

УДК 634.721:577.21

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ СПОСОБОВ ВЫДЕЛЕНИЯ ДНК ИЗ ЗАМОРОЖЕННЫХ ЛИСТЬЕВ СМОРОДИНЫ ЧЕРНОЙ

А.А. Гузеева¹ , И.А. Капитова¹, Ф.Ф. Сазонов¹

¹ФГБНУ «Федеральный научный селекционно-технологический центр садоводства и питомниководства», 115598, Россия, г. Москва, ул. Загорьевская, д. 4, fncsad@fncsad.ru

Аннотация

В статье представлены результаты сравнительного анализа различных способов выделения ДНК из замороженных листьев смородины чёрной для оценки генетического разнообразия сортов с помощью SSR-маркеров. В задачи исследования входило подобрать и оценить эффективность различных способов выделения ДНК для растительного материала с высоким содержанием полифенольных соединений, используя, в том числе готовые коммерческие наборы, а по результатам оценки качества выделенной ДНК и ПЦР анализа при необходимости, провести модификацию метода. В результате исследований была выделена ДНК из замороженных листьев 12 сортов смородины чёрной селекции ФНЦ Садоводства различными способами выделения ДНК на основе детергента СТАВ: по D. Puchooa для растительного материала с высоким содержанием полифенольных соединений с модификациями, способом выделения ДНК из косточковых культур в присутствии СТАВ с модификациями, используемым в ФНЦ Садоводства, коммерческими наборами для выделения растительной ДНК «СОРБ-ГМО-Б» (ЗАО Синтол) и «Plant DNA Isolation Kit» (FOREGENE)). Полученная ДНК исследовалась на спектрофотометре и с помощью ПЦР анализа. В результате оценки качества выделенной ДНК удалось определить наиболее эффективные и нетрудоемкие способы выделения ДНК из замороженных листьев смородины чёрной. Способ выделения ДНК, используемый в ФНЦ Садоводства, показал высокий выход ДНК и достаточную для проведения ПЦР анализа чистоту. Результаты оценки способов выделения ДНК из замороженных листьев смородины чёрной коммерческими наборами показали небольшой выход ДНК (до 30 нг/мл), сравнительно высокую чистоту выделенного образца, но при этом, оказались менее трудоемкими, чем два предыдущих метода. ПЦР анализ с идентификацией SSR-маркеров позволил определить наиболее эффективный способ выделения ДНК из замороженных листьев смородины черной – способ, используемый в ФНЦ Садоводства, который является рентабельным в использовании, благодаря экономии реактивов, а за счёт большого выхода ДНК позволяет проводить оценку генетического разнообразия для большего количества локусов.

Ключевые слова: ДНК, СТАВ, смородина черная, ПЦР

COMPARATIVE ANALYSIS OF DNA EXTRACTION METHODS FROM FROZEN BLACK CURRANT LEAVES

A.A. Guzeeva¹ , I.A. Kapitova¹, F.F. Sazonov¹

¹Federal Horticultural Research Center for Breeding, Agrotechnology and Nursery, 115598, Russia Federation, Moscow, Zagor'evskaya st., 4, fncsad@fncsad.ru

Abstract

The article presents the results of a comparative analysis of various methods of DNA extraction from frozen black currant leaves to assess the genetic diversity of varieties using SSR markers.

The objectives of the study included selecting and assessing the effectiveness of various methods for extracting DNA for plant material with a high content of polyphenolic compounds, including using ready-made commercial kits, and, based on the results of assessing the quality of the extracted DNA and PCR analysis, modifying the method if necessary. As a result of the research, DNA was isolated from frozen leaves of 12 blackcurrant varieties bred by the Federal State Budgetary Scientific Institution Federal Scientific Center of Horticulture using various methods of DNA isolation based on the CTAB detergent: according to D. Puchooa for plant material with a high content of polyphenolic compounds with modifications, a method for DNA isolation from stone fruit crops in the presence of CTAB with modifications used at the Federal Scientific Center of Horticulture, commercial kits for the isolation of plant DNA "SORB-GMO-B" (ZAO Sintol) and "Plant DNA Isolation Kit" (FOREGENE). The obtained DNA was analyzed using a spectrophotometer and PCR analysis. As a result of assessing the quality of the isolated DNA, it was possible to determine the most effective and labor-saving methods for isolating DNA from frozen black currant leaves. The DNA isolation method used in the Federal Scientific Center of Horticulture showed a high DNA yield and sufficient purity for PCR analysis. The results of assessing the methods for isolating DNA from frozen black currant leaves using commercial kits showed a low DNA yield (up to 30 ng/ml), a relatively high purity of the isolated sample, but at the same time, they were less labor-intensive than the two previous methods. PCR analysis with the identification of SSR markers made it possible to determine the most effective method for isolating DNA from frozen black currant leaves – the method used in the Federal Scientific Center of Horticulture, which is cost-effective in use due to the saving of reagents, and due to the high DNA yield, it allows assessing the genetic diversity for a larger number of loci.

Key words: DNA, CTAB, black currant, PCR

Введение

Смородина чёрная (*Ribes nigrum* L.) – урожайная и доходная культура, которая занимает особое место среди широко распространенных ягодных культур садов России. Популярность её объясняется витаминной ценностью плодов, неприхотливостью к условиям возделывания, высокой и стабильной продуктивностью (Жидёхина и др., 2007; Князев и др., 2016; Сазонова, 2017). Урожайность современных сортов смородины чёрной отечественной селекции составляет от 10,5 до 12,5 т/га, максимально до 15,0 т/га (Евдокименко и др., 2022). Смородина чёрная является одним из лидеров среди ягодников по накоплению в плодах витамина С, для обеспечения суточной потребности в аскорбиновой кислоте достаточно всего 15...20 ягод смородины. Кроме аскорбиновой кислоты ягоды содержат каротин, сахара, витамины Р, В, пектиновые вещества, органические кислоты, антоцианы, соли калия, кальция, железа, магния, натрия, марганца и фосфора (Макаркина и др., 2017; Сазонова, 2021). Культивирование смородины чёрной представляет экономический интерес благодаря возможности механизации большинства агротехнических мероприятий при возделывании, включая уборку урожая (Князев и др., 2014; Сазонов, Даньшина, 2016; Panfilova et al., 2021).

Методы молекулярной селекции растений позволяют создавать принципиально новые сорта для решения проблем продовольственной безопасности, повышения уровня жизни и здоровья населения (Куликов и др., 2021). На сегодняшний день для ускорения селекционного процесса большое значение имеют ДНК-технологии для защиты авторских прав оригинаторов сортов. Поэтому, для оценки генетического разнообразия, так важно использовать наиболее эффективные молекулярно-генетические методы, в том числе и метод выделения ДНК. Выделение ДНК является первым этапом оценки генетического разнообразия, от качества проведения которого зависит вся результативность дальнейших

исследований (получение и разделение ПЦР фрагментов по длинам). Разрушение клеточной мембраны в классических методах выделения ДНК обычно проводят механическим путем в водных растворах в присутствии детергентов и хелатирующих агентов, подавляющих нуклеазную активность. Удаление белковых примесей осуществляют в ходе экстракции фенолом или с помощью депротеинизирующего препарата с протеиназой. Процедура последующей очистки весьма разнообразна и в большей степени зависит от целей эксперимента (Edwardsetal., 1991; Pomsetal., 2001; Пикунова и др., 2019).

С целью совершенствования метода выделения ДНК нами была проведена оценка эффективности различных способов экстракции ДНК из замороженных листьев смородины черной коллекции ФНЦ Садоводства для дальнейшей оценки генетического разнообразия с помощью SSR-маркеров. Установление уникальных генетических профилей смородины чёрной на сегодняшний день является актуальной задачей, решение которой позволит в дальнейшем проводить точную идентификацию сорта для его паспортизации. Для решения поставленных задач на первом этапе необходимо было определить наиболее эффективный способ выделения ДНК, осуществив подбор и сравнительный анализ различных вариантов выделения ДНК из замороженных листьев смородины чёрной и модифицировать их при необходимости.

Материалы и методы

Объектами исследования были 12 сортов смородины черной селекции ФГБНУ ФНЦ Садоводства (Бармалей, Брянский Агат, Дебрянск, Миф, Чародей, Гамаюн, Стрелец, Вера, Кудесник, Фаворит, Каскад, Подарок Ветеранам). Представленные сорта относятся к наиболее перспективным для изучения их генетического разнообразия, так как обладают ценными хозяйственными признаками (зимостойкость, устойчивость к засухе, мучнистой росе, листовым пятнистостям, почковому клещу), но не изучены всесторонне (Сазонов, 2021). Отобранные листья смородины чёрной были заморожены на два месяца в кельвинаторе U535 Innovac температурой ниже минус 70°C. Для оценки эффективности способов выделения ДНК из замороженных листьев смородины черной были выбраны четыре различных способа выделения растительной ДНК из замороженных листьев по методике, предложенной D. Puchooa (2004) для растительного материала с высоким содержанием полифенольных соединений с модификациями; способ выделения ДНК из косточковых культур с модификациями, используемый в ФНЦ Садоводства; коммерческий набор для выделения растительной ДНК «СОРБ-ГМО-Б» (ЗАО Синтол); коммерческий набор для выделения растительной ДНК «Plant DNA Isolation Kit» (FOREGENE) (Наборы реагентов для выделения ДНК; Набор для выделения ДНК, FOREGENE, Китай).

На первом этапе были выделены образцы растительной ДНК из 12 сортов смородины чёрной в двух повторностях от каждого сорта четырьмя разными способами в количестве 96 проб с ДНК. Для выделения ДНК смородины во всех случаях брали по 100 мг замороженных листьев на каждую пробу. Выделение ДНК по D. Puchooa (2004) выполнялось в следующем порядке: измельчили пробы в присутствии лизирующего раствора (100mM Tris pH=8.0, 20mM EDTA pH=8.0, 2M NaCl, 2% поливинилпироллидон, 5% меркаптоэтанол, 2% СТАВ, 10 mM AcNH₄); после нагревания при 60°C осадили клеточный дербис с помощью хлороформа; отобрали и перенесли в верхнюю фазу в новую пробирку; повторно добавили хлороформ и повторили процедуру; осадили осадок с помощью изопропанола и слили жидкость; промыли осадок буфером TE, 75% этанолом, 10mM AcNH₄, а затем удалили жидкость; осадок подсушили до исчезновения блеска, затем растворили в TE; повторно осадили ДНК с помощью изопропанола и слили жидкость; повторили отмывку с 70% и 80% растворами этанола; просушили осадок и растворили в воде высокой степени очистки (mQ).

Способ выделения ДНК из косточковых культур с модификациями проводили в следующем порядке: гомогенизировали образцы замороженных листьев в лизирующем СТАВ-буфере (1М Трис, 0,5М ЭДТА, 5М NaCl, 2% ЦТАБ, 1,5% ПВП, 5% меркаптоэтанол); после инкубирования при 65°C в течение 60 минут, осадили клеточный дербис с помощью смеси хлороформа с изоамилового спирта (24 : 1); в отобранную и перенесенную в чистую пробирку надосадочную жидкость добавили чистый изопропиловый спирт охлаждённый до минус 20°C и оставили осаждаться при минус 20°C в течение 30...60 минут; осадили ДНК с помощью центрифугирования; провели многократную очистку с помощью 70% раствора этилового спирта и подсушили; растворили ДНК в дистиллированной автоклавированной воде.

Выделение ДНК двумя коммерческими наборами проводились в строгом соответствии с инструкцией к набору. Оценку эффективности выделения ДНК и её качества проводили вначале с помощью изменения концентрации ДНК на спектрофотометре BioSpectrometer Eppendorf fluorescence, а затем провели ПЦР-анализ для определения SSR-маркеров. Оценка результатов измерения на спектрофотометре проводилась по следующим параметрам: общее количество ДНК (нг/мл); отношение поглощения на длинах волн 260 и 280 нм (A260/280) для оценки чистоты препарата оптимальный показатель – 1,8...1,9; отношение поглощения на длинах волн 260 и 230 нм (A260/230), для оценки чистоты препарата оптимальный показатель около 1,8.

ПЦР-анализ проводился с помощью 12 пар специфичных праймеров к 12 SSR-маркеров (e1-021, g2-H21, g2-L17, e4-D03, g1-E03, g2-B20, g1-M07, e3-B02, e1-001, g1-K04, g2-J08, g2-G12) (Межнина, Урбанович 2017). Выполнен классический метод ПЦР с отдельной амплификацией с каждой парой праймеров на амплификаторе Gene Explorer (BIOER). Реакцию амплификации проводили в реакционной смеси объемом 20 мкл, содержащей 2,5 мкл 0,2 мМ dNTP; 2,5 мкл 10хПЦР буфер; 0,5 мкл 0,3Е Taq ДНК-полимераза; 2,5 мкл 25мМ MgCl₂, 1мкл 0,5 мкМ праймера и 100 нг геномной ДНК на реакцию, в термоциклере Gene Explorer (BIOER) в режиме: предварительная денатурация – 15 мин. при 94°C, 35 циклов повторяется: денатурация – 30 сек. при 94°C; отжиг праймеров – 45 сек. 50...56°C в зависимости от температуры плавления праймеров; синтез ДНК – 1 мин. при 72°C; элонгация – 5 мин. при 72°C.

Детекция ПЦР продуктов проводилась при помощи электрофореза в 2% агарозном геле в режиме постоянного напряжения 100 V.

Результаты и их обсуждение

Оценка выбранных способов выделения ДНК проводилась в три этапа. На первом этапе были выделены образцы растительной ДНК из 12 сортов чёрной смородины в двух повторностях от каждого сорта четырьмя разными способами. Повторно провели выделение ДНК способом по D. Puchooa и используемым в ФНЦ Садоводства способом выделения ДНК из косточковых культур с модификациями, позволяющими увеличить выход ДНК из смородины черной высокого качества. Оба апробированных способа выделения ДНК достаточно трудоёмки и занимают в среднем от 6 до 7 часов. На втором этапе все выделенные образцы были проанализированы на спектрофотометре. По результатам измерения концентрации выделенной растительной ДНК были отобраны образцы ДНК из нескольких повторов, наиболее высокого качества для дальнейшего ПЦР анализа (таблица 1).

После выделения растительной ДНК из листьев 12 сортов смородины чёрной различными методами полученные образцы ДНК были протестированы на пригодность к проведению ПЦР анализа. Оценка эффективности ПЦР проводилась посредством сопоставления полученных результатов ПЦР выделенной ДНК четырьмя указанными способами. ПЦР продукты

предварительно визуализировали на агарозном геле для подтверждения успешной амплификации нужных участков ДНК смородины черной (рисунок 1).

Таблица 1 – Результаты измерения концентрации ДНК в образцах смородины чёрной с вычислением поглощения на длинах волн 260/280 и 260/230 нм

Сорт	Способ выделения ДНК (по D. Puchooa, 2004)*			Способ выделения ДНК (используемый в ФНЦ Садоводства)*			Набор для выделения растительной ДНК «СОРБ-ГМО-Б» (ЗАО Синтол)			Набор для выделения растительной ДНК «Plant DNA Isolation Kit» (FOREGENE)		
	нг/мл	A260/A280	A260/A230	нг/мл	A260/A280	A260/A230	нг/мл	A260/A280	A260/A230	нг/мл	A260/A280	A260/A230
Бармалей	151,1	1,41	1,77	297,5	2,03	1,79	36,1	1,96	1,81	70,1	1,91	1,88
Брянский Агат	148,3	1,56	1,81	310,1	2,02	1,86	55,9	1,95	1,88	65,8	1,94	1,91
Дебрянск	170,6	1,62	1,85	384,9	1,99	1,89	44,2	2,08	1,91	76,5	2,08	1,82
Миф	210,2	1,76	1,56	567,9	1,93	1,86	52,3	1,97	1,93	33,1	1,96	1,81
Чародей	225,3	1,26	1,62	259,9	2,03	1,89	60,9	1,94	2,3	59,9	1,96	1,88
Гамаюн	162,4	1,78	1,73	326,4	2,01	1,92	93,5	2,01	1,84	44,2	2,13	1,90
Стрелец	136,6	1,92	1,79	335,3	1,99	1,91	40,9	2,01	1,88	67,6	1,97	1,84
Вера	159,6	1,59	2,61	297	2,02	1,86	55,5	2,06	1,92	72,9	2,03	1,79
Кудесник	125,8	1,88	1,46	239,1	1,93	1,94	39,6	1,96	1,84	46,4	2,06	1,87
Фаворит	110,3	2,01	2,52	173,0	2,07	1,94	73,6	1,99	1,93	58,1	1,96	1,88
Каскад	126,7	1,89	2,01	208,2	2,00	1,85	55,7	1,78	1,88	63,8	2,09	1,91
Подарок Ветеранам	134,1	1,72	1,86	189,4	1,99	1,87	56,0	1,82	1,97	48,6	1,97	1,79

Примечание: звездочкой отмечены методы выделения ДНК с модификацией

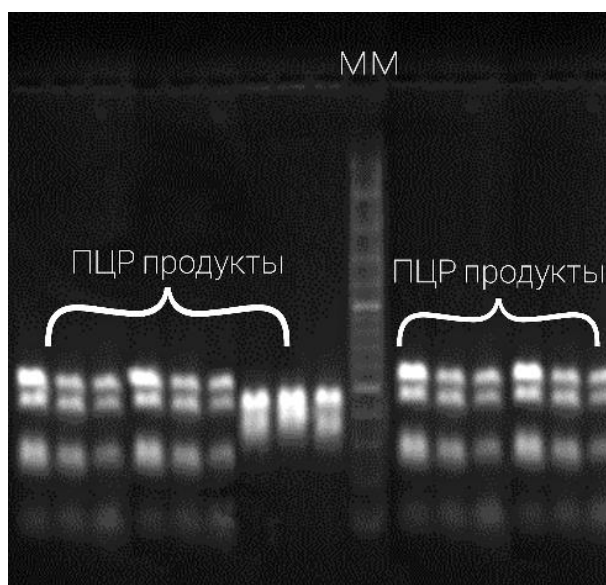


Рисунок 1 – Электрофореграмма продуктов амплификации с SSR праймерами на 12 сортах смородины черной (2% агарозный гель, окрашенный бромистым этидием; ММ-маркер молекулярного веса)

ПЦР-анализ с помощью 12 SSR-маркеров выполненный классическим методом ПЦР позволил визуализировать каждый локус отдельно и оценить возможность его дальнейшего разделения на генетическом анализаторе (рисунок 2).



Рисунок 2 – Электрофореграмма продуктов амплификации с праймерами 25G1-K04

Параметрами оценки являлись уровень чувствительности ПЦР и воспроизводимость результатов ПЦР в процентах, рассчитанных на каждый метод отдельно, с учетом наличия/отсутствия фоновой амплификации (шмеры на электрофореграмме) (таблица 2).

Таблица 2 – Оценка эффективности выделения растительной ДНК из листьев смородины чёрной по результатам обнаружения продукта ПЦР после электрофоретической детекции в 2% агарозном геле

Сорт	Способ выделения ДНК (по D. Puchooa, 2004)*		Способ выделения ДНК (используемый в ФНЦ Садоводства)*		Набор для выделения растительной ДНК «СОРБ-ГМО-Б» (ЗАО Синтол)		Набор для выделения растительной ДНК «Plant DNA Isolation Kit» (FOREGENE)	
	Проба1	Проба2	Проба1	Проба2	Проба1	Проба2	Проба1	Проба2
Бармалей	+	+	+	+	+	+	+	+/-
Брянский Агат	-	+	+	+	+	+	+	+
Дебрянск	+	+	+	+	+	+	+	+
Миф	+	+	+	+	+	+	+	+
Чародей	+	+	+	+	+	+	+	+
Гамаюн	+	+	+	+/-	+/-	-	+	+
Стрелец	+/-	-	+	+	+	+	+/-	+
Вера	+	+/-	+	+	+	+	+	+
Кудесник	+	+	+	+	+	+	+	+
Фаворит	+	+/-	+	+	+	+	+	+
Каскад	+	+	+	+	+	+	+	+
Подарок Ветеранам	+	+	+	+	+	+	+	+/-
Чувствительность ПЦР, %	0,5		0,1		0,1		0,1	
Воспроизводимость результатов ПЦР, %	81		99		92		88	
Наличие фоновой амплификации	+		-		-		+	

Примечания: звездочкой выделены методы выделения ДНК с модификацией; плюс (+) – обнаружены продукты ПЦР; минус (-) – не обнаружены продукты ПЦР; плюс/минус (+/-) – сомнительный результат.

Чувствительность ПЦР анализировали после разведения полученных продуктов ПЦР и визуализации их посредством электрофореза. В первой пробирке концентрация раствора составила 1 : 10, во второй – 1 : 100, в третьей – 1 : 1000, и так далее. Вместе с

чувствительностью ПЦР также параллельно оценивалась воспроизводимость результатов ПЦР, путем постановки каждого из разведенного образца ПЦР в двух повторностях (проба 1 и проба 2) для подсчета процента обнаружения/отсутствия продуктов ПЦР.

Результат ПЦР анализа показал, что наилучшие показатели эффективности метода (чувствительность – 0,1%, воспроизводимость – 99%, отсутствие фоновой амплификации) были получены у образцов, выделенных способом используемым в ФНЦ Садоводства. На втором месте по эффективности оказался коммерческий набор «СОРБ-ГМО-Б» (ЗАО Синтол), чувствительность которого составила 0,1%, воспроизводимость 92% и также отсутствовала фоновая амплификация. На третьем месте по эффективности оказался коммерческий набор для выделения растительной ДНК «Plant DNA Isolation Kit» (FOREGENE). Его чувствительность составила 0,1%, воспроизводимость 88%, при этом были обнаружены шмеры на электрофореграмме. Метод выделения растительной ДНК по D. Puchooa (2004), показал среднюю чувствительность (0,5%), невысокую воспроизводимость результатов ПЦР (81%), а также выявлены фоновые продукты амплификации.

Заключение

По результатам оценки эффективности выделения ДНК из замороженных листьев 12 сортов смородины черной селекции ФГБНУ ФНЦ Садоводства удалось выделить наиболее эффективные и нетрудоемкие способы выделения ДНК. Результаты оценки эффективности способов выделения ДНК из замороженных листьев смородины чёрной готовыми коммерческими наборами показали небольшой выход ДНК (в среднем 30 нг/мл), сравнительно высокую чистоту выделенного образца, что подтверждено результатами эффективности ПЦР анализа, при этом оказались менее трудоемкими, чем два других способа.

Полученные результаты исследований позволяют рекомендовать для выделения ДНК из замороженных листьев смородины чёрной для оценки генетического разнообразия культуры с помощью SSR-маркеров способ выделения ДНК из косточковых культур с модификацией, используемый в ФНЦ Садоводства, так как он, несмотря на свою трудоемкость в исполнении, является эффективным и даёт высокий выход ДНК (170...380 нг/мл), которой хватает на большое количество ПЦР реакций.

Финансирование

Работа выполнена в рамках государственного задания по теме «FGUW-0432-2022-0001 Воспроизводство и сохранение ценных генотипов плодовых и ягодных культур методами новых биотехнологий».

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литература

1. Евдокименко С.Н., Сазонов Ф.Ф., Андропова Н.В., Козак Н.В., Имамкулова З.А., Подгаецкий М.А. Ягодные культуры: биологические особенности, сорта и технологии возделывания: монография // под науч. ред. акад. РАН И.М. Куликова. М.: ФНЦ Садоводства, 2022. 368.
2. Жидехина Т.В., Родюкова О.С., Магомедова С.А., Бочарова Т.Е. Оценка новых сортов смородины чёрной // Садоводство и виноградарство. 2007. 5. 15-16. <https://www.elibrary.ru/ibitcb>
3. Куликов И.М., Евдокименко С.Н., Тумаева Т.А., Келина А.В., Сазонов Ф.Ф., Андропова Н.В., Подгаецкий М.А. Научное обеспечение ягодоводства России и перспективы его

- развития // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2021. 25, 4. 414-419. <https://doi.org/10.18699/VJ21.046>
4. Князев С.Д., Левгерова Н.С., Макаркина М.А., Пикунова А.В., Салина Е.С., Чекалин Е.И., Янчук Т.В., Шавыркина М.А. Селекция чёрной смородины: методы, достижения, направления. Орёл: ВНИИСПК, 2016. 328. <https://www.elibrary.ru/vwpjyb>
 5. Князев С.Д., Пикунова А.В., Бахотская А.Ю., Чекалин Е.И., Шавыркина М.А. Инновационные направления селекционных исследований смородины чёрной // Селекция и сорторазведение садовых культур. 2014. 1. 192-211. <https://www.elibrary.ru/uqezep>
 6. Макаркина М.А., Янчук Т.В., Князев С.Д. Оценка и отбор исходного материала для селекции смородины черной на улучшение химического состава ягод. Орел: ВНИИСПК, 2017. 168. <https://www.elibrary.ru/yrewxu>
 7. Межнина О.А., Урбанович О.Ю. Генетическое разнообразие сортов смородины черной (*Ribes nigrum*) в Беларуси // Вестник Национальной академии наук Белоруссии. Серия биологических наук, 2017. 1. 62-69. <https://www.elibrary.ru/ygsmjz>
 8. Пикунова А.В., Князев С.Д., Голяева О.Д., Бахотская А.Ю., Калинина О.В. Исследование генома с применением ДНК-маркеров у смородины // Генетика. 2019. 55, 9. 998-1010. <https://doi.org/10.1134/S001667581909011X>
 9. Сазонов Ф.Ф. Формирование отечественного сортимента смородины чёрной в условиях Нечерноземного региона России // Садоводство и виноградарство. 2021. 1. 23-31. <https://doi.org/10.31676/0235-2591-2021-1-23-31>
 10. Сазонов Ф.Ф., Даньшина О.В. Селекционные возможности создания сортов и форм смородины чёрной для машинной уборки урожая // Садоводство и виноградарство. 2016. 2. 22-27. <https://doi.org/10.18454/VSTISP.2016.2.1091>
 11. Сазонова И.Д. Оценка новых сортов смородины чёрной Кокинского опорного пункта ВСТИСП для технической переработки // Аграрная наука в условиях модернизации и инновационного развития. Иваново: Ивановская ГСХА, 2017. 1. 175-180. <https://www.elibrary.ru/yquvrl>
 12. Сазонова И.Д. Биохимическая оценка плодов малины и смородины в условиях юго-западной части Нечерноземья России // Вестник Брянской ГСХА. 2021. 5. 36-44. <https://doi.org/10.52691/2500-2651-2021-87-5-36-44>
 13. Edwards K., Johnstone C., Thomson C. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis // Nucleic Acids Research. 1991. 19, 6. 1349. <https://doi.org/10.1093/nar/19.6.1349>
 14. Panfilova O., Tsoy M., Golyaeva O. Currant growing technology and mechanized harvesting-review // E3S Web of Conferences. 2021. 254. 07002. <https://doi.org/10.1051/e3sconf/202125407002>
 15. Poms R.E., Glossl J., Foissy H. Increased sensitivity for detection of specific target DNA in milk by concentration in milk fat // European Food Research and Technology. 2001. 213. 361-365. <https://doi.org/10.1007/s002170100383>
 16. Puchooa D., A simple, rapid and efficient method for the extraction of genomic DNA from lychee (*Litchi chinensis* Sonn.) // African Journal of Biotechnology. 2004. 3, 4. 253-255. <https://doi.org/10.5897/AJB2004.000-2046>

References

1. Evdokimenko, S.N., Sazonov, F.F., Andronova, N.V., Kozak, N.V., Imamkulova, Z.A., & Podgaetsky, M.A. (2022). *Economic, biological features, varieties and cultivation technologies*:

- monograph*. Scientific Institution Federal Scientific Center for Horticulture. (In Russian, English abstract).
2. Zhidekhina, T.V., Rodyukova, O.S., Magomedova, S.A., & Bocharova, T.E. (2007). Assessment of new varieties of black currants. *Horticulture and Viticulture*, 5, 15-16. <https://www.elibrary.ru/ibitcb>. (In Russian).
 3. Kulikov, I.M., Evdokimenko, S.N., Tumaeva, T.A., Kelina, A.V., Sazonov, F.F., Andronova, N.V., & Podgaetsky, M.A. (2021). Scientific support of small fruit growing in Russia and prospects for its development. *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*, 25(4), 414-419. <https://doi.org/10.18699/VJ21.046>. (In Russian, English abstract).
 4. Knyazev, S.D., Levgerova, N.S., Makarkina, M.A., Pikunova, A.V., Salina, E.S., Chekalin, E.I., Yanchuk, T.V., & Shavyrkina, M.A. (2016). *Black Currant Selection: Methods, Achievements, Directions*. VNIISPK. <https://www.elibrary.ru/vwpjyb>. (In Russian).
 5. Knyazev, S.D., Pikunova, A.V., Bakhotskaya, A.Yu., Chekalin, E.I., & Shavyrkina, M.A. (2014). Innovational directions in black currant breeding. In E.N. Sedov (Ed.) *Breeding and Variety Cultivation of Fruit and Berry Crops*, (Vol. 1, pp. 192-211). VNIISPK. <https://www.elibrary.ru/uqezep>. (In Russian, English abstract).
 6. Makarkina, M.A., Yanchuk, T.V., & Knyazev, S.D. (2017). *The Assessment and Selection of the Initial Material for Black Currant Breeding for Berry Chemical Composition Improvement*. VNIISPK. <https://www.elibrary.ru/yrewxu>. (In Russian, English abstract).
 7. Mezhnina, O.A., & Urbanovich, O.Yu. (2017). Genetic variability of blackcurrant varieties (*Ribes nigrum*) in Belarus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological Series*, 1, 62-69. <https://www.elibrary.ru/ygsmjz>. (In Russian, English abstract).
 8. Pikunova, A.V., Knyazev, S.D., Golyaeva, O.D., Bakhotskaya, A.Yu., & Kalinina, O.V. (2019). Genome studies by means of DNA markers of the blackcurrant. *Russian Journal of Genetics*, 55(9), 1061-1071. <https://doi.org/10.1134/S1022795419090102>
 9. Sazonov, F.F. (2021). Forming of domestic blackcurrant stock in Non-Chernozem Region of Russia. *Horticulture and Viticulture*, 1, 23-31. <https://doi.org/10.31676/0235-2591-2021-1-23-31>. (In Russian, English abstract).
 10. Sazonov, F.F., & Danshina, O.V. (2016). Breeding possibilities of creation varieties and forms of blackcurrant for machine harvesting. *Horticulture and Viticulture*, 2, 22-27. <https://doi.org/10.18454/VSTISP.2016.2.1091>. (In Russian, English abstract).
 11. Sazonova, I.D. (2017). Assessment of new varieties of black currants of the Kokinsky stronghold of VSTISP for technical processing. In *Agricultural Science in Conditions of Modernization and Innovative Development*, (pp. 175-180). Ivanovskaya GSHA. <https://www.elibrary.ru/yquvrl>. (In Russian).
 12. Sazonova, I.D. (2021). Biochemical assessment of raspberry and currant berries in the South-Western part of the Non-Black Earth Region of Russia. *Vestnik of the Bryansk State Agricultural Academy*, 5 (87), 36-44. <https://doi.org/10.52691/2500-2651-2021-87-5-36-44>. (In Russian, English abstract).
 13. Edwards, K., Johnstone, C., & Thomson, C. (1991). A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Research*, 19, 1349. <https://doi.org/10.1093/nar/19.6.1349>
 14. Panfilova, O., Tsoy, M., & Golyaeva, O. (2021). Currant growing technology and mechanized harvesting-review. *E3S Web of Conferences*, 254, 07002. <https://doi.org/10.1051/e3sconf/202125407002>
 15. Poms, R.E., Glossl, J., & Foissy, H. (2001). Increased sensitivity for detection of specific target DNA in milk by concentration in milk fat. *European Food Research and Technology*, 213, 361-365. <https://doi.org/10.1007/s002170100383>

16. Puchooa, D. (2004). A simple, rapid and efficient method for the extraction of genomic DNA from lychee (*Litchi chinensis* Sonn.). *African Journal of Biotechnology*, 3(4), 253-255. <https://doi.org/10.5897/AJB2004.000-2046>

Авторы:

Алла Андреевна Гузеева, аспирант, отдел репродуктивной биотехнологии ФГБНУ «Федеральный научный селекционно-технологический центр садоводства и питомниководства» (ФГБНУ ФНЦ Садоводства), alla1988.88@mail.ru

Ирина Александровна Капитова, кандидат химических наук, старший научный сотрудник, отдел репродуктивной биотехнологии ФГБНУ «Федеральный научный селекционно-технологический центр садоводства и питомниководства» (ФГБНУ ФНЦ Садоводства), kiastandart@gmail.com
ORCID 0000-0003-3629-4461
SPIN 1040-1331

Фёдор Фёдорович Сазонов, доктор сельскохозяйственных наук, доцент, ведущий научный сотрудник отдела генетики и селекции садовых культур ФГБНУ «Федеральный научный селекционно-технологический центр садоводства и питомниководства» (ФГБНУ ФНЦ Садоводства), sazon-f@yandex.ru
SPIN 1494-7253

Authors details:

Alla A. Guzeeva, PhD student, Department of Reproductive Biotechnology, Federal Horticultural Center for Breeding, Agrotechnology and Nursery, alla1988.88@mail.ru

Irina A. Kapitova, Candidate in Chemistry Sciences, Senior Researcher in Department of Reproductive Biotechnology of Federal Horticultural Center for Breeding, Agrotechnology and Nursery, kiastandart@gmail.com
ORCID 0000-0003-3629-4461
SPIN 1040-1331

Fedor F. Sazonov, Doctor of Agricultural Sciences, Associate Professor, Leading Researcher in Department of Genetics and Selection Horticultural Crops of Federal Horticultural Center for Breeding, Agrotechnology and Nursery, sazon-f@yandex.ru
SPIN 1494-7253

Отказ от ответственности: заявления, мнения и данные, содержащиеся в публикации, принадлежат исключительно авторам и соавторам. ФГБНУ ВНИИСПК и редакция журнала снимают с себя ответственность за любой ущерб людям и/или имуществу в результате использования любых идей, методов, инструкций или продуктов, упомянутых в контенте.