

ТЕСТИРОВАНИЕ МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ ЛОКУСОВ КРЫЖОВНИКА НА ЧЕРНОЙ И КРАСНОЙ СМОРОДИНЕ

© 2024 А. В. Пикунова^{1, *}, А. А. Павленко¹, М. А. Должикова¹, О. Д. Голяева¹, С. Д. Князев¹

¹Всероссийский научно-исследовательский институт селекции плодовых культур,

Орловская область, п/о Жулина, 302530 Россия

*e-mail: pikuanna84@mail.ru

Поступила в редакцию 15.03.2024 г.

После доработки 02.05.2024 г.

Принята к публикации 06.05.2024 г.

Одиннадцать микросателлитных маркеров, ранее разработанных на основании сиквенсов крыжовника, были протестированы на красной и черной смородине. В результате все микросателлитные локусы амплифицировали на представителях смородины черной, а на представителях смородины красной в трех локусах не было амплификации (RucANS, RucDFR2-1, RucDFR1-3). Выявлены полиморфные локусы как для черной, так и для красной смородины. В локусе MTT-7 у исследуемых генотипов черной смородины наблюдается амплификация трех фрагментов, возможно, данный локус дублирован. При этом на красной смородине в локусе MTT-7 наблюдается амплификация, типичная для монолокусного микросателлита. Локусы RucHLH-1 и RucUFGT были протестированы на гибридной семье смородины красной (Белая Потапенко × 1426-21-80). Путем генетического картирования установлена локализация локуса RucHLH-1 на группе сцепления 4 в геноме красной смородины и локализация RucUFGT (предположительно) на группе сцепления 1. Набор микросателлитных локусов для рода Смородина на данный момент ограничен. В данной работе показано, что часть SSR-маркеров, разработанных на крыжовнике, амплифицируются и выявляют полиморфизм и на смородине тоже, а также могут быть использованы для исследований как черной, так и красной смородины.

Ключевые слова: смородина, крыжовник, микросателлитные локусы, ДНК-маркеры, SSR, *Ribes* L., генетический полиморфизм, генетическое картирование.

DOI: 10.31857/S0016675824100114 **EDN:** WEKCGY

Микросателлитные маркеры (SSR, simple sequence repeat) ограничивают повторы простых последовательностей ДНК, размер повторяющейся единицы которых не превышает 1–10 п. н. SSR – мультиаллельные, кодоминантные маркеры, обладающие хорошей воспроизводимостью. Они широко используются как инструмент характеристики геномов различных живых организмов, в том числе сельскохозяйственно-значимых культур [1].

Первые микросателлитные маркеры для представителей рода Смородина были созданы шотландскими учеными в начале 2000-х гг. [2]. На данный момент набор протестированных микросателлитных локусов для смородин крайне ограничен и насчитывает не более 100 локусов, из них около 50 картированы в геноме черной или красной смородины [3, 4]. Для сравнения – база данных Hidras насчитывает 664 локуса для яблони (<https://sites.unimi.it/camelot/hidras/HiDRAS-SSRdb/pages/CompleteSSRtable.php>), большинство из которых картированы.

SSR применяют в фундаментальных исследованиях по оценке генетического полиморфизма, изучению филогенетических отношений, построению генетических карт для групп сцепления и в прикладных целях – для изучения родословных, формирования идентификационных систем, поиска маркеров, связанных с важными хозяйственно-биологическими свойствами, при маркер-вспомогательном отборе интересных с генетико-селекционной точки зрения генотипов в начале онтогенеза растений [5].

Род Смородина (*Ribes* L.) включает более 150 видов, хозяйственное значение имеют смородина черная (*Ribes nigrum* L.), смородина красная (*Ribes rubrum* L.) и крыжовник (*Ribes uva-crispa* L.) [6]. По современным взглядам, смородина и крыжовник принадлежат к одному роду *Ribes* [3, 7], хотя ранее относились к двум различным родам в пределах одного семейства в связи со значительными морфологическими отличиями [8]. Зачастую SSR-маркеры, разработанные для одного вида, могут

Таблица 1. Микросателлитные локусы, задействованные в работе

№	Название локуса	Т отжига, °C	Последовательность праймеров 5–3'		Источник
			F	R	
1	MTT-5	56	GCGATTCCATTACGACACTTTGCA	ggttATAGGGAAGCATCACCTCACC	[10]
2	MTT-7	50	CACCCAAACATACTGTAATGGATCGAAG	ggttACACGATCTCGTTCTATC	
3	MTT-9	50	ATGACTCTGATACCACACCAG	ggtTGCGTATGTGATTCTGCTCTG	
5	RucANS	60	TCTTAACCCCTAAAATTGCAGCC	ggttCCATTCCACCACCACTTCTTTCTC	
6	RucHLH-1	60	TTTCACTAGAGCCATTCTTGCC	ggttGAAAAATACGTTACGATGGAGC	
7	RucHLH-2	60	TTTTCTCTTCCTCGTGTGCTC	ggttCCCCCTCTCTGTAGTGCCAAATTC	
8	RucHLH-3	60	GAATTGGCACTACAGAGAGGG	ggtTGAAAGTTGAGTGTTCTCGGAGAGA	[11]
9	RucDFR1-2	50	ACCCTACTTGGCAGAAATGAAGT	ggttCGTGGTCTTCGACACAAAAATAC	
10	RucDFR1-3	60	CTAGTGGTGTGTCCTTTCAATCA	ggttCTAGGCTGGTCCCTAAATCGTA	
11	RucDFR2-1	60	CTATATCGTTCGAGCAACCGTA	ggtTGGCAAGTCTAAACAAATGCTTC	
12	RucUFGT	55	GTGCTCATGTTTATACCGACTTCA	ggttCAAAGCAAAGGGGAAGAGGTTG	

Таблица 2. Результаты амплификации микросателлитных локусов на красной и черной смородине

№	Локус	Размеры фрагментов, п. н.			H_o	H_e
		крыжовник*	черная смородина	красная смородина		
1	MTT-5	145–261	140–152	162	0.50	0.68
2	MTT-7	151–193	150, 160, 198	140–153	1.00	0.74
3	MTT-9	—	225, 320	335	0.40	0.34
4	RucANS	237, 241	210, 212	—	0.75	0.47
5	RucHLH-1	198, 208	235–240	220–222	0.33	0.67
6	RucHLH-2	243–248	245	245	—	—
7	RucHLH-3	314–319	310	305	0.00	0.32
8	RucDFR1-2	364–397	375–480	340	0.20	0.46
9	RucDFR1-3	318–326	160	—	—	—
10	RucDFR2-1	257–261	230	—	—	—
11	RucUFGT	343–355	510, 515	685–700	0.50	0.74

Примечание. Прочерк – амплификации на протестированных образцах не было. * – по ранее опубликованным данным разработчиков локусов [11, 12]; H_o – наблюдаемая гетерозиготность; H_e – ожидаемая гетерозиготность.

использоваться и при исследовании близкородственных видов за счет консервативности генома [5].

Цель настоящей работы – проверить переносимость микросателлитных локусов, разработанных для крыжовника на черной и красной смородине.

ДНК выделяли из молодых листьев смородины СТАВ-методом с небольшими модификациями [9]. В настоящей работе протестировали 11 микросателлитных локусов (табл. 1) на красной (сорт Белая Потапенко и гибридная форма 1426-21-80) и черной смородине (сорта Кипиана, Арапка, Воевода, гибридная форма 3516-14-46). Локусы RucHLH-1 и RucUFGT также были протестированы на гибридах картирующей популяции красной смородины, полученной от скрещивания Белая Потапенко и формы 1426-21-80, всего 139 гибридов (шесть из них были исключены в процессе картирования в связи с большим количеством выпадов). Разделение фрагментов проводили в 8%-ном ПААГ с окрашиванием нитратом серебра. Значение коэффициентов гетерозиготности вычисляли в программе GenAIEх 6.5 [12]. Генетическую карту составляли с применением программы Join Map3/0, регрессионное картирование с использованием функции Kosambi.

Микросателлитные локусы, задействованные в работе, ранее были получены на основании сиквенов крыжовника в работах К. Antonius с соавт. [10] и Е. Vidyagina с соавт. [11]. В результате все микросателлитные локусы амплифицировали на

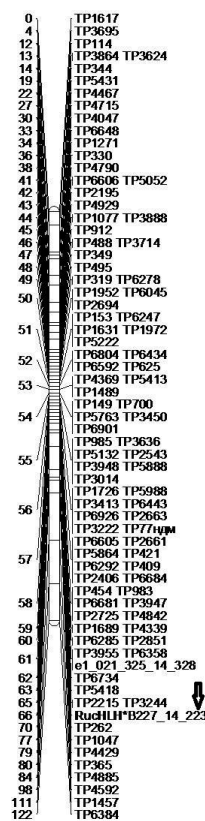


Рис. 1. Генетическая карта группы сцепления 4 смородины красной и локализация на ней локуса RucHLH-1 (указан стрелкой).

представителях смородины черной, а на представителях смородины красной не было амплификации в трех локусах: *RucANS*, *RucDFR2-1*, *RucDFR1-3* (табл. 2). Данный факт может опосредованно отражать большую генетическую близость крыжовника к смородине черной, нежели чем к смородине красной, отмеченную ранее на основании исследований с применением различных типов молекулярно-генетических данных [13, 14].

Диапазон амплифицируемых на образцах смородины фрагментов в целом аналогичен диапазону аллелей на крыжовнике, кроме локусов *RucUFGT* и *RucDFR1-3*, в которых размеры фрагментов для крыжовника и смородин значительно различаются. Лocus *RucHLH-2* оказался мономорфным у всех проанализированных образцов красной и черной смородины, в нем был амплифицирован один фрагмент размером около 245 п. н. У образцов черной смородины в локусах *RucDFR1-3*, *RucDFR2-1*, *RucHLH-3* также амплифицировался один мономорфный фрагмент (160, 230, 310 п. н. соответственно). У образцов красной смородины мономорфный фрагмент амплифицировался также в локусе *MTT-5*. При этом в локусах *MTT-9*, *RucHLH-3* и *RucDFR1-2* у образцов красной смородины наблюдалась амплификация лишь у одного из тестируемых образцов, данные локусы мы рассматриваем как полиморфные.

По полученным данным были подсчитаны коэффициенты гетерозиготности (см. табл. 2). Наблюдаемая гетерозиготность варьировала от 0.2 (в локусе *RucDFR1-2*) до 1 (в локусе *MTT-7*), ожидаемая гетерозиготность варьировала от 0.32 (в локусе *RucHLH-3*) до 0.74 (в локусах *MTT-7* и *RucUFGT*). *MTT-7* на ДНК каждого образца черной смородины амплифицировал по три фрагмента и, возможно, является двулокусным. При этом на красной смородине наблюдается амплификация, типичная для монолокусного микросателлита. Возможно, в геноме черной смородины locus *MTT-7* дублирован. Однако для подтверждения данной гипотезы необходимы дополнительные исследования.

Таким образом, в результате были выявлены полиморфные локусы для черной (*MTT-5*, *MTT-7*, *MTT-9*, *RucANS*, *RucHLH-1*, *RucDFR1-2*, *RucUFGT*) и красной (*MTT-9*, *RucHLH-3*, *RucDFR1*, *MTT-7*, *RucHLH-1*, *RucUFGT*) смородины.

Локусы *RucHLH-1* и *RucUFGT* протестировали на гибридной семье (Белая Потапенко × 1426-21-80). Полученные данные были использованы для построения генетической карты вместе с ранее полученной информацией о полиморфизме микросателлитных и SNP-маркеров [4]. Лocus *RucHLH-1* был локализован нами на группе сцепления 4 вместе с микросателлитным локусом *e1-O21*

и 94 SNP-маркерами (карта раунда 3, LOD 5, рис. 1).

Лocus *RucUFGT* сгруппировался вместе с микросателлитным локусом *g1-K04* и SNP-маркером *TP1673* (карта раунда 1, LOD 5) на расстоянии 5 сМ от *g1-K04*. На предыдущей генетической карте красной смородины locus *g1-K04* не был сгруппирован с другими маркерами [4], однако на ранее опубликованной генетической карте черной смородины он располагается на группе сцепления 1 [3]. Таким образом, в данной работе установлена локализация локуса *RucHLH-1* на группе сцепления 4 в геноме смородины красной и локализация *RucUFGT*, предположительно, на группе сцепления 1.

В настоящей работе показано, что большая часть SSR-маркеров, разработанных на крыжовнике, амплифицируется и выявляет полиморфизм и на смородине, они могут быть использованы для исследований как черной, так и красной смородины.

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ “Изучение генома смородины (*Ribes* L.) с помощью ДНК маркеров” 23-26-00160.

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. *Vieira M.L., Santini L., Diniz A.L., Munhoz C.D.* Microsatellite markers: What they mean and why they are so useful // *Genet. Mol. Biol.* 2016. V. 4. № 39. P. 312–328.
<https://doi.org/10.1590/1678-4685-GMB-2016-0027>
2. *Brennan R., Jorgensen L., Woodhead M., Russell J.* Development and characterization of SSR markers in *Ribes species* // *Mol. Ecol.* 2002. V. 2. № 3. P. 327–330.
<https://doi.org/10.1046/j.1471-8286.2002.00233.x>
3. *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>
4. *Пикунова А.В., Горюнова С.В., Горюнов Д.В.* Генетическая карта смородины красной (*Ribes rubrum* L.), построенная с применением SSR и SNP ДНК-маркеров // *Генетика*. 2020. V. 56. № 11. С. 1340–1344.
<https://doi.org/10.31857/S0016675820100100>
5. *Kalia R.K., Rai M.K., Kalia S. et al.* Microsatellite markers: An overview of the recent progress in plants

- // Euphytica. 2011. V. 177. № 3. P. 309–334.
<https://doi.org/10.1007/s10681-010-0286-9>
6. Князев С.Д., Огольцова Т.П. Селекция смородины черной на современном этапе. Орел: Изд-во ОрелГАУ, 2004. 238 с.
 7. Janczewski E. Monograph of the currants *Ribes* L. // Mem. Soc. Phys. Hist. Nat. Geneve. 1907. V. 35. P. 199–517.
 8. Berger A. A taxonomic review of currants and gooseberries // N.Y. Agric. Exptl Sta. Techn. Bull. 1924. V. 109. P. 1–118.
 9. Doyle J.J., Doyle J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue // Phytochem. Bull. 1987. V. 19. P. 11–15.
 10. 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. Res.: Characterization and Utilization. 2012. V. 10. P. 70–73.
<https://doi.org/10.1017/S1479262111000980>
 11. Vidyagina E.O., Lebedev V.G., Subbotina N.M. The development of the genic SSR markers for analysis of genetic diversity in gooseberry cultivars // Agronomy. 2021. V. 11. № 6.
<https://doi.org/10.3390/agronomy11061050>
 12. Peakall R., Smouse P.E. GenAlEx 6.5: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research — an update // Bioinformatics. 2012. V. 28. P. 2537–2539.
<https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2005.01155.x>
 13. Пикунцова А.В., Мартыросян Е.В., Князев С.Д., Рыжова Н.Н. Применение RAPD-анализа для изучения генетического полиморфизма и филогенетических связей у представителей рода *Ribes* L. // Экол. генетика. 2011. Т. 9. № 2. С. 34–44.
 14. Pikunova A., Goryunova S., Goryunov D. Genetic diversity and pedigree analysis of red currant germplasm // Plants. 2022. V. 11. № 13.
<https://doi.org/10.3390/plants11131623>

Transferability of SSR Markers Developed on Goseberry to Red and Black Currants

A. V. Pikunova^{1,*}, A. A. Pavlenko¹, M. A. Dolzhikova¹, O. D. Golyaeva¹, S. D. Knyazev¹

¹All-Russian Research Institute of Fruit Crop Breeding, VNIISP, Zhilina, Orel district, 302530 Russia

Eleven microsatellite markers previously developed based on gooseberry sequences were tested on red and black currants. As a result, all microsatellite loci were amplified on representatives of black currant, but on representatives of red currant there was no amplification in three loci (RucANS, RucDFR2-1, RucDFR1-3). Polymorphic loci have been identified for both black and red currants. In the MTT-7 locus in the studied black currant genotypes, amplification of 3 fragments has been observed. Probably this locus is duplicated in black currant genome. At the same time, in red currant, amplification typical for monolocus microsatellite has been observed in the MTT-7 locus. The RucHLH-1 and RucUFGT loci were tested on a hybrid red currant family (Belaya Potapenko × 1426-21-80). By genetic mapping, the localization of the RucHLH-1 locus was established on linkage group 4 in the red currant genome, and the localization of RucUFGT was presumably on linkage group 1. The set of microsatellite loci for the currant genus is currently limited. This work shows that some of the SSR markers developed on gooseberries are amplified and reveal polymorphism in currants and can be used to study both black and red currants.

Keywords: currants, gooseberry, microsatellite loci, DNA-markers, SSR, *Ribes* L., genetic polymorphism, linkage mapping.