КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 634.7:577.21

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ КАРТА СМОРОДИНЫ КРАСНОЙ (*Ribes rubrum* L.), ПОСТРОЕННАЯ С ПРИМЕНЕНИЕМ SSR И SNP ДНК-МАРКЕРОВ

© 2020 г. А. В. Пикунова^{1, *}, С. В. Горюнова^{2, 3}, Д. В. Горюнов⁴, М. А. Должикова¹, О. Д. Голяева¹

¹Всероссийский научно-исследовательский институт селекции плодовых культур, Орловская область, п/о Жилина, 302530 Россия

²Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва, 119991 Россия

³Всероссийский научно-исследовательский институт картофельного хозяйства им. А.Г. Лорха,

Московская область, п. Красково, 140051 Россия

⁴НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, 119992 Россия

> *e-mail: pikuanna84@mail.ru Поступила в редакцию 13.12.2019 г. После доработки 19.02.2020 г. Принята к публикации 07.03.2020 г.

Данная работа направлена на составление первой в мире генетической карты смородины красной с применением микросателлитных и SNP ДНК-маркеров. Построенная генетическая карта включает восемь групп сцепления с уровнем LOD 10, в которые вошли 299 ДНК-маркеров, в том числе 12 микросателлитных и 287 SNP маркеров; общая длина всех групп сцепления составила 741 сМ, средняя — 93 сМ. В семи из восьми полученных групп сцепления картирован хотя бы один микросателлитный ДНК-маркер. Для большинства локализованных нами на карте красной смородины микросателлитных локусов позиции соотносятся с положением на группах сцепления смородины черной (локусы e3-B02, g1-A01, g1-L12 размещаются на одной группе сцепления № 5; локусы g2-J08, g2-B20, e1-O21, e1-O01 на полученной карте находятся каждый в отдельной группе сцепления 2, 3, 4, 6 соответственно), за исключением локусов, картированных у смородины черной на группе сцепления 1. которые в нашей работе не вошли ни в одну из составленных групп сцепления. Локус g2-J11 в наших исследованиях амплифицирует фрагменты в двух диапазонах, что позволяет предположить его дупликацию в геноме исследуемых образцов. Данный локус был картирован в двух группах сцепления смородины красной. Локализовано также два новых, ранее не картированных и не опубликованных микросателлитных локуса. В дальнейшем планируется провести локализацию хозяйственно полезных признаков в геноме смородины красной.

Ключевые слова: смородина красная, геном, ДНК-маркеры, SSR, SNP, NGS, генетическая карта, *Ribes* L. **DOI:** 10.31857/S0016675820100100

Род смородина *Ribes* L. включает более 150 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.) [1].

Наиболее глубоко изученной с применением ДНК-маркеров культурой рода *Ribes* L. является смородина черная. Для нее составлено несколько генетических карт (ГК) групп сцепления и разработан ряд методик для маркер-вспомогательной селекции [2–4].

Смородина красная на сегодняшний день широко распространена в промышленном ягодоводстве стран Европейского Союза [5]. Помимо окраса и биохимического состава ягод смородина красная имеет ряд существенных отличий от смородины черной, в том числе у красной смородины нет присущего черной аромата, выделяемого специальными железками на листьях. Для красной смородины характерны более быстрое вступление в состояние покоя, более долговечные плодоносящие побеги, более позднее начало вегетации и др. Гибриды между черной и красной смородиной бесплодны [6].

Цель настоящей работы — составление первой в мире генетической карты групп сцепления смородины красной с применением микросателлитных и SNP ДНК-маркеров.

В работе использована гибридная популяция, насчитывающая 139 гибридов (шесть из них были исключены в процессе картирования в связи с

1341

Таблица 1. Сравнение локализации микросателлитных локусов на генетических картах черной и красной смородин

Локус	Группа сцепления в геноме смородины черной*	Группа сцепления в геноме смородины красной	
gr2-J05	1	Не группирован	
g1-M07	1	(ungrouped) Не группирован (ungrouped)	
g1-K04	1	He группирован (ungrouped)	
g2-J08	2	2	
g2-B20	3	3	
Cra-489	_	3	
e1-O21	4	4	
e3-B02	5	5	
g1-A01	5	5	
g1-L12	5	5	
e1-O01	6	6	
Cra-531	—	6	
g2-G12	7	7.1	
g2-J11	7	2, 7.2?	

* По Brennnan et al., 2008.

большим количеством выпадов), полученная от скрещивания сорта Белая Потапенко (Красный крест × Красная сибирячка) и гибридной формы 1426-21-80 (82-4-11 (Rote Spatlese × Чулковская) × × 78-2-118 (Rote Spatlese × Маарсис Проминент)). Картируемая семья имеет сложное генетическое происхождение, в котором задействованы такие виды как смородина красная (*R. rubrum* L.), смородина обыкновенная (*R. sativum* L.), смородина обыкновенная крупноплодная (*R. sativum* var. *macrocarpum*), смородина скалистая (*R. petreum*) Wulf.), смородина многоцветковая (R. multiflorum Kit.). Более 60 пар праймеров к микросателлитным локусам были взяты в анализ для тестирования на небольшой выборке образцов смородины красной. Из них 38 пар праймеров ранее использовались для изучения представителей рода смородина [7-11]. Нуклеотидные последовательности 30 пар праймеров (далее по тексту обозначаются как новые) предоставлены Nahla Bassil (неопубликованные данные, личные коммуникации) и созданы на базе нуклеотидных сиквенсов смородины, размещенных в базе данных NCBI. Полиморфизм микросателлитных локусов детектировали в 8%-ном ПААГ с окрашиванием нитратом серебра. Для выявления SNP маркеров был использован подход секвенирования ДНК-библиотек с уменьшенной сложностью генома (Genotyping by

sequencing, GBS). Готовая к секвенированию библиотека была отсеквенирована на одной дорожке Illumina HiSeq 4000. Генетическую карту составляли с применением программы Join Map3/0, регрессионное картирование с использованием функции Kosambi.

Из протестированных пар праймеров к микросателлитным локусам большинство оказались непригодными для картирования по следующим причинам: амплифицировали фрагменты свыше 500 пн, амплифицировали неполиморфные ПЦРпродукты, не амплифицировали на ДНК родителей гибридной популяции при минимальной температуре отжига в 50°C, показывали нетипичный для микросателлитных локусов профиль амплификации (большое количество фрагментов в широком диапазоне, не исчезающих при повышении температуры отжига) и др. Типичный микросателлитный профиль и наличие полиморфных фрагментов наблюдались при амплификации с 13 парами праймеров (ранее опубликованные: gr2-J05, g1-M07, g1-K04, g2-J08, g2-B20, e1-O21, e3-B02, g1-A01, g1-L12, e1-O01, g2-G12 и новые Cra-531 и Cra-489). В локусе g2-J11 на картируемой популяции амплифицируются фрагменты в двух диапазонах (250-260 и 315-320 пн), что позволяет предположить дупликацию данного локуса в геноме исследуемых образцов. Таким образом, для картирования были использованы данные о полиморфизме 14 микросателлитных локусов (табл. 1).

В результате секвенирования ДНК-библиотек с уменьшенной сложностью генома, созданных на ДНК гибридной популяции и родителей, было получено 382373581 прочтений хорошего качества. После удаления адаптерных последовательностей и выявления SNP с помощью программы Tassel 5.0 было обнаружено 5741 SNP. После анализа расщепления в популяции для картирования было использовано 667 SNP маркеров.

В результате картирования построено восемь групп сцепления с уровнем LOD 10 (рис. 1), в которые вошли 299 локусов, в том числе 12 микросателлитных и 287 SNP маркеров, общая длина всех групп сцепления составила 741 сМ, средняя — 93 сМ (табл. 2). Три микросателлитных локуса не вошли ни в одну из групп сцепления (ungrouped) это gr2-J05, g1-M07, g1-K04; интересно отметить, что данные локусы находятся на одной группе сцепления № 1 генетической карты смородины черной. Более половины SNP маркеров также оказались вне групп сцепления, несколько маркеров были исключены в связи с высоким вкладом в параметр Mean chisquare contributions. В семи из восьми групп сцепления картирован хотя бы один микросателлитный ДНК-маркер.

На полученной карте смородины красной группы сцепления пронумеровали сообразно группам сцепления ранее опубликованной гене-

ПИКУНОВА и др.



Рис. 1. Генетическая карта смородины красной (нумерация групп сцепления корреспондирует к карте смородины черной с учетом расположения микросателлитных локусов; представленные группы сцепления объединяют маркеры при LOD 10 и являются картами первого раунда картирования, кроме группы сцепления 2, которая представлена картой второго раунда картирования).

	I ····		
Номер группы сцепления	Длина, сМ	Число SSR	Число SNP
2	76	2	47
3	73	2	24
4	123	1	36
5	115	3	16
6	79	2	59
7.1	85	1	39
7.2?	110	1	15
8?	80	0	51
Среднее значение	93	2	36
Сумма	741	12	287

Таблица 2. Краткое описание полученных групп сцепления смородины красной

тической карты смородины черной [2], опираясь на локализацию одинаковых микросателитных локусов. При этом локусы e3-B02, g1-A01, g1-L12, картированные вместе на 5-й группе сцепления смородины черной, на полученной нами карте смородины красной также размещаются на одной группе сцепления. Локусы g2-J08, g2-B20, e1-O21, е1-О01 на карте черной смородины, размещенные соответственно в группах сцепления 2, 3, 4, 6, на нашей карте также находятся каждый в отдельной группе сцепления (табл. 2). Противоречит локализации на карте смородины черной положение локуса g2-J11. Картированный в геноме смородины черной на 7-й группе сцепления вместе с локусом g2-g12, на нашей карте локус g2-J11 не примкнул к локусу g2-g12 а вошел в отдельную группу сцепления (условно обозначенную как 7.2?). Кроме того, в связи с предположенной выше лупликацией g2-J11 в геноме красной смородины данный локус был также картирован на группе сцепления 2 вместе с локусом g2-J08. Одна из полученных групп сцепления составлена полностью из SNP-маркеров и, возможно, представляет восьмую группу сцепления, так как микросателлитные локусы, картированные на 8-й группе сцепления генетической карты смородины черной, не прошли первоначальное тестирование по одной из причин, описанных выше, и не были использованы в картировании генома смородины красной. Таким образом, большинство локализованных нами на карте красной смородины микросателлитных локусов корреспондируют к положению локусов на группах сцепления смородины черной. Локализовано также два новых, ранее не картированных и не опубликованных микросателлитных локуса. Дизайн праймеров к ним осуществлялся на базе сиквенсов *Ribes americanum*. Это локус Cra-489 (F: 5'-TCTATTATCACACCCTCAACAA-3', R: 5'-GTTTATACGACACATCAACTTTCCA-3') к пентануклеотидным повторам в геноме, и локус Cra-531 (F: 5'-AGAAGTGAAAGTGGAAGAACC-3', R: 5'-GTTTGTTTGAAGGAAGACAGAGAAC-3') к тринуклеотидным повторам, локализованные в данной работе на группах сцепления смородины красной № 3 и № 10 соответственно.

В дальнейшем планируется увеличить количество картированных микросателлитных локусов и провести поиск локализации хозяйственно полезных признаков в геноме смородины красной.

Авторы выражают благодарность Nahla Bassil за дизайн праймеров к новым ранее не опубликованным микросателлитным локусам.

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

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием в качестве объекта животных.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием в качестве объекта людей.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. Помология. Т. IV. Смородина. Крыжовник // Под ред. Седова Е.Н. Орел: ВНИИСПК, 2009. 468 с.
- Brennan R., Jorgensen L., Hackett C. et al. The development of a genetic linkage map of blackcurrant (*Ribes nigrum* L.) and the identification of regions associated with key fruit quality and agronomic traits // Euphytica. 2008. V. 161. P. 19–34. https://doi.org/10.1007/s10681-007-9412-8
- 3. *Russell J.R., Bayer M., Booth C. et al.* Identification, utilisation and mapping of novel transcriptome-based markers from blackcurrant (*Ribes nigrum*) // BMC Plant Biol. 2011. № 11(1). P. 147. https://doi.org/10.1186/1471-2229-11-147
- Russell J., Hackett C., Hedley P. et al. The use of genotyping by sequencing in blackcurrant (*Ribes nigrum*): developing high-resolution linkage maps in species without reference genome sequences // Mol. Breeding. 2014. V. 33(4). P. 835–849. https://doi.org/10.1007/s11032-013-9996-8
- Малиновский Б. 2017. https://propozitsiya.com/krasnayasmorodina-priznana-samoy-rentabelnoy-nishevoy-yagodoy.www.fruits-journal.org. https://doi.org/10.1051/fruits/2011049
- 6. Бученков И.Э., Чернецкая А.Г., Рышкель И.В., Рышкель О.С. Межвидовая отдаленная гибридизация смородины черной (*Ribes nigrum* L.) и смородины красной (*Ribes rubrum* L.) // Вестн. Полесского гос. ун-та. Серия природоведческих наук. 2014. № 2. С. 48–55.

ГЕНЕТИКА том 56 № 11 2020

- 7. Brennan R., Jorgensen L., Woodhead M. et al. Development and characterization of SSR markers in *Ribes* species // Mol. Ecol. 2002. № 2(3). P. 327–330. https://doi.org/10.1046/j.1471-8286.2002.00233.x
- Cavanna M., Marinoni D. T., Beccaro G.L. et al. Microsatellite-based evaluation of *Ribes* spp. germplasm // Genome. 2009. V. 52. № 10. P. 839–848. https://doi.org/10.1139/G09-057
- 9. *Antonius K., Karhu S., Kaldm H. et al.* Development of the Northern European *Ribes* core collection based on a microsatellite (SSR) marker diversity analysis // Plant Genet. Resources: Characterization and Utilization.

2012. P. 70-73.

https://doi.org/10.1017/S1479262111000980

- 10. *Palmieri L., Grando M.S., Sordo M. et al.* Establishment of molecular markers for germplasm management in a worldwide provenance *Ribes* spp. collection // Plant Omics. 2013. V. 6(3). P. 165–174.
- 11. Пикунова А.В., Князев С.Д., Бахотская А.Ю. и др. Полиморфизм микросателлитных локусов у сортов черной смородины (*Ribes nigrum* L.) из коллекции ВНИИСПК // С.-х. биология. 2015. Т. 50. № 1. С. 46–54.

https://doi.org/10.15389/agrobiology.2015.1.46rus

The Development of a Genetic Linkage Map of Red Currant (*Ribes rubrum* L.) by Means of SSR and SNP DNA-Markers

A. V. Pikunova^{*a*, *}, S. V. Goryunova^{*b*, *c*}, D. V. Goryunov^{*d*}, M. A. Dolzhikova^{*a*}, and O. D. Golyaeva^{*a*}

^aRussian Research Institute of Fruit Crop Breeding, Orlovska oblast, Zilina, 302530 Russia ^bVavilov Institute of General Genetics, Moscow, 119991 Russia ^cLorkh Potato Research Institute, Moscow oblast, Kraskovo, 140051 Russia ^dBelozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119992 Russia

*e-mail: pikuanna84@mail.ru

This work is aimed at compiling the world's first linkage map of red currant with the use of microsatellite and SNP DNA markers. As a result of mapping, 8 linkage groups with an LOD level of 10 were built, which included 299 DNA markers, including 12 microsatellite and 287 SNP markers, the total length of all linkage groups was 741 cm, the average was 93 cm. In seven of the 8 linkage groups obtained, at least one microsatellite DNA marker was mapped. Most of the microsatellite loci localized on the redcurrant map correspond to their position on the blackcurrant linkage groups (loci e3-B02, g1-A01, g1-L12 are located on the same linkage group No. 5; loci g2-J08, g2-B20, e1-O21, e1-O01 on the resulting map are each in a separate linkage group 2,3,4,6, respectively), with the exception of the loci mapped at blackcurrant on linkage group 1, which in our work were unmapped. The g2-J11 locus in our studies amplifies fragments in two ranges, which suggests its duplication in the genome of the studied samples. This locus was mapped in two linkage groups of red currant. Two new, not previously mapped and unpublished microsatellite loci were also localized on linkage map of red currant. In the future, it is planned to localize economically useful traits in the red currant genome.

Keywords: red currant, genome, DNA-markers, SSR, SNP, NGS, linkage map, Ribes L.

1344