

ИЗУЧЕНИЕ ПОЛИМОРФИЗМА МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ ЛОКУСОВ КАК ЭТАП НА ПУТИ К ПАСПОРТИЗАЦИИ ЕЖЕВИКИ

М.А. Должикова , А.В. Пикунова, А.А. Павленко, Л.А. Грюнер, Б.Б. Корнилов*ФГБНУ ВНИИ селекции плодовых культур, 302530, Россия, Орловская область, Орловский район, д. Жилина, ВНИИСПК, info@vniispk.ru***Аннотация**

Данная работа посвящена изучению полиморфизма 11 микросателлитных локусов на 15 сортах ежевики. Большинство сортов и форм ежевики имеют четыре базовых набора хромосом ($2n = 4x = 28$). В нашей работе большинство сортов тетраплоиды (Agawam, Reuben, гибридная форма Т × С, Brzezina, Loch Maree, Ouachita, Thornfree, Loch Tay, Cacanska Besterna, Chester) и несколько – гексаплоиды (Karaka Black, Texas, Helen). Теоретически возможно наблюдать 4 разных фрагмента, амплифицируемых на ДНК одного тетраплоидного генотипа, что зависит от уровня гетерозиготности анализируемого локуса. В исследованиях разноплоидных гибридов яблони наблюдалось 3...4 фрагмента у тетраплоидных генотипов. В исследовании амплифицировалось от 1 до 3 фрагментов у некоторых тетраплоидных сортов для одного локуса (у гибридной формы Т × С в локусе ERubLR_SQ01_G16 амплифицировалось 3 аллеля, у сорта Egie амплифицировался 1 аллель в локусе ERubLR_SQ019_3_G09). Всего на ДНК 15 образцов в 11 микросателлитных локусах было амплифицировано 48 аллелей. В среднем один генотип тетраплоидного сорта по всем локусам амплифицирует приблизительно 18 аллелей. У некоторых гексаплоидных сортов амплифицировалось от 2 до 4 фрагментов (у сорта Texas в локусе ERubLR_SQ19_3_G09 амплифицировалось 2 аллеля, у сорта Karaka Black в локусе ERubLR_SQ01_G16 амплифицировалось 4 аллеля). Один гексаплоидный генотип в среднем амплифицирует 25 аллелей по всем локусам. В работе обсуждаются особенности и ограничения методики детекции ПЦР продуктов микросателлитных локусов путем разделения в полиакриламидных гелях. На данном этапе работы отработаны методики амплификации 11 микросателлитных локусов ежевики, обнаружен полиморфизм, выявлены наиболее полиморфные локусы (RubEndo_SQ004_N23, ERubLR_SQ01_G16, ERubLR_SQ01_M20), которые в дальнейшем могут быть использованы для генетической паспортизации сортов ежевики и работе с генетическими ресурсами.

Ключевые слова: ДНК-маркеры, полимеразная цепная реакция, идентификация

STUDY OF MICROSATELLITE LOCI POLYMORPHISM AS A STAGE ON THE WAY TO CERTIFICATION OF BLACKBERRIES

M.A. Dolzhikova , A.V. Pikunova, A.A. Pavlenko, L.A. Gruner, B.B. Kornilov*Russian Research Institute of Fruit Crop Breeding, 302530, Russia, Orel region, Orel district, Zhilina, VNIISP, info@vniispk.ru***Abstract**

This work is devoted to the study of polymorphism of 11 microsatellite loci on 15 blackberry cultivars. Most cultivars and forms of blackberries have four basic sets of chromosomes ($2n = 4x = 28$). In our work, most of the cultivars are tetraploids (Agawam, Reuben, the hybrid form Т × С, Brzezina, Loch Maree, Ouachita, Thornfree, Loch Tay, Cacanska Besterna, Chester) and several cultivars are hexaploids (Karaka Black, Texas, Helen). Theoretically, it is possible to

observe 4 different fragments amplified on the DNA of one tetraploid genotype, which depends on the level of heterozygosity of the analyzed locus. In studies of apple hybrids having different ploidy (Pikunova et al., 2018), 3–4 fragments were observed in tetraploid genotypes. From 1 to 3 fragments were amplified in some tetraploid cultivars (in the variety Erie, 1 allele was amplified at the locus ERubLR_SQ019_3_G09, in the Hybrid T × C cultivar, 3 alleles were amplified at the ERubLR_SQ01_G16 locus). A total of 48 alleles were amplified on the DNA of 15 samples in 11 microsatellite loci. On average, one genotype of a tetraploid cultivar amplifies approximately 18 alleles at all loci. In some hexaploid cultivars, from 2 to 4 fragments were amplified (in Texas 2 alleles were amplified at the ERubLR_SQ19_3_G09 locus; in Karaka Black, 4 alleles were amplified at the ERubLR_SQ01_G16 locus). On average, one hexaploid genotype amplifies 25 alleles at all loci. This paper discusses the features and limitations of the method of detecting PCR products of microsatellite loci by separation in polyacrylamide gels. At this stage of the work, methods of amplification of 11 microsatellite blackberry loci have been worked out; polymorphism has been detected, and the most polymorphic loci have been identified (RubEndo_SQ004_N23, ERubLR_SQ01_G16, ERubLR_SQ01_M20), which can later be used for genetic certification of blackberry cultivars and work with genetic resources.

Key words: DNA markers, polymerase chain reaction, identification

Введение

Ежевика – ценная ягодная культура, плоды которой служат источниками ценных для организма человека микро- и макроэлементов, ряда витаминов. Плоды ежевики созревают после большинства других ягодных культур, что способствует увеличению сроков производства продукции, богатой витаминами, в регионах выращивания. Плоды её содержат значительное количество важных биологически активных компонентов антиоксидантного комплекса, участвующих во многих процессах метаболизма человека (Грюнер, Корнилов, 2020).

На территории России выделяют три основных центра видовой разнообразия ежевик: в Калининградской области, где западноевропейские таксоны находятся на восточной границе своих ареалов; в Крыму, где распространены крымские формы средиземноморского происхождения; российском Кавказе (в основном в Предкавказье) в виде совокупности средиземноморских и кавказских представителей. Виды подрода ежевик (*Rubus*) формируют полиплоидные ряды от $2x$ ($2n = 14$) до $12x$ ($2n = 84$) с основным числом хромосом $x = 7$, а также включают анеуплоиды разного уровня ploidy (Дунаева, 2022).

Классическая селекция ягодных культур представляет длительный и затратный процесс, например, длительность выведения нового сорта малины достигает 15 лет (Graham, Jennings, 2009). Использование маркерной селекции значительно ускоряет данный процесс. Однако, стоит важный вопрос идентификации имеющегося сортового материала.

Для идентификации сортов ежевики используются количественные и качественные признаки, которые определяются визуально. Однако данные признаки имеют зависимость их проявления от внешних факторов. В результате возникают сложности в идентификации. В связи с этим наиболее эффективной системой маркирования сортов является генетическая идентификация сорта, представляющая собой метод получения генетически детерминированных характеристик с помощью молекулярных маркеров (Каган, 2014).

Для выявления полиморфизма микросателлитных локусов наиболее часто используют SSR-маркеры (простые повторяющиеся последовательности). В первой работе по изучению SSR-полиморфизма у представителей рода *Rubus* микросателлитные участки выявляли методом блот-гибридизации по Саузерну, используя в качестве зонда две синтетические

ДНК-пробы с тандемно повторяющимися последовательностями GACA и GATA (Bussemeyer et al., 1997)

J. Graham с соавторами (Graham et al., 2002) были выявлены SSR-районы путем секвенирования клонов из библиотек, обогащенных последовательностями (AC)_n и (AG)_n. Разработанные праймеры были апробированы на выборке из 50 генотипов (сорта малины, сорта ежевики, образцы дикорастущих видов *R. grabowski*, *R. deliciosus* и межвидовые гибриды). В дальнейшем многочисленные группы исследователей создавали наборы SSR-маркеров для разных видов малин и ежевик: *R. coreanus* (Lee et al., 2015), *R. glaucus* (López et al., 2019), а также сортов ежевики (Lewers et al., 2008).

Созданные наборы SSR-маркеров широко используются для изучения генетического разнообразия и генотипирования сортов ежевики и малины (Castillo et al., 2010a). Так, группой отечественных учёных было протестировано 9 сортов малины и ежевики по 11 микросателлитным локусам (Лебедев и др., 2018). Был разработан метод генотипирования сортов малины, ежевики и малино-ежевичных гибридов отечественной и зарубежной селекции на основе микросателлитного анализа набора из 13 маркеров (Субботина и др., 2019). Коллегами из Беларуси были проанализированы 5 сортов ежевики различного генетического происхождения в целях дальнейшей паспортизации методом маркирования с использованием 8 SSR-маркеров (Гашенко и др., 2020). Все проводимые работы дают основание полагать актуальность изучения данной культуры при помощи SSR- маркеров в целях дальнейшей идентификации.

Материалы и методы

Выделение ДНК производилось по методике Doyle and Doyle (1990) с небольшими модификациями из свежесобранного растительного материала (молодых листьев).

Объекты исследований – 15 сортов ежевики биоресурсной коллекции ВНИИСПК: Agawam, Natchez, Karaka Black, Reuben, Texas, гибридная форма Т × С, Brzezina, Loch Maree, Erie, Ouachita, Helen, Thornfree, LochTay, Sacanska Bestrna, Chester (таблица 1).

Таблица 1 – Объекты исследований

Сорт	Плоидность	Происхождение
Агавам (Agawam)	2n=4x=28	<i>R. allegheniensis</i> Pozter
Натчез (Natchez)	2n=28	скрещивание селекционных линий
Карака Блек (Karaka Black)	2n=6x=42	скрещивание селекционных линий
Рубен (Reuben)	2n=4x=28	скрещивание селекционных линий
Техас (Texas)	2n=6x=42	<i>R. loganovaccus</i>
Гибридная форма Т × С	2n=4x=28	Thornfree × <i>Rubus cauzasicus</i>
Бжезина (Brzezina)	2n=4x=28	Black Satin × Darrow
Лох Мери (Loch Maree)	2n=4x=28	Loch Ness × селекционные формы
Эри (Erie)	неизвестно	неизвестно
Вошита (Ouachita)	2n=4x=28	Navaho × Ark.1506
Хелен (Helen)	2n=6x=42	селекционные сеянцы × Silvan
Торнфри (Thornfree)	2n=4x=28	(Brainerd × Merton Thornless) × (Merton Thornless × Eldorado)
Лох Тей (LochTay)	2n=4x=28	Loch Ness × SCRJ82417D
Чачанска Бестрна (Sacanska Bestrna)	2n=4x=28	Dirksen Thornless × Black Satin
Честер (Chester)	2n=4x=28	Darrow × Thornfree

Для проведения ПЦР выделенную ДНК разбавляли. ПЦР проводили с использованием реактивов и *Bio Taq* полимеразы фирмы Dialat Ltd. Проанализированные микросателлитные локусы перечислены в таблице 2. Они представляют 5 групп сцепления ежевики из 7.

Таблица 2 – Характеристика микросателлитных локусов, задействованных в анализе

Локус	ГС*	RM	t °C	Ведущий праймер с хвостом 5'→3'	Обратный праймер 5'→3'
ERubLR_SQ19_1_A05	5	GAA	50	aacaggtatgaccatga GTTTGCTTCCTTCGTAGTC	gttt TATACTAATGGCCACCTTGG
ERubLR_SQ01_B06	4	AGCG	53	aacaggtatgaccatga CCTCTACACCACCCCATCAG	gttt CGTCATCGTCATCTCTCTCG
RubPara_SQ008_D04	1	AT	53	aacaggtatgaccatga TTGAGAACCATGCCTACATATCTT	gttt GCTGGAAATGGATTGAATGG
ERubLR_SQ07_4_D05	3	AGC	50	aacaggtatgaccatga CTTCTTTCCAACCGATTTC	gttt ACGAATTGATTTCATCAACC
ERubLR_SQ06_2_E01	5	AT	53	aacaggtatgaccatga GCAGGAGTTGGACGAGTAG	gttt TTTCCAGATCAAACAAGACC
ERubLR_SQ01_M20	5	ATA	50	aacaggtatgaccatga TTACGAACCCCATTAATTTAAGTC	gttt AATCCTGAGACCGACGAGTG
RubEndo_SQ004_N23	4	TA	53	acaggtatgaccatga CACTGCAAGGTGTCGTTTGT	gttt ATAGCTCCGGCAATCCATC
ERubLR_SQ19_3_G09	4	GCTC	53	acaggtatgaccatga GTTGTCATCGTCATCTCTC	gttt AGAAAACCAAACCCCTCTAC
ERubLR_SQ01_G16	7	TC	50	acaggtatgaccatga GCACCCTAATCTCCATGACC	gttt CCGCTGTAGTTCTGTAGGC
ERubLR_SQ07_2_H02	4	CTAG	50	aacaggtatgaccatga TGGCAATCAACCACTGTG	gttt CAAACCTGACAAACGCTCTTCC
ERubLR_SQ01_I20	5	TA	50	aacaggtatgaccatga TCTTTTGCGGTGGCTACAAG	gttt CAACCCGAAGTCTACAACAGC

Примечания: ГС – группа сцепления; RM – repeat motif; t°C – температура отжига

Условия ПЦР следующие: денатурация 5 мин при 95°C, затем 30 циклов – 30 с при 95°C, температура отжига специфична для конкретной пары праймеров, экспериментально подобранная – 30 с, 72°C – 30 с; финальная элонгация 72°C – 10 мин. Анализ полиморфизма ранее опубликованных микросателлитных локусов (Woodhead et al., 2008) проводили методом разделения в 8 % полиакриламидном геле (ПААГ) с последующим окрашиванием нитратом серебра. Размеры фрагментов определяли с помощью маркера молекулярного веса 10 bp DNA Ladder.

Результаты и их обсуждение

Всего на ДНК 15 образцов в 11 микросателлитных локусах было амплифицировано 48 аллелей (таблица 3). В каждом отдельном локусе наблюдалась амплификация от 2 (ERubLR_SQ07_4_D05, ERubLR_SQ06_2_E01) до 8 фрагментов (ERubLR_SQ01_M20) при анализе всех 15 генотипов ежевики. Как наиболее полиморфные локусы можно выделить: RubEndo_SQ004_N23, ERubLR_SQ01_G16, ERubLR_SQ01_M20.

Большинство сортов и форм ежевики имеют четыре базовых набора хромосом ($2n=4x=28$). В нашей работе большинство сортов тетраплоиды (Agawam, Reuben, гибридная форма Т×С, Brzezina, Loch Maree, Ouachita, Thornfree, LochTay, Cacanska Besterna, Chester) и несколько - гексаплоиды (Karaka Black, Texas, Helen). Теоретически возможно наблюдать 4 разных фрагмента, амплифицируемых на ДНК одного тетраплоидного генотипа, что зависит от уровня гетерозиготности анализируемого локуса. В исследованиях разноплоидных гибридов яблони (Пикунова и др., 2018) наблюдалось 3...4 фрагмента у тетраплоидных генотипов.

У сортов Agawam, Renben, Bzzezina, Ouachita, Chester, Natchez во всех изучаемых локусах амплифицировалось от одной до двух аллелей. Например, у сорта Natchez

наблюдается от одной до двух аллелей по всем проанализированным локусам (например, в локусе ERubLR_SQ19_3_G09 аллель в приблизительном размере 232 п.н., в локусе ERubLR_SQ01_B06 две аллели с приблизительными размерами 214 и 226 п.н. соответственно).

Таблица 3 – Характеристика полиморфизма 11-ти микросателлитных локусов у анализируемой выборки 15-ти сортообразцов с детекцией на ПААГ

№	Локус	Наблюдаемое количество фрагментов	Приблизительные размеры аллелей (п.н.)
1 GAA	ERubLR_SQ19_1_A05	4	220, 225, 230, 240
2 AGCG	ERubLR_SQ01_B06	4	214, 222, 226, 230
3 AT	RubPara_SQ008_D04	5	262, 264, 266, 268, 270
4 AGC	ERubLR_SQ07_4_D05	2	267, 270
5 AT	ERubLR_SQ06_2_E01	2	163, 166
6 ATA	ERubLR_SQ01_M20	8	253, 256, 259, 271, 280, 283, 286, 292
7 TA	RubEndo_SQ004_N23	6	220, 224, 236, 240, 250, 270
8 GCTC	ERubLR_SQ19_3_G09	3	228, 232, 236
9 TC	ERubLR_SQ01_G16	7	220, 225, 230, 235, 240, 245, 260
10 CTAG	ERubLR_SQ07_2_H02	3	252, 260, 264
11 TA	ERubLR_SQ01_I20	4	225, 230, 245, 260

У ряда изучаемых сортов амплифицировалось от 1 до 3 аллелей по всем изучаемым локусам (у сортов Texas, гибридная форма TxС, Loch Mereе, Helen, Thornfree, LochTeу, Erie). Например, у гибридной формы TxС в локусе ERubLR_SQ01_G16 амплифицировалось 3 аллеля, у сорта Erie амплифицировался 1 аллель в локусе ERubLR_SQ019_3_G09. У сорта Sacanska Bestrna в локусе ERubLR_SQ01_M20 амплифицировалось 2 аллеля

В среднем один генотип тетраплоидного сорта по всем 11 локусам амплифицирует 18 аллелей. У гексаплоидных сортов амплифицировалось от 2 до 4 фрагментов (у сорта Karaka Black в локусе ERubLR_SQ01_G16 амплифицировалось 4 аллеля). Один гексаплоидный генотип в среднем амплифицирует 25 аллелей по всем локусам.

В работе М. Woodhead с соавт. (2008) было проанализировано 9 родов *Rubus* (*R. fruticosus*, *R. geoides*, *R. grabowski*, *R. idaeus*, *R. lacustre*, *R. macraei*, *R. mesogaeus*, *R. coreanus*, *R. strigosus*) и одна гибридная форма *Eubatus* × *Ideobatus* hybrid более чем по 20-ти микросателлитным локусам, в том числе по 11 локусам, которые изучались в нашей работе. В работе М. Woodhead с соавт. в локусах ERubLR_SQ19_1_A05, ERubLR_SQ01_B06, ERubLR_SQ07_4_D05, ERubLR_SQ06_2_E01, RubEndo_SQ004_N23, ERubLR_SQ19_3_G09, ERubLR_SQ07_2_H02 наблюдается наибольшее количество аллелей маркеров в сравнении с полученными нами данными. Причиной этому может служить наиболее разнообразная выборка. Однако в некоторых локусах, таких как RubPara_SQ008_D04, ERubLR_SQ01_M20 и ERubLR_SQ01_I20 в выборке, используемой в наших исследованиях, было обнаружено большее количество аллелей данных маркеров, то есть выборка оказалась более полиморфной.

Полиморфизм в микросателлитных локусах обусловлен, как правило, различным числом повторений определенного набора нуклеотидов – мотива. Мотив может состоять из разного числа нуклеотидов – от двух пар нуклеотидов (динуклеотидные повторы) и выше (три-, тетра- пентануклеотидные повторы). Соответственно, размеры аллелей могут отличаться минимум на 2 п.н. (если локус представляет собой динуклеотидные повторы), 3 п.н. (тринуклеотидный повтор), 4 п.н. (тетрануклеотидный повтор) и т.д. Некоторые авторы отмечают, что использование динуклеотидных повторов сопряжено с рядом недостатков, и

отмечают что наиболее удобны для практического использования микросателлиты ограничивающие повторяющиеся мотивы свыше динуклеотидных (Кветко и др., 2019)

Наиболее современным методом детекции полиморфизма микросателлитных локусов является разделение путём капиллярного электрофореза, поскольку позволяет различить фрагменты с разницей в одну пару нуклеотидов. Его минусом является необходимость наличия дорогостоящего оборудования, например, ABI prizm Genetic Analyser. Детекция в 8% полиакриламидном геле (ПААГ) так же может подходить для ряда задач при работе с микросателлитными локусами. В вопросах генетической паспортизации данную методику можно рассматривать как промежуточный диагностический этап, поскольку разрешающая способность ПААГ ограничена и чем ближе фрагменты по размеру, тем их сложнее разделить в геле. Визуальное разделение фрагментов зависит и от размеров фрагментов, так в диапазоне 150...200 п.н. фрагменты с разницей в 2 п.н. разделяются лучше, чем в диапазоне 200...250 п.н.

Разделение в ПААГ локусов с динуклеотидным повтором требует особенно длительной пробежки и идеальной окраски (рисунок 1). Однако, как прослеживается на представленной электрофореграмме, учет некоторых фрагментов затруднителен. Несмотря на это можно проследить что в локусе RubPara_SQ008_D04 на всех изучаемых генотипах амплифицируется 5 фрагментов с приблизительными размерами 262, 264, 266, 268, 270 п.н.

Легче учитывать данные при разделении ПЦР продуктов в ПААГ для локусов, представляющих три- и тетрануклеотидные повторы.

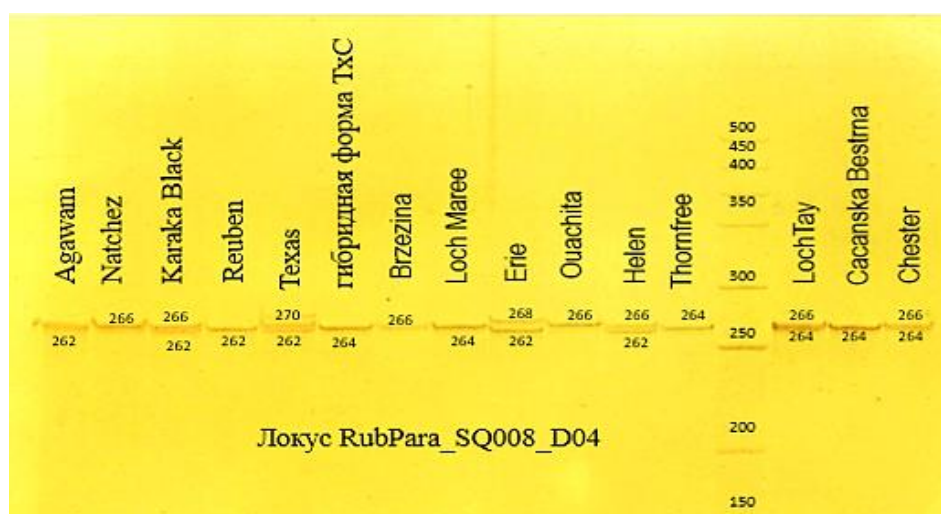


Рисунок 1 – Локус RubPara_SQ008_D04 по изучаемым сортам на 8 % полиакриламидном геле (ПААГ)

Выводы

На данном этапе методики амплификации по 11 микросателлитным локусам отработаны. Все локусы полиморфны. В дальнейшем данные локусы могут быть использованы для генетической паспортизации сортов ежевики и в работе с генетическими ресурсами.

Выявлены наиболее полиморфные локусы, амплифицирующие на данной выборке 6...8 аллелей (ERubLR_SQ01_M20, RubEndo_SQ004_N23, ERubLR_SQ01_G16). Анализ динуклеотидных локусов (RubPara_SQ008_D04, ERubLR_SQ06_2_E01, RubEndo_SQ004_N23, ERubLR_SQ01_G16, ERubLR_SQ01_I20) с учетом размеров повторяющихся мотивов рекомендуется проводить путём фрагментного электрофореза.

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литература

1. Гашенко Т.А., Фролова Л.В., Козловская З.А. Молекулярно-генетическая паспортизация сортов ежевики в Беларуси // Гродно: ГГАУ. 2020.
2. Грюнер Л.А., Корнилов Б.Б. Приоритетные направления и перспективы селекции ежевики в условиях средней полосы России // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2020. Т. 24, № 5. С. 489-500. <https://doi.org/10.18699/VJ20.641> EDN: [UGZQAO](#)
3. Дунаева С.Е., Красовская Л.С., Гавриленко Т.А. Сохранение генетических ресурсов рода *Rubus* (Rosaceae) *ex situ* (обзор) // Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. 2022. Т. 183, № 1. С. 236-253. <https://doi.org/10.30901/2227-8834-2022-1-236-253> EDN: [VYRUCH](#)
4. Каган Д.И., Шестибратов К.А., Лебедев В.Г., Азарова А.Б., Филиппов М.С., Бесов С.А., Барсукова М.М. Паспортизация сортов малины и ежевики и изучение их филогенетических взаимоотношений методом RAPD-анализа // Биотехнологические приемы в сохранении биоразнообразия и селекции растений: материалы конференции. Минск, 2014. С. 101-104. EDN: [ZBVWAH](#)
5. Кветко Е.П., Кузмицкая П.В., Межнина О.А., Урбанович О.Ю. Разработка и анализ SSR-маркеров для идентификации сортов и видов представителей рода *Malus* // Селекция и сорторазведение садовых культур. 2019. Т. 6, № 2. С. 30-33. EDN: [VLIWUX](#)
6. Лебедев В.Г., Субботина Н.М., Киркач В.В., Видягина Е.О., Поздняков И.А., Шестибратов К.А. Анализ микросателлитных локусов как первый этап на пути к маркерной селекции малины и земляники // Селекция и сорторазведение садовых культур. 2018. Т. 5, № 1. С. 65-68. EDN: [UJGETS](#)
7. Пикунова, А.В., Седов, Е.Н., Токмаков, С.В., Супрун, И.И., Горбачева, Н.Г., Должикова, М.А., Серова, З. М. Полиморфизм микросателлитных локусов разноплоидных генотипов яблони (*Malus domestica* Borkh.) // Генетика. 2018. Т. 54, № 4. С. 447-455. <https://doi.org/10.7868/S0016675818040069> EDN: [YWMRSO](#)
8. Субботина Н.М., Лебедев В.Г., Шестибратов К.А. Генотипирование сортов малины, ежевики и малино-ежевичных гибридов с использованием микросателлитных маркеров // Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и сельскохозяйственной микробиологии: материалы конференции. М., 2019. С. 53-54. EDN: [TWTSRJ](#)
9. Bussemeyer D.T., Pelikan S., Kennedy R.S., Rogstad S.H. Genetic diversity of Philippine *Rubus moluccanus* L. (*Rosaceae*) populations examined with VNTR DNA probes // Journal of Tropical Ecology. 1997. Vol. 13, N 6. P. 867-884. <https://doi.org/10.1017/S0266467400011044>
10. Castillo N.R.F., Reed B.M., Graham J., Fernandez-Fernandez F., Bassil N.V. Microsatellite markers for raspberry and blackberry // Journal of the American Society for Horticultural Science. 2010. Vol. 135, N 3. P. 271-278. <https://doi.org/10.21273/JASHS.135.3.271>
11. Doyle J.J., Doyle J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue // Focus. 1990. Vol. 12, N 1. P.13-15.
12. Graham J., Jennings N. Raspberry breeding // Breeding plantation tree crops: temperate species. New York: Springer, 2009. P. 233-248. https://doi.org/10.1007/978-0-387-71203-1_7
13. Graham J., Smith K., Woodhead M., Russell J.R. Development and use of simple sequence repeat SSR markers in *Rubus* species // Molecular Ecology Notes. 2002. Vol. 2, N 3. P. 250-252. <https://doi.org/10.1046/j.1471-8286.2002.00203.x>
14. Lee G.A., Song J.Y., Choi H.R., Chung J.W., Jeon Y.A., Lee J.R., Ma K.H., Lee M.C. Novel microsatellite markers acquired from *Rubus coreanus* Miq. and cross-amplification in other *Rubus* species // Molecules. 2015. Vol. 20, N 4. P. 6432-6442 <https://doi.org/10.3390/molecules20046432>
15. Lewers K., Saski C., Cuthbertson B., Henry D., Staton M., Main D., Dhanaraj A., Rowland L., Tomkins J. A blackberry (*Rubus* L.) expressed sequence tag library for the development of simple sequence repeat markers // BMC Plant Biology. 2008. Vol. 8, N 1. P. 1-8.

16. Lopez A., Barrera C., Marulanda M. Evaluation of SSR and SNP markers in *Rubus glaucus* Benth progenitors selection // *Revista Brasileira de Fruticultura*. 2019. Vol. 41. <https://doi.org/10.1590/0100-29452019081>
17. Woodhead, M., Smith, K., Williamson, S., Cardle, L., Mazzitelli, L., Graham, J. Identification, characterisation and mapping of simple sequence repeat (SSR) markers from raspberry root and bud ESTs // *Molecular breeding*. 2008. Vol. 22, N 4. P. 555-563. <https://doi.org/10.1007/s11032-008-9198-y>

References

1. Gashenko, T.A., Frolova, L.V., & Kozlovskaya, Z.A. (2020). *Molecular genetic certification of blackberry cultivars in Belarus*. Grodno: GGAU. (In Russian).
2. Gruner, L.A., & Kornilov, B.B. (2020). Priority directions and prospects of blackberry breeding in the conditions of central Russia. *Vavilovsky journal of genetics and breeding*, 24, 489-500. <https://doi.org/10.18699/VJ20.641> EDN: [UGZAOA](https://doi.org/10.18699/VJ20.641) (In Russian, English abstract).
3. Dunaeva, S.E., Krasovskaya, L.S., & Gavrilenko, T.A. (2022). Preservation of genetic resources of the genus *Rubus* (*Rosaceae*) ex situ (review). *Proceedings on applied botany, genetics and breeding*, 183(1), 236-253. <https://doi.org/10.30901/2227-8834-2022-1-236-253> EDN: [VYRUCH](https://doi.org/10.30901/2227-8834-2022-1-236-253) (In Russian, English abstract).
4. Kagan, D.I., Shestibratov, K.A., Lebedev, V.G., Azarova, A.B., Filippov, M.S., Besov, S.A., & Barsukova, M.M. (2014). Certification of raspberry and blackberry cultivars and study of their phylogenetic relationships by RAPD-analysis method. In *Biotechnological techniques in biodiversity conservation and plant breeding: proc. sci. conf.* (pp. 101-104). Minsk., EDN: [ZBVVAH](https://doi.org/10.18699/VJ20.641) (In Russian).
5. Kvetko, E.P., Kuzmitskaya, P.V., Mezhnina, O.A., & Urbanovich, O.Yu. (2019). Development and analysis of SSR markers for identification of cultivars and species of *Malus* representatives. *Breeding and variety cultivation of fruit and berry crops*, 6(2), 30-33. EDN: [VLIWUX](https://doi.org/10.18699/VJ20.641) (In Russian, English abstract).
6. Lebedev, V.G., Subbotina, N.M., Kirkach, V.V., Vidyagina, E.O., Pozdnyakov, I.A., & Shestibratov, K.A. (2018). Analysis of microsatellite loci as the first stage on the way to marker selection of raspberries and strawberries. *Breeding and variety cultivation of fruit and berry crops*, 5(1), 65-68. EDN: [UUGETS](https://doi.org/10.18699/VJ20.641) (In Russian, English abstract).
7. Pikunova, A.V., Sedov, E. N., Tokmakov, S. V., Suprun, I.I., Gorbacheva, N.G., Dolzhikova, M.A., & Serova, Z.M. (2018). Polymorphism of microsatellite loci of apple genotypes of different ploidy (*Malus domestica* Borkh.). *Genetika*, 54(4), 447-455. <https://doi.org/10.7868/S0016675818040069> EDN: [YWMRSO](https://doi.org/10.7868/S0016675818040069) (In Russian, English abstract).
8. Subbotina, N.M., Lebedev, V.G., & Shestibratov, K.A. (2019). Genotyping of raspberry, blackberry cultivars and raspberry-blackberry hybrids using microsatellite markers. In *Biotechnology in crop production, animal husbandry and agricultural microbiology: proc. sci. conf.* (pp. 53-54). Moscow. EDN: [TWTSRJ](https://doi.org/10.18699/VJ20.641) (In Russian).
9. Bussemeyer, D.T., Pelikan, S., Kennedy, R.S., & Rogstad, S.H. (1997). Genetic diversity of Philippine *Rubus moluccanus* L. (*Rosaceae*) populations examined with VNTR DNA probes. *Journal of tropical ecology*, 13(6), 867-884. <https://doi.org/10.1017/S0266467400011044>
10. Castillo, N.R.F., Reed, B.M., Graham, J., Fernandez-Fernandez, F., & Bassil, N.V. (2010). Microsatellite markers for raspberry and blackberry. *Journal of the American society for horticultural science*, 135(3), 271-278. <https://doi.org/10.21273/JASHS.135.3.271>
11. Doyle, J.J., & Doyle, J.L. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12(1), 13-15.
12. Graham, J., & Jennings, N. (2009). Raspberry breeding. In *Breeding plantation tree crops: temperate species* (pp. 233-248). Springer. https://doi.org/10.1007/978-0-387-71203-1_7

13. Graham, J., Smith, K., Woodhead, M., & Russell, J.R. (2002). Development and use of simple sequence repeat SSR markers in *Rubus* species. *Molecular ecology notes*, 2(3), 250-252. <https://doi.org/10.1046/j.1471-8286.2002.00203.x>
14. Lee, G.A., Song, J.Y., Choi, H.R., Chung, J.W., Jeon, Y.A., Lee, J.R., Ma, K.H., & Lee, M.C. (2015). Novel microsatellite markers acquired from *Rubus coreanus* Miq. and cross-amplification in other *Rubus* species. *Molecules*, 20(4), 6432-6442 <https://doi.org/10.3390/molecules20046432>
15. Lewers, K., Saski, C., Cuthbertson, B., Henry, D., Staton, M., Main, D., Dhanaraj, A., Rowland, L., & Tomkins, J. (2008). A blackberry (*Rubus* L.) expressed sequence tag library for the development of simple sequence repeat markers. *BMC plant biology*, 8(1), 1-8. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-8-69>
16. Lopez, A., Barrera, C., & Marulanda, M. (2019). Evaluation of SSR and SNP markers in *Rubus glaucus* Benth progenitors selection. *Revista brasileira de fruticultura*, 41. <https://doi.org/10.1590/0100-29452019081>
17. Woodhead, M., Smith, K., Williamson, S., Cardle, L., Mazzitelli, L., & Graham, J. (2008). Identification, characterisation and mapping of simple sequence repeat (SSR) markers from raspberry root and bud ESTs. *Molecular breeding*, 22(4), 555-563. <https://doi.org/10.1007/s11032-008-9198-y>

Авторы:

Мария Александровна Должикова, аспирант, младший научный сотрудник лаборатории биохимической генетики ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт селекции плодовых культур», dolzhikova@vniispk.ru

Анна Викторовна Пикунова, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник, зав. лабораторией биохимической генетики ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт селекции плодовых культур», pikunova@vniispk.ru

Анна Андреевна Павленко, младший научный сотрудник лаборатории биохимической генетики ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт селекции плодовых культур», pavlenko@vniispk.ru

Лидия Андреевна Грюнер, кандидат сельскохозяйственных наук, ведущий научный сотрудник лаборатории селекции, сортоизучения и сортовой агротехники крыжовника, малины и земляники ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт селекции плодовых культур», gruner@vniispk.ru

Борис Борисович Корнилов, кандидат сельскохозяйственных наук, старший научный сотрудник лаборатории селекции, сортоизучения и сортовой агротехники крыжовника, малины и земляники ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт селекции плодовых культур», kornilov@vniispk.ru

Authors details:

Maria Dolzhikova, PhD student, junior researcher in biochemical genetics laboratory of Russian Research Institute of Fruit Crop Breeding (VNIISPK), dolzhikova@vniispk.ru

Anna Pikunova, PhD in Biology, leading researcher, Head of biochemical genetics laboratory of Russian Research Institute of Fruit Crop Breeding (VNIISPK), pikunova@vniispk.ru

Anna Pavlenko junior researcher in biochemical genetics laboratory of Russian Research Institute of Fruit Crop Breeding (VNIISPK), pavlenko@vniispk.ru

Lydia Gruner, PhD in Agriculture, leading researcher in laboratory of selection and variety study of gooseberries, raspberries and strawberries of Russian Research Institute of Fruit Crop Breeding (VNIISPK), gruner@vniispk.ru

Boris Kornilov, PhD in Agriculture, senior researcher in laboratory of selection and variety study of gooseberries, raspberries and strawberries of Russian Research Institute of Fruit Crop Breeding (VNIISPK), kornilov@vniispk.ru