднее значение	Стандартная ошибка
Межподродовые расстояния			
<i>Grossularia</i> Rich. и <i>Ribesia</i> Berl. секция <i>Ribesia</i> Berl., emend Jancz.	0,13–0,19	0,16	0,0024
<i>Grossularia</i> Rich. и <i>Ribesia</i> Berl. секция <i>Eucoreosma</i> Jancz.	0,12–0,17	0,14	0,0011
<i>Colobotrya</i> Spach — <i>Grossularia</i> Rich.	0,15–0,18	0,17	0,0069
<i>Symphocalyx</i> Berl. — <i>Grossularia</i> Rich.	0,19–0,21	0,2	0,0036
Межсекционные расстояния			
секция <i>Eucoreosma</i> Jancz и секция <i>Ribesia</i> Berl, emend janc	0,14–0,21	0,16	0,0006
<i>Colobotrya</i> Spach — <i>Ribesia</i> Berl.	0,14–0,23	0,17	0,0078
<i>Colobotrya</i> Spach — <i>Eucoreosma</i> Jancz.	0,12–0,16	0,14	0,0020
<i>Symphocalyx</i> Berl. — <i>Ribesia</i> Berl.	0,15–0,18	0,16	0,0032
<i>Symphocalyx</i> Berl. — <i>Eucoreosma</i> Jancz.	0,17–0,22	0,19	0,0022
<i>Symphocalyx</i> Berl. — <i>Colobotrya</i> Spach		0,22	
Межвидовые (виды принадлежат одной секции)			
<i>R. nigrum</i> , <i>R. ussuriense</i> (секция <i>Eucoreosma</i> Jancz)	0,04–0,05	0,05	0,0009
Приморская форма, <i>R. petreum</i> var. <i>atropurpureum</i> , <i>R. rubrum</i> , <i>R. sativum</i> , <i>R. warszewiczii</i> , <i>R. palczewskii</i> (секция <i>Ribesia</i> Berl emend jancz)	0,05–0,13	0,08	0,006
Внутрисекционные			
секция <i>Eucoreosma</i> Jancz	0,01–0,08	0,04	0,0006
секция <i>Ribesia</i> Berl., emend Jancz.	0,04–0,13	0,07	0,0038
секция <i>Eugrossularia</i> Engl.	0,03–0,05	0,04	0,0024
Внутривидовые			
<i>R. nigrum</i> (10–17,19)	0,02–0,05	0,03	0,0012
Межсортовые			
Сорта чёрной смородины (27 образцов, 8–22, 24–35)	0,01–0,07	0,04	0,0004
Сорта красной смородины (5 образцов, 43–47)	0,04–0,09	0,06	0,005
Смородинно-крыжовниковые гибриды			
<i>Grossularia</i> Rich. и см.-кр. гибриды	0,08–0,11	0,1	0,003
секция <i>Eucoreosma</i> Jancz. и см.-кр. гибриды	0,05–0,09	0,07	0,001

Ribesia (красная смородина) — 0,04–0,13. Сравнительно низкое генетическое различие было детектировано для образцов крыжовника (подрод *Grossularia*) 0,03–0,05, что, однако, может быть связано с малой представленностью этого подрода в анализе (4 образца).

Интересно отметить, что гибриды Йошта и 203029-61, полученные от скрещивания видов, относящихся к разным подродам *R. grossularia* (подрод *Grossularia*) и *R. nigrum* (подрод *Ribesia*), показали сравнительно большее сходство с представителями секции черной смородины, подрод *Ribesia* (0,05–0,09), чем с представителями крыжовников, подрод *Grossularia* (0,08–0,11).

Наибольшие генетические различия обнаружены между представителями секции *Ribesia* и секции *Eucoreosma* (0,14–0,21); представителем секции *Symphocalyx R. aureum* (золотистая смородина) и представителями секции *Eucoreosma* (черной смородины) (0,17–0,22); представителем секции *Symphocalyx R. aureum* (золотистая сморо-

дина) и представителем секции *Colobotrya R. sanguineum* (кроваво-красная смородина) (0,23); представителем секции *Colobotrya R. sanguineum* (кроваво-красная смородина) и представителями секции *Ribesia* (красная смородина) (0,14–0,23), в то время как различия между представителями подродов *Grossularia* и *Ribesia* были на том же уровне или даже меньше, например, между представителями подрода *Grossularia* (крыжовник) и представителями подрода *Ribesia* секции *Eucoreosma* (черная смородина) (0,12–0,17); представителями подрода *Grossularia* (крыжовник) и представителем подрода *Ribesia* секции *Colobotrya* — *R. sanguineum* (кроваво-красная смородина) (0,15–0,18).

Таким образом, согласно данным RAPD-анализа, в целом значения генетических различий между представителями разных секций подрода смородин (0,12–0,23) даже несколько превышали различия между представителями разных подродов (подрод смородин *Ribesia* и подрод крыжовников *Grossularia*) (0,12–0,21). Этот факт

поддерживает выделение вышеперечисленных секций в отдельные подроды. Это наиболее полно отражено в классификации Элизабет Кип (Keep, 1962), выделяющей 9 подродов, включая подроды *Grossularia*, *Symphocalyx*, *Ribesia*, *Colobotrya*, за исключением объединения секции *Eucoresma* и секции *Colobotrya* в подрод *Colobotrya*.

Выявленное несколько большее родство исследованных представителей черной смородины (подрод *Ribesia*, секция *Eucoresma*) и крыжовника (подрод *Grossularia*), с одной стороны, может быть связано с присутствием крыжовников в родословных отдельных сортов черной смородины. С другой стороны, сама возможность гибридизации и существования гибридных форм между представителями секции *Eucoresma* подрода *Ribesia* и представителями подрода *Grossularia*, вероятно, говорит о сравнительно большем родстве черной смородины и крыжовника и несоответствии таксономического разделения рода *Ribes* на подроды *Grossularia* (крыжовник) и *Ribesia* (смородина).

Кроме того, заметное отличие образцов кроваво-красной смородины *R. sanguineum* (секция *Colobotrya*) и золотистой смородины *R. aureum* (секция *Symphocalyx*) от представителей других секций данного подрода *Ribesia* также говорит в пользу необходимости пересмотра их таксономической принадлежности.

Интересно также отметить, что *R. sanguineum* (смородина кроваво-красная, секция *Colobotrya*, подрод *Ribesia*) имеет сходство (0,14) с образцами черной смородины (секция *Eucoresma*, подрод *Ribesia*) и крыжовника (0,17) (подрод *Grossularia*). Выявленное большее сходство геномов, относящихся к разным секциям и подкладам, действительно имеет под собой определенные основания. Так, например, известно, что *R. sanguineum* var. *glutinosum* (= *R. glutinosum* Benth.) может давать гибридные формы с видами секции черной смородины и присутствует в родословных ряда исследованных сортов и гибридов (Князев и Огольцова, 2004).

В целом, согласно коэффициентам генетических различий, среди исследованных представителей 4 секций рода *Ribes*, можно выделить три неформальные группы по степени сходства геномов: 1) представители секций *Eucoresma* и *Colobotrya* подрода *Ribesia* и представители подрода *Grossularia*, 2) представители секции *Ribesia*, 3) представитель секции *Symphocalyx*.

Исследование таксономических и филогенетических отношений анализируемых представителей рода *Ribes*

На основании полученных RAPD-спектров методом кластерного анализа (UPGMA) была построена дендрограмма, наглядно отражающая степень различий исследованных образцов (рис. 1).

Все исследованные образцы рода с 93 % бутстреп-поддержкой объединяются в один общий кластер, а образец внешней группы занимает базальное положение на дендрограмме. Объединение всех исследованных образцов рода *Ribes* наблюдалось и в других работах по молекулярной

филогении (Messinger et al., 1999; Senters and Soltis, 2003; Schultheis and Donoghue, 2004), в которых оценивался полиморфизм как ядерной, так и хлоропластной ДНК.

Исследованные представители рода *Ribes* образуют три основные группы (рис. 1).

Первая группа, главным образом, включает в себя представителей секции *Eucoresma* подрода *Ribesia* (смородина черная), а также смородинно-крыжовниковые гибриды. Вторая группа представлена крыжовниками *R. grossularia* (подрод *Grossularia*), и третья — сортами и гибридными формами красной смородины, секция *Ribesia* подрода *Ribesia*. Отдельные ветви формируют представитель секции *Colobotrya* подрода *Ribesia* — образец *R. sanguineum* (смородина кроваво-красная) и представитель секции *Symphocalyx* подрода *Ribesia* — образец *R. aureum* (смородина золотистая).

В первой группе основной кластер образуют формы черной смородины, генетической основой которых является вид *R. nigrum*. Несколько обособленно от него группируются гибридная форма *R. nigrum* × *R. procumbens*, представитель вида *R. ussurienses* и смородинно-крыжовниковые гибриды.

На дендрограмме к кластеру черных смородин с высокими значениями индекса бутстрепа (ИБ 100 %) примыкают смородинно-крыжовниковые гибриды (Йошта и 2030-29-61), что, вероятно, свидетельствует о преобладании у них генома черной смородины. По данным П. Ланхема и др. (Lanham et al., 1995) группа смородинно-крыжовниковых гибридов также размещается внутри группы сортов черной смородины.

Отдельную ветвь в этой группе формирует гибридная форма *R. dikusha* × *R. hudsonianum*. Полученные результаты подтверждают данные П. Ланхема и др. (Lanham et al., 2000) по RAPD- и ISSR-маркированию, согласно которым образцы секции *Eucoresma* — *R. dikusha*, *R. nigrum* и *R. ussurienses* — так же объединяются в одну группу. Аналогичным образом образцы этих видов кластеризуются вместе на основании данных полиморфизма ITS ядерной ДНК и рестрикционных сайтов хлоропластной ДНК (Messinger et al., 1999; Senters and Soltis, 2003).

Как было сказано выше, основной кластер первой группы представлен сортами и гибридными формами смородины черной *R. nigrum*. Наиболее многочисленную подгруппу черных смородин образуют комплексные современные сорта, полученные в результате скрещивания подвидов смородины черной и других видов, а также собственно образцы подвидов, представленные сортами, полученными в результате отбора из диких популяций или селекционной работы, с образцами подвидов *R. nigrum*: *R. nigrum* var. *europaeum* (сорта Ртищевская, Веллингтон-30, Отелло, Северянка, Силго), *R. nigrum* var. *sibiricum* (сорт Бурая сладкая) и *R. nigrum* var. *scandinavicum* (сорт Оджебин).

Было интересно проследить корреляцию между кластеризацией по данным анализа полиморфизма генома и данным родословных анализируемых образцов черной

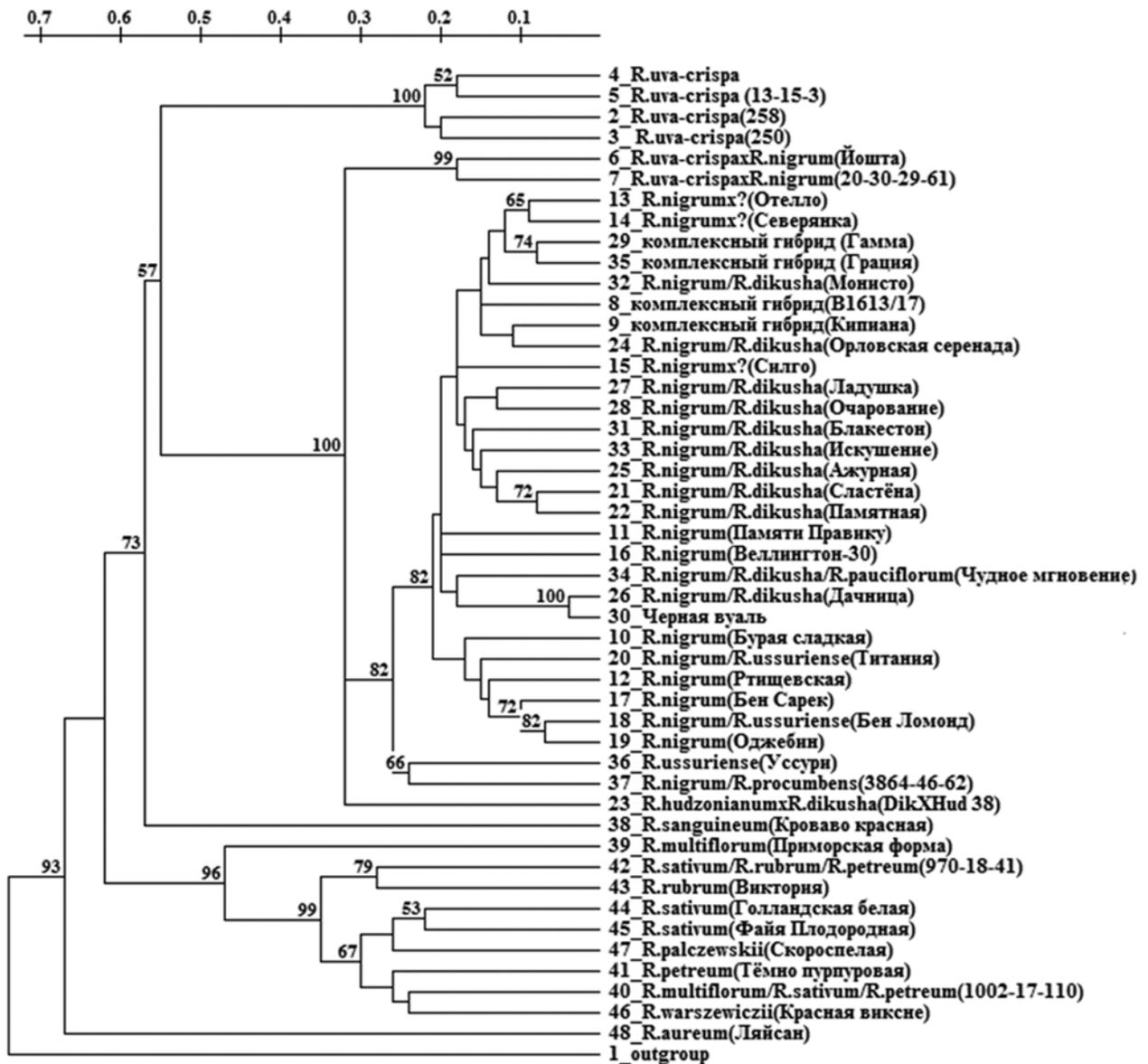


Рис. 1. Дендрограмма сходства 47 образцов рода *Ribes*, построенная на основании RAPD данных

смородины. На полученной дендрограмме с высокой бутстреп-поддержкой (72 %) объединяются сорта, имеющие в родословной представителя скандинавского подвида смородины черной (сорт Оджебин 100 % по родословной *R. nigrum* var. *scandinavicum*, Бен Ломонд 50 % скандинавского подвида смородины черной, Бен Сарек — 25 % скандинавского подвида смородины черной в родословной). Однако сорт Титания, в родословной которого *R. nigrum* var. *scandinavicum* составляет 25 %, в этот кластер не входит, что, вероятно, связано с присутствием в ее родословной также сибирского подвида (25 %). В работе П. Ланхема и др. (Lanham et al., 1995) сорта Бен Ломонд и Бен Сарек группируются отдельно от сорта Оджебин.

Среди сортов (Северянка, Отелло, Ртищевская, Силго, Веллингтон-30), имеющих в родословной представителя подвида *R. nigrum* var. *europaeum* со сравнительно

высокими значениями бутстреп-поддержки, объединяются только сорта Отелло и Северянка (65 %).

Необходимо отметить, что данные кластерного анализа не всегда отражают данные родословных. Так, сорта Гамма, Грация и Кипиана получены из одной гибридной семьи (100 % родства по родословным). Но по данным дендрограммы вместе кластеризуются только сорта Гамма и Грация. В работе П. Ланхема и др. (Lanham et al., 1995) также отмечается, что группировка сортов черной смородины, основанная на данных родословных, отличается от таковой, основанной на RAPD-данных. Авторы указывают несколько причин данных различий: некоторые сорта имеют неизвестное или неточное происхождение, ряд сортов получен от открытого опыления, следовательно, отец неизвестен, некоторые сорта получены в результате отбора из диких популяций.

Второй и наиболее близкий к представителям черной смородины (секция *Eucoreosma* подрод *Ribesia*) кластер образуют образцы крыжовника вида *R. grossularia*, относящегося к подроду *Grossularia*.

Также к «черносморородинно-крыжовниковому» кластеру примыкает отдельная ветвь, образованная образцом вида *R. sanguineum* смородины кроваво-красной секции *Colobotrya* подрода *Ribesia*. В работе Л. Шултис и М. Донохью (Schultheis and Donoghue, 2004) *R. sanguineum* также группируется с подродом *Grossularia* на дендрограммах, построенных по данным вариабельности последовательностей ITS, ETS, psbA-trnH и рестрикционных сайтов хлоропластной ДНК.

Третью группу на дендрограмме образуют представители секции *Ribesia* (ИБ 96%), которая подразделяется на ряд отдельных подкластеров. Наиболее крупный подкластер образуют образцы видов *R. sativum* (сорт Файя Плодородная, Голландская белая), *R. palczewskii* (сорт Скороспелая), *R. petreum* (дикая форма смородины темно-пурпуровой), *R. warszewiczii* (сорт Красная Виксне), и гибридная форма 1002-17-110, имеющая в родословной генетический материал от *R. multiflorum*, *R. sativum*, *R. petreum*. С этим подкластером объединяется два образца (ИБ 79%), имеющие в составе своего генома генетический материал вида *R. rubrum* (сорт Виктория, отобранный из популяции *R. rubrum*) и гибридную форму 970-18-41.

Базальную ветвь в третьей группе формирует приморская форма, являющаяся предположительно образцом вида *R. multiflorum* или вида *R. mandshuricum*.

Несмотря на то что по классификации GRIN (<http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/html/taxon.pl?31860>) *R. sativum* и *R. rubrum* являются синонимами, согласно полученным нами данным, представители *R. sativum* отделяются от *R. rubrum* и проявляют большее сходство с представителями таких видов, как *R. palczewskii*, *R. petreum*, *R. warszewiczii*.

По данным полиморфизма ITS рДНК-секция *Ribesia* также не монофилетична (Senters and Soltis, 2003). Половина включенных в анализ видов секции *Ribesia* (*R. mandshuricum*, *R. petraeum*, *R. triste*) образуют отдельную группу, в то время как оставшиеся виды (включая *R. rubrum*) кластеризуются с образцами, представленными преимущественно видами подрода *Berisia* (Senters and Soltis, 2003).

По данным проведенного RAPD-анализа наиболее обособленным от анализируемых видов *Ribes* является вид *R. aureum* (смородина золотистая, сорт Ляйсан), формирующий на дендрограмме отдельную ветвь. Аналогичным образом представители секции *Symphocalyx* (*R. aureum* и *R. odoratum*) присоединяются ко всем остальным исследованным образцам рода на самом дальнем расстоянии на дендрограммах, построенных по данным полиморфизма хлоропластного спейсера psbA-trnH и ETS рибосомального оперона (Schultheis and Donoghue, 2004).

Таким образом, был проведен молекулярный RAPD-анализ рода *Ribes*, включающего в себя представителей смородины черной, смородины красной, золотистой и кро-

ваво-красной, крыжовника, а также сорта и гибридные формы отечественной селекции. Метод RAPD-анализа выявил достаточно высокий уровень полиморфизма генома и позволил идентифицировать близкородственные сорта — представителей одной сестринской линии (сорта Кипиана, Гамма, Грация). Выявлено несколько большее родство исследованных представителей крыжовника (*Eugrossularia*) и черной смородины (*Eucoreosma*), а межподродовые черносморородинно-крыжовниковые гибриды Йошта и 203029-61 показали сравнительно большее сходство с представителями секции черной смородины, чем с представителями секции крыжовника. В целом значения генетических различий между представителями разных подродов (подрод смородин *Ribesia* и подрод крыжовников *Grossularia*) (0,12–0,21) не превышали различия между представителями разных секций подрода смородин (0,12–0,23). Полученные нами результаты говорят о том, что таксоны крыжовника, черной смородины и красной смородины являются таксонами одного уровня, что свидетельствуют в пользу классификаций, выделяющих их в отдельные подроды.

Авторы благодарят Голяеву О. Д. (к. б. н., селекционер красной смородины, ВНИИСПК, Орел) и Курашева О. В. (к. б. н., селекционер крыжовника, ВНИИСПК, Орел) за предоставление растительного материала.

Литература

1. Еленевский А. Г. и др. 2001. Ботаника высших, или наземных растений: Учеб. для студ. высш. пед. учеб. заведений / А. Г. Еленевский, М. П. Соловьева, В. Н. Тихомиров. М.: Издательский центр «Академия», 432 с.
2. Еремин Г. В., Исачкин А. В., Казаков И. В. и др., 2004. Общая селекция и сортоведение плодовых и ягодных культур. М.: Мир, 422 с.
3. Князев С. Д., Огольцова Т. П., 2004. Селекция смородины черной на современном этапе. Орел: Изд-во Всероссийского научно-исследовательского института селекции плодовых культур, 238 с.
4. Самигуллина Н. С., 2006. Практикум по селекции и сортоведению плодовых и ягодных культур: Учебное издание. Мичуринск: Издательство Мичуринского государственного университета, 197 с.
5. Berger A., 1924. A taxonomic review of currants and gooseberries // NewYork Agric. Exp. Sta. Techn. Bull. Vol. 109. С. 1–118.
6. Brennan R., Jorgensen L., Hackett C. et al., 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. Vol. 161. P. 19–34.
7. Brennan R. M., 2008. Currants and Gooseberries // Temperate Fruit Crop Breeding / Ed. Hancock J. F., Springer Science+Business Media. P. 177–196.
8. Coville F. V., Britton N. L., 1908. Grossulariaceae // North American Flora. Vol. 22. P. 193–225.

9. *Cronquist A.*, 1988. The Evolution and Classification of Flowering Plants. — New York.: The New York Botanical Garden, 555 p.
10. *Hummer K. E., Barney D.* 2002. Currants: Comprehensive Crop Report // HortTechnology. Vol. 12. N 3. P. 377–387.
11. *Janczewski E.*, 1907. Monograph of the currants *Ribes L.* // Mem. Soc. Phys. Hist. Nat. Geneve. Vol. 35. P. 199–517.
12. *Keep E.*, 1962. Interspecific hybridization in *Ribes* // Genetica. Vol. 33. P. 1–23.
13. *Komarov V. L.*, 1971. Flora of the (former) USSR. Vol. IX p. 175–208. In: Ribesioideae Engl. (Translated from the Russian by the Israel Program for Scientific Translation, Jerusalem). Keter, London.
14. *Lanham P., Brennan R., Hackett C. et al.*, 1995. RAPD fingerprinting of blackcurrant (*Ribes nigrum L.*) cultivar. // Theor Appl genet. Vol. 90. P. 166–172.
15. *Lanham P., Korycinska A. and Brennan R.* 2000. Genetic diversity within a secondary gene pool for *Ribes nigrum L.* revealed by RAPD and ISSR markers // Journal of horticultural Science & Biotechnology. Vol. 75. N 4. P. 371–375.
16. *Messinger W., Liston A., and Hummer K.*, 1999. Ribes phylogeny as indicated by restriction-site polymorphisms of PCR-amplified chloroplast DNA // Plant Systematics and Evolution. Vol. 217. P. 185–195.
17. *Peer Van de Y., Wachter R. D.*, 1994. TREECON for Windows: A software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment // Comput. Appl. Biosci. Vol. 10. P. 569–570.
18. *Puchooa D.*, 2004. A simple, rapid and efficient method for the extraction of genomic DNA from lychee (*Litchinensis Sonn*) // African Journal of Biotechnology. April. Vol. 3. N 4. P. 253–255.
19. *Rehder A.*, 1954. Manual of cultivated trees and shrubs. — Toronto.: MacMillan and Co. 999 pp.
20. *Schultheis L. M., Donoghue M. J.*, 2004. Molecular phylogeny and biogeography of *Ribes (Grossularia)* with an emphasis of gooseberry (subg. *Grossularia*) // Systematic Botany. Vol. 29. N. 1. P. 77–96.
21. *Senters A. E. and Soltis D. E.*, 2003. Phylogenetic relationships in *Ribes (Grossulariaceae)* inferred from ITS sequence data // TAXON. Vol. 52. P. 51–66.
22. *Sinnott Q. P.*, 1985. A revision of *Ribes L.* subg. *Grossularia (Mill.) per. Sect. Grossularia (Mill.) Nutt. (Grossulariaceae)* in North America // Rhodora. Vol. 87. P. 189–286.
23. *Weigend M.*, 2007. Flowering plants. Eudicots. The Families and Genera of Vascular Plants. Vol. 9, P. 168–176.

MOLECULAR ANALYSIS OF GENETIC POLYMORPHISM AND PHYLOGENETIC RELATIONSHIPS IN *RIBES L.*

A. V. Pikunova, E. V. Martirosyan, S. D. Knyazev, N. N. Ryzhova

☼ **SUMMARY:** The RAPD analysis have been used to study genome polymorphism and phylogenetic relationships in genus *Ribes L.* Levels of interspecific, intraspecific and intercultivars genome diversity have been evaluated. Revealed polymorphism allows the recognition of closely related cultivars. Genotype-specific RAPD fragments and also group-specific fragments have been identified. Hybrids between blackcurrant and gooseberry have shown more similarity with blackcurrant. Calculated similarity coefficients and dendrogram topology support the genus classifications that recognize equal independent taxonomic level of blackcurrant, redcurrant and gooseberry with genus *Ribes L.*

☼ **KEY WORDS:** RAPD analysis; phylogeny; polymorphism; currant; gooseberry; *Ribes L.*; molecular markers.

☼ Информация об авторах

Пикунова Анна Викторовна — младший научный сотрудник. Орловский государственный аграрный университет. 302040, г. Орел, ул. Красноармейская, д. 17. E-mail: pikuanpa84@mail.ru.

Мартirosyan Елена Владимировна — к. б. н., научный сотрудник. Центра «Биоинженерия» РАН. 117312, Россия, Москва, пр-т 60-летия Октября, д. 7, корп. 1. E-mail: marty-elena@yandex.ru.

Князев Сергей Дмитриевич — доктор с.-х. наук, профессор кафедры растениеводства, Орловский государственный аграрный университет, ведущий научный сотрудник отдела ягодных культур ГНУ ВНИИСПК, Орел. Красноармейский ст., 17, Орел, 302040. E-mail: ksd_61@mail.ru.

Рыжова Наталья Николаевна — кандидат биологических наук, научный сотрудник Центра «Биоинженерия» РАН. 117312, Россия, Москва, пр-т 60-летия Октября, д. 7, корп. 1. E-mail: rynatalia@yandex.ru.

Pikunova A. V. — junior scientific assistant. Orel State Agrarian University (OSAU). Красноармейский ст., 17, Орел, 302040. E-mail: pikuanpa84@mail.ru.

Martirosyan E. V. — PhD, scientific assistant. Centre "Bioengineering". 60 let Otyabrya av. 7/1, Moscow, Russia, 117312. E-mail: marty-elena@yandex.ru.

Knyazev S. D. — PhD, professor of chair of plant breeding. Orel State Agrarian University (OSAU). Красноармейский ст., 17, Орел, 302040. E-mail: ksd_61@mail.ru.

Ryzhova N. N. — PhD, scientific assistant. Centre "Bioengineering". 60 let Otyabrya av. 7/1, Moscow, Russia, 117312. E-mail: rynatalia@yandex.ru.